



HAL
open science

Le contrôle qualité de la synthèse protéique comme cible pour le développement de nouveaux antibiotiques

Kévin Macé

► To cite this version:

Kévin Macé. Le contrôle qualité de la synthèse protéique comme cible pour le développement de nouveaux antibiotiques. Génétique. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1B034 . tel-01691728

HAL Id: tel-01691728

<https://theses.hal.science/tel-01691728>

Submitted on 24 Jan 2018

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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Kévin Macé

Préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6290
Institut de Génétique & Développement de Rennes, équipe RBS
U.F.R Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Le contrôle qualité
de la synthèse protéique
comme cible pour
le développement de
nouveaux antibiotiques**

**Thèse soutenue à Rennes
le 24 novembre 2016**

devant le jury composé de :

Axel Hartke

Professeur à l'Université de Caen Normandie - EA 4655, Caen
/ rapporteur

Emmanuelle Schmitt

Directrice de recherche CNRS UMR7654, Maître de conférences
de l'Ecole polytechnique, Palaiseau
/ rapporteur

Brice Felden

Professeur à Université de Rennes 1 – INSERM U835, Rennes
/ examinateur

Jean-Christophe Giard

Professeur à l'Université de Caen Normandie - U2RM, Caen
/ examinateur

Axel Innis

Chargé de Recherches INSERM U1212 CNRS UMR 5320, Institut
Européen de Chimie et Biologie (IECB) Pessac
/ examinateur

Reynald Gillet

Professeur à l'Université de Rennes 1 – IGDR UMR6290, Rennes
/ Directeur de thèse

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Kévin Macé

Préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6290
Institut de Génétique & Développement de Rennes, équipe RBS
U.F.R Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Le contrôle qualité
de la synthèse protéique
comme cible pour
le développement de
nouveaux antibiotiques**

**Thèse soutenue à Rennes
le 24 novembre 2016**

devant le jury composé de :

Axel Hartke

Professeur à l'Université de Caen Normandie - EA 4655, Caen
/ rapporteur

Emmanuelle Schmitt

Directrice de recherche CNRS UMR7654, Maître de conférences
de l'Ecole polytechnique, Palaiseau
/ rapporteur

Brice Felden

Professeur à Université de Rennes 1 – INSERM U835, Rennes
/ examinateur

Jean-Christophe Giard

Professeur à l'Université de Caen Normandie - U2RM, Caen
/ examinateur

Axel Innis

Chargé de Recherches INSERM U1212 CNRS UMR 5320, Institut
Européen de Chimie et Biologie (IECB) Pessac
/ examinateur

Reynald Gillet

Professeur à l'Université de Rennes 1 – IGDR UMR6290, Rennes
/ Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire de recherche Traduction et Repliement, appartenant à l'Institut Génétique et du développement de Rennes (IGDR), Unité Mixte de Recherche 6290 du CNRS et de l'Université Rennes 1. J'adresse mes remerciements aux personnes qui ont rendu la réalisation de cette thèse possible.

En premier lieu, je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le Pr Reynald Gillet, pour ses grandes qualités humaines, pour avoir su se rendre disponible tout en me laissant une grande autonomie. Il est une source de savoir qui m'a été indispensable dans la réussite de mes projets scientifiques. Il a été pour moi un vrai Mentor, un directeur de thèse exemplaire, et dont les 3 années passées à ses côtés ont été un privilège dont j'ai profité au maximum. Concernant son aide au long de ma thèse, je tiens particulièrement à souligner son indéfectible optimisme et ses relectures scrupuleuses des articles et du manuscrit.

Je remercie ensuite tous mes collègues pour ce super esprit d'équipe qui imprègne le laboratoire. Ce fut un réel plaisir de collaborer avec tous. En particulier le bon accueil qui m'a été offert par Aurélie et Claire. Nicolas que je remercie pour l'encadrement à la paillasse à mes débuts, ainsi que Jean-Paul qui m'a initié à la microscopie électronique avec passion.

Pour leurs esprits de cohésion, je remercie également Christian pour sa bonne humeur et sa générosité, merci à Cyrille et Eléonore pour les bons moments passés ensemble et pour leurs aides tout au long de la thèse notamment pour la logistique quotidienne du laboratoire.

Merci à Manu pour sa richesse intellectuelle et culturelle. Un grand merci pour sa collaboration fructueuse à ce projet.

Merci à Charlotte, Fanny et Sophie pour leurs aides dans ce projet et leurs investissements pour les autres projets en cours de réalisation. En souvenirs à toutes les soirées labo, V&B, au bar...

Je n'oublierai pas de remercier Daniel et Maryvonne pour leur grande générosité.

Je remercie aussi la seconde équipe qui travaille en collaboration avec la nôtre, en particulier Carlos, Annie et Gwennola pour la formation reçue au cours de mes études à l'Université de

Rennes 1, ainsi que Renan, Sylvie, Manon pour l'aide scientifique apportée tout au long de la thèse.

Merci également à l'équipe TIPs, Denis, Laurence, Claire et Franck ainsi qu'à l'équipe SPARTE.

Je remercie aussi mes stagiaires durant ces trois dernières années qui ont tous participé à ce projet (mais aussi pour tous les bons moments en dehors du labo) : Nadia, Martial, Caroline, Louise et Émilie, les stagiaires de médecine Ondine & Marie, Flore-Anne & Marine et de pharmacie Lorraine & Maxime. Également à tous les autres stagiaires passés au labo.

Merci à Florence et Didier, mes parents pour leur soutien infailible. Un énorme merci du cœur pour ma femme Aurélie, sans qui je ne serais jamais parvenu jusque là. Et évidemment une grosse pensée à ma source de bonheur quotidienne : Léandre.

Je tiens aussi à remercier spécialement ceux qui ont minutieusement lu et corrigé les articles présents dans ce manuscrit et cela sans compter leur temps : Reynald, Manu, Juliana, Renan, Daniel... L'émulation scientifique et leurs suggestions toujours avisées ont permis de réaliser des articles scientifiques de haute qualité.

Merci aussi à tous ceux qui liront cette thèse.

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit de thèse se découpe en trois parties. Il a pour fil conducteur la synthèse protéique bactérienne et ses systèmes de contrôle-qualité.

La partie I débute par une courte introduction sur l'origine du code génétique. L'article théorique associé (Macé and Gillet, 2016) émet l'hypothèse argumentée de la naissance de la synthèse protéique à partir de l'ARN transfert-messager. Vient ensuite, une introduction sur la synthèse des protéines de nos jours, avec une attention particulière pour le facteur d'élongation G, objet du second article (Macé *et al.*, soumis). Celui-ci présente des résultats structuraux originaux du facteur d'élongation G complexé au ribosome dans une conformation jamais observée auparavant.

La partie II se focalise sur un mécanisme de sauvetage de la synthèse protéique bactérienne : la *trans*-transduction. Un troisième article de revue (Giudice, Macé *et al.*, 2014), ainsi que des résultats structuraux préliminaires la composent. Cette partie se poursuit par la présentation des autres fonctions de la *trans*-transduction, notamment son rôle dans la virulence. Il se termine par un autre article de revue (Macé *et al.*, 2015) mettant en évidence les applications thérapeutiques de la *trans*-transduction.

La partie III traite de la *trans*-transduction comme cible pour de nouveaux antibiotiques. Après une courte introduction sur les antibiotiques, et plus spécifiquement ceux ciblant la *trans*-transduction, cette partie est complétée par un cinquième article (Macé *et al.*, en préparation). Cet article traite de la mise au point d'un système rapporteur de la *trans*-transduction, permettant de cribler à haut-débit de nouveaux composés inhibiteurs. Cet article est accompagné du brevet d'application de ce système.

Table des matières

Table des matières

_Toc464685020

| | |
|---|----|
| Table des matières | 10 |
| Partie I | 17 |
| La synthèse protéique | 17 |
| I - Origine de la synthèse protéique | 18 |
| I.1 – Introduction – Origine de la synthèse protéique | 18 |
| I.2 - Origine du code génétique | 19 |
| I.3 - Origine de la vie : L'hypothèse du monde ARN | 21 |
| I.3.A - Introduction : Le paradoxe de l'origine de la vie | 21 |
| I.3.B - Découverte des ARN catalytiques | 21 |
| II - Article #1 K. Macé and R. Gillet - 2016 - Nucleic Acids Research | 23 |
| II.1 - Introduction de l'article #1 | 23 |
| II.2 - Article #1 | 25 |
| II.3 - Conclusion de l'article #1 | 37 |
| III - Le ribosome | 39 |
| III.1 - Introduction - Le ribosome | 39 |
| III.2 - Nomenclature du ribosome | 40 |
| III.2.1 - Nomenclature des ARN ribosomiques | 40 |
| III.2.2 - Nomenclature des protéines ribosomiques | 41 |
| III.2.2.A - Historique | 42 |
| III.2.2.B - La nouvelle nomenclature | 43 |
| III.3 - Structure du ribosome | 45 |
| IV - Le cycle traductionnel | 48 |
| IV.1 - Introduction – Le cycle traductionnel | 48 |

| | |
|---|----|
| IV.1.1 - Les acides ribonucléiques de transfert, partenaires clés du ribosome au cours de la synthèse protéique | 48 |
| IV.1.1.A - Structure des ARNt | 49 |
| IV.1.1.B - Synthèse et modification post-transcriptionnel des ARNt | 50 |
| IV.1.2 - Les aminoacyl-ARNt-synthétases (aaRS) | 51 |
| IV.1.2.A - Généralités et structure..... | 51 |
| IV.1.2.B - Le mécanisme d'aminacylation..... | 52 |
| IV.2 - Les étapes du cycle traductionnel..... | 53 |
| IV.2.1 – L'initiation de la traduction..... | 53 |
| IV.2.1.A - Introduction – L'initiation de la traduction..... | 53 |
| IV.2.1.B - Caractéristiques de la région TIR de l'ARNm | 54 |
| IV.2.1.C - Les étapes conduisant à la formation d'un ribosome fonctionnel | 55 |
| IV.2.2 - L'élongation..... | 57 |
| IV.2.2.A - Introduction : L'élongation | 57 |
| IV.2.2.B - Les étapes du cycle d'élongation..... | 57 |
| IV.2.2.B.1 - Liaison du complexe ternaire..... | 57 |
| IV.2.2.B.2 - Le décodage | 57 |
| IV.2.2.C - Le transfert peptidique..... | 62 |
| IV.2.2.D - La translocation | 63 |
| IV.2.2.D.1 – Introduction : La translocation..... | 63 |
| IV.2.2.D.2 - Les états intermédiaires durant la translocation | 63 |
| IV.2.2.D.3 - « Ratcheting » des sous-unités pendant la translocation | 63 |
| IV.2.2.D.4 - Mouvement de l'ARNm et des ARNt dans la sous-unité 30S | 64 |
| IV.2.2.D.5 - Facteur d'Elongation G | 65 |
| IV.2.2.D.6 - L'État de Post-translocation..... | 65 |
| IV.2.3 - La terminaison | 66 |

| | |
|--|-----|
| IV.2.3.1 - Structure des facteurs de terminaison et interaction avec le ribosome..... | 66 |
| IV.2.3.2 - Reconnaissance du codon de terminaison | 67 |
| IV.2.3.3 - Hydrolyse et libération de la protéine..... | 68 |
| IV.2.3.4 - Départ des facteurs de terminaison..... | 69 |
| IV.2.4 - Le recyclage..... | 69 |
| V - Gros plan sur EF-G : au cœur du mécanisme de translocation | 70 |
| V.1 - Introduction – Au cœur du mécanisme de translocation | 70 |
| V.2 - Le « swiveling » de la tête du 30S | 70 |
| V.3 - Casser l'état PRE | 71 |
| V.4 - Le passage de l'ARNt du site P à E | 72 |
| V.5 - Contrôle du mouvement de l'ARNm..... | 73 |
| V.6 - Rôle et déclenchement du centre GTPasique | 74 |
| VI - Article #2 K. Macé, E. Giudice, S. Chat and R. Gillet..... | 75 |
| VI.1 - Introduction de l'Article #2 | 75 |
| VI.2 - Article #2..... | 77 |
| VI.3 - Conclusion de l'Article #2..... | 103 |
| Partie II..... | 107 |
| La <i>trans</i> -traduction | 107 |
| I - Introduction Partie II – La <i>trans</i> -traduction..... | 108 |
| II - Article #3 E. Giudice, K. Macé and R. Gillet. - 2014 - Frontiers in Microbiology.... | 109 |
| II.1 - Introduction de l'Article #3..... | 109 |
| II.2 - Article #3 | 111 |
| III - Résultats préliminaires de l'étude structurale de la <i>trans</i> -traduction | 123 |
| III.1 - Introduction – Résultats préliminaires de l'étude structurale de la <i>trans</i> -traduction | 123 |
| III.2 - Complexe ribosomique en cours de <i>trans</i> -traduction en présence de RNase R... | 124 |
| III.2.1 - Introduction : étude de la <i>trans</i> -traduction en présence de la RNase R | 124 |

| | |
|--|-----|
| III.2.2 - Résultats préliminaires de l'étude de la trans-traduction en présence de la RNase R..... | 126 |
| III.2.3 - Discussion et conclusion des résultats préliminaires | 130 |
| IV - Les autres rôles de la <i>trans</i> -traduction | 131 |
| IV.1 - Introduction – Les autres rôles de la <i>trans</i> -traduction..... | 131 |
| IV.1.1 - Les autres rôles de la trans-traduction | 131 |
| IV.1.2 - Régulation de la pathogénicité..... | 131 |
| IV.1.2.1 - Le stress..... | 131 |
| IV.1.2.1 - La pathogénicité..... | 132 |
| IV.2 - Conclusion – Les autres rôles de la <i>trans</i> -traduction | 134 |
| V - Article #4 K. Macé, E. Giudice and R. Gillet. - 2015 - Med Sci..... | 135 |
| V.1 - Introduction de l'Article #4 | 135 |
| V.2 - Article #4 | 137 |
| VI - Conclusion – La <i>trans</i> -traduction | 147 |
| Partie III..... | 149 |
| Recherche d'antibiotiques ciblant la <i>trans</i> -traduction | 149 |
| I - Généralités sur les antibiotiques | 150 |
| I.1 - Bref historique sur les antibiotiques..... | 150 |
| I.3 - Les antibiotiques ciblant le ribosome..... | 153 |
| II - État de l'art des antibiotiques ciblant la <i>trans</i> -traduction..... | 155 |
| II.1 - Introduction – État de l'art des antibiotiques ciblant la <i>trans</i> -traduction | 155 |
| II.2 - La pyrazinamide..... | 156 |
| II.2.1 - Introduction : la pyrazinamide | 156 |
| II.2.2 - Effet de l'acide pyrazinoïque sur la trans-traduction | 158 |
| II.3 - Le KKL-35..... | 160 |
| III - Le développement d'un outil pour la recherche d'antibiotiques ciblant la <i>trans</i> -traduction..... | 162 |

| | |
|--|-----|
| III.1 - Introduction – Le développement d’un outil pour la recherche d’antibiotiques ciblant la <i>trans</i> -traduction | 162 |
| III.2 - Détail et construction du système rapporteur | 165 |
| III.3 - Conclusion - Le développement d’un outil pour la recherche d’antibiotiques ciblant la <i>trans</i> -traduction | 168 |
| V - Article #5 K. Macé <i>et al.</i> | 169 |
| V.1 - Introduction de l’Article #5 | 169 |
| V.2 - Article #5 | 171 |
| V.3 - Conclusion de l’Article #5 | 199 |
| VI - Conclusion du manuscrit..... | 203 |
| Bibliographie | 205 |
| Liste des articles | 223 |
| Liste des figures & tableaux..... | 225 |
| Liste des abréviations | 229 |
| Annexes | 233 |
| Annexes de la Partie I..... | 234 |
| Annexes de la Partie II..... | 241 |
| Annexes de la Partie III | 263 |

Partie I

La synthèse protéique

I - Origine de la synthèse protéique

I.1 - Introduction - Origine de la synthèse protéique

Le code génétique est universel à tout le règne vivant. Son décryptage nécessite deux étapes bien distinctes représentant le « dogme central » de la biologie moléculaire : la transcription et la traduction. La transcription correspond au passage de l'information génétique contenue dans l'acide desoxyribonucléique (ADN) sous la forme d'acide ribonucléique (ARN). La traduction correspond au passage de l'ARN sous la forme de chaîne protéique, grâce à une machinerie cellulaire complexe, le ribosome. Le code génétique est un véritable langage écrit avec des mots de 3 lettres ordonnées (triplet ou codon) à parti d'un alphabet de quatre lettres (nucléotides) adénine, thymine, cytosine et guanine (A, T, G et C). Lors de la transcription de l'ADN en ARN, un code à quatre lettres est conservé (A, U, G et C). Par contre lors de la traduction, le passage à un alphabet à vingt lettres (les acides aminés composant les protéines) est nécessaire. La traduction est donc plus complexe, nécessitant le passage d'un « langage » à un autre *via* l'utilisation d'une clé : l'ARN de transfert (ARNt).

Il existe 64 codons (4 nucléotides possibles à 3 positions différentes soit $4^3 = 64$) pour 20 acides aminés (tableau 1). Le code génétique est dit dégénéré, c'est-à-dire qu'il y a une redondance d'attribution des codons : il peut exister plusieurs codons pour un même acide aminé. Il existe donc des ARNt différents apportant le même acide aminé à des codons différents, on parle alors d'ARNt isoaccepteurs. Quant aux codons correspondant à un même acide aminé ils sont dits synonymes. Chaque séquence codante commence par un codon initiateur (le plus souvent AUG codant pour une formyl-méthionine chez les bactéries) et définit ce que l'on appelle le cadre ouvert de lecture (« open reading frame » ORF) ou séquence codante. La séquence codante se termine par la reconnaissance d'un des trois triplets de terminaison ou stop (UGA = opale ; UAG = ambre ; UAA = ocre).

Box N°1 - Ne pas confondre "code génétique" avec "information génétique". L'information génétique est une notion vague et théorique qui signifie les données enregistrées dans les acides nucléiques et les protéines par la cellule.

Tableau 1. Le code génétique. Le code génétique est un tableau (dictionnaire de traduction) des correspondances entre les 64 triplets de bases azotées de l'ARNm (codons) et les 20 acides aminés.

| | U | C | A | G | |
|---|--------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|---|
| G | Valine Val - V | Alanine Ala - A | Aspartic acid Asp - D | Glycine Gly - G | U |
| | | | Glutamic acid Glu - E | | C |
| C | Leucine Leu - L | Proline Pro - P | Histidine His - H | Arginine Arg - R | A |
| | | | Glutamine Gln - Q | | G |
| A | Isoleucine Ile - I | Threonine Thr - T | Asparagine Asn - N | Serine Ser - S | U |
| | | | Lysine Lys - K | | C |
| U | Methionine Met - M | Serine Ser - S | Arginine Arg - R | Cysteine Cys - C | A |
| | Phenylalanine Phe - F | | Tyrosine Tyr - Y | | G |
| | Leucine Leu - L | | STOP codon | | U |
| | | | STOP codon | Tryptophan Trp - W | C |
| | | | | | A |
| | | | | | G |

I.2 - Origine du code génétique

Il existe une infinité de combinaisons possibles permettant d'associer les 64 codons à 21 éléments d'information (20 acides aminés et un signal de terminaison). Malgré cela, le code génétique est quasiment similaire pour toutes les formes de vies connues, se limitant à de rares variations mineures. Diverses hypothèses, souvent opposées, ont été émises pour expliquer l'origine de cette attribution et l'homogénéité observée.

Tout d'abord, l'hypothèse stéréochimique propose que l'origine du code génétique soit basée sur des affinités chimiques réciproques entre le codon et l'acide aminé. En particulier, des expériences avec des aptamères ont mis en évidence que certains acides aminés présentent une affinité chimique spécifique pour les codons qui les encodent (Knight and Landweber, 1998). D'autres expériences ont mis en évidence le fait qu'un certain nombre d'acides aminés (6 sur 8 testés) peuvent s'associer avec leurs codons (Yarus *et al.*, 2009). La base du premier code génétique serait donc une conséquence logique de la relation chimique entre codons et acides aminés.

Ce premier code génétique très simple aurait incorporé progressivement de nouveaux acides aminés, en lien avec l'évolution du métabolisme cellulaire (Amirnovin, 1997; Ronneberg *et al.*, 2000). Cette incorporation de nouveaux acides aminés dans le code génétique s'est faite conjointement avec une optimisation du système de reconnaissance, *via* trois principes

antagonistes (Tlusty, 2010): (i) le besoin d'un éventail d'acides aminés suffisamment diversifié ; (ii) la nécessité de limiter l'impact des erreurs ; (iii) l'avantage de réduire le coût du processus en termes d'utilisation des ressources de la cellule.

Effectivement, les acides aminés codés par des codons proches les uns des autres ont des propriétés chimiques similaires. De plus, les acides aminés qui partagent une voie métabolique de biosynthèse commune tendent également à avoir la même première base nucléique dans leurs codons (Taylor and Coates, 1989). Ceux dont la chaîne latérale présente des propriétés physicochimiques proches tendent à avoir également des codons semblables (Wong, 1980). Cette organisation du code génétique a pour effet de limiter les conséquences des mutations ponctuelles, car les acides aminés modifiés sont remplacés par des acides aminés pouvant jouer un rôle similaire pour la structure de la protéine et ainsi que sa fonction soit conservée (Freeland and Hurst, 1998; Freeland *et al.*, 2000).

Intervient la théorie la plus communément connue, celle du "frozen accident" proposée par Francis Crick (Crick, 1968). Elle considère que le code génétique est général et universel car une réattribution du code génétique n'est possible que dans les étapes primitives de la vie. Tout changement du code génétique des organismes modernes entraînerait une modification de tout le protéome, ce qui serait évidemment délétère pour la cellule.

La sélection naturelle a conduit à retenir un code génétique optimum qui, couplé à une machinerie de synthèse protéique complexe, permet de traduire une quantité d'information époustouflante de manière rapide et fidèle. L'origine et l'évolution du code génétique jusqu'au « frozen accident » ne représente qu'une courte étape dans l'évolution de la vie : environ 200 millions d'années, à comparer aux 3.6 milliards d'années environ de l'évolution cellulaire qui a suivi. Cependant l'origine du code génétique soulève un problème conceptuel puisque l'ADN, support de l'information génétique pour la synthèse des protéines, est répliqué par des polymérase qui sont des protéines. Il en résulte un paradoxe : qui des protéines ou de l'ADN est apparu en premier au cours de l'émergence de la vie ?

I.3 - Origine de la vie : L'hypothèse du monde ARN

I.3.A - Introduction - Le paradoxe de l'origine de la vie

Dans les années 1960, Carl Woese, Francis Crick et Leslie Orgel constatent l'omniprésence et les diverses fonctionnalités de l'ARN dans le monde d'aujourd'hui, et suggèrent qu'il pourrait avoir été le principal acteur au début de la vie sur Terre. Cette hypothèse, appelée « Monde ARN » (RNA world), permet de résoudre le paradoxe de l'œuf et de la poule concernant l'ADN, support de l'information génétique et les protéines, responsables de l'activité enzymatique cellulaire. Pour fabriquer une protéine il faut un ADN, mais pour fabriquer un ADN, il faut... une protéine. L'hypothèse du monde ARN est que l'ARN soit à la fois support de l'information et des activités catalytiques.

Box N°2 - Har Gobind Khorana, Robert W. Holley et Marshall Nirenberg ont obtenu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1968 pour « leur interprétation du code génétique et de sa fonction dans la synthèse des protéines ».

I.3.B - Découverte des ARN catalytiques

C'est dans les années 1980 que les premiers ARN ayant une activité catalytique sont découverts. Ensuite appelés ribozymes, ces ARN peuvent avoir un rôle de catalyseur, comme les protéines, permettant de rendre l'hypothèse du monde ARN crédible. Le premier de ces ARN, découvert en 1981, est un ARN auto-catalytique, étant capable d'auto épissage (Cech and Bass, 1986). Fait intéressant, ces ARN, appelés « self splicing group I RNAs » se retrouvent fréquemment dans les ARN de transfert et ribosomiques. Le second de ces ARN est la RNase P (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Il est le premier cas avéré d'une molécule d'ARN qui catalyse une réaction sans subir elle-même un changement net. De plus, la RNase P intervient dans la maturation des ARN de transfert et ribosomiques.

Box n°3 – “The protein is thought to aid in the reaction, but is not required for catalysis. All enzymes are not proteins”. Cette découverte inattendue a valu à Cech et Altman le prix Nobel de chimie en 1989.

Depuis, de nombreuses équipes ont mis au point des méthodes visant à diriger l'évolution d'ARN, afin de sélectionner ceux présentant une activité catalytique optimale. De nombreux ribozymes capables de réaliser une multitude de réactions biochimiques, comme lier des nucléotides entre eux, lier des acides aminés à des ARN, effectuer des réactions d'oxydo-réductions etc, ont ainsi été développés (Beaudry and Joyce, 1992; Ellington and Szostak,

1990; Tuerk and Gold, 1990). Il est donc possible que l'ARN seul suffise à établir un métabolisme primitif.

Un dernier ARN catalytique découvert récemment, et non des moindres, est le ribosome. Confirmé dans les années 2000, la fonction catalytique du ribosome lors de la synthèse protéique est en effet assurée par son ARN, ce qui fait du ribosome un ribozyme. Le cœur catalytique du ribosome, composé de deux hélices d'ARN, appelé centre de transfert peptidique, semble être le fossile moléculaire du premier catalyseur de la synthèse protéique.

II - Article #1 | K. Macé and R. Gillet - 2016 - Nucleic Acids Research

II.1 - Introduction de l'article #1

Origins of tmRNA: the missing link in the birth of protein synthesis?

**K. Macé and R. Gillet
(17):8041-51.**

Nucleic Acids Res. 2016 Sep 30;44

Si l'évolution du monde ARN jusqu'à aujourd'hui semble bien connue, il reste une zone d'ombre autour de la naissance d'une étape essentielle au commencement de la vie : la synthèse protéique. En considérant que le monde ARN prend fin lorsque des proto-cellules deviennent capables de synthétiser des petits peptides à partir d'un code génétique élémentaire, ce passage fort symbolique vers un monde ribonucléoprotéique (RNP World) reste mystérieux.

Nous avons décidé d'effectuer un travail de recherche théorique – et non une revue de synthèse – afin de développer l'hypothèse d'une synthèse protéique ayant pour origine un fossile moléculaire ARN, aujourd'hui présent uniquement chez les bactéries : l'ARN transfert-messenger (ARN_{tm}). Il s'agit d'une molécule hybride ayant les caractéristiques à la fois d'un ARN de transfert et celle d'un ARN messager. L'ARN_{tm} joue le rôle de sauvetage de la synthèse protéique lorsque celle-ci se bloque. L'article propose un modèle argumenté de l'origine de la synthèse protéique, basé entre autres sur l'analyse de séquences de l'ARN_{tm}. Cette hypothèse a également permis de faire le point sur la répartition de l'ARN_{tm} dans les différents domaines du vivant tout en expliquant l'absence de l'ARN_{tm} chez les archées ou les cellules eucaryotes.

II.2 - Article #1

Origins of tmRNA: the missing link in the birth of protein synthesis?

Kevin Macé¹ and Reynald Gillet^{1,2,*}

Author Affiliations

¹Université de Rennes 1, CNRS UMR 6290 IGDR, Translation and Folding Team, 35042 Rennes cedex, France

²Institut Universitaire de France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 2 23 23 45 07; Email: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

Received June 9, 2016.
Revision received July 22, 2016.
Accepted July 26, 2016.

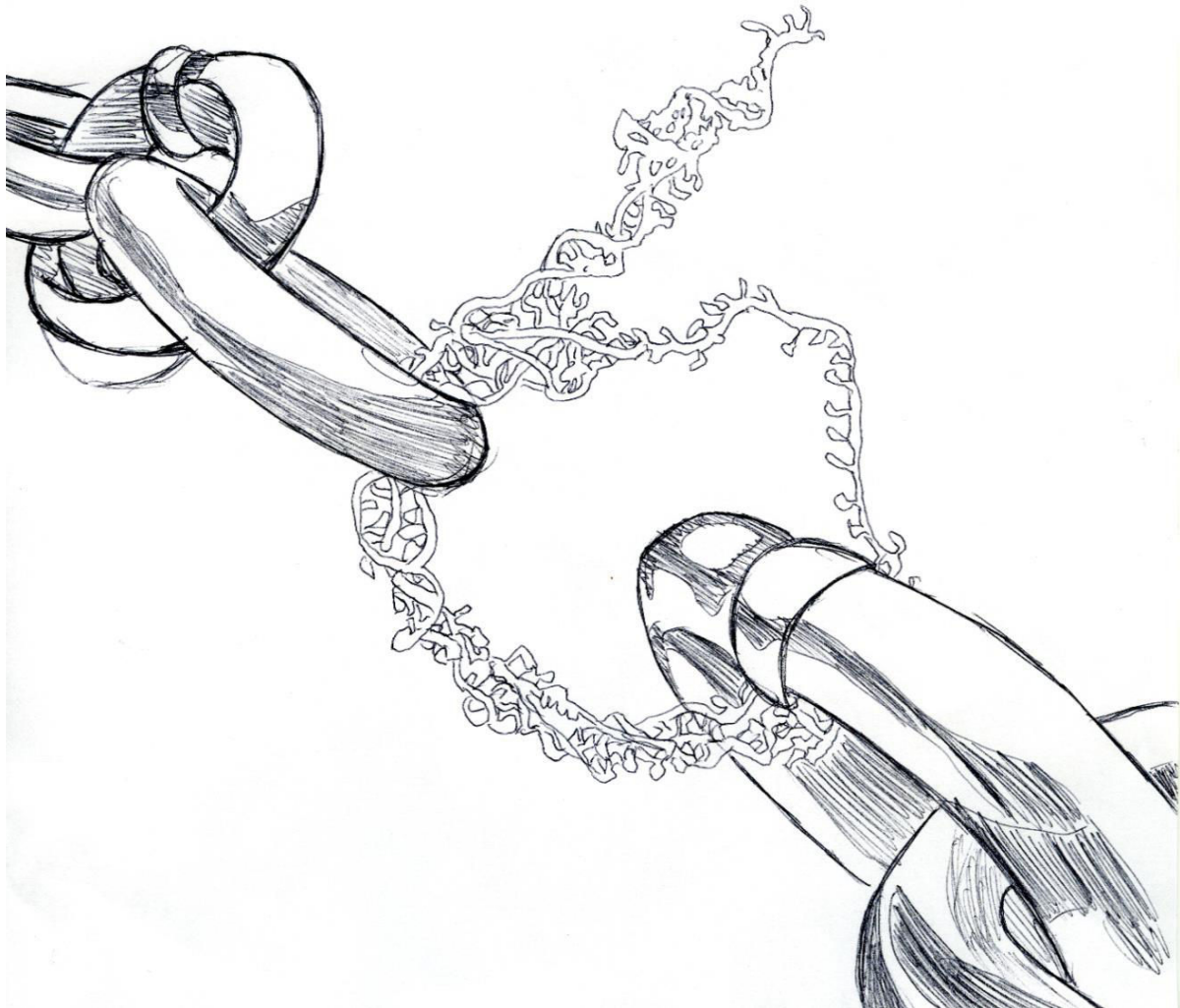


Illustration réalisée par Emilie Saucisse, 2016

Published online 2 August 2016

Nucleic Acids Research, 2016, Vol. 44, No. 17 8041–8051
doi: 10.1093/nar/gkw693

SURVEY AND SUMMARY

Origins of tmRNA: the missing link in the birth of protein synthesis?

Kevin Macé¹ and Reynald Gillet^{1,2,*}¹Université de Rennes 1, CNRS UMR 6290 IGDR, Translation and Folding Team, 35042 Rennes cedex, France and²Institut Universitaire de France

Received June 09, 2016; Revised July 22, 2016; Accepted July 26, 2016

ABSTRACT

The RNA world hypothesis refers to the early period on earth in which RNA was central in assuring both genetic continuity and catalysis. The end of this era coincided with the development of the genetic code and protein synthesis, symbolized by the apparition of the first non-random messenger RNA (mRNA). Modern transfer-messenger RNA (tmRNA) is a unique hybrid molecule which has the properties of both mRNA and transfer RNA (tRNA). It acts as a key molecule during *trans*-translation, a major quality control pathway of modern bacterial protein synthesis. tmRNA shares many common characteristics with ancestral RNA. Here, we present a model in which proto-tmRNAs were the first molecules on earth to support non-random protein synthesis, explaining the emergence of early genetic code. In this way, proto-tmRNA could be the missing link between the first mRNA and tRNA molecules and modern ribosome-mediated protein synthesis.

INTRODUCTION

The RNA world hypothesis was first proposed over forty years ago as a major and early step in the evolution of life, at a time when there was no protein synthesis mechanism as it exists now (1–3). The theory is based on the capacity of RNA to simultaneously catalyze enzymatic reactions and store genetic information, as now done by proteins and DNA, respectively. RNA's intrinsic weaknesses support such a slow shift to modern molecular biology, in which genetic information passes from DNA to RNA and possibly to proteins. Indeed, despite the versatility of RNA, DNA has a higher molecular stability for carrying genetic information, and proteins have higher catalytic abilities. At some point during the RNA world, an evolutionary leap took

place between the first system able to replicate molecules responsible for biochemical reactions (i.e. self-replicating RNA), and the cell that replicates a whole genome encoding for these biochemical activities. This evolutionary leap was embodied by the emergence of non-random coding RNA, which served as the first medium for genetic information. From there, RNA and peptides had to co-evolve through a ribonucleoprotein (RNP) world (Figure 1). This step would have been fundamental for the development of the code of life. At that time (Figure 1, red star), the world must have consisted of: a network of small RNAs sufficiently evolved as to have different catalytic and self-replicating properties; some primitive amino acids such as alanine, glycine, and aspartic acid; and the minimal prerequisites for translation, such as the first proto-ribosomes. Coding RNA may then have evolved to become non-random and specifically recognized as messenger RNA rather than another RNA type. The evolution of the translation mechanism will have been the result of 'molecular Darwinism', or in other words a random phenomenon leading progressively to a selective advantage.

Many molecular fossils of the RNA world are still present and even active in modern organisms. Candidates must be either catalytic, ubiquitous, and/or central to some aspect of metabolism (4). Transfer-messenger RNA (tmRNA) is a hybrid molecule present in all bacteria. It exhibits properties of both transfer and messenger RNA, and permits the rescue of ribosomes arrested during translation. So not only does tmRNA play a key cellular role in modern bacteria, but in a single molecule it also has two major and ancient functions that were necessary for the transition from an RNA world to the modern protein synthesis pathways.

ORIGINS OF THE GENETIC CODE

The genetic code is the set of rules by which the information encoded within DNA and messenger RNA (mRNA) is translated into proteins. The information is contained in

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 2 23 23 45 07; Email: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

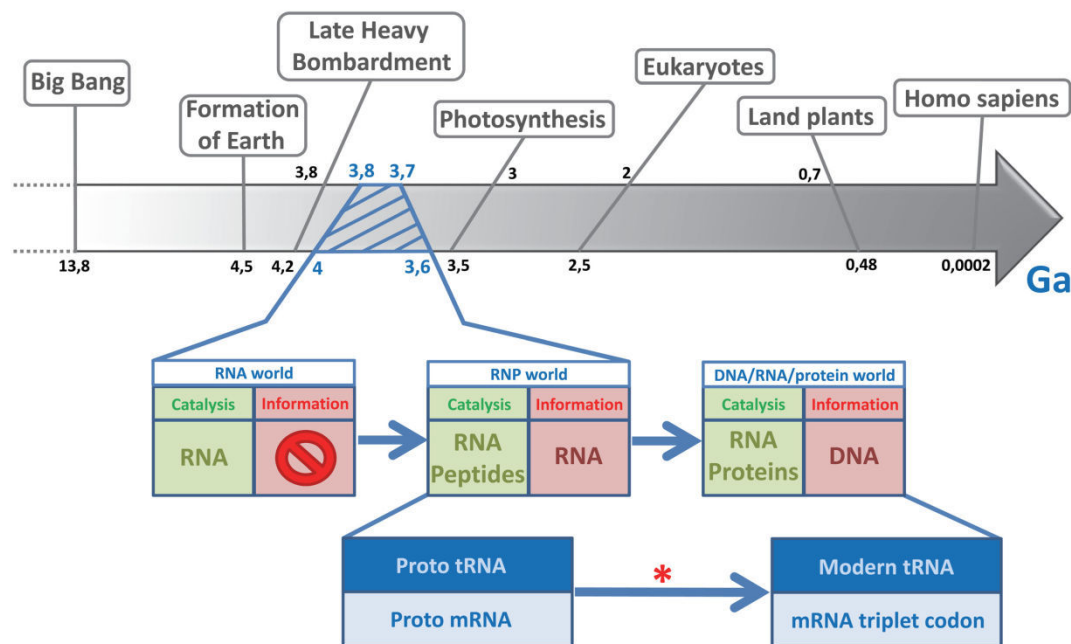
8042 *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, No. 17

Figure 1. Timeline of early events, emphasizing the transition from an RNA world to modern life. During the history of life on earth, the RNA world lasted from the first appearance of short catalytic RNAs right up to the transition to a modern period in which genetic information carried by DNA and RNA became translated into proteins. The RNP (ribonucleoprotein) world was the intermediate period in which RNA and the first random peptides coexisted as informational and catalytic molecules. The red star indicates when the genetic medium stopped being random. Ga, giga-annum, or 10^9 (1 000 000 000) years.

the mRNA sequence, combined into codons or nucleotide triplets. Each codon corresponds to either a specific amino acid or to a stop signal which terminates protein synthesis. With four different nucleotides and a code made of nucleotide triplets, there are $3^4 = 64$ possibilities to code 20 amino acids and three stop codons. Consequently, modern genetic code is degenerated, or in other words, most amino acids are encoded by more than one codon. Although we may not know what led to the current distribution of codons and their corresponding amino acids, these distributions are not random. For example, amino acids that share the same biosynthetic pathway or similar polarities and/or side-chain sizes tend to be close to each other on the genetic code table (Figure 2) (5).

Many theories have been put forward about the origins of the genetic code. Francis Crick first described merely a 'frozen accident' (1). This would mean that the system of twenty amino acids and their designated codons was good enough to work, but too resistant to change to improve. Other possibilities are: that the current shape of the code depends greatly on specific primordial biochemical interactions (such as those between RNA and amino acids) (6); that modern genetic code grew from an earlier and simpler code through a 'biosynthetic expansion' process (7); or that it resulted from information channels (8). Though the different forces that led to the evolution of the genetic code are unknown, there is a generally accepted model describing its appearance. In this, an RNA charged with an amino acid (proto-tRNA) targeted a proto-mRNA by complementary interactions. The evolution of interactions between the proto-tRNA and the proto-mRNA then gave birth to

the first mRNAs coding for non-random short peptides (9). This reaction was probably promoted by a proto-ribosome. Today, based on the biosynthetic pathway of each amino acid and on the coevolution of transfer RNA (tRNA) and aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS), we can reliably predict the order in which the codons appeared. The first generation of codons were of the GNS type ($G = G$; $N = A, U, C, \text{ or } G$; and $S = C \text{ or } G$), while the second generation were SNS (10). This early genetic code continued to evolve, maximizing its efficiency, until it became as it is today (Figure 2).

MODERN RIBOSOMES AND PROTO-RIBOSOMES

Nowadays, the information carried by DNA is first transcribed into mRNA, which in turn can be translated into proteins by the ribosome. Ribosomes are made of two subunits, themselves made up of ribosomal RNA (rRNA) and proteins. The ribosomes translate mRNA codons into one of the twenty amino acids that make up proteins. In a broad outline of the process (see (11) for a complete review), the small subunit permits the decoding of genetic information carried by mRNA, while the large subunit catalyzes the link between amino acids (peptide bonds). The first atomic resolution structures of the ribosome allowed for a precise description of its catalytic heart, the Peptidyl Transfer Center (PTC). Strikingly, the ribosome is a ribozyme, since only RNA performs its key role of peptide bond formation (12,13). The PTC's highly conserved structure is symmetrical, made up of a 'stem-elbow-stem' RNA of approximately 180 nucleotides. Its structure probably originated from the dimerization of two stem-elbow-stem mo-

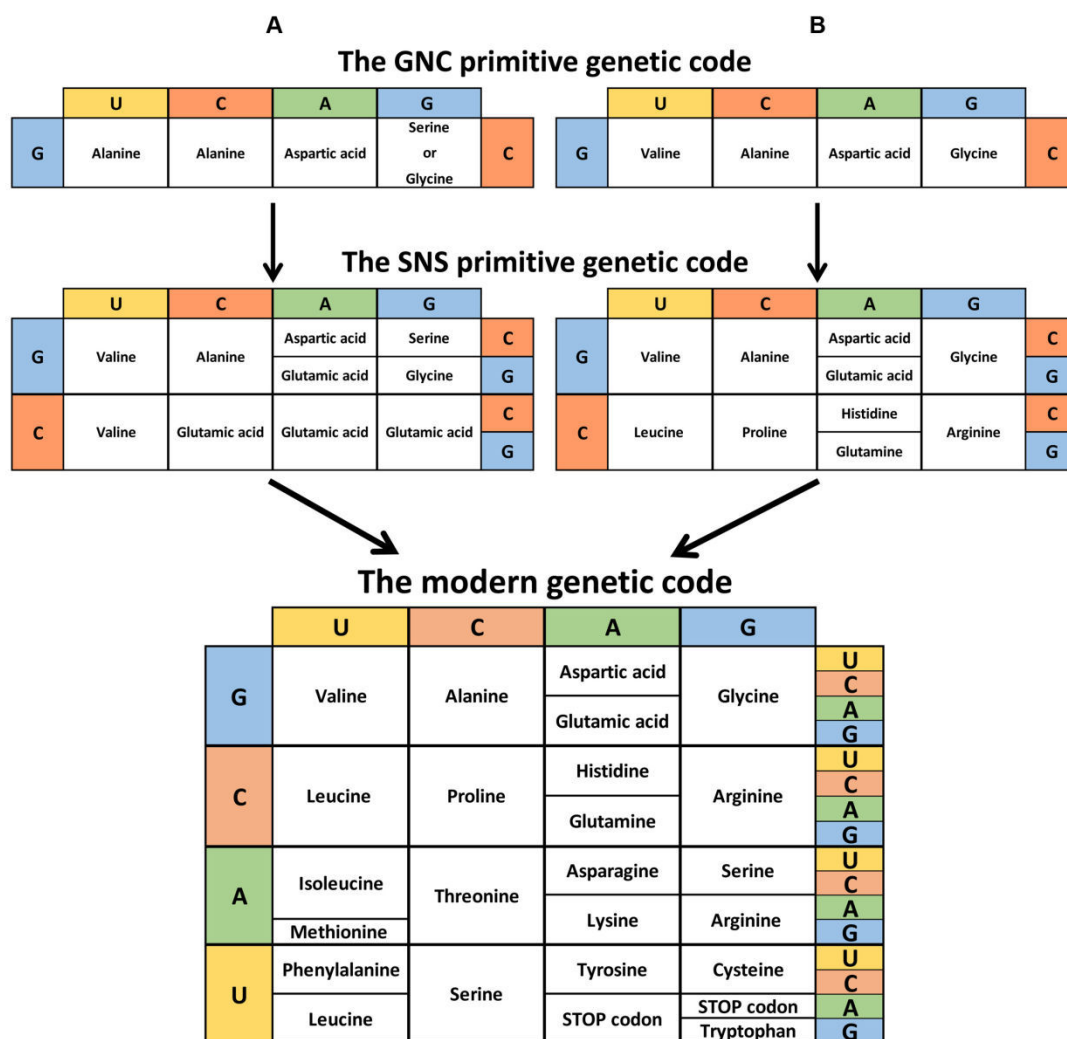


Figure 2. Theory of the genetic code evolution. This shows the evolutionary pathway going from the GNC code (4 codons) to the SNS code (16 codons) to the universal genetic code (64 codons). (A) Adapted from Massimo Di Giulio (72). (B) Adapted from Kenji Ikehara (10). (C) Instead of the conventional representation, the modern genetic code is shown reflecting the order of codon occurrence (columns G and U inverted).

tifs forming a pocket. This form evolved because it offers the best substrate orientation for peptide bond catalysis. The PTC is currently considered to be the first proto-ribosome dating from the RNA world (14–16).

ORIGINS OF TRANSFER RNA: BRIDGING TWO GENETIC CODES

Transfer RNA (tRNA) molecules have a major role to link the genetic information carried by mRNA codons and the corresponding amino acids necessary for protein synthesis. Because of their central role, tRNA have two distinct characteristics corresponding to two different genetic codes (17). First, a tRNA carries the anticodon, a specific nucleotide triplet which corresponds to the mRNA codon. Secondly, each tRNA also binds with high specificity to the amino acid corresponding to its anticodon, in a reaction catalyzed by a specific aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS). In this sense, tRNA is a key molecule for combining ribonucleotide

information (ancient RNA world) and peptide information (modern protein world). The specific attachment of a particular amino acid to its corresponding tRNA is referred to as the ‘second genetic code’. In fact, this second code must have appeared first (17) then evolved together with the aminoacyl-tRNA synthetases, a family of enzymes believed to be among the oldest proteins on earth (18). Today, aaRS discriminates between different tRNAs by recognizing elements in both the anticodon loop and acceptor stem of the RNA (19). The tRNA molecule is present in all organisms and its secondary structure is among the most evolutionarily conserved. Consequently, it is commonly accepted that at least from the Last Universal Common Ancestor (LUCA), its origin is monophyletic.

Several models propose explanations for the molecular mechanisms leading to the formation of modern tRNA (Figure 3). Ancestral tRNA could have been encoded by split genes, which later were merged to encode modern tRNA (Figure 3A) (20). Modern tRNAs could instead be

8044 Nucleic Acids Research, 2016, Vol. 44, No. 17

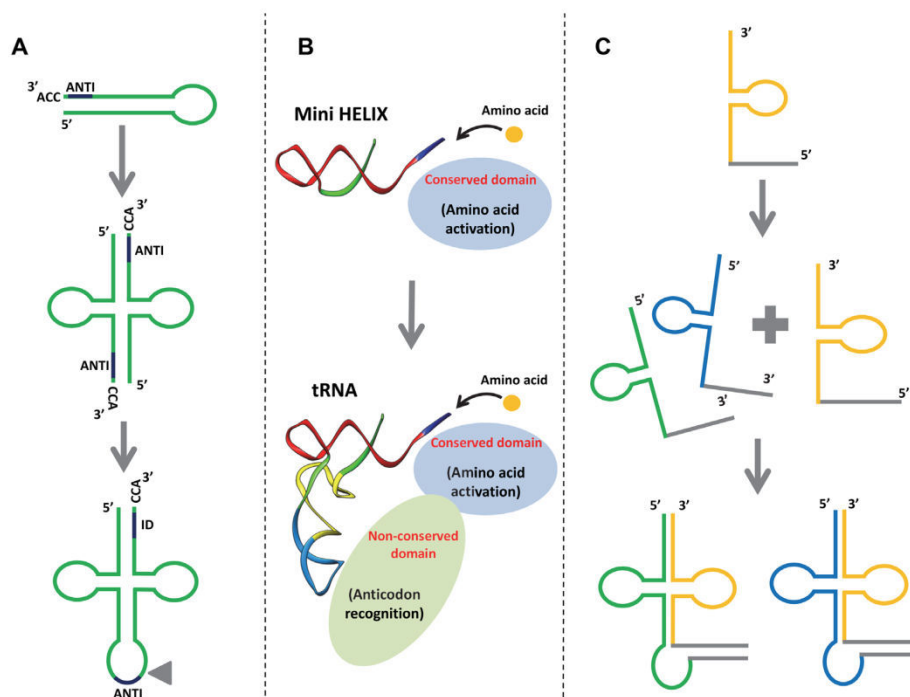


Figure 3. Different models explaining the origins of tRNA. (A) tRNA may originate from the dimerization of two hairpin structures. ANTI, anticodon; ID, the discrimination region for identifying tRNA. The triangle represents the position where the intron is found in tRNA genes (73). (B) tRNA may originate from the late fusion between two RNA minihelices. A new aminoacyl tRNA synthetase (aaRS) domain links the operational RNA code to the trinucleotides of the genetic code (21). (C) tRNA may originate from the fusion of split genes of non-contiguous tRNAs (22).

the result of a fusion between two ancient RNA minihelices (Figure 3B) (21). A third model is based on the sequence analysis of archaeal tRNA genes, focusing on the presence of introns for clues (Figure 3C) (22). Indeed, during archaeal evolution the nucleotide sequences of the 3'-end (CCA sequence) were more conserved than those of the 5'-halves. Since the 3'-end is required for adding the amino acid residue to tRNA, it would seem that the 3'-arm evolved first. A variety of tRNA species would have been generated at a later stage through asymmetric combination with different 5'-tRNA halves. Accordingly, most tRNA sequences have vestiges of double hairpin folding, suggesting that the structure of tRNA molecules could have been the result of double hairpin formation in the ancient prebiotic world (23).

Whatever the scenario, tRNA evolution is closely linked to aminoacylation. Although it is not precisely known how it operated in the RNA world, aminoacylation can be achieved through spontaneous chemical reactions. Indeed, it is possible to aminoacylate an RNA minihelix with an aminoacyl phosphate oligonucleotide (24), which would explain the importance of amino acid chirality in this mechanism. In another study it was shown that a simple pocket formed by a complex of four nucleotides (the C4N RNA hairpin) can be aminoacylated with specificity at its 3'-end by a simple Val-Asp dipeptide (25). The emergence of aaRS-like ribozymes certainly increased reaction specificity. Such ribozymes, referred to as flexizymes, have not yet identified *in vivo*, but they were isolated by means of *in vitro* selection (26). In the early stages of the translational system's development, the discrimination was made close

to the CCA 3'-end (27). During evolution, it moved away from the acceptor stem loop until it arrived to the current situation, with aaRS recognition performed in both the anticodon and acceptor stem loops (28).

FUNCTION AND STRUCTURE OF TRANSFER-MESSENGER RNA

In all bacteria, *trans*-translation is the primary rescue system that permits the release of stalled ribosomes as well as the elimination of the related incomplete proteins and mRNA. A particular RNA performs this process: tmRNA associated with Small protein B (SmpB). tmRNA is a hybrid molecule carrying out both transfer and messenger RNA activities, and its total length varies between about 260 and 430 nucleotides, depending on the cell species (Figure 4). It is always aminoacylated by alanine. As for SmpB, its topology makes it similar to several other modern RNA-binding proteins associated with translation, such as ribosomal protein s17, aspartyl tRNA synthetase, or the prokaryotic translation initiation factor IF1 (29). This structural link not only suggests that they may share a common ancestor or be linked by an evolutionary relationship, but also that they emerged late, when modern translation was already set up. Thanks to SmpB, the tRNA-like domain (TLD) of tmRNA recognizes and enters the vacant decoding site of ribosomes stalled at the 3'-end of truncated mRNAs, thus restarting translation. In a sophisticated ballet, protein synthesis then switches on the mRNA part of tmRNA. This allows the truncated protein to be extended by a short sequence of amino acids that tags it for destruction by

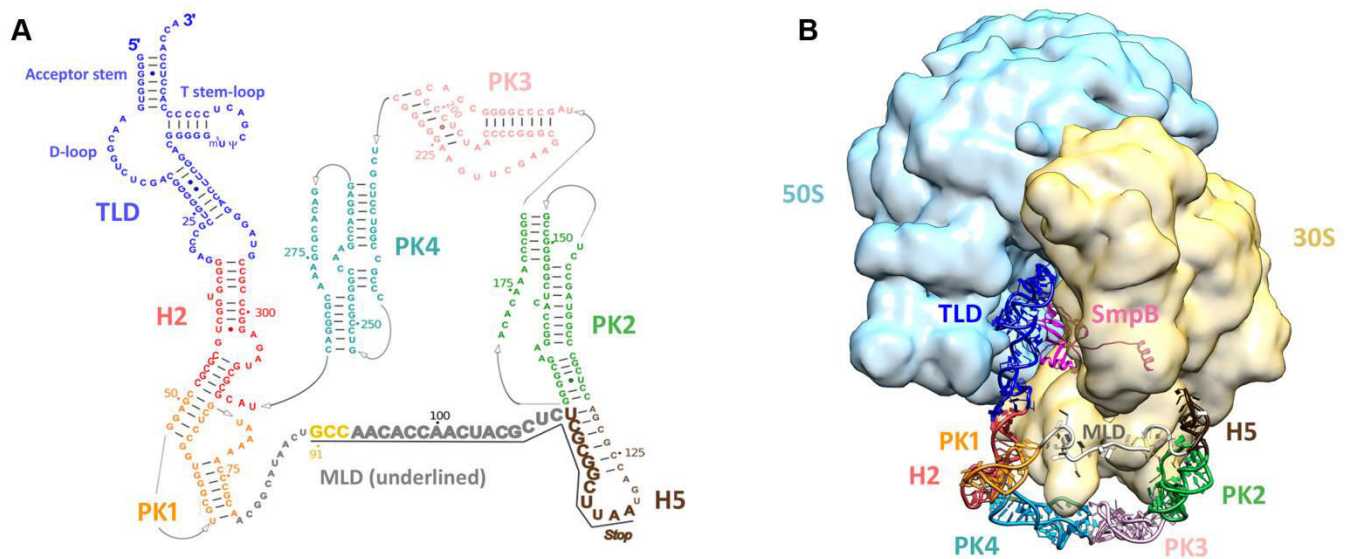


Figure 4. tmRNA secondary and tertiary structures. (A) Secondary structure diagram of *Thermus thermophilus* tmRNA. Watson–Crick base pairs are connected by lines and GU pairs are represented by dots. Domains are in color: the tRNA-like domain (TLD) is blue; helix 2 (H2) is red; pseudoknot 1 (PK1) is orange; helix 5 (H5) is brown; pseudoknot 2 (PK2) is green; pseudoknot 3 (PK3) is pink; and pseudoknot 4 (PK4) is light blue. The nucleotides within the internal open reading frame (ORF) are underlined and shown in a larger font. The resume codon is yellow and the STOP codon is indicated. (B) Cryo-EM map of the alanyl-tmRNA-SmpB complex bound to a stalled ribosome. 3D molecular model of tmRNA based on the homology modeling of each independent domain followed by flexible fitting into the cryo-EM density map of the accommodated step (74). EMDB entry: EMD-5188. Color code: tmRNA domains are the same as in (A); SmpB is magenta; the small 30S subunit is yellow; the large 50S subunit is light blue.

cellular proteases, while the incomplete mRNA is released to be destroyed by ribonucleases (for a full review see (30)). *Trans*-translation occurs frequently, accounting for as much as 2–4% of translation reactions in *Escherichia coli* (31). It is found almost exclusively in the bacterial world (32), with a few exceptions. *Trans*-translation is also found in the plastomes of some primitive algae (33–35); in some rare diatoms (Stramenopila) that acquired genes from marine bacteria (36); and in the Jakobids, sub-lineages of the very distant organismal group Eucavates (37). The Jakobids are interesting due to their uniquely bacterial-like mitochondrial genomes (38). They are considered to be some of the most ancient living eukaryotes, which would explain the presence of tmRNA in their mitochondrial genome. Although faced with the same need for protein synthesis quality control, eukaryotic and archaeal cells have distinct rescue systems that have evolved differently. Although faced with the same need for quality control of protein synthesis, eukaryotic and archaeal cells have distinct rescue systems that have evolved differently. These include nonsense-mediated decay (NMD), no-go decay (NGD), and nonstop decay (NSD) in eukaryotes (39,40); and NGD in archaea (41). At the beginning of the DNA–RNA–protein era, translation errors and (proto)-ribosome stalling must have been far more frequent, and the need for an unlocking system such as *trans*-translation was even more necessary. Therefore, one can assume that a selective pressure led to the appearance of tmRNA then to its high conservation during evolution, an assumption which seems confirmed by the fact that tmRNA is now ubiquitous in all bacteria. On the other hand, SmpB is likely to have arisen as modern tmRNA needed a more accurate way to recognize and rescue stalled ribosomes. tm-

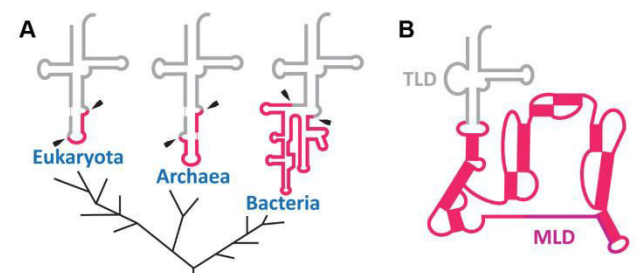


Figure 5. Position and secondary structure similarities between the tRNA intron and tmRNA pseudoknots. (A) The tRNA intron in the three major kingdoms (Bacteria, Archaea and Eukaryota), adapted from Akio Kanai (22). Introns are framboise and mature tRNA is gray. Intron clipping sites are indicated with black arrows. (B) Secondary structure of tmRNA. The tRNA-like (TLD) and mRNA-like (MLD) domains are indicated, and the pseudoknots are framboise. Note the similar positioning of the tRNA introns in the three domains of life and in the other tmRNA domains.

RNA might therefore be the molecular fossil that coevolved with the translational system up to the present day.

ORIGINS OF TRANSFER-MESSENGER RNA

Introns: common features in tmRNA and tRNA?

In the three domains of life, some rare tRNA molecules still undergo splicing of non-coding sequences (introns) located within the anticodon stem–loop (Figure 5A) (42). In bacteria, these introns are eliminated by self-splicing, while in archaea and eukaryotes they are taken care of by endonucleases. The origin of these introns is still being debated. In an ‘introns-early’ scenario (27,43), all essential tRNA genes had an intermediate block in the anticodon loop that had

8046 Nucleic Acids Research, 2016, Vol. 44, No. 17

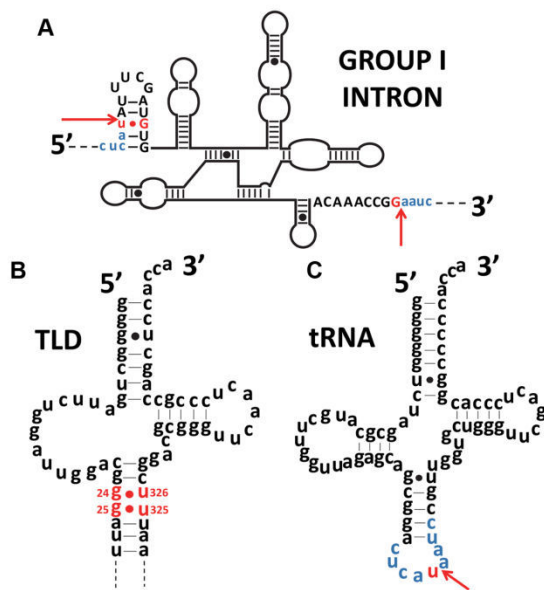


Figure 6. Similarity of the positions of G:U mismatches in the tRNA intron and in tmRNA. (A) Secondary structure of the *Azoarcus* group I intron. Exon sequences are in lower case and blue, while introns are in upper case letters, with red arrows indicating the splice boundaries. The conserved G-U mismatch necessary for self-splicing and the guanine partner are red. (B) Secondary structure of the *Escherichia coli* tRNA-like domain (TLD) of tmRNA. The conserved G-U mismatches in the TLD are red. A similarity in position between the G-U mismatch of the tRNA intron and the TLD is noticeable. (C) Secondary structure of a tRNA^{Ile} (CAU) from *Azoarcus*. The red arrow indicates the insertion site for the introns shown in (C). The exon sequence common to figures (A) and (C) is blue. Mismatches are signaled by dots.

to be removed, and large parts of these introns were lost during evolution. A second scenario is ‘introns-late’ (44), and it theorizes that introns were inserted into genes after the emergence of tRNA. Although there is no evidence for a biological role for these non-coding intron regions, it must be noted that they are present in all three domains of life. The selective pressures that allowed the conservation of some of them up to the present day remain unclear, but their presence seems to be a signature of tRNA evolution. Remarkably, a simple comparison of the secondary structures shows that the positioning of the introns in the anticodon stem-loop of modern tRNA is the same as the large and structured ring abutting the TLD of tmRNA (Figure 5B). Other similarities—such as the length of these extra sequences and the presence of highly structured stem-loops—reinforce the idea that there is a link between modern tmRNA and tRNA. In bacteria, these introns belong to self-splicing group I introns which must be ancestral as they have characteristics that are omnipresent in different bacterial phyla and as they have self-catalytic activity reminiscent of the RNA world (45). The typical secondary structure of a group I intron consists of approximately ten paired elements organized into three domains (46). Self-splicing group I introns use a mechanism based on two distinct guanines as a cofactor (Figure 6A). The first guanine is located at the beginning of the intron in the Internal Guide Sequence (IGS), a highly conserved element in a stem-loop structure. An in-

teresting particularity of this stem-loop is that the guanine used for the self-splicing reaction is associated with a uracil (G:U) (Figure 6A). This mismatch is conserved in all pre-tRNA molecules having a group I intron (47). Strikingly this mismatch characteristic is also found in the TLD domain of tmRNA, at the position G24:U328 ± 1 (Figure 6B) which would correspond to the start of a pre-tRNA intron (Figure 6C). The possible reason for having an intron in the tRNA anticodon is so strange today that neither its origins nor any evolutionary advantages that may have led to its preservation are known (48).

Although it is difficult to predict whether tmRNA derives from a tRNA carrying a type I intron or vice versa, one could imagine a scenario in line with the introns-early hypothesis (27). In this variation, a universal proto-tmRNA with a large intron could be the common ancestor of both tRNA and tmRNA molecules. Gradually, some portions of this loop would have been lost, finally giving birth to the modern panel of tRNAs (49). tmRNA could result from the evolution of this loop into an internal open reading frame, encoding several codons. tmRNA probably arose very early, evolving from a proto-tmRNA that was aminoacylated by alanine only (see below).

Alanines at the crossroads of tmRNA-based aminoacylation and tagging events

Alanine is the simplest chiral amino acid, and along with glycine and aspartic acid the first to be present on earth (50–52). Accordingly, alanine was one of the first amino acids encoded by the first generation of codons (Figure 2). Remarkably, tmRNA is always charged by alanyl-tRNA synthetase (AlaRS), a class II tRNA synthetase that also catalyzes the esterification of alanine to tRNA^{Ala}. Contrary to recognition of most aminoacyl-tRNA synthetases, AlaRS does not require a specific signature on the anticodon moiety of the corresponding tRNA. Instead, it depends mainly on the presence of both a conserved G3:U70 base pair in the acceptor stem of the tRNA^{Ala} isoacceptor, and an adenosine at the discriminator position adjacent to the 3'-terminal CCA (53). This exception is extremely conserved within the three branches of life, and without a doubt reflects the ancient recognition of RNA minihelices by the first enzymes (54). Strikingly, this age-old signature is always present in tmRNA sequences, supporting its early apparition as well as the maintenance through the ages of specific aminoacylation of tmRNA, even in the absence of an anticodon (18,55).

Similarly, four alanines are also encoded by the mRNA-like domain (MLD) that has the following consensus sequence: A*AN—ALAA (e.g. A*ANDENYALAA in *E. coli*, with the first A* carried by the tmRNA TLD) (Figure 7A). The first alanine codon is essential to *trans*-translation. Indeed, this region is important because it ensures the proper placement of the reading frame which allows resumption of translation in the absence of a start codon (56). Remarkably, when comparing the sequences of the resume codon among the various bacterial species, the more primitive the bacteria, the more ancestral GNC codons are recovered (Figure 7B-C). The three conserved tmRNA alanine codons (—A-AA) that follow are also crucial, allowing specific recognition of the tagged protein

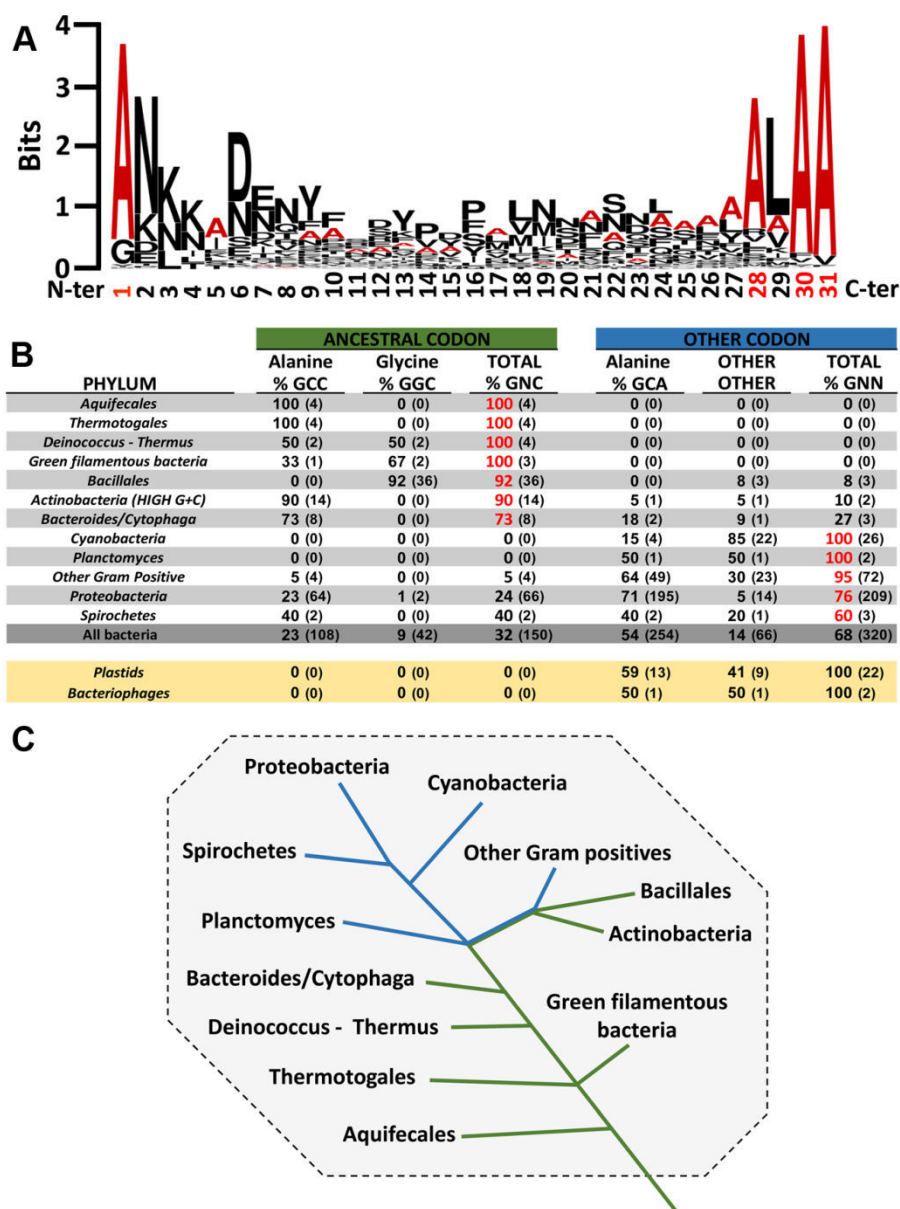


Figure 7. Consensus of amino acids and repartition of first codon of mRNA-like domain in bacteria phyla. (A) Sequence of the consensus sequence and diversity of the amino acids in the MLD. Sequence conservation is measured in bits, going from weakly conserved (0) to highly conserved (4). Alanine is in red and the other amino acids are in black. The alignment was obtained using 708 tag sequences from the UTHSCSA RNP database (<http://rnp.uthscsa.edu/rnp/tmRDB/peptide/peptide.html>) (66). The consensus logo was created using WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (75). (B) Analysis of the first MLD codon in different bacteria phyla. The first codon of the MLD is indexed by the ancestral codons (GNC) and the others. The percentage of each is bold and the sequence number is in parentheses. If the percentage of a codon in a phylum is superior to 50%, it is red. Non-bacterial tmRNA is yellow. Sequence alignments are presented for 940 different tmRNAs. They were taken from the 'tmRNA website' (76). Briefly, the first codon is identified thanks to the highly-conserved upstream sequence determinants. Of course, the resume codon sequence itself is another likely determinant. (C) Variations in the first MLD codon in the different bacteria phyla. The green line indicates ancestral codons for the first codon of the MLD, and the blue line indicates other codons. Adapted from the phylogenetic tree of all extant organisms based on 16S rRNA gene sequence data, as originally proposed by Woese.

by proteases. Indeed, most tmRNA-tagged proteins are degraded by ClpXP or less frequently by ClpAP proteases. Within the typical tagging sequence, ClpX binds the C-terminal residues (—LAA), whereas ClpA recognizes both C- and N-terminal tag residues (AA—ALA-) (57,58). Degradation is also influenced by the adaptor protein SspB

that binds to the tag's N-terminal portion to deliver the tagged peptide tagged to ClpXP (59).

tmRNA-mediated initiation and termination

In the RNA world, for an RNA to be considered a messenger molecule it had to be recognized through specific

8048 *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, No. 17

signatures. Today, this recognition is complex and involves many protein partners such as initiation and release factors. In the RNA world, the mechanism would have been simpler since only the PTC catalytic domain was present. Consequently, the first mRNAs with a non-random coding sequence needed an initiation signal for starting on the correct codon and accurately stopping translation. In fact, tmRNA fulfills all of these conditions. Indeed, the TLD domain of tmRNA can resume translation on its internal coding sequence, even in the absence of any canonical initiation factors. The presence of structured RNA regions upstream of a coding sequence is one of the simplest mechanisms known for initiating translation, as observed today in many tRNA-like structures (60,61). In the same way, tmRNA also carries a signal for terminating translation on its internal reading frame. All modern tmRNAs carry this stop codon within a stem-loop (Figure 4), known to be a basic signal to stop translation (62). Since in primordial times there were no release factors, stop codons, nor ribosomes with helicase activity, the primitive stop signal was probably a stem-loop RNA structure. In the absence of a whole ribosome, the mRNA could not anchor to maintain interactions with the PTC catalytic domain. Yet these interactions were certainly necessary to encourage the translation's evolution in the RNA world. Again, tmRNA possesses the ability to host these interactions *via* its non-coding domain. The large pseudoknot ring of tmRNA can perform many interactions with the translational complex and may have been used for anchoring the mRNA part to the first proto-ribosomes.

A UNIVERSAL PROTO-tmRNA AT THE ORIGINS OF MODERN tRNAs AND mRNAs?

We suggest that tmRNA fulfills all the criteria for being the missing link between an ancient RNA-driven world and the apparition of modern protein synthesis, which is organized around tRNA, mRNA and ribosomes. The model is based on an early prebiotic world in which various sets of short RNA molecules were first synthesized by the non-enzymatic bonding between free-floating nucleotides present in the primordial soup (Figure 8). Driven by evolutionary forces, these short RNAs would then have tended to pair with each other and/or fold into minihelices, forming hairpin structures. This stage likely promoted further interactions and permitted the first forms of the genetic code to emerge, while new RNA catalytic properties generated self-replicating molecules and the first aminoacylated RNA. We propose that in the second stage of an intriguing 'intron scenario', a primitive proto-tmRNA carrying a tRNA acceptor stem with a large intron was obtained by fusing two separate hairpin RNA. Such an ancestral molecule would possess both proto-tRNA and proto-mRNA functions (archaic forms of peptidylation and coding, respectively) within a single molecule. This would in fact explain the emergence of early genetic code, the two parts having evolved very closely. At this stage, proto-tmRNA could contain different acceptor branches charged by their specific early amino acids (*e.g.* alanine, see above). The large intronic loop abutted to the acceptor branch would contain several primitive codons (*e.g.* alanine codons). Indeed, according to a recent model by Di Giulio, the first mRNAs on earth might have

also been peptidated, making tmRNA a perfect candidate to be one of the first mRNAs (63). However, it would also act as a strand of primitive anticodons (49) interacting with the primitive codons of other proto-tmRNAs simply by creating antiparallel duplexes as in modern anticodon-codon interactions. Even if we cannot rule out the theory that the first interactions between proto-tmRNAs occurred in the absence of any other partners (64), these proto-tmRNAs might have rapidly interacted with the first forms of the early peptidyl transferase center (PTC) while the first genetic code was evolving. Indeed, we can assume that the proto-PTC might have emerged in the same way, by self-folding and dimerization of RNA chains, thus providing the first framework for stereochemistry favoring for peptide bond formation and substrate-mediated catalysis (16,65). At this stage, protein synthesis was surely limited to quite short peptides. Co-evolution between these peptides and RNAs might have created a 'virtuous circle', meaning that RNA persisted thanks to peptide protection, the increased RNAs produced more peptides, this led to longer RNAs and peptides, and so on (66). We propose that in a subsequent stage, proto-tmRNAs eventually gave birth to tRNA and mRNA, and evolved into modern tmRNA molecules. In this stage, tRNA was made by variable intronic processing, resulting in the placement of a particular anticodon in the contemporary anticodon position (49). Relics of such a transition can be found today in tRNA variable loops and/or introns, which may correspond to the intron loop's unprocessed excess nucleotides. As for tmRNA, it would have emerged from one of the proto-tmRNAs that had an ancestral tRNA^{Ala} acceptor branch (*i.e.* having a G:U base pair in the acceptor stem). Interestingly, AlaRS is one of the rare enzymes that continues to recognize only the tRNA acceptor stem (early 'second genetic code') rather than the tRNA^{Ala} anticodon. It is possible that, despite its lack of anticodon, the need for tmRNA to be correctly aminoacylated is part of the evolutionary force that drove AlaRS to not incorporate the anticodon into its recognition process (67). Due to its essential role in cells, tmRNA is present in all bacteria, reinforcing the idea that it arose before bacterial phylogenetic divergence (68). Three simple criteria can be used to establish RNA 'antiquity': catalysis, ubiquity, and central placement in the cellular metabolism (4). Many modern RNAs, particularly non-coding ones (ncRNAs), can thus be considered as relics of an ancient RNA world. However, during the slow and gradual replacement of RNAs by ribonucleoproteins (RNPs) and proteins in catalysis, there must have been a crucial step that allowed for the switchover to ribosome-mediated translation. While many RNAs meet the three criteria, introducing a central role in protein synthesis as a fourth criterion makes the game more complicated. Indeed, unlike tmRNA, only few modern RNAs carry specific features related to translational events. Among these, tRNA-like structures (TLSs) are thought to be molecular fossils of the original RNA world. These structures are often located at the 3'-end of the single-stranded RNA genomes of many bacterial and plant viruses, allowing both for tRNA mimicry (including aminoacylation) and regulation of RNA genome replication (61). In an appealing 'genomic tag model', Weiner and Maizels (69) suggested that these 3'-terminal TLSs were

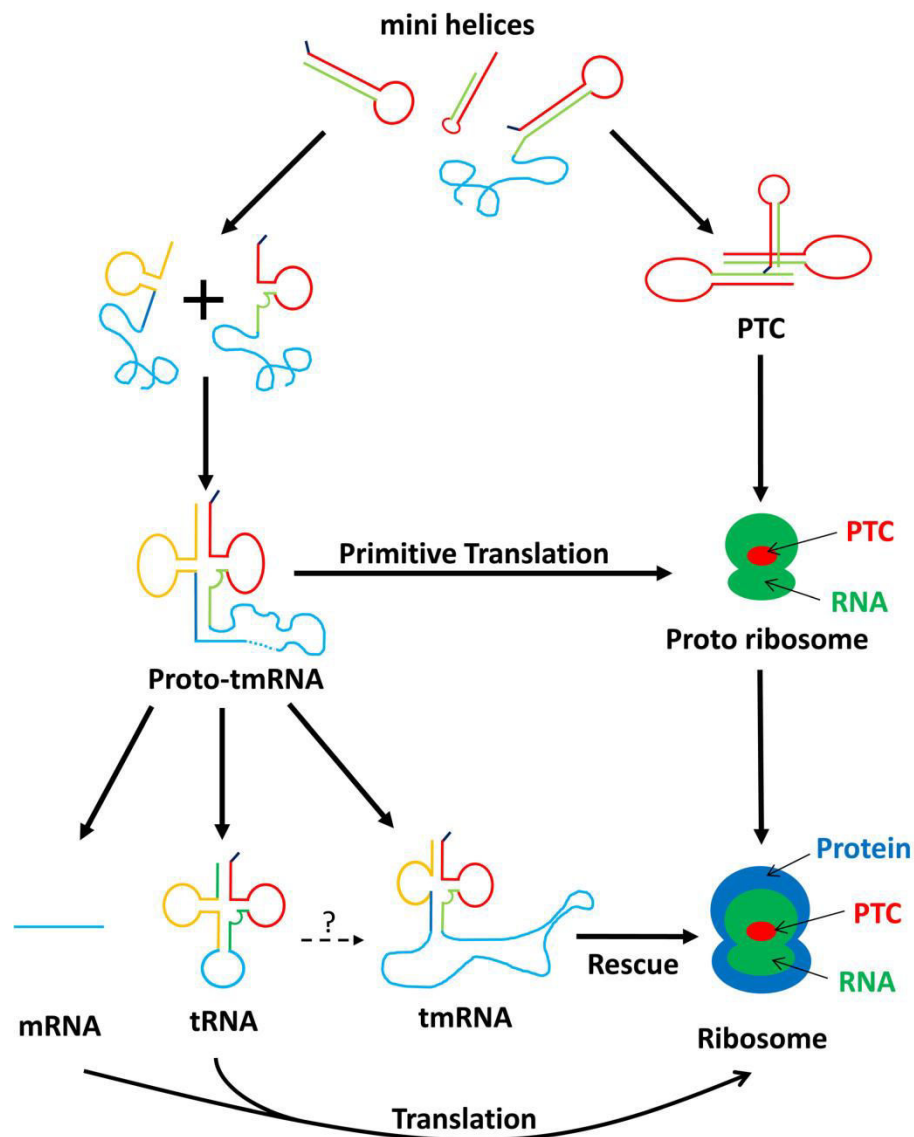


Figure 8. Schematic model representing the different possibilities for the origin of tmRNA. In the beginning of the RNA world, there was a mix of different minihelices. A homodimerisation between two of these would have generated the first proto-ribosome, the Peptidyl Transferase Center (PTC). With aleatory amino acids or aminoacylated minihelices, the PTC created the first random peptide syntheses. A heterodimerization between two minihelices (plus sign) then surely generated a proto-tmRNA. In this step, the proto-tmRNA would have been used as a proto-mRNA. At the same time, the PTC must have evolved into a proto-ribosome by acquiring new RNA that improved its activity. The proto-ribosome would then have continued to evolve via the new synthesized proteins, finally ending up as the ribosomal complex seen today. In contrast to this ribosomal development, the proto-tmRNA took varying evolutionary paths. Through self-splicing, it produced a proto-tRNA that evolved into modern tRNA. It also led to modern tmRNA, which now serves as a rescue system in all bacteria. In addition, proto-tmRNA provided the first non-random genetic medium, which evolved into the RNA genome then into modern mRNA. However, we cannot exclude the theory that a proto-tRNA^{Ala} grew into modern tmRNA, through the insertion of nucleotides into its gene (question mark) (77).

molecular fossils that originally identified genomic RNA molecules for replication and also functioned as primitive telomeres. In this case, aminoacylation would have come along later, fortuitously via an aminoacylating replicase. Such a scenario does not however contradict our model. It could even explain how the first aminoacylated proto-tmRNAs arose after the cleavage of aminoacylated TLS-tagged genomic RNAs.

Modern tmRNA has two main functions (embodied in mRNA and tRNA) that are indispensable to the emer-

gence of protein synthesis. But contrary to isolated mRNA or tRNA, it is only found in bacteria and therefore does not fulfill the second criterion of being ubiquitous. Nevertheless, it is interesting to note that overall prokaryotic and eukaryotic/archaea share several common features, including the addition of a degradation signal to incomplete peptides, and specific degradation of problematic mRNAs. However, in eukaryotes and archaea, the degradation pathway mainly involves the sophisticated ubiquitin proteasome system (70,71), which suggests that tmRNA was

8050 *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, No. 17

lost with ubiquitin's appearance. Accordingly, the Dom34p-mediated no-go decay (NGD) protein is universal in eukaryotes and archaea, suggesting that NGD is probably an ancient mechanism already present in their last common ancestor (41). Evolution of mRNA decay systems in eukaryotes might then have been driven by eRF1 and eRF3 gene duplications. We can therefore assume that tmRNA was lost very early, replaced by more elaborate protein-based quality control mechanisms (i.e. NGD, NSD and NMD as discussed above) in response to the greater diversity of potential clients in eukaryotes and archaea.

In conclusion, we believe that a proto-tmRNA dating from the RNA world is the common ancestor of both modern tRNA and mRNA. This early RNA might have been the first player in protein synthesis and the evolution of the genetic code, making it one of the oldest known fossils of the RNA world.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Emmanuel Giudice for generously helping to create the figures used here, and Juliana Berland for insightful comments on the manuscript.

FUNDING

Agence Nationale pour la Recherche and Direction Générale de l'Armement (ANR-14-ASTR-0001); Institut Universitaire de France. Funding for open access charge: CNRS.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Crick, F.H. (1968) The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.*, **38**, 367–379.
- Orgel, L.E. (1968) Evolution of the genetic apparatus. *J. Mol. Biol.*, **38**, 381–393.
- Woese, C.R. (1967) The genetic code the molecular basis for genetic expression. *Harper & Row*. ASIN: B00013M2KK.
- Jeffares, D.C., Poole, A.M. and Penny, D. (1998) Relics from the RNA world. *J. Mol. Evol.*, **46**, 18–36.
- Goldberg, A.L. and Wittes, R.E. (1966) Genetic code: aspects of organization. *Science*, **153**, 420–424.
- Yarus, M., Widmann, J.J. and Knight, R. (2009) RNA-amino acid binding: a stereochemical era for the genetic code. *J. Mol. Evol.*, **69**, 406–429.
- Ronneberg, T.A., Landweber, L.F. and Freeland, S.J. (2000) Testing a biosynthetic theory of the genetic code: fact or artifact? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 13690–13695.
- Tlusty, T. (2010) A colorful origin for the genetic code: information theory, statistical mechanics and the emergence of molecular codes. *Phys. Life Rev.*, **7**, 362–376.
- Foltan, J.S. (2008) tRNA genes and the genetic code. *J. Theor. Biol.*, **253**, 469–482.
- Ikehara, K. (2002) Origins of gene, genetic code, protein and life: comprehensive view of life systems from a GNC-SNS primitive genetic code hypothesis. *J. Biosci.*, **27**, 165–186.
- Voorhees, R.M. and Ramakrishnan, V. (2013) Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 203–236.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**, 920–930.
- Noller, H.F. (2012) Evolution of protein synthesis from an RNA world. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a003681.
- Davidovich, C., Belousoff, M., Bashan, A. and Yonath, A. (2009) The evolving ribosome: from non-coded peptide bond formation to sophisticated translation machinery. *Res. Microbiol.*, **160**, 487–492.
- Hsiao, C., Lenz, T.K., Peters, J.K., Fang, P.-Y., Schneider, D.M., Anderson, E.J., Preepre, T., Bowman, J.C., O'Neill, E.B., Lie, L. *et al.* (2013) Molecular paleontology: a biochemical model of the ancestral ribosome. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3373–3385.
- Krupkin, M., Matzov, D., Tang, H., Metz, M., Kalaora, R., Belousoff, M.J., Zimmerman, E., Bashan, A. and Yonath, A. (2011) A vestige of a prebiotic bonding machine is functioning within the contemporary ribosome. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **366**, 2972–2978.
- de Duve, C. (1988) Transfer RNAs: the second genetic code. *Nature*, **333**, 117–118.
- Ribas de Pouplana, L. and Schimmel, P. (2000) A view into the origin of life: aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, **57**, 865–870.
- Beuning, P.J. and Musier-Forsyth, K. (1999) Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. *Biopolymers*, **52**, 1–28.
- Di Giulio, M. (2014) The split genes of Nanoarchaeum equitans have not originated in its lineage and have been merged in another Nanoarchaeota: a reply to Podar *et al.* *J. Theor. Biol.*, **349**, 167–169.
- Schimmel, P. and Ribas de Pouplana, L. (1995) Transfer RNA: from minihelix to genetic code. *Cell*, **81**, 983–986.
- Kanai, A. (2015) Disrupted tRNA genes and tRNA fragments: a perspective on tRNA gene evolution. *Life Basel Switz.*, **5**, 321–331.
- Tanaka, T. and Kikuchi, Y. (2001) Origin of the cloverleaf shape of transfer RNA - the double-hairpin model: Implication for the role of tRNA intro and the long extra loop. *SSOEL Jpn.*, **29**, 134–142.
- Tamura, K. and Schimmel, P.R. (2006) Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix: Mechanistic features and chiral suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 13750–13752.
- Shimizu, M. (1995) Specific aminoacylation of C4N hairpin RNAs with the cognate aminoacyl-adenylates in the presence of a dipeptide: origin of the genetic code. *J. Biochem. (Tokyo)*, **117**, 23–26.
- Suga, H., Hayashi, G. and Terasaka, N. (2011) The RNA origin of transfer RNA aminoacylation and beyond. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **366**, 2959–2964.
- Di Giulio, M. (2006) The non-monophyletic origin of the tRNA molecule and the origin of genes only after the evolutionary stage of the last universal common ancestor (LUCA). *J. Theor. Biol.*, **240**, 343–352.
- Cavarelli, J. and Moras, D. (1993) Recognition of tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **7**, 79–86.
- Dong, G., Nowakowski, J. and Hoffman, D.W. (2002) Structure of small protein B: the protein component of the tmRNA-SmpB system for ribosome rescue. *EMBO J.*, **21**, 1845–1854.
- Giudice, E. and Gillet, R. (2013) The task force that rescues stalled ribosomes in bacteria. *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 403–411.
- Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T. (2011) Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS One*, **6**, e28413.
- Mao, C., Bhardwaj, K., Sharkady, S.M., Fish, R.I., Driscoll, T., Wower, J., Zwieb, C., Sobral, B.W.S. and Williams, K.P. (2009) Variations on the tmRNA gene. *RNA Biol.*, **6**, 355–361.
- Gimple, O. and Schön, A. (2001) In vitro and in vivo processing of cyanelle tmRNA by RNase P. *Biol. Chem.*, **382**, 1421–1429.
- Watanabe, T., Sugita, M. and Sugiura, M. (1998) Identification of 10S RNA (tmRNA) homologues from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC6301 and related organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1396**, 97–104.
- Williams, K.P. (2000) The tmRNA website. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 168.
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otillar, R.P. *et al.* (2008) The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, **456**, 239–244.
- Hafez, M., Burger, G., Steinberg, S.V. and Lang, B.F. (2013) A second eukaryotic group with mitochondrion-encoded tmRNA: in silico identification and experimental confirmation. *RNA Biol.*, **10**, 1117–1124.
- Gray, M.W., Lang, B.F. and Burger, G. (2004) Mitochondria of Protists. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 477–524.
- Brandman, O. and Hegde, R.S. (2016) Ribosome-associated protein quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 7–15.

40. Simms, C.L., Thomas, E.N. and Zaher, H.S. (2016) Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, doi:10.1002/wrna.1366.
41. Atkinson, G.C., Baldauf, S.L. and Hauryliuk, V. (2008) Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC Evol. Biol.*, **8**, 290.
42. Abelson, J., Trotta, C.R. and Li, H. (1998) tRNA splicing. *J. Biol. Chem.*, **273**, 12685–12688.
43. Di Giulio, M. (1992) On the origin of the transfer RNA molecule. *J. Theor. Biol.*, **159**, 199–214.
44. Cavalier-Smith, T. (1991) Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends Genet. TIG*, **7**, 145–148.
45. Edgell, D.R., Belfort, M. and Shub, D.A. (2000) Barriers to intron promiscuity in bacteria. *J. Bacteriol.*, **182**, 5281–5289.
46. Adams, P.L., Stahley, M.R., Kosek, A.B., Wang, J. and Strobel, S.A. (2004) Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature*, **430**, 45–50.
47. Cech, T.R. (1988) Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis—a review. *Gene*, **73**, 259–271.
48. Costa, J.-L., Paulsrud, P. and Lindblad, P. (2002) The cyanobacterial tRNA(Leu) (UAA) intron: evolutionary patterns in a genetic marker. *Mol. Biol. Evol.*, **19**, 850–857.
49. Lacey, J.C. and Staves, M.P. (1990) Was there a universal tRNA before specialized tRNAs came into existence? *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life*, **20**, 303–308.
50. Martin, W. and Russell, M.J. (2007) On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **362**, 1887–1926.
51. Miller, S.L. (1953) A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, **117**, 528–529.
52. Muñoz Caro, G.M., Meierhenrich, U.J., Schutte, W.A., Barbier, B., Arcones Segovia, A., Rosenbauer, H., Thiemann, W.H.-P., Brack, A. and Greenberg, J.M. (2002) Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues. *Nature*, **416**, 403–406.
53. Hou, Y.M. and Schimmel, P. (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature*, **333**, 140–145.
54. Ribas de Pouplana, L. and Schimmel, P. (2001) Operational RNA code for amino acids in relation to genetic code in evolution. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6881–6884.
55. Fischer, A.E., Beuning, P.J. and Musier-Forsyth, K. (1999) Identification of discriminator base atomic groups that modulate the alanine aminoacylation reaction. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37093–37096.
56. Miller, M.R., Healey, D.W., Robison, S.G., Dewey, J.D. and Buskirk, A.R. (2008) The role of upstream sequences in selecting the reading frame on tmRNA. *BMC Biol.*, **6**, 29.
57. Flynn, J.M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S.H., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2001) Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 10584–10589.
58. Levchenko, I., Grant, R.A., Flynn, J.M., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2005) Versatile modes of peptide recognition by the AAA+ adaptor protein SspB. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 520–525.
59. Janssen, B.D. and Hayes, C.S. (2012) The tmRNA ribosome-rescue system. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **86**, 151–191.
60. Kieft, J.S. (2008) Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 274–283.
61. Katz, A., Elgamal, S., Rajkovic, A. and Ibba, M. (2016) Non-canonical roles of tRNAs and tRNA mimics in bacterial cell biology. *Mol. Microbiol.*, doi:10.1111/mmi.13419.
62. Henkin, T.M. and Yanofsky, C. (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *BioEssays*, **24**, 700–707.
63. Di Giulio, M. (2015) A Model for the Origin of the First mRNAs. *J. Mol. Evol.*, **81**, 10–17.
64. Gillet, R. and Felden, B. (2001) Transfer RNA(Ala) recognizes transfer-messenger RNA with specificity: a functional complex prior to entering the ribosome? *EMBO J.*, **20**, 2966–2976.
65. Farias, S.T., Rêgo, T.G. and José, M.V. (2014) Origin and evolution of the Peptidyl Transferase Center from proto-tRNAs. *FEBS Open Biol.*, **4**, 175–178.
66. van der Gulik, P.T.S. and Speijer, D. (2015) How amino acids and peptides shaped the RNA world. *Life Basel Switz.*, **5**, 230–246.
67. Nameki, N., Tadaki, T., Muto, A. and Himeno, H. (1999) Amino acid acceptor identity switch of *Escherichia coli* tmRNA from alanine to histidine in Vitro. *J. Mol. Biol.*, **289**, 1–7.
68. Meli, M., Albert-Fournier, B. and Maurel, M.C. (2001) Recent findings in the modern RNA world. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.*, **4**, 5–11.
69. Weiner, A.M. and Maizels, N. (1987) tRNA-like structures tag the 3' ends of genomic RNA molecules for replication: implications for the origin of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7383–7387.
70. Fu, X., Liu, R., Sanchez, I., Silva-Sanchez, C., Hepowitz, N.L., Cao, S., Chen, S. and Maupin-Furlow, J. (2016) Ubiquitin-like proteasome system represents a eukaryotic-like pathway for targeted proteolysis in archaea. *mBio*, **7**, doi:10.1128/mBio.00379-16.
71. Maupin-Furlow, J. (2012) Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 100–111.
72. Di Giulio, M. (2008) An extension of the coevolution theory of the origin of the genetic code. *Biol. Direct*, **3**, 37.
73. Di Giulio, M. (2012) The origin of the tRNA molecule: Independent data favor a specific model of its evolution. *Biochimie*, **94**, 1464–1466.
74. Giudice, E., Macé, K. and Gillet, R. (2014) Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB. *Front. Microbiol.*, **5**, 113.
75. Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. and Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.*, **14**, 1188–1190.
76. Hudson, C.M. and Williams, K.P. (2015) The tmRNA website. *Nucleic Acids Res.*, **43**, D138–D140.
77. Himeno, H., Kurita, D. and Muto, A. (2014) tmRNA-mediated trans-translation as the major ribosome rescue system in a bacterial cell. *Front. Genet.*, **5**, 66.

II.3 - Conclusion de l'article #1

L'analyse de l'ARNtm, fossile moléculaire datant des étapes précoces de l'origine de la vie, permet d'émettre une hypothèse sur la naissance de la synthèse protéique. Cette étape est un évènement crucial de l'évolution, puisque le décryptage d'une information contenue dans une molécule constitue le saut évolutif le plus important dans l'évolution de la vie.

Cette hypothèse permet également de faire le point sur la répartition de l'ARNtm dans les différents domaines du vivant. Effectivement, l'absence de l'ARNtm chez les archées et eucaryotes n'avait jamais été explicitée, ni l'exception de sa présence chez quelques eucaryotes.

La *trans*-traduction assure aujourd'hui de nombreuses fonctions, en plus du sauvetage de la synthèse protéique. Son rôle central dans la cellule en fait une cible bactérienne particulièrement attractive pour le développement de nouveaux antibiotiques. Malgré la complexification de la synthèse protéique au cours de l'évolution, comme nous allons le voir lors du chapitre suivant, l'ARNtm possède toujours la clé permettant de sauver le ribosome.

III - Le ribosome

III.1 - Introduction - Le ribosome

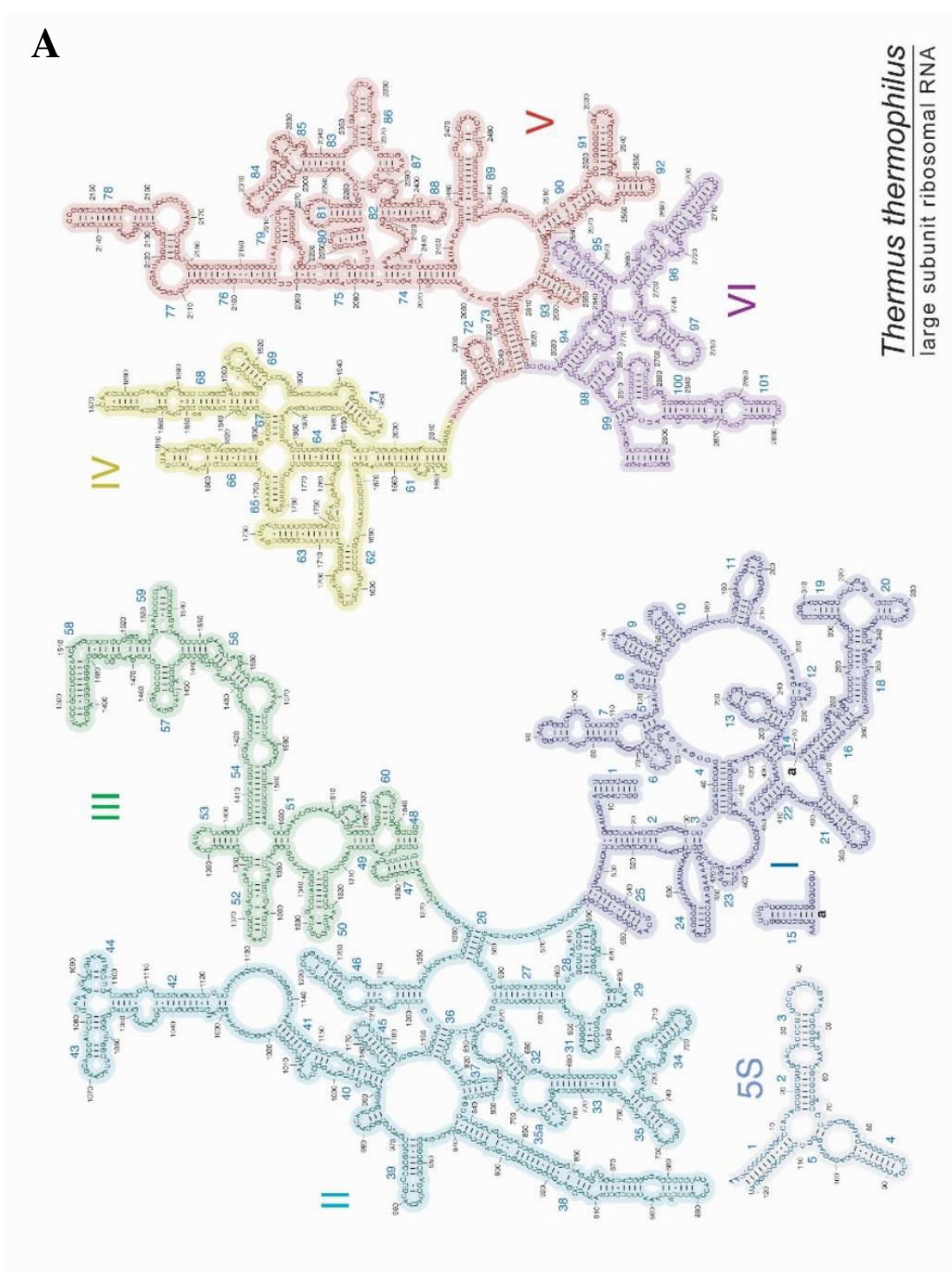
Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique constitué de deux sous-unités. Chez les bactéries, la petite sous-unité possède un coefficient de sédimentation de 30 Svedberg (30S) et prend en charge l'ARNm. Elle est constituée de l'ARNr 16S (1 540 nucléotides) et de 21 protéines. La grande sous-unité 50S assure la catalyse des liaisons peptidiques entre les acides aminés formant la protéine. Elle est composée de l'ARN 23S (2 300 nucléotides), de l'ARN 5S (120 nucléotides) et de 34 protéines. Les deux sous-unités réunies forment le ribosome complet 70S, composé de 2/3 d'ARN et d'1/3 de protéines, pour une masse de 2.7 million Daltons (MDa) pour *Escherichia coli*. Éléments essentiels de la cellule, les ribosomes peuvent représenter plus de 50% de la masse sèche d'une bactérie, cela représente plus de 20 000 ribosomes par cellule. Plusieurs ribosomes peuvent être associés et traduire simultanément un même ARNm, on parle alors de polysomes.

Le ribosome est le catalyseur de la synthèse protéique, particulièrement au sens biochimique pour son aide dans la formation de la liaison peptidique. Le ribosome accélère la réaction de transfert peptidique par un facteur d'environ 10^5 (Trobroy and Aqvist, 2005), ce qui est beaucoup moins efficace que nombres d'enzymes protéiques qui accélèrent les réactions jusqu'à 10^{23} fois (Kraut *et al.*, 2003). Mais si aujourd'hui le ribosome n'a pas été remplacé par une protéine, c'est qu'il est également un catalyseur dans un sens plus global. Il est notamment le lieu de décryptage du code génétique qui permet d'obtenir des conditions physico-chimiques et de proximités optimales pour tous les partenaires. De plus, le ribosome permet une synchronisation des différentes étapes nécessaires à la traduction. Ces différentes fonctions se sont optimisées au cours de l'évolution pour atteindre des capacités impressionnantes de 15-20 codons décodés par seconde et ne commettant qu'une erreur pour 10 000 (Zaher and Green, 2009) acides aminés assemblés. La traduction est un processus très dynamique et continu, qui a fait l'objet de très nombreuses études structurales à partir des années 1970 jusqu'à aujourd'hui (2000, première structure du ribosome bactérien à haute résolution (3 ångström = 3 Å) (pour le 30S : (Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000) (pour le 50S : (Ban *et al.*, 2000) | 2015, première structure du ribosome humain à haute résolution (3.6 Å) (Khatter *et al.*, 2015)).

III.2 - Nomenclature du ribosome

III.2.1 - Nomenclature des ARN ribosomiques

Le ribosome procaryote est composé de trois ARNr : 23S, 16S et le 5S. Le 23S est codé par le gène *rrlA*, le 5S par *rrfH* et le 16S par le gène *rrsA*, et ces gènes sont présents en plusieurs copies chez tous les organismes. Les ARNr 23S et 16S sont découpés en six et quatre domaines respectivement (Figure 1, A). Les ARNr forment de nombreuses hélices dans l'espace : 45 pour l'ARN16S et 101 pour le 23S, numérotés selon leur ordre d'apparition dans la séquence (Figure 1, B).



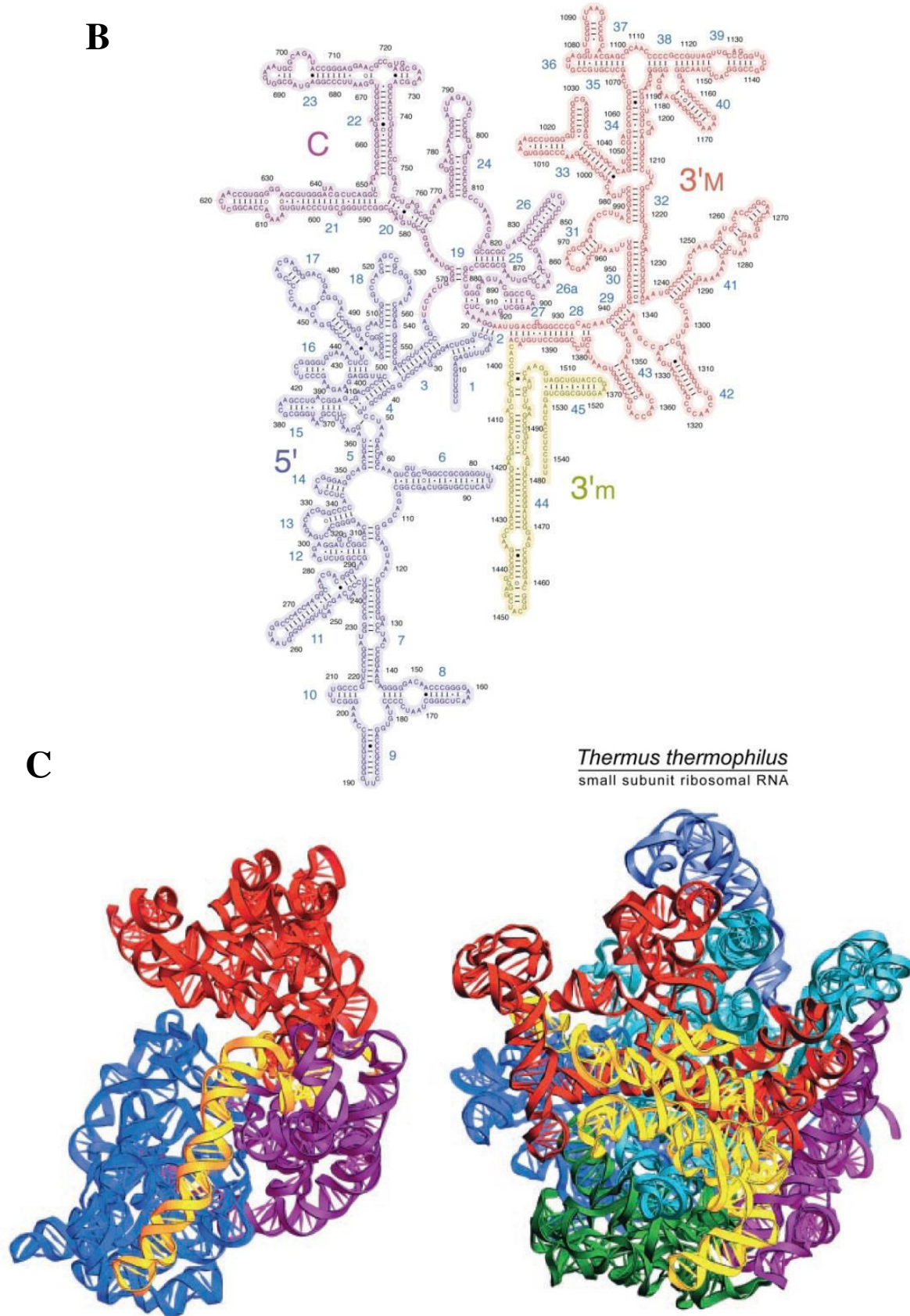


Figure 1. Structures secondaires et tertiaires de 16S, 23S et 5S ARNr. D'après Yusupov et al., 2001, *Science*. (A) Les structures secondaires des ARNr 23S et 5S de *T. thermophilus*, avec indication pour l'ARNr 23S des domaines I (bleu), II (cyan), III (vert), IV (jaune), V (rouge) et VI (magenta). Les ARNr sont numérotés en fonction d'*E. coli* (69). (B) Structure secondaire de *T. thermophilus* ARNr 16S, avec les domaines 5', C, 3'M et 3'm en bleu-violet, magenta, rouge et jaune respectivement. (C) Structure en trois dimensions de l'ARNr 16S à gauche et du 23S et 5S à droite, avec les domaines colorés comme dans (B) et (A) respectivement.

III.2.2 - Nomenclature des protéines ribosomiques

III.2.2.A - Historique

La dénomination des protéines ribosomiques est devenue problématique dès le milieu des années 1960, lorsque plusieurs groupes ont commencé à les purifier et les caractériser chez *Escherichia coli*. Chaque laboratoire a conçu son propre système de nomenclature et ce chaos a pris fin en 1971 après la mise en place d'un premier système de nomenclature universel. Cependant le problème revint au milieu des années 1980, avec l'identification des protéines ribosomiques d'archées et d'eucaryotes. À la fin des années 1980, le nombre de séquences de protéines ribosomiques disponibles était devenu assez grand pour que les homologies soient réalisées en toute confiance à travers les trois domaines du vivant. En 1989, un système de nomenclature pour les archées et eucaryotes fût donc mis au point (Bergmann and Wittmann-Liebold, 1990).

Cependant les premières structures cristallines de ribosomes eucaryotes en 2011 entraînèrent une nouvelle confusion dans la dénomination de chaque protéine. Dans une étude publiée en 2012, un nouveau système pour nommer des protéines ribosomiques eucaryotes fut donc proposé (Jenner *et al.*, 2012). Plusieurs obstacles au changement furent identifiés, notamment une réticence au changement des bases de données de séquence, par exemple, le fait que les noms de l'ancien système soient déjà incorporés dans la littérature clinique qui traite des maladies ribosomiques etc. La proposition fut donc discutée lors du « ribosome meeting » à Napa, CA, en 2013 avant de donner naissance au nouveau système de nomenclature des protéines ribosomiques, aujourd'hui universellement applicable (Ban *et al.*, 2014).

III.2.2.B - La nouvelle nomenclature

Le système pour nommer les protéines ribosomiques actuel est décrit dans le tableau 2 (50S) et le tableau 3 (30S) et, qui présentent les équivalences entre les différents systèmes de désignation ancien et nouveau. Étant donné que les protéines ribosomiques d'*E. coli* furent les premières à être isolées et entièrement séquencées, elles sont abondamment décrites dans la littérature et servent ici de référence pour le nouveau système.

Tableau 2. Nouvelle nomenclature pour les protéines ribosomiques procaryotes de la grande sous unité. D'après Ban et al., 2014, *Curr Opin Struct Biol*. En fond violet les protéines non retrouvées chez la levure ou l'humain.

| Cytoplasmic ribosome New Name # | Occurrence* | Bacteria Old name | Yeast Old name | Human Old name | Mitochondrial ribosome New name # | Mammalian mitoribosome Old name | Yeast mitoribosome Old name |
|------------------------------------|-------------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| uL1 | BAE m | L1 | L1 | L10A | uL1m | MRPL1 | MRPL1 |
| uL2 | BAE m | L2 | L2 | L8 | uL2m | MRPL2 | RML2 |
| uL3 | BAE m | L3 | L3 | L3 | uL3m | MRPL3 | MRPL9 |
| uL4 | BAE m | L4 | L4 | L4 | uL4m | MRPL4 | YML6 |
| uL5 | BAE m | L5 | L11 | L11 | uL5m | – | MRPL7 |
| uL6 | BAE m | L6 | L9 | L9 | uL6m | – | MRPL6 |
| bL9 | B m | L9 | – | – | bL9m | MRPL9 | MRPL50 |
| uL10 | BAE m | L10 | P0 | P0 | uL10m | MRPL10 | MRPL11 |
| uL11 | BAE m | L11 | L12 | L12 | uL11m | MRPL11 | MRPL19 |
| bL12 | B m | L7/L12 | – | – | bL12m | MRPL12 | MNP1 |
| uL13 | BAE m | L13 | L16 | L13A | uL13m | MRPL13 | MRPL23 |
| uL14 | BAE m | L14 | L23 | L23 | uL14m | MRPL14 | MRPL38 |
| uL15 | BAE m | L15 | L28 | L27A | uL15m | MRPL15 | MRPL10 |
| uL16 | BAE m | L16 | L10 | L10 | uL16m | MRPL16 | MRPL16 |
| bL17 | B m | L17 | – | – | bL17m | MRPL17 | MRPL8 |
| uL18 | BAE m | L18 | L5 | L5 | uL18m | MRPL18 | – |
| bL19 | B m | L19 | – | – | bL19m | MRPL19 | IMG1 |
| bL20 | B m | L20 | – | – | bL20m | MRPL20 | – |
| bL21 | B m | L21 | – | – | bL21m | MRPL21 | MRPL49 |
| uL22 | BAE m | L22 | L17 | L17 | uL22m | MRPL22 | MRPL22 |
| uL23 | BAE m | L23 | L25 | L23A | uL23m | MRPL23 | MRP20 (MRPL41) |
| uL24 | BAE m | L24 | L26 | L26 | uL24m | MRPL24 | MRPL40 |
| bL25 | B | L25 | – | – | – | – | – |
| bL27 | B m | L27 | – | – | bL27m | MRPL27 | MRP7 |
| bL28 | B m | L28 | – | – | bL28m | MRPL28 | MRPL24 |
| uL29 | BAE m | L29 | L35 | L35 | uL29m | MRPL47 | MRPL4 |
| uL30 | BAE m | L30 | L7 | L7 | uL30m | MRPL30 | MRPL33 |
| bL31 | B m | L31 | – | – | bL31m | MRPL55 | MRPL36 |
| bL32 | B m | L32 | – | – | bL32m | MRPL32 | MRPL32 |
| bL33 | B m | L33 | – | – | bL33m | MRPL33 | MRPL39 |
| bL34 | B m | L34 | – | – | bL34m | MRPL34 | MRPL34 |
| bL35 | B m | L35 | – | – | bL35m | MRPL35 | YNL122C |
| bL36 | B m | L36 | – | – | bL36m | MRPL36 | RTC6 |

Tableau 3. Nouvelle nomenclature pour les protéines ribosomiques procaryotes de la petite sous unité. D'après Ban et al., 2014, *Curr Opin Struct Biol*. En fond violet les protéines non retrouvées chez la levure ou l'humain.

| Cytoplasmic ribosome | | | | | Mammalian mitoribosome | |
|----------------------|-------------|-------------------|----------------|----------------|------------------------|---------------------------------|
| New name # | Occurrence* | Bacteria Old name | Yeast Old name | Human Old name | New name # | Mammalian mitoribosome Old name |
| bS1 | B m | S1 | – | – | bS1m | MRPS28 |
| uS2 | BAE m | S2 | S0 | SA | uS2m | MRPS2 |
| uS3 | BAE m | S3 | S3 | S3 | uS3m | MRPS24 |
| uS4 | BAE | S4 | S9 | S9 | – | – |
| uS5 | BAE m | S5 | S2 | S2 | uS5m | MRPS5 |
| bS6 | B m | S6 | – | – | bS6m | MRPS6 |
| uS7 | BAE m | S7 | S5 | S5 | uS7m | MRPS7 |
| uS8 | BAE | S8 | S22 | S15A | – | – |
| uS9 | BAE m | S9 | S16 | S16 | uS9m | MRPS9 |
| uS10 | BAE m | S10 | S20 | S20 | uS10m | MRPS10 |
| uS11 | BAE m | S11 | S14 | S14 | uS11m | MRPS11 |
| uS12 | BAE m | S12 | S23 | S23 | uS12m | MRPS12 |
| uS13 | BAE | S13 | S18 | S18 | – | – |
| uS14 | BAE m | S14 | S29 | S29 | uS14m | MRPS14 |
| uS15 | BAE m | S15 | S13 | S13 | uS15m | MRPS15 |
| bS16 | B m | S16 | – | – | bS16m | MRPS16 |
| uS17 | BAE m | S17 | S11 | S11 | uS17m | MRPS17 |
| bS18 | B m | S18 | – | – | bS18m | MRPS18C |
| uS19 | BAE | S19 | S15 | S15 | – | – |
| bS20 | B | S20 | – | – | – | – |
| bS21 | B m | S21 | – | – | bS21m | MRPS21 |
| bTHX | B | THX | – | – | – | – |

L'ancien système de nomination, c'est-à-dire LX pour une protéine de la grande sous unité et SX pour la petite (où X est le numéro de la protéine) est conservé. À cela est rajouté un préfixe. Les protéines trouvées dans les ribosomes de chacun des trois domaines sont identifiées par le préfixe «u» (pour ubiquitaire). Les protéines bactériennes sans homologues eucaryotes (ou archées) sont désignées par le préfixe «b», de même pour les eucaryotes par la lettre «e» et pour les archées par le préfixe «a» (pour Archaea) (Figure 2).

III.3 - Structure du ribosome

Le ribosome est constitué de deux sous-unités, nommées 30S et 50S chez les bactéries. La petite sous-unité ou 30S se décompose en deux parties : la tête, avec une protubérance appelée bec, et le corps qui possède plusieurs protubérances, l'éperon, l'épaule et la plate-forme. La grande sous-unité ou 50S possède trois protubérances : la protubérance uL1 formée par l'hélice H78 du 23S et de la protéine uL1 ; la protubérance centrale (PC) constituée de uL5, bL31, de l'ARN 23S et 5S ; et la protubérance L7/L12 (nouvelle nomenclature bL12) formée par les hélices H42, H43 et H44 du 23S avec la protéine L10 (Figure 2). Cette dernière protubérance est de taille variable puisqu'elle vient se fixer au-dessus de la protéine L11, suivie par plusieurs dimères bL12 (quatre chez *E. coli*, six chez *T. thermophilus*). Ce complexe joue un rôle essentiel dans la fixation des facteurs GTP-dépendant lors de la traduction (Deroo *et al.*, 2012). Les deux sous-unités sont reliées au niveau de leurs interfaces planes par une douzaine de ponts faisant intervenir des cations divalents Mg²⁺. La plupart de ces ponts sont constitués d'interactions ARN-ARN ou ARN-protéine, et une seule implique uniquement deux protéines (B1b). Le ribosome entier est une particule relativement globulaire, sans symétrie et d'environ 25nm de diamètre. Il possède trois sites de liaison aux ARNt : le site A (pour aminoacyl-ARNt); le site P (pour peptidyl-ARNt) et le site E (pour exit) (Figure 3).

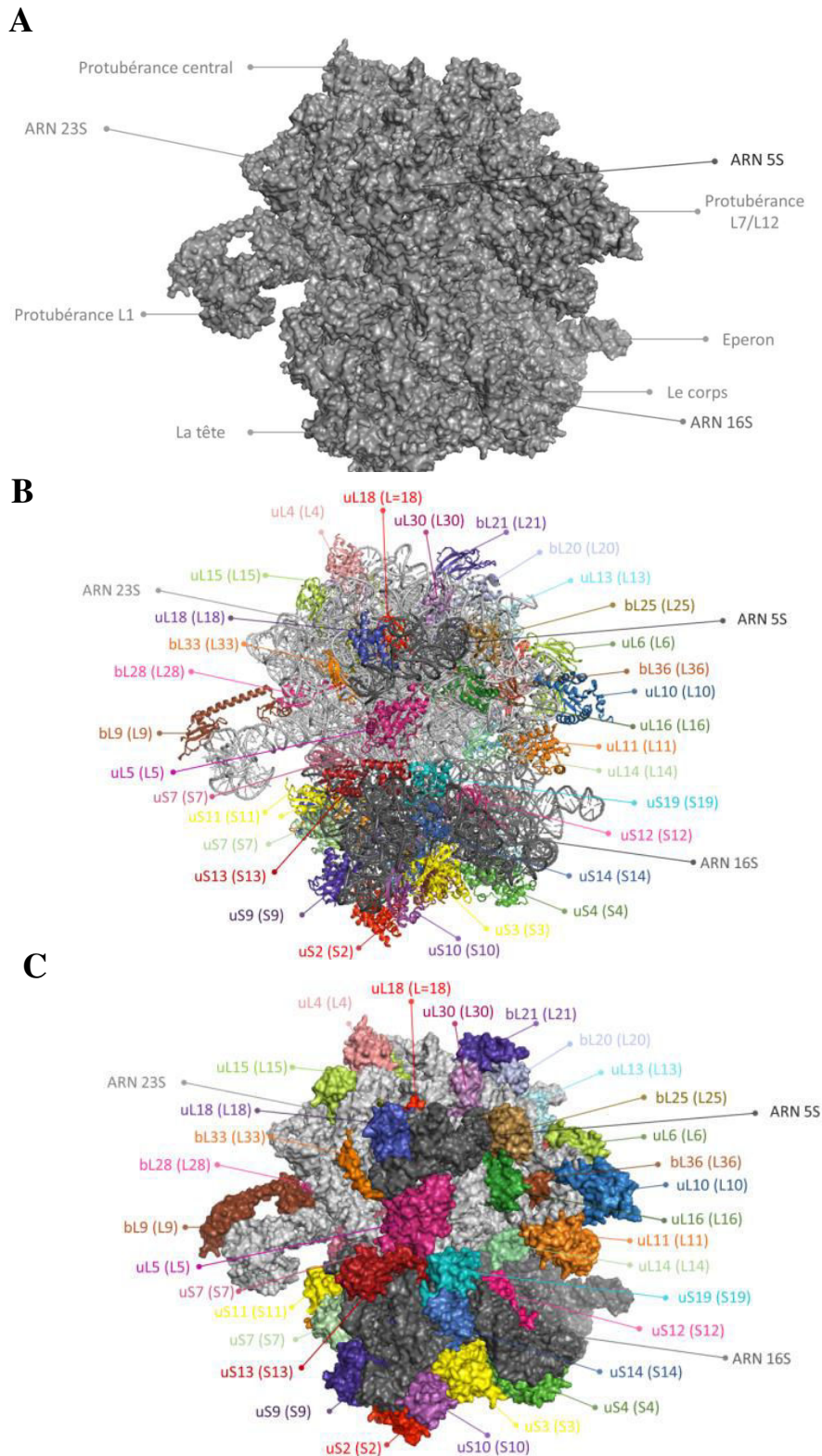


Figure 2. Structure du ribosome avec une orientation canonique. (A) Structure 3D du ribosome en représentation volume sans couleur avec indication des zones facilement reconnaissables. (B) Structure 3D du ribosome en représentation volume avec coloration des protéines ribosomiques qui sont indiquées avec la double nomenclature. Les 3 ARNr sont de différentes nuances de gris. (C) Structure du ribosome en représentation « carton » avec le même code couleur.

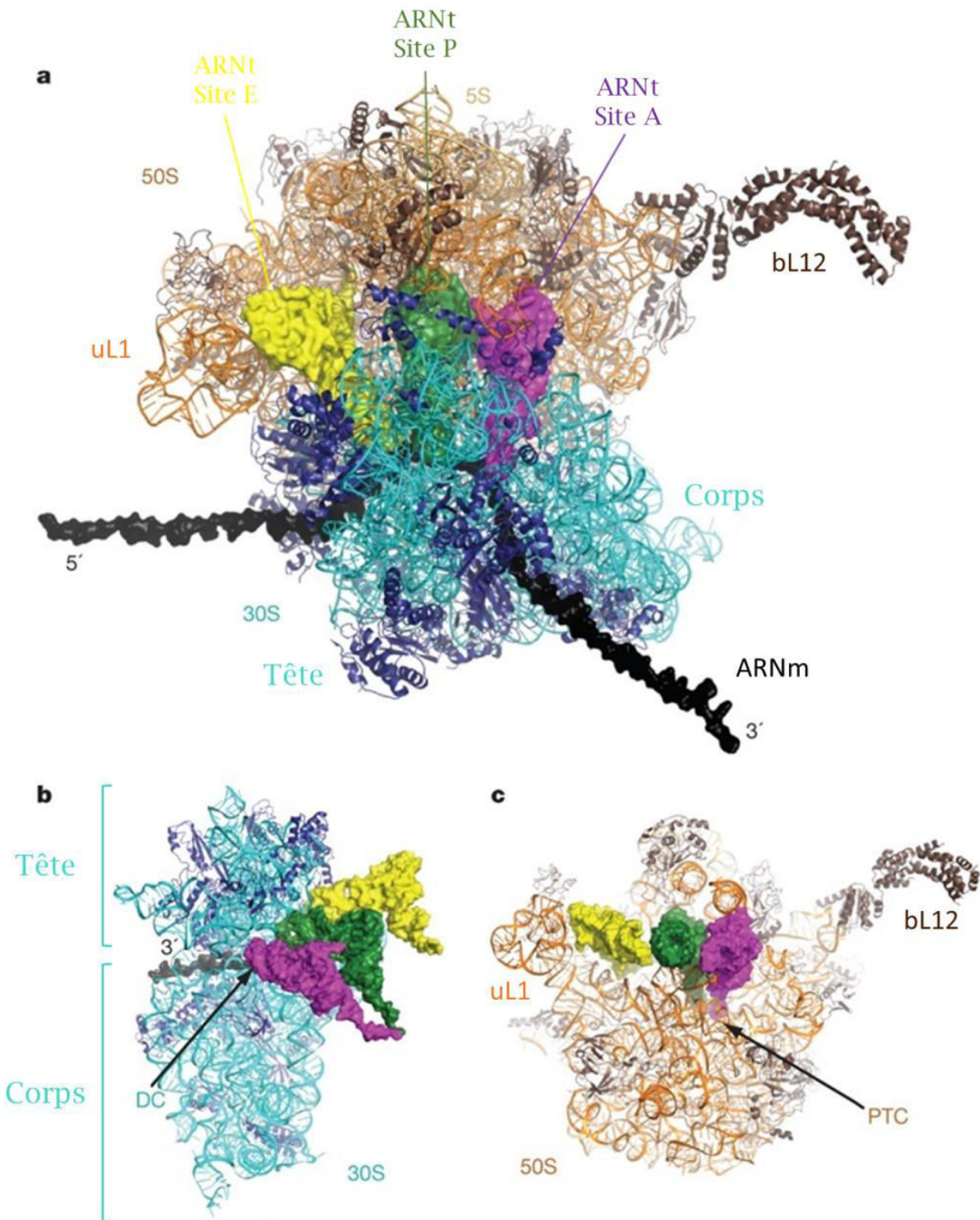


Figure 3. Structure du ribosome en représentation « carton ». D'après T. Martin Schmeing et V. Ramakrishnan, 2009, *Nature*. (A) Orientation du ribosome identique à la figure précédente (N°2) avec indication des ARNt et de l'ARNm. (B) Vue de la sous-unité 30S seule avec la présence des 3 ARNt et de l'ARNm. (C) Vue de la sous-unité 50S seule avec toujours la présence des 3 ARNt.

IV - Le cycle traductionnel

IV.1 - Introduction – Le cycle traductionnel

IV.1.1 - Les acides ribonucléiques de transfert, partenaires clés du ribosome au cours de la synthèse protéique

Les acides ribonucléiques de transfert (ARNt) sont les acteurs clés de la traduction du code génétique. Ils assurent la correspondance et le lien physique entre l'information génétique des ARNm, sur lesquels ils déchiffrent les codons successifs, et amènent les acides aminés correspondants pour la synthèse de la protéine. Cette capacité à déchiffrer le code génétique provient du fait que l'ARNt possède, d'une part, un triplet « anticodon » complémentaire d'un codon spécifique de l'ARNm, et d'autre part, l'acide aminé correspondant au codon lié de manière covalente à son extrémité 3'-CCA. Lorsqu'ils sont ainsi porteurs d'un acide aminé, on dit que ce sont des aminoacyl-ARNt ou aa-ARNt. Il y a vingt acides aminés standards dans le code génétique, plus deux autres encodés indirectement par des codons-stop qui sont recodés en codons d'acides aminés dans certaines conditions. Il s'agit de la sélénocystéine (UGA) retrouvé dans tout le règne vivant et la pyrrolysine (UAG) uniquement présent chez les archées méthanogènes. Le chargement spécifique d'un acide aminé (aa) sur l'ARNt correspondant est assuré par les aminoacyl-ARNt-synthétases (aaRS). Ces enzymes sont donc garantes du code génétique au niveau biochimique.

Box N°4 - Dès 1955, Francis Crick prédisait l'existence de molécules adaptatrices faisant le lien entre le langage des acides nucléiques, porté par les ARNm, et la chaîne polypeptidique naissante au niveau du ribosome. Ils furent découverts trois ans plus tard par Mahlon Hoagland.

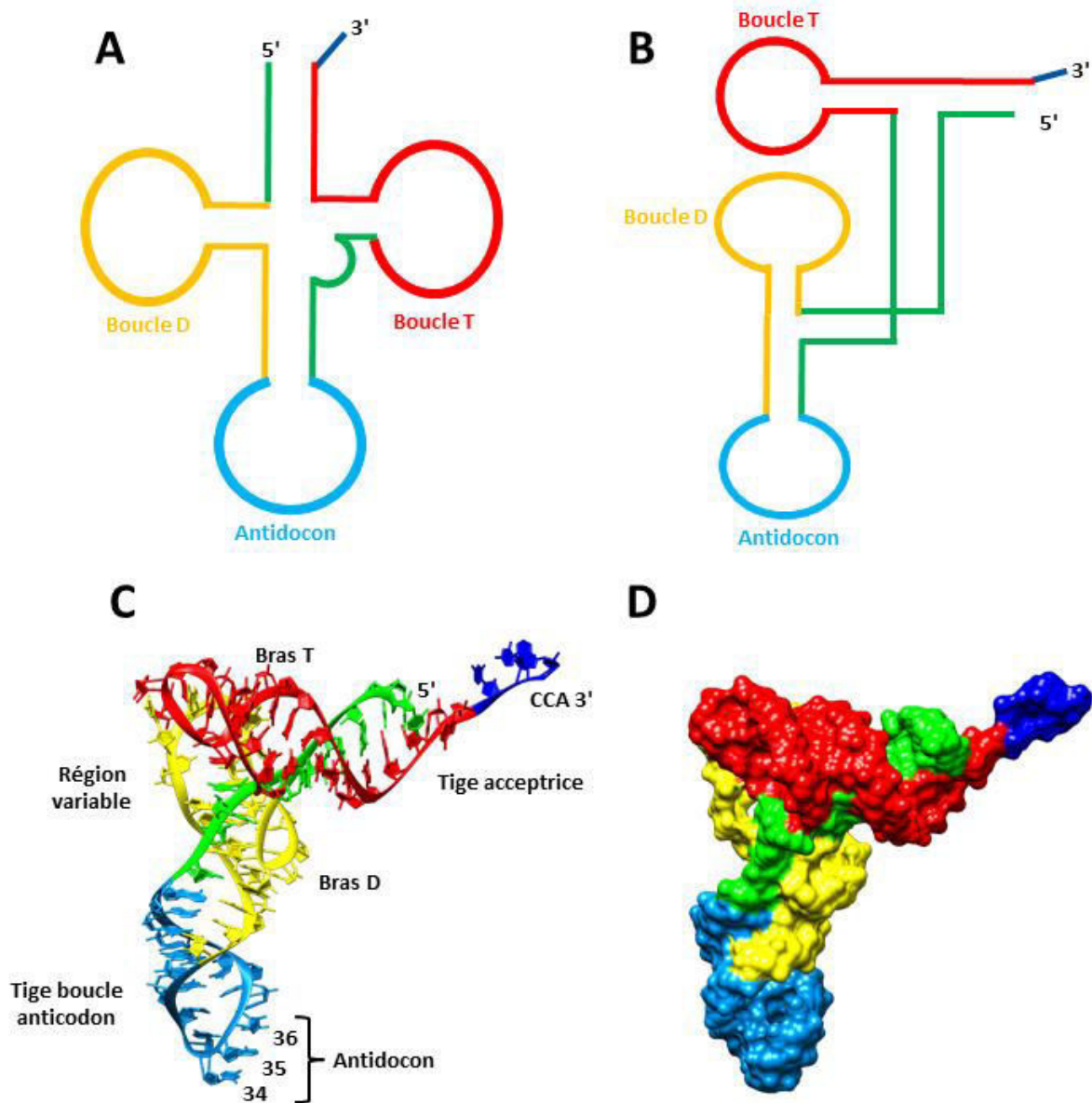


Figure 4. Structures secondaires et tertiaires d'un ARNt canonique. Le code couleur utilisé n'est pas conventionnel, mais correspond de l'article Macé & Gillet, 2016. (A) Structure secondaire en forme de trèfle d'un ARNt. (B) Structure secondaire en forme de L d'un ARNt. (C) Structure 3D atomique d'un ARNt avec indication des bases de l'anticodon. (D) Structure 3D en représentation volume d'un ARNt.

IV.1.1.A - Structure des ARNt

Les ARNt sont des acides ribonucléiques simple brin, de longueurs variant entre 74 et 98 nucléotides, avec une moyenne de 76. Ils se replient *via* des appariements canoniques Watson-Crick de type (G-C) et (A-U) et des interactions tertiaires pour adopter une structure comportant plusieurs tiges-boucles, en forme de «L» dans l'espace (Figure 4, B). En structure secondaire, cinq régions sont définies :

- La tige acceptrice est une hélice sur laquelle l'acide aminé correspondant est estérifié. Le premier appariement de l'hélice entre la guanine 1 (G1) et la cytosine 72 (C72) est extrêmement conservé dans tous les ARNt, mis à part dans l'ARNt^{fMet} (ARNt N-formylméthionine) bactérien où l'on retrouve un mésappariement C1 : A72. Cette hélice possède à son extrémité 3' une séquence simple brin de quatre nucléotides de type NCCA-3'. Le nucléotide N est un discriminant important dans la spécificité des aaRS. La séquence universellement conservée CCA porte à son extrémité 3' l'acide aminé, lié de façon covalente par une liaison ester entre le groupement hydroxyle 2' ou 3' du ribose et le groupement carboxyle de l'acide aminé.
- La tige-boucle D possède une hélice de trois ou quatre paires de bases et une boucle de 8 à 11 nucléotides possédant deux bases modifiées dihydrouridines (D), d'où le nom de la tige-boucle.
- La tige-boucle anticodon possède la séquence anticodon dans sa boucle. L'hélice possède toujours cinq paires de bases et la boucle est très conservée avec une séquence consensus Py32-U33-XYZ-Pu37-N38, où Py représente une pyrimidine (C ou U), XYZ peut être n'importe quel triplet de nucléotide et représente l'anticodon, Pu une purine (A ou G) et N n'importe quel nucléotide.
- La tige-boucle T possède, comme la précédente, une hélice de cinq paires de bases et une boucle de sept nucléotides. Cette boucle contient la séquence TΨC (T pour ribose-thymidine et Ψ pour pseudouridine), donnant le nom de bras T à cette structure.
- En plus de ces structures très conservées, il existe une région variable entre la tige-boucle T et anticodon, dont la longueur varie entre 4 et 24 nucléotides.

Ces quatre tiges se replient en trois dimensions pour former une structure en forme de "L" par l'empilement coaxial deux à deux des tiges : le bras T sur bras accepteur d'une part, et le bras anticodon sur le bras D d'autre part.

IV.1.1.B - Synthèse et modification post-transcriptionnel des ARNt

La synthèse des ARNt s'effectue généralement sous forme d'opérons transcrits donnant un seul précurseur contenant plusieurs ARNt non matures. Le transcrit primaire est mûré par la ribonucléase E et P. Chez les trois domaines du vivant, la maturation de certains ARNt fait

intervenir en plus une étape d'épissage d'un intron. Après maturation, les nucléotides des ARNt subissent de nombreuses modifications. Les ARNt sont les ARN les plus modifiés dans la cellule (Tableau 4).

Tableau 4. Diversité et proportion de nucléotides modifiés pour les différents types d'ARN.
D'après Rozenski J et al., 1999, NAR.

| Type d'ARN | ARNt 74–98 nt | ARNsn 70–1200 nt | ARNr 1600–4000 nt | ARNm 100–3000 nt |
|------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Nombre de nt modifié par ARN | 3–20 nt (3–26 %) | 0–13 nt (0–10 %) | 65–200 nt (1–3 %) | 0–5 nt (< 1 %) |

Près de 25% des nucléotides des ARNt possèdent des modifications post-transcriptionnelles. Ces modifications permettent d'élargir la diversité chimique et d'affiner la fonctionnalité des molécules d'ARNt dans les trois domaines de la vie. Elles ont diverses fonctions comme la stabilité de la structure tertiaire, la reconnaissance auprès des aaRS et de l'interaction avec le facteur d'élongation EF-Tu (« facteur d'élongation thermo instable ») et le ribosome. À ce jour, plus de 100 modifications chimiques différentes ont été identifiées.

IV.1.2 - Les aminoacyl-ARNt-synthétases (aaRS)

IV.1.2.A - Généralités et structure

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) forment une famille de ligases qui catalysent l'estérification des acides aminés sur l'extrémité 3' des ARNt (l'aminacylation). Chaque aaRS reconnaît spécifiquement un acide aminé et tous ses ARNt isoaccepteurs. Ce sont des protéines essentielles pour la fidélité de la traduction du code génétique, car elles garantissent que l'acide aminé estérifié à l'extrémité de l'ARNt correspond au bon anticodon. Ce sont des enzymes très anciennes, dont l'origine est estimée antérieure à LUCA (Last Universal Common Ancestor). L'enzyme possède trois sites distincts, l'un pour la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) afin de l'activer, l'autre pour la liaison de l'acide aminé spécifique et le troisième site pour la fixation spécifique de l'ARNt. Ce sont les deux dernières caractéristiques qui valent aux aaRS

Box N°4 - Chez *Escherichia coli* il existe 22 aminoacyl-ARNt synthétases, une pour chaque acide aminé standard sauf la lysine qui en possède deux + la pyrrolysine.

d'être considérées comme garantes du code génétique, nommé communément le second code génétique. La reconnaissance spécifique entre l'aaRS et son ARNt correspondant implique des interactions spécifiques localisées dans la branche acceptrice et de la branche anticodon. Il existe cependant trois exceptions où il n'y a pas d'interaction au niveau de la branche anticodon : LeuRS, SerRS et AlaRS.

Leur structure quaternaire est variable, allant du monomère (ArgRS) au tétramère (AlaRS). Les aaRS sont classées en deux catégories :

- Les aminoacyl-ARNt synthétases de Classe I se fixent sur le petit sillon du bras accepteur, estérifient l'acide aminé en 2' de l'adénosine terminale de l'ARNt. Leur structure est organisée autour d'un domaine constitué d'une alternance d'hélices alpha et feuillets bêta, appelé pli Rossmann.

Box N°5 – Le pli Rossmann est une structure typique commune à de nombreuses enzymes utilisant un cofacteur nucléotidique (ATP, NAD+). Son nom provient de Michael Rossmann, qui fut le premier à souligner la fréquence de ce type de pli.

- Les aminoacyl-ARNt synthétases de classe II se lient par le grand sillon de son bras accepteur, estérifient l'acide aminé sur le 3'-OH de l'adénosine terminale de l'ARNt et possèdent une structure construite autour d'un feuillet bêta antiparallèle.

IV.1.2.B - Le mécanisme d'aminacylation

La réaction d'aminacylation se décompose en deux étapes. Les aaRS activent d'abord l'acide aminé en formant un aminoacyl-adénylate avec l'ATP. Cette activation induit une modification conformationnelle de l'aaRS rendant les sites de liaisons actifs à l'acide aminé et à l'ARNt. Ensuite, l'enzyme catalyse la formation de la liaison ester entre l'acide aminé activé et l'adénosine de l'ARNt.



IV.2 - Les étapes du cycle traductionnel

La synthèse protéique est un processus complexe, auquel participent les ARN messagers (ARNm), les ARN de transfert (ARNt) et le ribosome, mais aussi de nombreux facteurs protéiques. Ce processus peut se diviser en quatre grandes étapes distinctes : le démarrage (ou initiation), l'élongation, la terminaison et le recyclage (Figure 5).

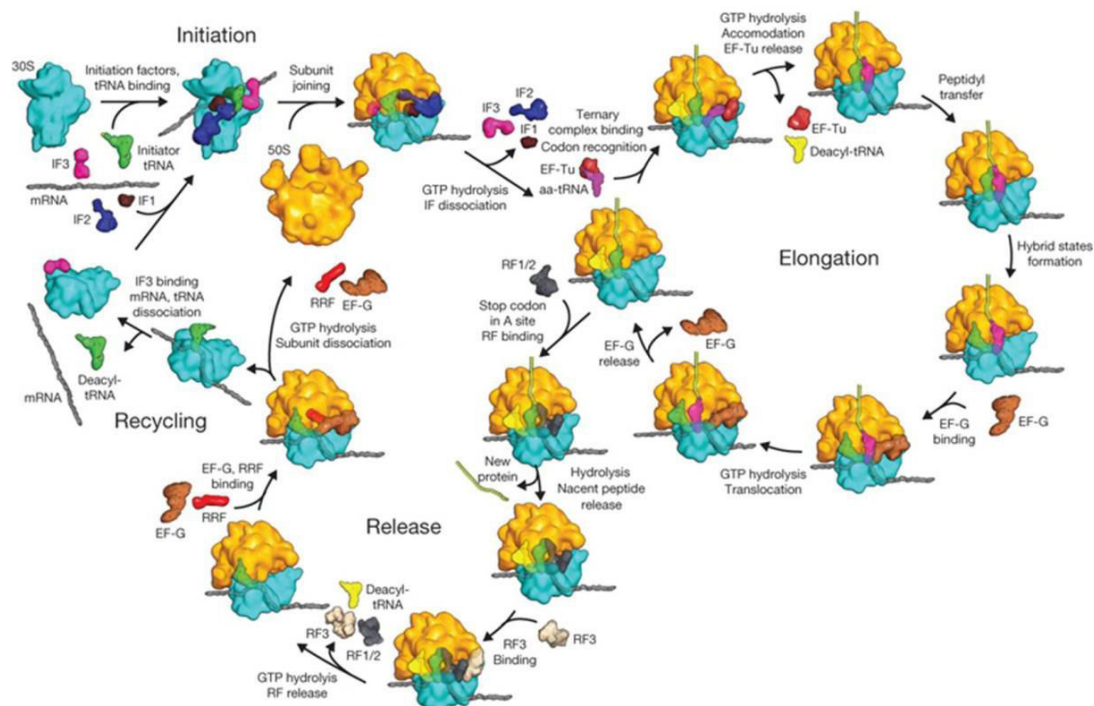


Figure 5. Le cycle de traduction bactérienne. D'après T. Martin Schmeing & V. Ramakrishnan, 2009, *Nature*. Les quatre grandes étapes distinctes y sont présentées : le démarrage (Initiation), l'élongation (Elongation), la terminaison (Release) et le recyclage (Recycling).

IV.2.1 – L'initiation de la traduction

IV.2.1.A - Introduction – L'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est l'étape de régulation post-transcriptionnelle de l'expression d'un grand nombre de gènes et joue également un rôle important dans la stabilité des ARNm. La phase d'initiation de la traduction commence par la formation d'un complexe d'initiation 30S (30S-IC), dans lequel une région de l'ARNm dite d'initiation à la traduction (TIR) est décodée par l'anticodon CAU de l'ARNt-fMet. Le 30S-IC est alors rejoint par la grande sous-unité ribosomique pour donner un complexe d'initiation 70S (70S-IC). Trois protéines, les

facteurs d'initiation (IF) IF1, IF2 et IF3, déterminent la cinétique et la fidélité de l'ensemble du processus d'initiation. Les trois IFs se lient au complexe 30S-IC, et sont dissociées du ribosome pendant la transition 30S-IC → 70S-IC. IF2 est le dernier facteur à se dissocier, laissant le ribosome prêt pour la formation de la première liaison peptidique et le début de la phase d'élongation de la synthèse protéique. Il existe deux autres types d'initiations non canoniques, *via* les ARNm « leaderless » (dépourvus de séquence de Shine Dalgarno) et le « 70S-scanning ». Ce dernier mécanisme, récemment découvert, intervient lors de la traduction d'un ARNm codant pour plusieurs gènes. Après la traduction de la première séquence codante le ribosome ne se dissocie pas, et balaye la séquence en aval à la recherche d'un nouveau site d'initiation (Yamamoto *et al.*, 2016).

IV.2.1.B - Caractéristiques de la région TIR de l'ARNm

Bien que le triplet AUG soit de loin le codon d'initiation le plus fréquent, d'autres triplets d'initiation sont possibles, notamment GUG, UUG, AUU, AUC et AUA, ayant pour point commun la base U centrale. Parmi ces triplets, seuls ceux ayant un 3'-G (AUG, GUG et UUG) sont reconnus comme " canoniques". De plus, le codon d'initiation AUG est utilisé comme signal fort pour permettre la traduction d'ARNm « leaderless ». Aucun autre codon potentiel (GUG, UUG ou CUG) ne peut remplacer AUG dans cette fonction.

Une autre caractéristique de la région TIR de l'ARNm est la présence de la séquence de Shine-Dalgarno (SD) et de la séquence complémentaire à d'extrémité 3' de l'ARNr 16S (anti-SD ou aSD). Le SD est constitué de 3 à 9 nucléotides consécutifs situés idéalement à une distance de 4 à 9 nucléotides chez *Escherichia coli* en amont du codon d'initiation. La séquence Shine-Dalgarno canonique complète est la suivante : AGGAGGUAA. Elle est rarement retrouvée sous la forme complète, et comporte généralement 4 à 6 nucléotides (exemples : AGGA ou GGAGG).

Lors de la formation du complexe d'initiation, cette séquence forme un appariement ARN-ARN avec l'anti-SD à l'extrémité 3' de l'ARN ribosomique 16S, ce qui permet de pré-positionner le ribosome. En fonction de la séquence, un SD peut avoir des interactions plus ou moins fortes avec son anti-SD. C'est lors de la formation de la première liaison peptidique que les interactions SD:anti-SD sont déstabilisées, ce qui est indispensable pour le mouvement de l'ARNm le long du ribosome au cours de la première étape de translocation (Uemura *et al.*, 2007). Les données disponibles suggèrent que le duplex SD:anti-SD formé en

amont du triplet d'initiation confère à un ARNm donné un excellent moyen de renforcer l'affinité thermodynamique du complexe productif 30S-ARNm et donc d'augmenter le nombre global de traductions.

IV.2.1.C - Les étapes conduisant à la formation d'un ribosome fonctionnel

La transition du complexe 30S de pré-initiation (30S pre-IC) vers le 30S-IC implique un mécanisme de verrouillage qui repose sur le changement conformationnel du fMet-ARNt induit par IF2 et l'ARNm, qui stabilise les interactions entre les différents ligands. Le verrouillage est l'étape limitant la vitesse de formation du complexe 30S-IC. L'étape d'association des deux sous-unités représente le deuxième point de contrôle de l'initiation de la traduction (Figure 6).

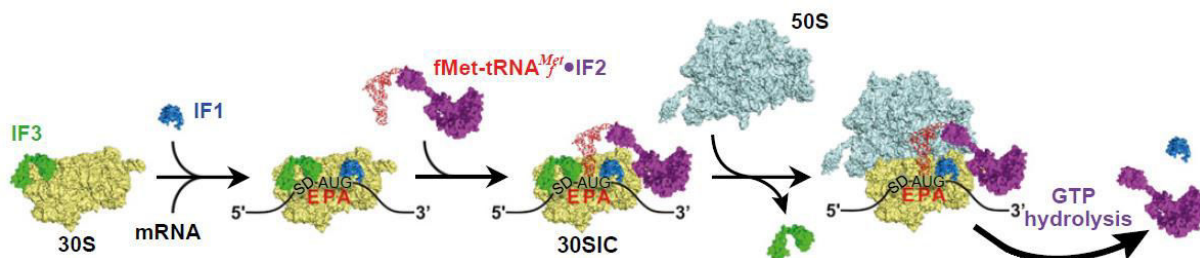


Figure 6. Schéma simplifié de l'initiation bactérienne. D'après Hiroshi Yamamoto et al., 2016, PNAS. Enchaînement du recrutement des facteurs d'initiation IF1 (bleu), IF2 (violet) accompagné de l' $fMet-ARNt^{fMet}$ (rouge) et IF3 (vert) à la sous-unité 30S (jaune). L'arrivée de la sous-unité 50S (bleu) au complexe 30S-IC provoque l'hydrolyse du GTP d'IF2 et le départ des facteurs.

Le facteur IF3 est le premier facteur à se lier à la sous-unité 30S, formant un complexe instable. La liaison ultérieure d'IF1 stabilise les facteurs au 30S. Ce complexe sur lequel l'ARNm est recruté, ainsi qu'IF2 lié à la branche acceptrice du fMet-ARNt^{fMet}, forme le complexe de transition 30S pré-IC. Le passage du complexe pré-IC au 30S-IC est accompagné d'une stabilisation de l'interaction 30S-ARNm entièrement attribuable à la mise en place de l'ARNm dans le canal messager ainsi qu'à l'appariement codon-anticodon dans le site P. Cette étape réduit l'affinité d'IF3 au 30S-IC, ce qui facilite l'accostage de la sous-unité 50S.

Le 30S-IC, contenant ses ligands canoniques (fMet-ARNt^{fMet}, l'ARNm avec un codon d'initiation et les trois facteurs d'initiation), est très rapidement accosté par la sous-unité ribosomique 50S, donnant naissance à un complexe 70S-IC initialement instable. IF3 se dissocie en même temps que la mise en place des ponts 30S-50S lors de la fixation du 50S au

complexe 30S-IC (*Fabbretti et al.*, 2007). Le complexe 70S-IC présente une rotation des deux sous-unités (voir chap. élongation). Le contact entre IF2 et le GAC (GTPase Activating Center) et la SRL (α - Sarcin Ricin Loop) de la sous-unité 50S déclenche l'hydrolyse du GTP d'IF2. Le phosphate inorganique (Pi) produit n'est pas libéré instantanément, et reste lié avec IF2 sur le ribosome sous forme GDP-Pi. Pendant ce temps, le complexe subit les modifications structurales nécessaires pour devenir productif ; essentiellement le départ d'IF1, le déplacement d'IF2 et le retour du ribosome dans un état classique. La dissociation du Pi de IF2 promeut son changement de conformation, perdant ainsi son contact avec le fMet-ARNt^{fMet}, dont l'extrémité acceptrice peut maintenant se loger dans le site de P. Suite au départ d'IF2, le ribosome fonctionnel peut débiter le cycle d'élongation (Gualerzi and Pon, 2015).

IV.2.2 - L'élongation

IV.2.2.A - Introduction – L'élongation

Le cycle d'élongation est un processus en plusieurs sous-étapes aboutissant à l'addition séquentielle d'acides aminés à la chaîne polypeptidique en croissance. Chaque cycle d'élongation permet d'apporter un nouvel acide aminé, ce qui implique une sélection précise de chaque ARNt dicté par le codon de l'ARNm, la catalyse de la formation d'une liaison peptidique, et le mouvement des ARNt et de l'ARNm. Le processus nécessite deux facteurs GTPasiques : le facteur d'élongation thermo instable (EF-Tu) et le facteur d'élongation G (EF-G). À chaque sous-étape de grands changements conformationnels se produisent au sein du ribosome.

Box N°6 - EF-Tu es la protéine la plus abondante dans la cellule bactérienne, représentant jusqu'à 5% des protéines totales.

IV.2.2.B - Les étapes du cycle d'élongation

IV.2.2.B.1 - Liaison du complexe ternaire

La liaison du complexe ternaire est rapide et indépendante de l'ARNm *via* des interactions avec la protéine bL12. Une fois le complexe lié au site A du ribosome, l'ARNt est positionné pour interagir avec le codon de l'ARNm. La reconnaissance correcte codon-anticodon induit un changement conformationnel. Dans l'ARNr 16S des résidus très conservés, A1492, A1493 de l'hélice h44 et G530 de l'hélice h18, interagissent avec la première et la deuxième base de l'anticodon. De plus, la sérine 46 (nomenclature *Escherichia coli*) de la protéine ribosomique uS12 est impliquée dans la reconnaissance de la seconde paire de bases. Tous ces éléments constituent le centre de décodage.

IV.2.2.B.2 - Le décodage

IV.2.2.B.2.1 -Introduction – Reconnaissance codon-anticodon

L'appariement codon-anticodon se fait dans le ribosome, par complémentarité de bases. De manière évidente, ce sont les positions 34, 35 et 36 de l'ARNt, correspondant à l'anticodon, qui interviennent dans la reconnaissance. Les modifications post-traductionnelles situées dans la tige-boucle anticodon sont également importantes lors du processus. D'autre part, en 1966, F. Crick énonce des règles d'associations codon-anticodon grâce auxquelles un nombre minimal de 32 ARNt est nécessaire (wobble hypothesis) (Crick, 1966). En effet, il est possible

que des ARNt possèdent un nucléotide non canonique en position 34 de leur anticodon : l'inosine (renfermant une base inhabituelle : l'hypoxanthine) qui peut s'associer (faiblement) par liaisons hydrogène avec U, C ou A. Ces appariements non canoniques sont appelés le « wobble pairing » (littéralement « appariement bancal ») et permettent donc de réduire le nombre d'ARNt nécessaires à la traduction du code génétique, en autorisant la lecture de différents codons synonymes par un seul et même ARNt.

Les nucléotides adjacents jouent également un rôle dans la reconnaissance codon-anticodon. Ainsi la position 33 est toujours un uracile (U) jamais modifié. A l'inverse, la position 37 est une purine (A ou G) fréquemment modifiée. Le rôle de celle-ci est associé au maintien à la fois de l'efficacité et de la fidélité de la traduction. Cette modification est fréquente lorsque la base en position 36 est une adénine ou un uracile. Effectivement, pour les interactions A:U ou U:A, la modification empêche la formation de paires de bases dans la structure tige-boucle de l'anticodon et réduit ainsi le risque de déphasage (Vendeix *et al.*, 2008). Étonnamment d'autres bases situées dans le corps de l'ARNt jouent également un rôle dans cette reconnaissance en intervenant dans la distorsion de l'ARNt au cours du processus de décodage.

Il est désormais évident que le ribosome ne fait aucune distinction entre la géométrie des paires de bases « Watson-Crick » et « wobble pairing ». Le mécanisme actuel établit en outre que la discrimination entre les ARNt est principalement fondée sur l'ajustement spatial, notamment grâce à la conformation unique et caractéristique de chaque ARNt, plutôt que sur le nombre de liaisons hydrogène entre le centre de décodage et le duplex codon-anticodon (Rozov *et al.*, 2016).

IV.2.2.B.2.2 - Les étapes du décodage

Le processus de décodage se décompose en une série d'étapes comprenant : (a) la liaison rapide et réversible du complexe ternaire au centre de décodage ; (b) la stabilisation de l'ARNt ; (c) la communication entre l'ARNt apparié et EF-Tu•GTP ; (d) le déclenchement de l'hydrolyse du GTP ; (e) la dissociation d'EF-Tu•GDP du ribosome et l'accommodation de l'ARNt dans le centre de transfert peptidique (PTC).

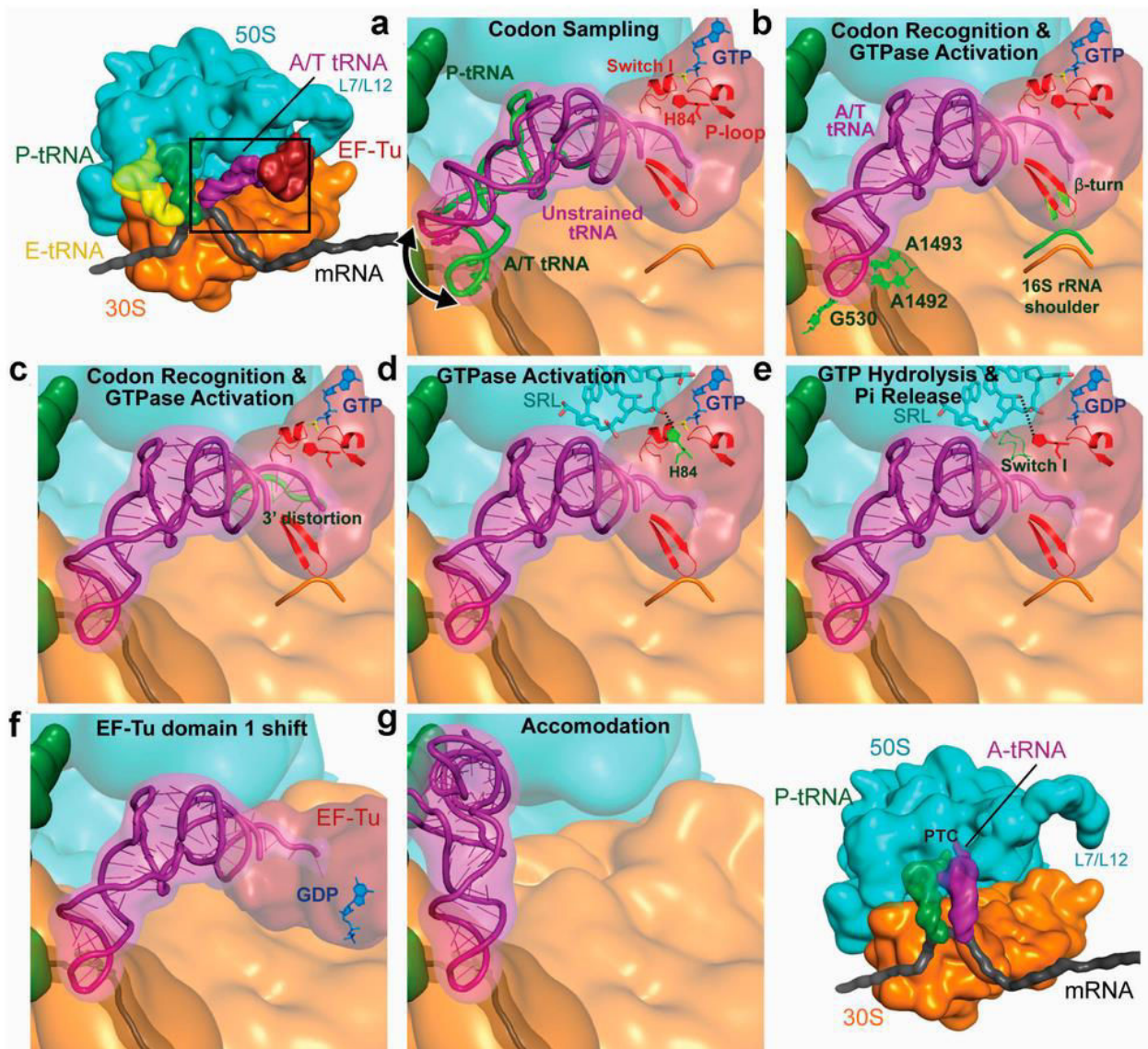


Figure 7. Les différentes étapes de l'arrivée d'un nouveau ARNt par EF-Tu au ribosome. D'après Voorhees R.M et Ramakrishnan V., 2013, *Annu. Rev. Biochem.* L'image (a) explique le code couleur utilisé.

IV.2.2.B.2.2.1 - Distorsions dans le Corps de l'ARNt

En plus de l'appariement des bases codon-anticodon, le corps de l'ARNt joue également un rôle essentiel dans le décodage. La liaison du complexe ternaire au ribosome entraîne en effet la formation d'un état A / T de l'ARNt. Cette conformation induit deux zones de déformation de l'ARNt : une torsion de la tige anticodon et un mouvement de la tige D par rapport à la tige T. La séquence du corps de l'ARNt qui permet sa déformation pour être dans l'état A/T est réglée avec précision à l'identité de l'acide aminé, tout comme la force d'interaction codon anticodon. Ainsi, chaque ARNt possède un équilibre d'énergie unique qui permet un décodage précis.

IV.2.2.B.2.2.2 - Facteur d'élongation Tu

En même temps que la déformation du corps de l'ARNt, EF-Tu subit un réarrangement conformationnel. EF-Tu est composé de trois domaines : le domaine 1 ou domaine GTPasique dont la structure et la séquence sont conservées dans tous les GTPases ; le domaine 2 qui est localisé au niveau de l'épaule du 30S lors de sa liaison ; le domaine 3 qui intervient dans les interactions avec l'ARNt.

IV.2.2.B.2.2.3 - L'activation de la GTPase et l'hydrolyse du GTP

L'hydrolyse du GTP est initialement empêchée par une porte hydrophobe composée des résidus Val20 et Ile60. Lors de l'activation GTPasique, l'Histidine 84 passe la porte hydrophobe et coordonne une molécule d'eau qui attaque le γ -phosphate du GTP. Les mouvements à l'intérieur de EF-Tu (β -tour), de l'ARNt (extrémité 3') et du ribosome (fermeture tête/épaule du 30S) sont nécessaires pour l'activation GTPasique.

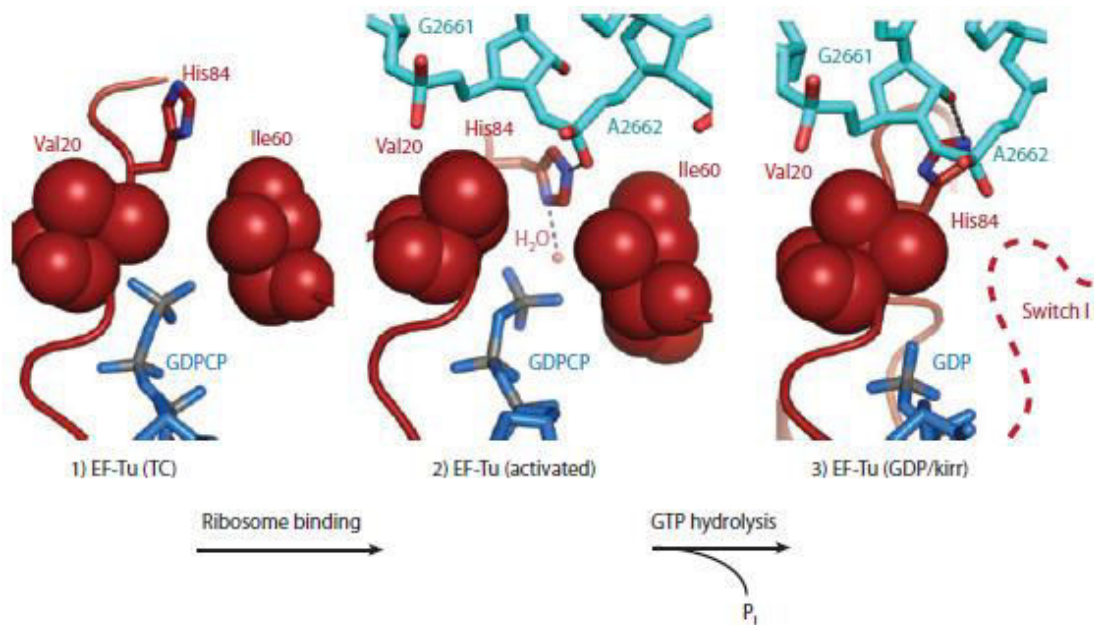


Figure 8. Hydrolyse du GTP d'EF-Tu lors de l'élongation. D'après Rebecca M. Voorhees et V. Ramakrishnan, 2013, *Annu. Rev. Biochem.* Conformation d'EF-Tu avant liaison au ribosome, l'histidine est dans une conformation catalytique inactive, éloignée du GTP. EF-Tu lié au ribosome en interaction avec le résidu A2662 de la boucle de sarcine ricine (SRL) (cyan) active l'hydrolyse en positionnant l'His84 (switch II) dans le site actif. Après hydrolyse du GTP et la libération de P_i, la boucle du switch I (Ile60) est désordonnée (ligne pointillée) et His84 est revenue à une conformation inactive, en contact avec le résidu G2661 du SRL.

À la suite de l'hydrolyse du GTP et de la libération du P_i, les interactions avec la boucle du switch I (Figure 8) se désordonnent. EF-Tu subit alors un changement conformationnel, ce qui implique une rotation du domaine 2 par rapport au domaine 3. Ce mouvement perturbe les interactions du domaine GTPasique avec la boucle SRL du 21S, ainsi que ceux entre switch II (Figure 8) et le bras accepteur de l'ARNt. L'ensemble de ces réarrangements affaiblit les interactions d'EF-Tu-GDP avec le ribosome et provoque sa dissociation.

IV.2.2.B.2.2.4 - Hébergement et Relecture

Après la sortie d'EF-Tu, l' aminoacyl ARNt est essentiellement maintenu sur le ribosome par ses interactions avec le centre de décodage. Bien que les ARNt non correspondant soient pour la plupart rejetés lors de l'étape initiale, ils peuvent aussi se dissocier du ribosome après hydrolyse du GTP, lors d'une sous-étape nommée « proofreading ». Effectivement, un ARNt mal apparenté possède des interactions plus faibles avec le centre de décodage, et se dissocie plus facilement. À l'inverse, un ARNt avec de fortes interactions au centre de décodage a donc une conformation stable, ce qui facilite son logement dans le centre peptidyl transférase. Le positionnement de l' aminoacyl-ARNt dans le centre de transfert peptidique conduit à la

formation rapide d'une liaison peptidique, ce qui représente la fin d'un cycle de décodage réussi.

IV.2.2.C - Le transfert peptidique

La liaison peptidique est réalisée dans le centre de transfert peptidique (PTC) qui réside au cœur de la grande sous-unité ribosomique. Le PTC est un ribozyme qui catalyse les deux principales réactions chimiques de synthèse protéique : formation d'une liaison peptidique et libération du peptide. La liaison peptidique est une attaque nucléophile du groupement amine de l'aa-ARNt sur le carbone du groupement carboxyl de la liaison ester du peptidyl-ARNt, formant ainsi une nouvelle liaison peptidique.

Les données biochimiques suggèrent que le transfert peptidique est catalysé par des effets entropiques seuls. Le PTC catalyse cette réaction principalement en formant un réseau de liaisons hydrogène qui positionne précisément les substrats et par l'exclusion d'une molécule d'eau. (Figure 9) (Hiller *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2005).

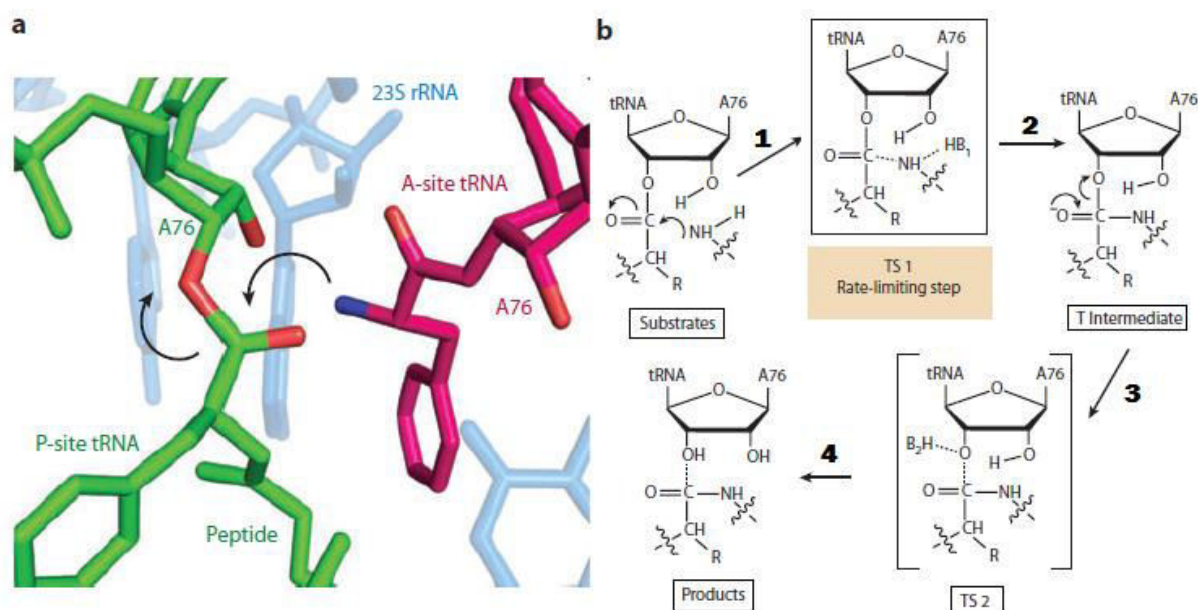


Figure 9. Le transfert peptidique via l'attaque nucléophile. D'après Rebecca M. Voorhees & V. Ramakrishnan, 2013, *Annu. Rev. Biochem.* (A) le transfert peptidyl implique l'attaque nucléophile du groupe α -amino de l'ARN de transfert aminoacyl (ARNt) (magenta) sur la peptidyl-ester de la peptidyl-ARNt (vert). (B) Schéma du mécanisme de l'attaque nucléophile et du transfert peptidique.

IV.2.2.D - La translocation

IV.2.2.D.1 - Introduction – La translocation

Après formation de la liaison peptidique, le ribosome dispose d'un ARNt déacylé dans le site P et un peptidyl-ARNt, allongé d'un résidu dans le site A. Dans l'étape suivante, connue sous le nom de translocation, les ARNt du site A et P (état de pré-translocation ou PRE) passent dans les sites P et E respectivement (état post-translocation ou POST), et l'ARNm se déplace précisément d'un codon, ce qui porte le codon suivant dans le site de décodage pour permettre un nouveau cycle d'élongation. La translocation est une propriété inhérente du ribosome, qui peut s'effectuer spontanément - quoiqu'extrêmement lent - dans les deux sens, en avant et en arrière. Dans la cellule, la translocation est favorisée par EF-G. La translocation comprend de grands mouvements avec de nombreux états intermédiaires et implique des changements conformationnels à grande échelle.

IV.2.2.D.2 - Les états intermédiaires durant la translocation

La translocation produit des états intermédiaires dans lesquels les ARNt se déplacent dans une sous-unité mais pas dans l'autre. Plus précisément, l'état hybride A/P et P/E des ARNt correspond à la position des extrémités CCA-3' des ARNt dans les sites P et E de la sous-unité 50S, tandis que leurs extrémités anticodon et l'ARNm restent ancrés dans la sous-unité 30S dans les sites A et P. Après la liaison d'EF-G et l'hydrolyse du GTP, l'ARNm et l'extrémité anticodon de l'ARNt se déplacent dans les sites P et E de la sous-unité 30S pour restaurer l'état canonique du ribosome, laissant le site A vide et prêt à accepter le prochain aminoacyl-ARNt. Un aminoacyl-ARNt dans le site A favorise l'état canonique A/A, alors qu'un peptidyl-ARNt favorise l'état intermédiaire A/P, ce qui démontre que le transfert peptidique entraîne la formation d'états hybrides, même en l'absence d'EF-G. De plus, seul un ARNt déacylé peut se lier au site E de la sous-unité 50S, assurant ainsi que l'état hybride P/E ne se forme qu'après le transfert du peptide. La formation de l'état P/E A/A précède la formation de l'état P/E A/P dans l'ordre des événements.

IV.2.2.D.3 - « Ratcheting » des sous-unités pendant la translocation

La formation d'états hybrides pendant la translocation est couplée à une rotation inverse des sous-unités. Ce mouvement, appelé « ratchet », correspond à la rotation de 7° de la sous-unité 30S par rapport à la sous-unité 50S. Cette rotation s'accompagne d'un mouvement de la protubérance uL1 vers l'intérieur du ribosome, ce qui stabilise l'état intermédiaire P/E de

l'ARNt (Figure 10). Dans l'état canonique, un rétrécissement ou une barrière entre la tête et la plate-forme de la sous-unité 30S inhibe la translocation de la tige anticodon de l'ARNt du site P au site E. Pour réaliser la translocation, la tête doit alors pivoter de 18° , un mouvement appelé « swiveling ». Plus exactement, la translocation se déroule au travers d'une série d'états intermédiaires de degré de rotation de la sous-unité 30S (« ratchet ») et de pivotement de la tête (« swiveling »).

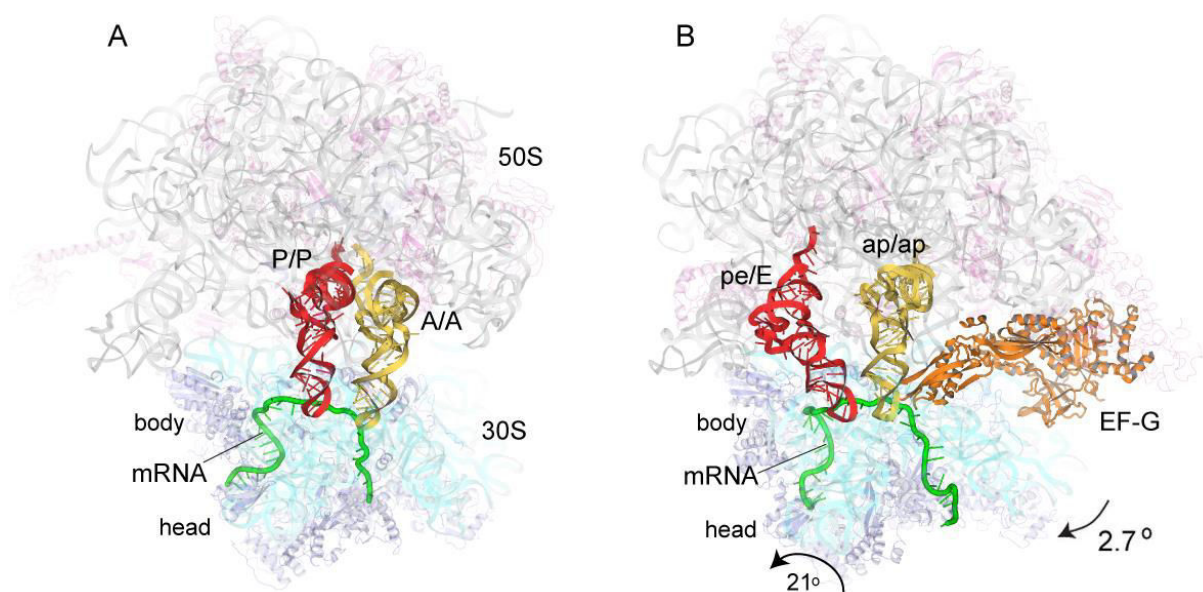


Figure 10. Structure du ribosome à l'état canonique et à l'état « ratcheté ». D'après Jie Zhou *et al.*, 2014, *Science*. (A) Ribosome à l'état canonique avec les ARNt en position A/A et P/P ; (B) État intermédiaire de la translocation montrant le ribosome à l'état ratcheté avec un fort « swiveling ». (Les angles de rotations sont indiqués) avec les ARNt en position hybride pe/E et ap/ap.

IV.2.2.D.4 - Mouvement de l'ARNm et des ARNt dans la sous-unité 30S

La seconde étape de la translocation catalysée par EF-G est le mouvement de l'ARNm et des ARNt par rapport à la sous-unité 30S. Le déplacement de l'ARNm s'effectue en simultané avec l'ARNt, et l'appariement des bases entre elles semble être maintenue tout au long de la translocation. Le domaine IV d'EF-G est en contact direct avec l'interaction codon-anticodon. Cette interaction est initialement formée dans le site A et persiste tout au long de la translocation. Cependant, l'action précise d'EF-G dans cette dernière étape de translocation n'est pas connue. L'affinité de l'ARNt pour le site E est diminuée lorsque le site A est occupé, et vice versa. Ainsi il ne se dissocie que lorsque l'aminoacyl ARNt suivant s'apparie au ribosome (Dinos *et al.*, 2005).

IV.2.2.D.5 - Facteur d'Elongation G

EF-G catalyse la translocation des ARNt et de l'ARNm dans le ribosome. La structure d'EF-G mime structurellement le complexe ternaire ARNt-EF-Tu•GTP (Figure 11).

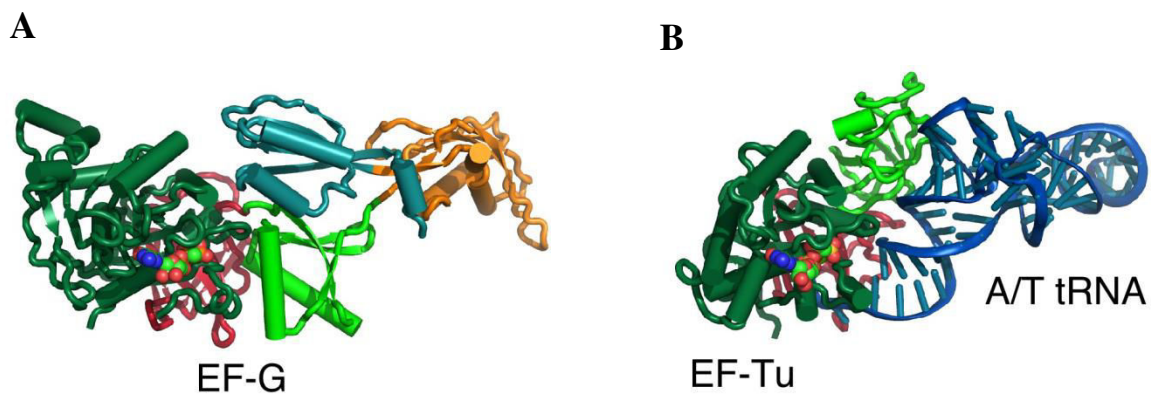


Figure 11. Comparaison structurale entre le complexe ternaire ARNt-EF-Tu•GTP et EF-G•GTP. D'après Pulk A and Cate JH, 2013, *Science*. Mise en lumière de la ressemblance structurale entre le complexe ARNt-EF-Tu et EF-G en présence tous deux de GTP. (A) Structure cristallographique d'EF-G•GTP avec les différents domaines indiqués : domaine I ou G (vert), domaine II (violet), domaine III (vert), le domaine IV (orange) et le domaine V (bleu). (B) Structure tridimensionnelle cristallographique d'EF-Tu•GTP-ARNt lié au ribosome lors de la reconnaissance codon/anticodon. EF-Tu•GTP domaine I (vert), II (violet) et III (vert clair) qui retient l'ARNt (bleu) par l'extrémité CCA3'.

EF-G•GTP peut se lier au ribosome, que ce dernier soit sous une forme pivotée (« ratchet ») ou non. EF-G accélère considérablement la translocation, le modèle actuel concluant que la fixation d'EF-G et l'hydrolyse du GTP conduisent à une étape de déverrouillage, qui est suivie par une translocation et un re-verrouillage. La question est de savoir si l'énergie libérée par l'hydrolyse du GTP est utilisée pour conduire la translocation directement, ou si elle est utilisée pour fournir un gradient d'énergie libre pour un « ratchet brownien ». Cette dernière hypothèse est actuellement privilégiée (Chen *et al.*, 2016).

IV.2.2.D.6 - L'État de post-translocation

Un mouvement de retour de la sous-unité 30S (rotation inverse du ratchet) remet le ribosome dans l'état canonique avec des ARNt dans les sites P et E. Lors de ce mouvement, il a été suggéré que uL1 tire l'ARNt à partir du site hybride P/E au site E, du fait des contacts entre uL1 et l'ARNt à l'état P/E (Valle *et al.*, 2003). Cependant, le mutant uL1 montre une performance inchangée de la réaction de translocation, indiquant qu'il est peu probable que uL1 joue un rôle actif dans la translocation (Sander, 1983). À la fin de la translocation, la

pointe du domaine IV d'EF-G est dans le site P en contact avec le couple codon-anticodon. Après le départ d'EF-G, le site A est pourvu d'un nouveau codon. Lors de l'arrivée d'un nouvel ARNt dans le site A, uL1 pivote et s'éloigne de l'ARNt du site E (en conformation ouverte), qui est ainsi facilement libéré. uL1 pourrait donc avoir comme fonction d'être une porte pour le site E et de contrôler la libération de l'ARNt (Feng *et al.*, 2013; Rheinberger and Nierhaus, 1983).

IV.2.3 - La terminaison

Les cycles d'élongation continuent itérativement jusqu'à l'arrivée d'un codon de terminaison dans le site A. Ces codons ne sont pas reconnus pas des ARNt (sauf cas particulier de la sélénocysteine et de la pyrrolysine) mais par deux protéines, les facteurs de terminaison RF1 et RF2 (« Release Factors »). Le codon UAG est reconnu par RF1, UGA par RF2, tandis qu'UAA est reconnu par les deux facteurs. Les séquences de RF1 et RF2 sont homologues (Ito *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1995) et leurs structures tridimensionnelles sont semblables (Shin *et al.*, 2004; Vestergaard *et al.*, 2001). Les motifs tripeptidiques PxT (Pro-X-Thr) de RF1 et SPF (Ser-Pro-Phe) de RF2 leur confèrent une spécificité pour les codons stop UAG et UGA, respectivement. Les deux facteurs de terminaison libèrent la protéine de manière universelle en catalysant, *via* motif de GGQ (Gly-Gly-Gln), l'hydrolyse de la liaison ester entre le peptide et l'ARNt.

IV.2.3.1 - Structure des facteurs de terminaison et interaction avec le ribosome.

La fixation des facteurs de terminaison au site A du ribosome ne provoque pas de changement conformationnel à grande échelle du ribosome (Figure 12). Les facteurs de terminaison se composent de quatre domaines. Le domaine I est lié au centre GTPasique (uL11 ribosomal protein). Le domaine II possède le motif PxT pour RF1 qui permet la reconnaissance spécifique des codons stop UAA et UAG, et le motif SPF pour RF2 qui reconnaît UAA et UGA. Le domaine III interagit avec le peptidyl-ARNt et possède le motif GGQ responsable de l'hydrolyse peptidique. Entre le domaine III et IV il y a une « switch loop » conservé qui intervient également dans la reconnaissance du codon stop. Enfin le domaine IV qui participe au réarrangement structural du facteur de terminaison après reconnaissance du codon stop.

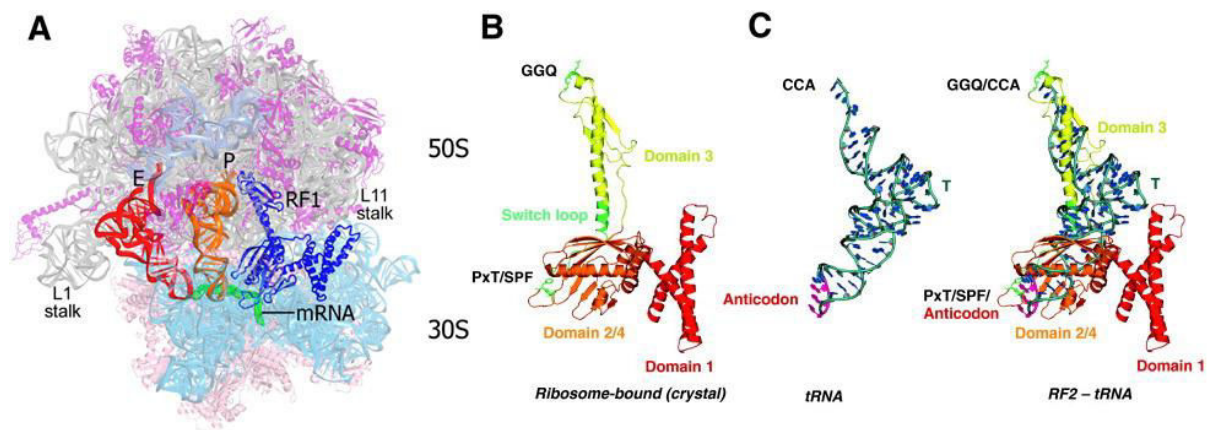


Figure 12. Structure du facteur de terminaison RF1 et RF2. Adapté d'après Andrei A. Korostelev, 2011, *RNA* et Bruno P. Klaholz, 2011, *Trends in Biochemical Sciences*. (A) Structure du ribosome en complexe avec RF1 (bleu). (B) Structure de RF2 dans la conformation liée au ribosome. La structure est colorée en fonction de l'organisation des quatre domaines; GGQ, PVT/SPF motifs ainsi que la « switch loop » sont indiqués en vert. (C) Comparaison d'un ARNt dans le site A aux domaines 2, 3 et 4 de RF2.

IV.2.3.2 - Reconnaissance du codon de terminaison

Les motifs PxT et SPF servent "d'anticodons tripeptidiques" (Wilson *et al.*, 2000). Les acides aminés situés dans d'autres régions de facteurs de libération, sont également impliqués dans la reconnaissance du codon stop (Ito *et al.*, 1998). La reconnaissance du codon stop implique des éléments conservés de RF1 / RF2 et l'ARNr 16S (Figure 13). Trois nucléotides clés de l'ARN 16S, du centre de décodage universellement conservé G530, A1492 et A1493, subissent des changements conformationnels cruciaux pour la reconnaissance du codon stop. Les nucléotides du codon stop sont appelés U1, A2 ou G2, et A3 ou G3. La reconnaissance du nucléotide U1 s'effectue par la formation de liaisons hydrogènes spécifiques avec la pointe d'une hélice du facteur de terminaison. Ces interactions sont identiques pour RF1 et RF2 et représentent la caractéristique universelle de la présence d'un uracile en première position des trois codons d'arrêt. Pour le second nucléotide, les motifs PxT et SPF définissent la spécificité des facteurs de libération (Korostelev *et al.*, 2010; Laurberg *et al.*, 2008). Intervient également dans la spécificité tout un réseau d'interaction hors du motif Pxt et SPF (Young *et al.*, 2010). La reconnaissance du troisième nucléotide du codon stop s'effectue avec le nucléotide G530 du centre de décodage. Pour RF1 c'est la présence d'une glutamine à l'extrémité N-terminale de la boucle de reconnaissance qui crée une liaison hydrogène avec l'A3 ou G3. Pour RF2, c'est une valine à cette position, qui ne peut réaliser cette interaction. Cela explique la capacité de RF1 à reconnaître un A ou G en troisième position (Korostelev *et al.*, 2008).

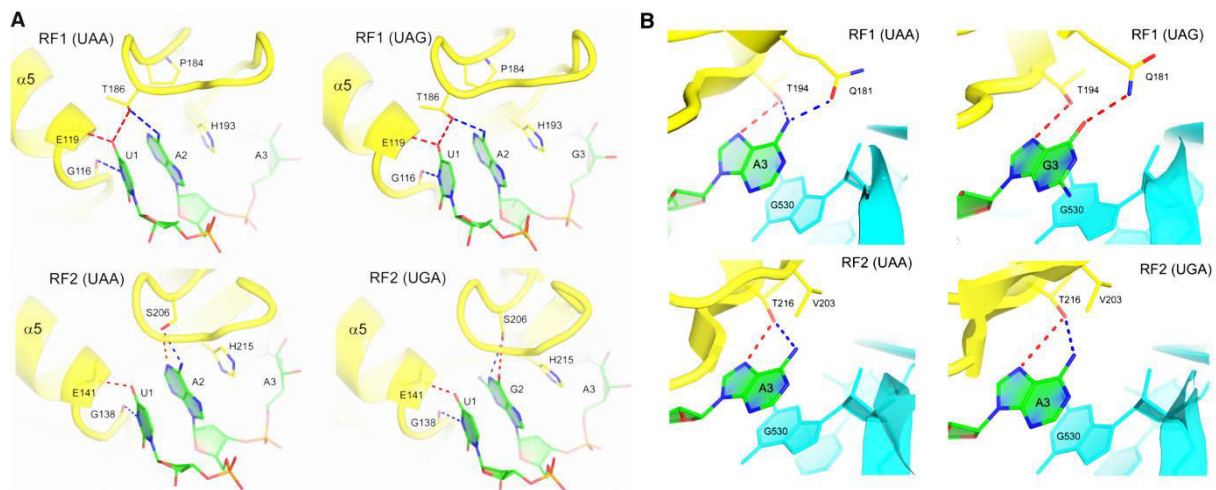


Figure 13. Reconnaissance spécifique des codons stop par les facteurs RF1 et RF2. D'après Andrei A. Korostelev, 2011, RNA. (A) Interactions entre les deux premières bases du codon stop UAA et UAG par RF1 et UAA et UGA par RF2. (B) Interactions entre la troisième base du codon stop UAA et UAG par RF1 et UAA et UGA par RF2.

IV.2.3.3 - Hydrolyse et libération de la protéine

L'hydrolyse du peptidyl ARNt est assurée par un motif tripeptidique universellement conservé GGQ (Gly-Gly-Gln). Le motif GGQ se lie au centre de transfert peptidique, aidé par des interactions spécifiques avec bL27 (Svidritskiy *et al.*, 2016). La petite taille du squelette des glycines permet un placement optimal du groupe NH₂ catalytique de la glutamine (Figure 14). Effectivement, la glutamine joue le rôle de catalyseur en stabilisant une étape intermédiaire dans la réaction d'hydrolyse, *via* une liaison hydrogène avec le groupe NH de son squelette.

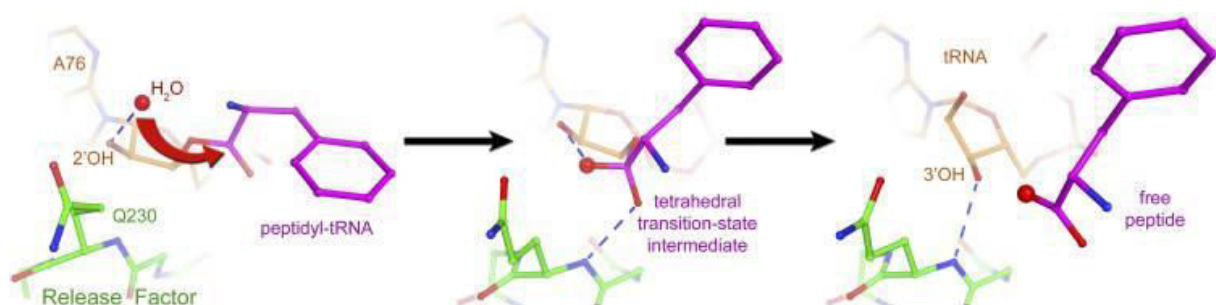


Figure 14. Schéma de la réaction d'hydrolyse du peptidyl-ARNt. D'après Andrei A. Korostelev, 2011, RNA. Le facteur de terminaison est en vert et le polypeptide en violet. La molécule d'eau est positionnée pour une attaque nucléophile du groupement OH du ribose 76 du peptidyl-ARNt. Puis un état de transition est stabilisé de (« tetrahedral transition-state intermediate »). Enfin le peptide est libéré après l'hydrolyse, le groupe OH 3' libre de l'ARNt du site P déacylé effectue une liaison hydrogène avec le squelette de la glutamine. Cependant, ça ne serait pas une molécule d'eau mais plutôt un ion hydroxyde qui réalise l'attaque nucléophile (Indrisiunaite *et al.*, 2015).

IV.2.3.4 - Départ des facteurs de terminaison

La libération de RF1/2 du ribosome est facilitée par RF3 d'une manière GTP-dépendante (Freistroffer *et al.*, 1997). RF3 libre dans le cytoplasme existe principalement dans la forme GDP. Contrairement à EF-Tu, l'échange du GDP en GTP pour RF3 s'effectue dans le ribosome *via* un complexe avec RF1/2 (Zavialov *et al.*, 2001). Après la libération de la protéine naissante, RF3•GDP est recruté sous une forme fermée. Après stabilisation rapide de RF3 au ribosome, le GDP est libéré et RF3 prend une conformation semi-ouverte. À ce stade, RF3 est en contact direct avec bL12, RF1/2 et la protéine uS12. Après le recrutement du GTP par RF3, RF3•GTP prend une conformation ouverte et induit un mouvement de rotation (ratchet) du ribosome qui provoque le départ de RF1/2 et place l'ARNt déacylé dans un état hybride P/E (Gao *et al.*, 2007). Cette conformation marque le début de l'activité GTPase de RF3 conduisant à l'hydrolyse du GTP et à la libération de Pi•RF3•GDP. Ce dernier se dissocie du complexe ribosomique dans sa conformation fermée et le ribosome est alors prêt pour le recyclage (Zavialov *et al.*, 2002).

IV.2.4 - Le recyclage

Afin de pouvoir recommencer un nouveau cycle de traduction, le ribosome nécessite une dernière étape afin que les deux sous-unités soient séparées et que l'ARNm et l'ARNt déacylé soient dissociés. Cette fonction est assurée par le facteur de recyclage du ribosome RRF (« Ribosome Recycling Factor ») associé à la protéine EF-G (Hirashima and Kaji, 1973). RRF se fixe au niveau du site A du ribosome « ratcheté », amenant l'extrémité de son domaine I à proximité de l'ARNt déacylé dans le site P (Pai *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2005). EF-G vient alors se fixer au complexe, induisant une rotation des domaines de RRF, qui effectue ensuite l'ouverture des ponts et divise les deux sous-unités du ribosome. EF-G, *via* la boucle II de son domaine IV, est directement impliqué dans la perturbation du principal pont entre hélice 44 (30S) et l'hélice 69 (50S) (B2a). EF-G est impliqué dans le processus de séparation finale en jouant un rôle actif en plus de faciliter l'orientation RRF. Enfin, lors de l'hydrolyse du GTP, EF-G change de conformation et sépare ainsi complètement le ribosome en deux sous-unités (Zhang *et al.*, 2015).

V - Gros plan sur EF-G : au cœur du mécanisme de translocation

V.1 - Introduction – Au cœur du mécanisme de translocation

Au cours d'un cycle d'élongation un ribosome oscille entre deux états principaux, à savoir la pré-translocation (PRE) et la post-translocation (POST), qui sont séparés par des barrières élevées d'énergie. Dans l'état PRE classique, les ARNt sont dans les sites A/A et P/P, puis après un mouvement de rotation (« ratchet ») de la petite sous-unité ribosomique, les ARNt se retrouvent dans des états intermédiaires A/P, P/E (état H1-PRE). Cette rotation est couplée à un mouvement de 30 ° vers l'intérieur de la protubérance L1.

V.2 - Le « swiveling » de la tête du 30S

Lorsque EF-G•GTP se lie à un état PRE ou H1-PRE du ribosome, il induit une forte modification conformationnelle du 30S : la tête pivote par rapport au corps (« swiveling ») d'environ 18 ° vers le site E. Dans les états intermédiaires de translocation, le complexe ribosome/EF-G contenant l'ARNm et deux ARNt dans un état hybride, où les anticodons ont déjà quitté les sites P et A de la petite sous-unité, mais n'ont pas encore atteint les sites E et P, respectivement. En conséquence, ces états hybrides observés sur les intermédiaires de translocation sont des inter-états appelés pe/E et les sites ap/P.

La tête de la petite sous-unité ribosomique est connectée au corps par une région appelée cou. Le mouvement de « swiveling » n'est pas juste un penchement de la tête au niveau du cou, mais plutôt une flexion en deux points d'articulation ou charnières (Mohan *et al.*, 2014). La première charnière se situe dans l'hélice H28, formée par la seule liaison covalente entre la tête et le corps. La seconde est non covalente, composée de l'hélice H35/36 de la tête, qui interagit avec l'hélice H2 du corps (Figure 15). Le mouvement des deux points d'articulation est strictement corrélé, conduisant au mouvement en un seul bloc de la tête, mais nous ignorons toujours comment EF-G déclenche ce mouvement.

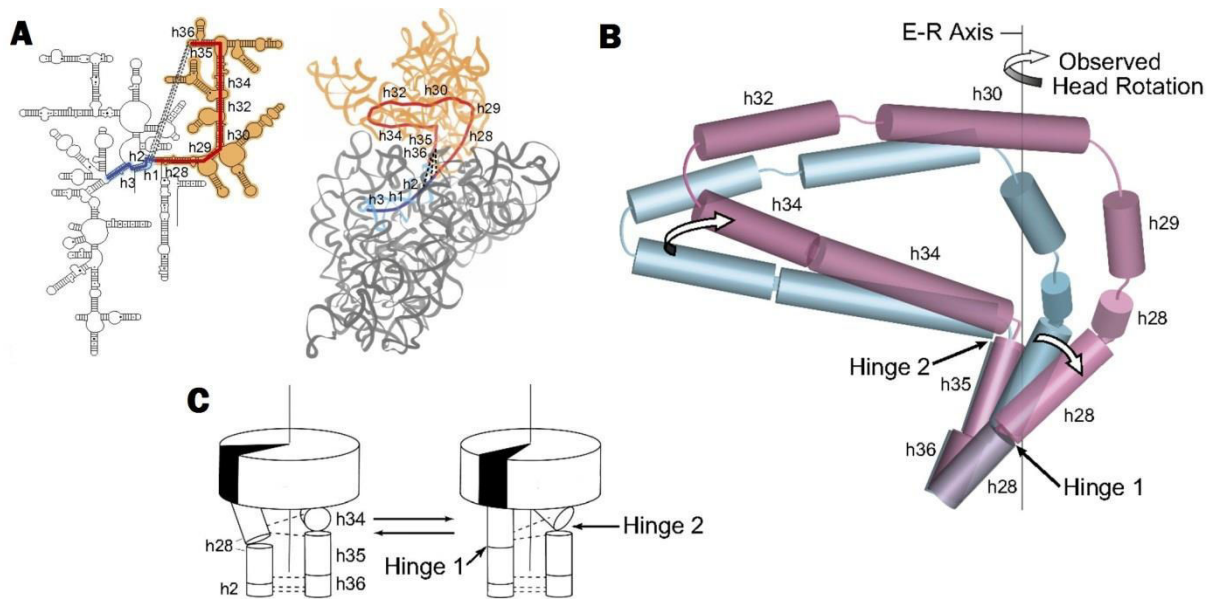


Figure 15. La rotation de la tête résulte de l'articulation concertée des charnières 1 et 2. D'après John Achenbach et Knud H. Nierhaus, 2014, *Biochimie*. (A) Structure secondaire et tertiaire des hélices formant le noyau de la tête 30S (rouge) ainsi que leurs connexions avec les hélices du corps (bleu). Les lignes en pointillés indiquent les connexions de l'hélice h36 et de h2. En orange, la structure de la tête et en grise la structure du corps. (B) Les flèches montrent le mouvement autour charnière 1 et charnière 2 et la rotation de la tête de domaine 30S autour de l'axe E-R. Les cylindres montrent la position des hélices dans pour l'état classique (bleu sarcelle) et l'état « swiveling » de la tête (magenta). (C) Lors de la rotation de la tête, le mouvement de la charnière 1 est provoqué par le redressement de l'hélice H28; le déplacement orthogonal de charnière 2 est le résultat du pivotement de l'hélice h34 autour de h35 statique. Les lignes pointillées représentent les interactions hydrogènes entre les deux charnières.

V.3 - Casser l'état PRE

L'ARNt du site A forme un réseau de liaisons hydrogène avec le codon et le centre de décodage (voir chap. Liaison du complexe tertiaire), stabilisant ainsi l'état PRE. Tous les résidus du centre de décodage appartiennent au corps du 30S. Pendant la rotation de la tête, le complexe ARNt/ARNm se déplace donc par rapport au corps. Il en résulte que ce réseau de liaisons hydrogène est affaibli ou perturbé avant que le duo ARNt/ARNm ne passe au site P. C'est notamment la pointe du domaine IV d'EF-G contenant deux boucles hautement conservées (boucles I et II) qui interagissent avec le centre de décodage par des liaisons hydrogène, en remplaçant le réseau de liaisons hydrogène du duplex codon-anticodon. Cela permet le déplacement concomitant du duo codon-anticodon du site A à P pendant la rotation de la tête.

V.4 - Le passage de l'ARNt du site P à E

En plus du mouvement de l'ARNt/ARNm du site A au site P, la sous-unité 30S est impliquée dans un deuxième mouvement, à savoir le déplacement de la tige-boucle de l'anticodon de l'ARNt du site P vers le site E. L'ARNt du site P doit passer une porte sur le chemin du site E, composée du résidu A790 de la plate-forme 30S et des résidus G1338-A1339-N1340-U1341 de la tête du 30S (Figure 16). Appelée porte A790, d'une largeur d'environ 14 Å (porte fermée), elle est trop étroite pour être traversée par une double-hélice d'ARN d'une largeur de 20 Å. Cette porte est ouverte à une largeur allant jusqu'à 24 Å exclusivement dans les états intermédiaires de translocation (Ratje *et al.*, 2010). Cette ouverture causée par l'EF-G est combinée à une forte rotation de la tête d'environ 18° (« swivelling ») (Zhou *et al.*, 2014).

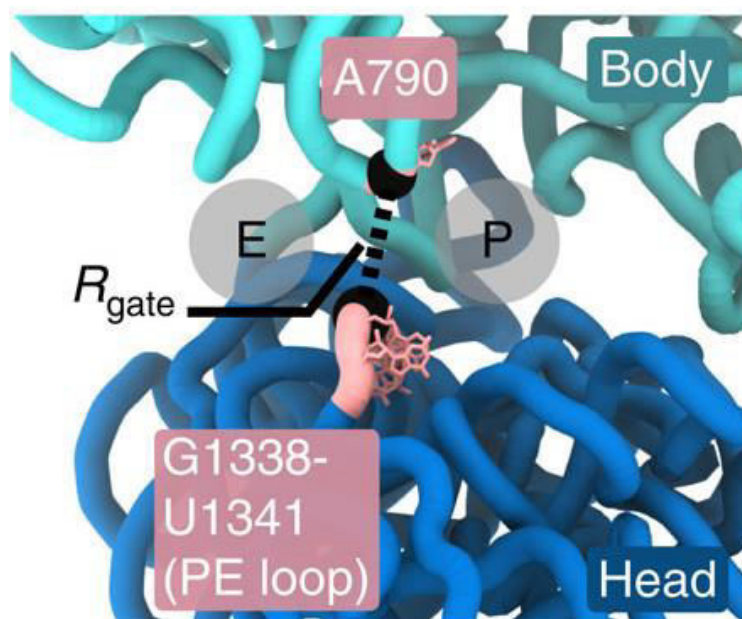


Figure 16. Ouverture et passage de l'ARNt de la porte G1338-A790 pendant la translocation. D'après Kien Ngyen et Paul C. Whitford, 2016, *Nature*. La boucle de PE entre les résidus G1338-U1341 de la tête et les résidus A790 du corps forme un pont séparant le site P et E. R_{gate} est la distance entre les atomes U1340 et A790 (perles noires), et sont utilisés comme référence pour mesurer l'ouverture et la fermeture de la porte.

V.5 - Contrôle du mouvement de l'ARNm

Le mouvement de l'ARNm est également contrôlé pendant la transition du PRE au POST. Les bases C1397 et A1503 de l'hélice H44 de l'ARNr 16S s'intercalent entre les nucléotides +9 et +10 et -1 et -2 dans les états intermédiaires de translocation, empêchant ainsi un retour coulissant de l'ARNm lors du retour de rotation de la tête du 30S. Dans l'état POST les deux nucléotides d'intercalation ne touchent pas l'ARNm (Figure 17).

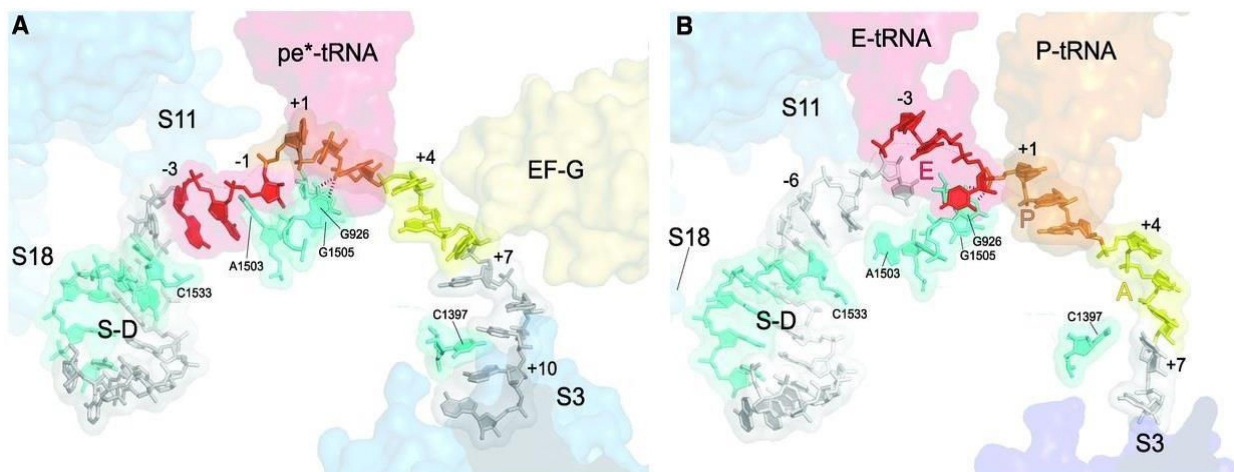


Figure 17. Vue des interactions entre l'ARNm et la sous-unité 30S. D'après Jie Zhou et al, 2013, *Science*. (A) l'ARNm lié à un état ratcheté du ribosome en complexe avec EF-G/Acide fusidic. (B) ARNm lié à un état classique du ribosome (POST). Les positions des protéines S3, S11 et S18 sont en bleues transparentes; également montré la position de EF-G (jaune); les tiges-boucles anticodon des ARNt P (orange), E et pe/E (rouge); l'hélice de Shine-Dalgarno en verte et grise (S-D). Les éléments de l'ARNr 16S sont en vert/cyan. L'ARNm en gris avec les codons du site A, P et E sont représentés en jaune, orange et rouge, respectivement.

V.6 - Rôle et déclenchement du centre GTPasique

Le rôle de l'activité GTPase d'EF-G pour la réaction de translocation a été controversé au cours des dernières décennies. Cependant des observations indiquent que l'énergie exploitée pour une réaction de translocation ne dérive pas de l'hydrolyse du GTP, mais plutôt d'une autre source. Par conséquent, EF-G n'est pas une protéine « moteur », mais plutôt une protéine G classique : lors de la liaison à sa cible (ici le ribosome PRE), ce dernier subit un changement conformationnel qui à son tour active le centre GTPase de la protéine G. La protéine G tombe dans sa conformation du GDP, desserre l'affinité pour la cible et se dissocie (Figure 18).

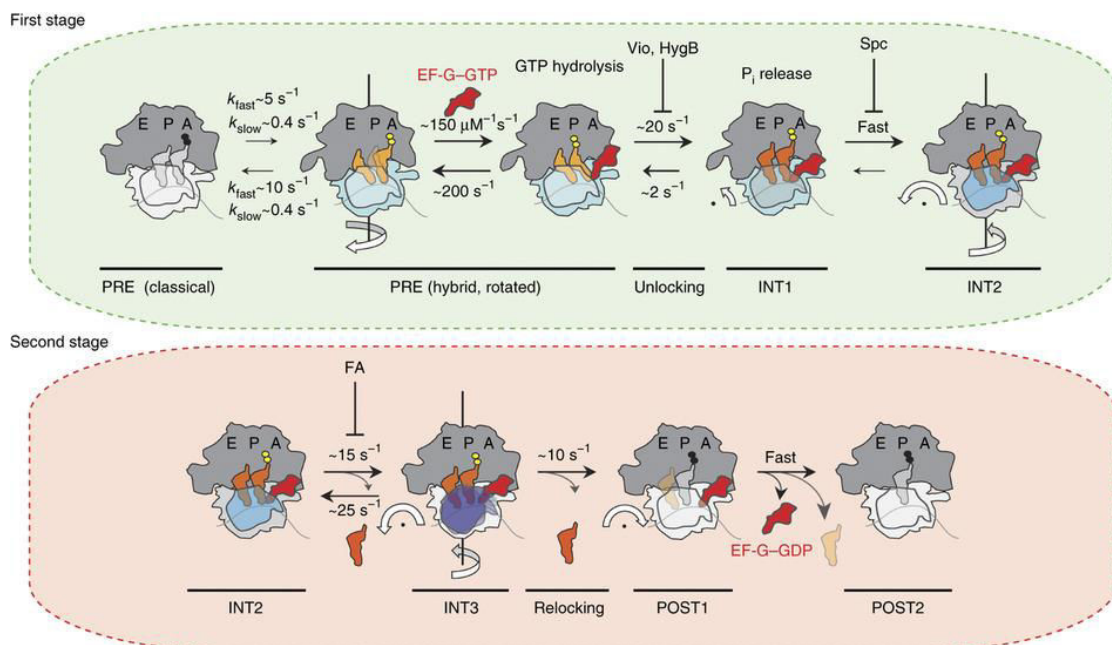


Figure 18. Modèle détaillé du mécanisme de translocation. D'après Wasserman MR et al., 2016, NSMB. EF-G•GTP se lie au complexe PRE et induit la rotation du 30S (gris-bleu), stabilisant ainsi la position hybride p/E et a/P des ARNt (orange clair). L'hydrolyse GTP et libération du phosphate inorganique (Pi) entraîne un déverrouillage du complexe PRE ainsi qu'un état intermédiaire compacté des ARNt (orange foncé). Cet état (INT1) est converti rapidement dans un état intermédiaire stable (INT2) affichant un pivotement de la tête (bleu) prononcé (18-21°) accompagné d'une légère rotation inverse du corps (gris). Les effets inhibiteurs de la viomycine (Vio), hygromycine B (hygB) et spectinomycine (Spc) sont indiqués. En bas, dans la deuxième étape de la translocation, un mouvement exagéré de tête (violet) conduit de manière réversible à un troisième intermédiaire transitoire (INT3). Un ARNt désacylé peut être libéré au cours de ce mouvement. A partir de cet état (INT3), le domaine de la tête pivote en sens inverse pour atteindre sa position non « ratcheté » de départ (blanc). Dans cet étape, l'ARNm et peptidyl-ARNt sont dans leurs configurations POST, ce qui est immédiatement suivi par la libération d'EF-G•GDP du ribosome.

VI - Article #2 | K. Macé, E. Giudice, S. Chat and R. Gillet

VI.1 - Introduction de l'Article #2

The structure of an elongation factor G-ribosome complex captured in the absence of inhibitors

K. Macé, E. Giudice, S. Chat and R. Gillet

Après traitement de l'hétérogénéité de l'échantillon lors de l'analyse des images, nous avons obtenu une structure à 3.9Å de résolution d'EF-G•GDP lié au ribosome en l'absence d'inhibiteur. Nous constatons une différence de positionnement du domaine III d'EF-G comparé aux structures connues. L'hydrolyse du GTP en GDP est confirmée par la visualisation directe du nucléotide GDP dans notre structure ainsi que par la déformation du « switch I » dans le domaine I d'EF-G.

L'analyse plus détaillée de cette nouvelle conformation d'EF-G révèle une perte d'interactions entre le domaine III et la protéine ribosomique S12. Une nouvelle interaction intra EF-G se forme entre le switch II (boucle du domaine I proche de la poche du GTP) et le domaine III. Ces résultats permettent de comprendre la réorganisation d'EF-G après hydrolyse du GTP. Ils permettent également d'expliquer le mécanisme d'action de l'acide fusidique, antibiotique qui bloque EF-G au ribosome.

VI.2 - Article #2

The structure of an elongation factor G-ribosome complex captured in the absence of inhibitors

Kevin Macé^{1*}, Emmanuel Giudice^{1*}, Sophie Chat¹ and Reynald Gillet^{1,2}

¹: Université de Rennes 1, UMR CNRS 6290 IGDR, « Translation and Folding Team»,
Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

²: Institut Universitaire de France.

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

Keywords: cryo-electron microscopy, elongation factor G, ribosome, translocation



Illustration réalisée par Viktor Koen: “The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology” (Ewen Callaway, 09 September 2015, Nature)

The structure of an elongation factor G-ribosome complex captured in the absence of inhibitors

Kevin Macé^{1*}, Emmanuel Giudice^{1*}, Sophie Chat¹ and Reynald Gillet^{1,2}

¹: *Université de Rennes 1, UMR CNRS 6290 IGDR, « Translation and Folding Team»,
Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France*

²: *Institut Universitaire de France.*

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

Keywords: cryo-electron microscopy, elongation factor G, ribosome, translocation

One sentence summary: The structure reported here reveals a hitherto unseen large motion of the third domain in EF-G, which helps clarify how fusidic acid antibiotics prevent EF-G release from the ribosome.

Abstract

During translation's elongation cycle, elongation factor G (EF-G) GTPase promotes messenger and transfer RNA translocation through the ribosome. Until now, the structures reported for EF-G-ribosome complexes have been obtained by trapping EF-G in the ribosome. These results were based on use of non-hydrolyzable guanosine 5'-triphosphate (GTP) analogs, specific inhibitors, or a mutated EF-G form. Here we present the first cryo-electron microscopy structure of EF-G bound to ribosome in the absence of an inhibitor. The structure reveals a natural conformation of EF-G•GDP in the ribosome, with a previously unseen conformation of its third domain. These data show how EF-G must affect translocation, and suggests the molecular mechanism by which fusidic acid antibiotics prevent the release of EF-G after GTP hydrolysis.

Main text: The ribosome is a large molecular machine performing protein synthesis, ‘translation,’ in all living cells. During translation’s elongation cycle, amino-acids are incorporated into a growing polypeptide chain through aminoacylated transfer RNA (tRNA) thanks to the decoding of mRNA codons. After each amino acid is added to the nascent peptide chain, the ribosome carries a peptidyl-tRNA at the aminoacyl A-site and a deacylated tRNA at the peptidyl P-site. In the next step, mRNA moves one codon length and the P- and A-site tRNA shift to the exit (E) and P-sites, respectively. In bacteria, this universal step of ‘translocation’ is catalyzed by elongation factor G (EF-G) (1). EF-G is a large GTPase protein made up of five distinct domains. The N-terminus (domains I-II) is separate from the C one (domains III-V), and a significant hinge-like joint motion probably occurs between the two (2). EF-G is structurally similar to the ternary complex made by EF-Tu with the incoming tRNA and guanosine 5'-triphosphate (GTP), with the third EF-G domain mimicking the acceptor arm and the fourth mimicking the tRNA anticodon stem-loop (ASL) (3). Translocation is divided into several small intermediate steps that permit a gradual shifting in tRNA positioning (4). Just after peptidyl transfer, tRNA are in what is called the pre-translocation (PRE) state, a classic A/A and P/P state. Then a reversible 7° rotation of one ribosomal subunit relative to the other (ratcheting) allows for movement of the tRNA into the large subunit from A- to P-, and from P- to E sites, leading to the occupancy of the A/P and P/E hybrid sites. EF-G binding to a PRE-state ribosome stabilizes the rotated state and triggers GTP hydrolysis (5). An internal 18° swiveling of the head relative to the small subunit body then leads to the final post-translocation state (POST), wherein only one tRNA is bound to the P-site and the E-site tRNA is released (4, 6, 7).

Several structures of ribosomal EF-G complexes were recently determined by X-ray or cryo-electron microscopy (cryo-EM). These yielded an accurate understanding of EF-G interactions and how they adjust with the ribosome along the translocation pathway between the PRE and POST states (3, 5, 8–14). So far, these detailed structures have been based on trapping EF-G in the ribosome *via* non-hydrolyzable GTP analogs, specific inhibitors (e.g., fusidic acid, thiostrepton, viomycin, and dityromycin), or a mutated form of EF-G. However, the use of these inhibitory conditions may have prevented the formation of relevant intermediate states. To explore how unobstructed EF-G acts in the ribosome, we performed experiments in the presence of natural GTP. To avoid extensive release of EF-G from the ribosome after GTP hydrolysis, we increased the EF-G/ribosome molecular ratio and used a

non-productive translation complex stalled on a truncated mRNA. To avoid competition with rescue systems (15), EF-G must leave the vacant decoding site after GTP hydrolysis (16), but without triggering translocation. We identify here how EF-G interacts with stalled ribosomes. The structure presented reveals a hitherto unseen large motion of the EF-G's domain III, indicating the molecular mechanism by which the antibiotic fusidic acid must prevent ribosomal release of EF-G after GTP hydrolysis.

Our single-particle cryo-EM reconstruction clearly shows extra densities for P-site tRNA and EF-G (Fig. 1). Compared to the classic ribosomal state (17), the 30S body is rotated slightly counterclockwise by $\sim 5^\circ$ with respect to the 50S subunit. This ratchet movement is lower than the 7° usually observed in PRE state ribosomes, but similar to that previously observed for complexes in intermediate POST states. This suggests a back-ratcheting of the 30S body after GTP hydrolysis but before complete translocation (6, 10, 18). The 30S head is also swiveled, but by only about 5° . This rather short swiveling may reflect the start of the partial back-swiveling movement of the head as tRNA transits from the hybrid P/E state to the classic E/E one.

As a result of 30S ratcheting, the P-site tRNA moves to an intermediate hybrid state between the ribosomal P- and E-sites. To better identify the position of the anticodon stem loop (ASL) with respect to these sites, we first aligned the small subunit's helix 44 to compare our structure with tRNA bound in intermediate PRE or POST states (8, 10). This showed that in our structure the ASL is positioned in a chimeric "pe" state, meaning that it interacts with parts of the 30S P-site head and E-site platform. More precisely, the ASL is positioned 7.5 \AA downstream from a canonical P-site ASL, and 16 \AA upstream from a canonical E-site one (8). This disposition resembles the structure recently described by Zhou and collaborators (10) in the presence of fusidic acid or GDPNP non-hydrolyzable analog of GTP (Fig. 1C). On the other hand, if aligned using the 23S rRNA, comparison of the same structures shows that in ours the acceptor stem has reached the E-site of the 50S subunit (Fig. 1D), and that the L1 stalk has moved inward into an intermediate conformation to interact with its elbow (Fig. S3). These interactions allow L1 to chaperone the p/E tRNA as it translocates to the E/E conformation (11). Overall, our data show the ribosome in an intermediate state, with a small

5° intersubunit rotation and a 5° swiveling of the 30S head. The tRNA is trapped in an intermediate pe/E translocation state.

In our structure, the EF-G density is well-defined and all five domains were easily attributed. Domains I, II, and V are stable and well-resolved, allowing for an accurate atomic reconstruction. On the other hand, domains III and IV are highly flexible and required the use of masked classification with residual signal subtraction in order to unambiguously attribute their electron densities.

The overall conformations and positions of domains I and II are very similar to that of previously-reported structures, in both PRE and POST states. Domain I is the GTPase active site of EF-G and contains switches I and II, two mobile elements that are essential for EF-G's unidirectional cycle during protein synthesis (16, 19). In our map, switch I (amino acids 38-64) is disordered (Fig. S4), a feature which is characteristic of EF-G after GTP hydrolysis into guanosine diphosphate (GDP) (3). Accordingly, the distinct density within the EF-G catalytic center correctly accommodates a GDP nucleotide molecule, but even at a high threshold it is too small for GTP (Fig. S4). The complex therefore looks like EF-G after GTP hydrolysis, including an intersubunit rotation and 30S subunit head swiveling, as well as having pe/E tRNA positioned close to the L1 stalk.

The switch II loop (amino acids 84-107) is one of the most stable EF-G elements in our complex (Fig. S6). The loop has moved away from the catalytic site to join domain III, and this conformation differs from all of the known structures of EF-G ribosomal complexes (Fig. 2). Due to a large motion of the third domain (see below), in that domain the Phe90 found in the tip of switch II interacts with Arg465 in the B3 helix. The switch II shift is similar to that encountered in crystal-free EF-G•GDP, confirming that the factor is frozen in a post-GTP hydrolysis conformation. However, the Phe90-Arg465 interaction is not seen in the free EF-G•GDP (Fig. S7).

Domain III is critical for EF-G activity, as its deletion impairs GTP hydrolysis and translocation (5, 20). Among the EF-G domains in our structure, it is the least well-defined,

suggesting its dynamic nature (Fig. S2). In comparison with the PRE state, domain III has moved toward domain V in a large motion of about 14 Å. This moves domain III away from s12, the only ribosomal protein located near the decoding site. It also allows new interactions to occur between domain III and switch II (Fig. 2). These data suggest that domain III is not part of a rigid body composed of domains III-V, but is instead subjected to large rotations during translocation (Movie S1). While this motion has never been described in structural studies, it has been suggested as a result of chemical crosslinking and single-molecule polarized fluorescence microscopy examinations of normal translocation (*i.e.* without blockers that might freeze the EF-G conformation) (21, 22). Our study shows the movement observed after GTP hydrolysis and before EF-G release, confirming that domain III can cause the subsequent movement of mRNA and tRNA (5). Unlike domain III, domain V does not undergo a large motion, although it is slightly pushed toward protein L11 (Fig. 2C)

The fourth domain establishes close contact with the decoding site on the small 30S subunit thus is critical for translocation catalysis. The decoding site cannot simultaneously bind tRNA and a translation factor, so obviously EF-G, and particularly domain IV, undergoes structural rearrangements during translocation (14, 23). Despite the absence of a codon, this domain fully occupies the decoding center in a similar location as in ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state (8), with loop I at the tip of domain IV extending toward the P-site to make contact with pe/E tRNA. Within helix 44, there is no deep remodeling of nucleotides G530, A1492, and A1493, as occurs during ribosomal tRNA selection (24). Thus this domain cannot directly interact with these nucleotides (Fig. 3) as it does during canonical translocation (13). This implies that EF-G detects the presence or absence of codon-anticodon interactions within the A-site by sampling the positions of these three nucleotides. Our results also confirm that the molecular clamp formed by these bases is necessary for triggering translocation, but not for EF-G binding and GTP hydrolysis (25), which are instead found to be due to EF-G flanking restrictions imposed by the III and V domains in the rotated ribosome (5).

According to various structures bound to fusidic acid (FA), the antibiotic bonds occur between domains II and III, preventing conformational changes in EF-G that are required for its release from the ribosome after GTP hydrolysis (8, 10, 12). In our map, obtained without

FA, domains I and III are linked through a hitherto unseen interaction between Phe90 and Arg465 (Figs 2, 4). We can therefore assume that after GTP hydrolysis, switch I disorganization causes the release of domain III, which then changes conformation. This movement allows new interactions to occur between domain III and switch II, triggering EF-G•GDP release from the ribosome (Movie S1). However, after GTP hydrolysis, FA replaces the switch I position on domain III and prevents binding of R465-F90 amino acids. As a consequence, EF-G preserves a “GTP-like” conformation and stays within the ribosome. This is in line with previous work showing that FA overlaps residues in the conserved core of switch loop I (10), and that the antibiotic interacts with both Phe90 and Arg465 (8). Consequently, mutation of these residues is known to confer FA resistance (26), and most FA-resistant EF-G mutations have altered switch II or domain III properties including these two amino-acids (26, 27).

Together, our data has provided an atomic model of EF-G•GDP bound to a rotated ribosomal state. The tRNA is in a chimeric intermediate pe/E state between the P/E and E/E ones, close to the L1 stalk of the large ribosomal subunit. The absence of translocation blockers allows for the first visualization of a large motion of EF-G’s domain III, a shift which leads to a close interaction between it and switch II. This conformational change occurs before the complete translocation of the tRNA from the P- to the E-site, and could therefore act as the facilitator for that final movement. This also explains how the antibiotic fusidic acid stops this conformational change and thus prevents EF-G release after GTP hydrolysis.

References

1. J. Achenbach, K. H. Nierhaus, The mechanics of ribosomal translocation. *Biochimie*. **114**, 80–89 (2015).
2. S. R. Connell *et al.*, Structural Basis for Interaction of the Ribosome with the Switch Regions of GTP-Bound Elongation Factors. *Mol. Cell*. **25**, 751–764 (2007).
3. A. Pulk, J. H. D. Cate, Control of ribosomal subunit rotation by elongation factor G. *Science*. **340**, 1235970 (2013).
4. W. Holtkamp, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, Synchronous tRNA movements during translocation on the ribosome are orchestrated by elongation factor G and GTP hydrolysis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **36**, 908–918 (2014).
5. W. Li *et al.*, Activation of GTP hydrolysis in mRNA-tRNA translocation by elongation factor G. *Sci. Adv.* **1** (2015), doi:10.1126/sciadv.1500169.
6. A. H. Ratje *et al.*, Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature*. **468**, 713–716 (2010).
7. R. M. Voorhees, V. Ramakrishnan, Structural Basis of the Translational Elongation Cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 203–236 (2013).
8. Y.-G. Gao *et al.*, The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science*. **326**, 694–699 (2009).
9. J. Lin, M. G. Gagnon, D. Bulkley, T. A. Steitz, Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during tRNA translocation. *Cell*. **160**, 219–227 (2015).
10. J. Zhou, L. Lancaster, J. P. Donohue, H. F. Noller, Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation. *Science*. **340**, 1236086 (2013).

11. D. S. Tourigny, I. S. Fernández, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation. *Science*. **340**, 1235490 (2013).
12. D. J. F. Ramrath *et al.*, Visualization of two transfer RNAs trapped in transit during elongation factor G-mediated translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20964–20969 (2013).
13. Y. Chen, S. Feng, V. Kumar, R. Ero, Y.-G. Gao, Structure of EF-G-ribosome complex in a pretranslocation state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1077–1084 (2013).
14. A. F. Brilot, A. A. Korostelev, D. N. Ermolenko, N. Grigorieff, Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20994–20999 (2013).
15. E. Giudice, K. Macé, R. Gillet, Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB. *Front. Microbiol.* **5**, 113 (2014).
16. C. Ticu, R. Nechifor, B. Nguyen, M. Desrosiers, K. S. Wilson, Conformational changes in switch I of EF-G drive its directional cycling on and off the ribosome. *EMBO J.* **28**, 2053–2065 (2009).
17. M. Selmer *et al.*, Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. **313**, 1935–1942 (2006).
18. H. Yamamoto *et al.*, EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 89–100 (2014).
19. I. R. Vetter, A. Wittinghofer, The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. **294**, 1299–1304 (2001).
20. K. A. Martemyanov, A. T. Gudkov, Domain III of elongation factor G from *Thermus thermophilus* is essential for induction of GTP hydrolysis on the ribosome. *J. Biol. Chem.* **275**, 35820–35824 (2000).
21. C. Chen *et al.*, Elongation factor G initiates translocation through a power stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 7515–7520 (2016).

22. R. Nechifor, K. S. Wilson, Crosslinking of translation factor EF-G to proteins of the bacterial ribosome before and after translocation. *J. Mol. Biol.* **368**, 1412–1425 (2007).
23. E. Salsi, E. Farah, J. Dann, D. N. Ermolenko, Following movement of domain IV of elongation factor G during ribosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15060–15065 (2014).
24. J. M. Ogle *et al.*, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science.* **292**, 897–902 (2001).
25. L. Garcia-Ortega, J. Stephen, S. Joseph, Precise alignment of peptidyl tRNA by the decoding center is essential for EF-G-dependent translocation. *Mol. Cell.* **32**, 292–299 (2008).
26. M. Laurberg *et al.*, Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J. Mol. Biol.* **303**, 593–603 (2000).
27. Y. Chen, R. K. Koripella, S. Sanyal, M. Selmer, Staphylococcus aureus elongation factor G--structure and analysis of a target for fusidic acid. *FEBS J.* **277**, 3789–3803 (2010).

Acknowledgments

We acknowledge the use of electron microscopes from the Netherlands Centre for Electron Nanoscopy (NeCEN) (Leiden University) funded by the Netherlands Organization for Scientific Research (NOW) and the European Regional Development Fund of the European Commission. We thank Juliana Berland for insightful comments on the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche with the Direction Générale de l'Armement (#ANR-14-ASTR-0001) and by the Institut Universitaire de France. Computer time was provided by GENCI (IDRIS and CINES, #i2015037391). The maps were deposited with the EMDB under the accession code **XXX**. Atomic coordinates were deposited with the Protein Data Bank under the accession code **YYY**.

Figures.

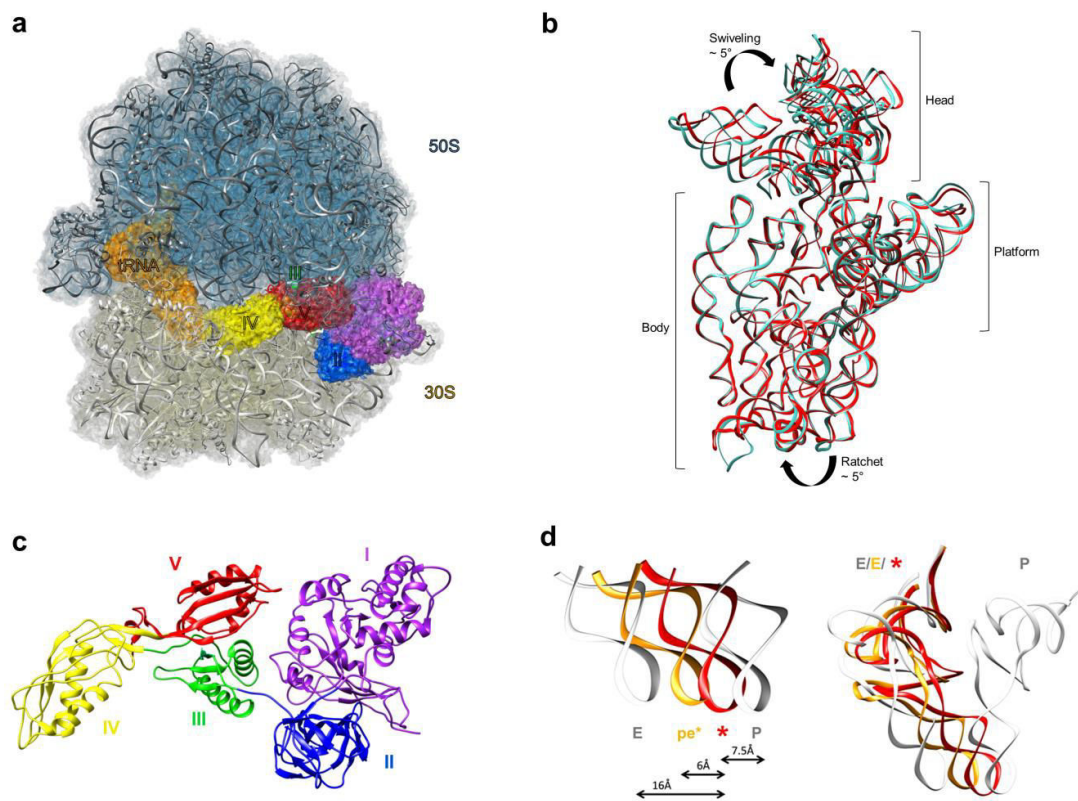


Figure 1. Overview of the EF-G-rotated ribosome complex and positioning of tRNA in the pe/E hybrid state

(a) Overall view of EF-G in the ribosome. The 50S subunit is blue, the 30S subunit is grey, tRNA is orange, and the five (I-V) domains of EF-G are purple, blue, green, red, and yellow, respectively. (b) Rotation of the 30S subunit relative to the 50S one in the EF-G complex. As compared to the non-rotated (PDB accession code 2J00) 30S subunit (cyan), in this structure 30S (red) shows a 5° counter-clockwise rotation of the 30S body and a 5° orthogonal swiveling of the head toward the L1 stalk. The two structures are aligned on 23S rRNA. (c) Cartoon representations of EF-G in GDP. The EF-G domain colors are as per (a). (d) *Left:* Comparisons of the distances between the current anticodon stem-loops (ASL). The ASLs are bound in p, pe and e-states and aligned on the 44 helix of each corresponding structure. The left side E-site ASL is white; the right side P-site ASL is white; the pe* state ASL is orange; a red star indicates the current ASL. The P- and E-site structures are from 4V5F, while the pe* state is from 4V9L. *Right:* Relative positions of the acceptor stems aligned on the 23S rRNA, presented using the same color code.

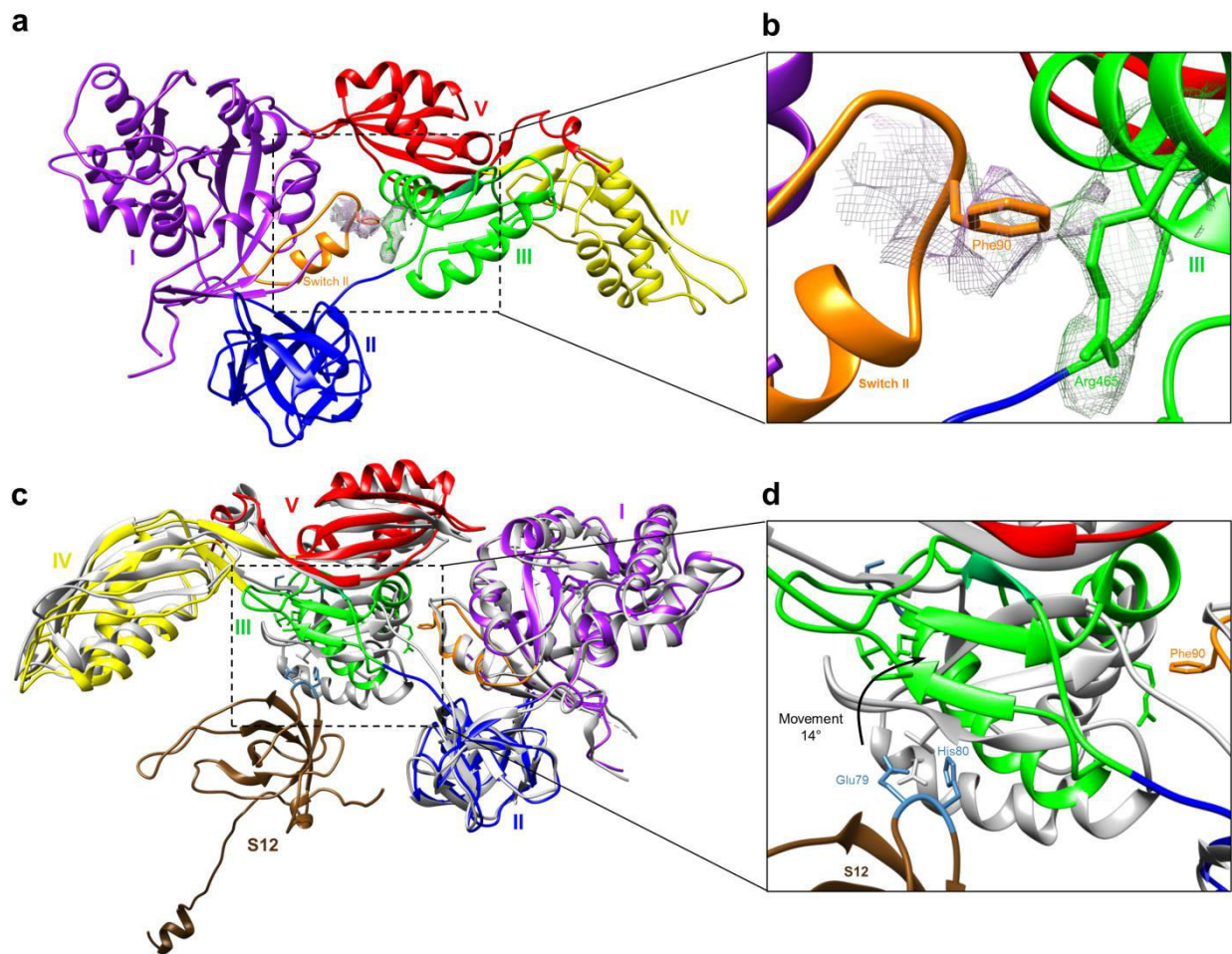


Figure 2. Interactions between EF-G switch II and domain III, and movement of this domain away from ribosomal protein s12.

(a) Overall view of EF-G, with the five domains indicated in various colors. (b) Focus on the interaction between switch II (orange) and domain III (green). The local mesh volume shows a clear interaction between phenylalanine 90 (Phe90) and arginine 465 (Arg465) residues. (c) Superposition of the EF-G-Fus (Gray-4V9L) structure and our EF-G model. Ribosomal protein s12 is brown. The two EF-G structures are aligned on EF-G domains I and II. (d) Details of the domain III movement as it relates to ribosomal protein s12. The third domain undergoes a 14° movement (black arrow) toward domain V, leading to a loss of interaction with s12 amino acid Lysine 79 and histidine 80 (light blue).

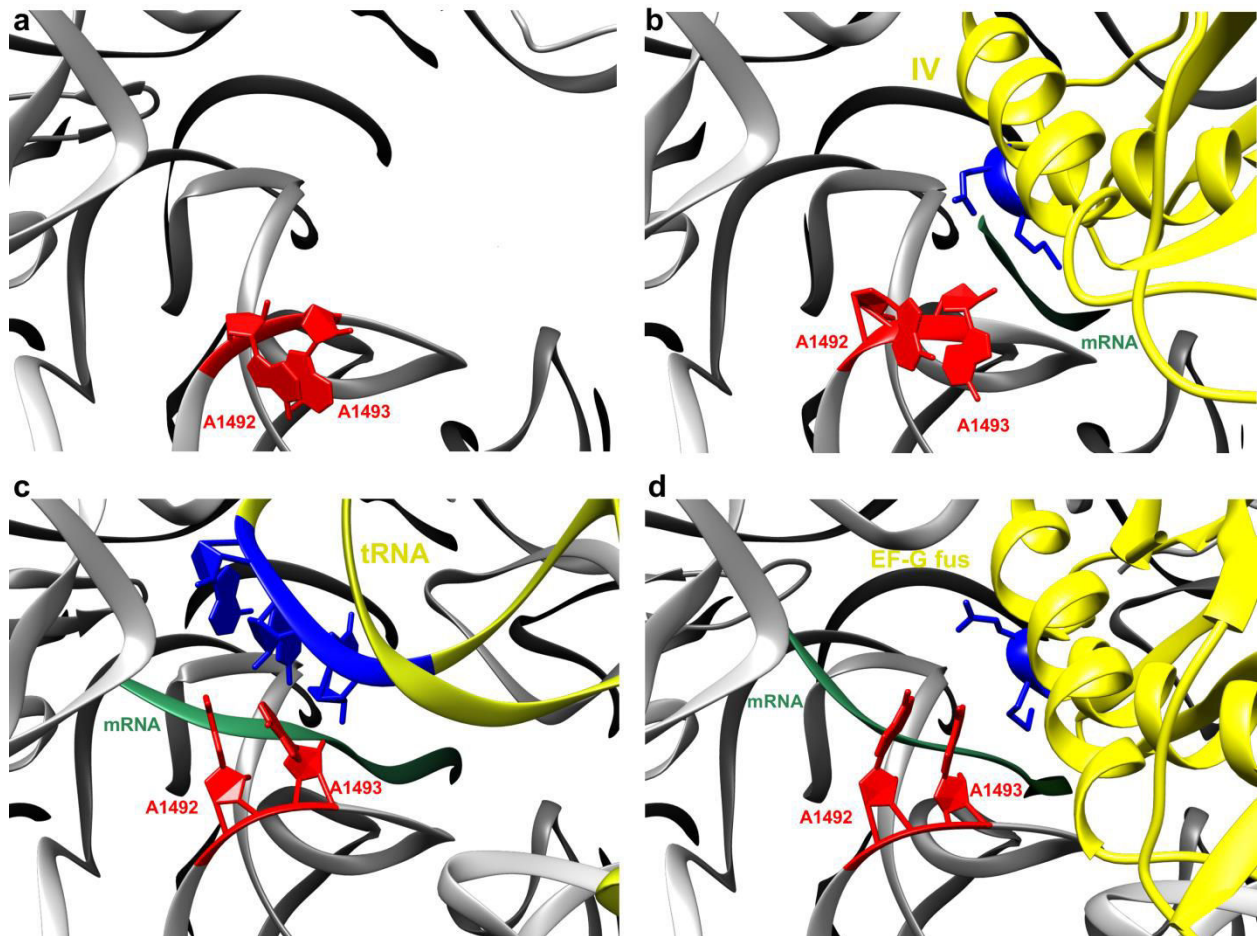


Figure 3. Comparison of the presented structure's decoding center with the structures of empty 30S, tRNA-EF-Tu, and PRE state EF-G.

Detailed interactions of EF-G domain IV with the universally conserved A1492 and A1493 16S rRNA (red). When present, mRNA is green. (a) The empty 30S subunit, without mRNA or tRNA in its A-site (PDB 1J5E). (b) The presented structure showing EF-G Ser578 and Met580 (blue) at the tip of domain IV (yellow). (c) The canonical tRNA (yellow with the nucleotides 34, 35 and 36 of ASL in blue) that decodes mRNA in the A-site (PDB 4V87). (d) The EF-G fus (yellow and Ser578 and Met580 in blue) in a classic intermediate state, with A-site mRNA (PDB 4V9L).

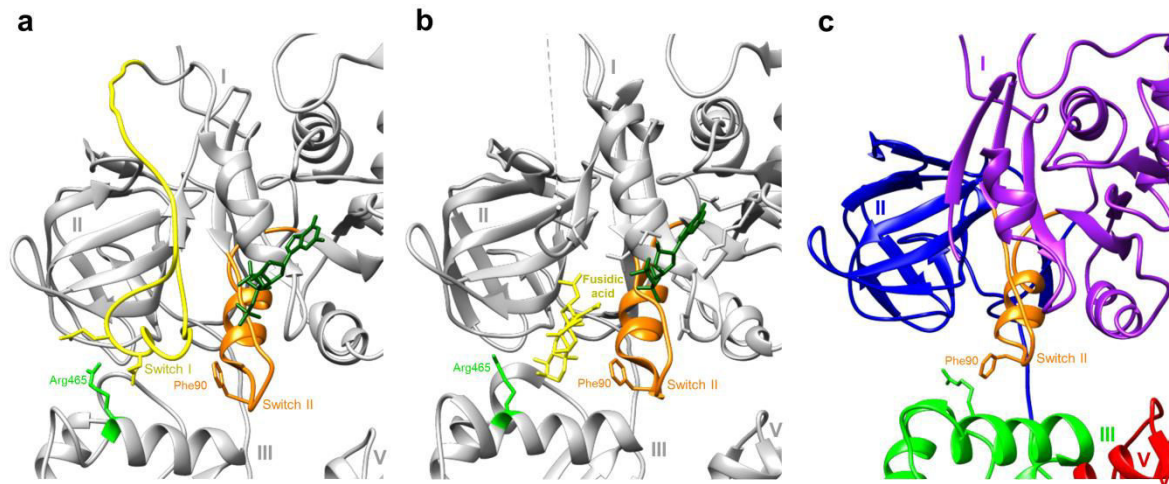


Figure 4. Overview of the structural mechanism of fusidic acid.

(a) Structure of EF-G GDPNP (dark green) (PDB 4V9K), showing the paths for switch loop I (yellow) and switch II (orange). Arg465 is green and Phe90 is orange. (b) In the Fus complex (PDB 4V9L), switch I is replaced by fusidic acid (yellow). (c) Position modifications of domain III and switch II in the absence of fusidic acid, as the interaction between them clashes with the antibiotic.

Supplementary Materials

Materials and Methods

Preparation of EF-G bound ribosomes

Ribosomes from *Thermus thermophilus* were a kind gift of Dr V. Ramakrishnan. His-tagged EF-G from *Thermus thermophilus* and His-tagged phenylalanine-tRNA synthetase (PheRS) from *Escherichia coli* were overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) using T7 expression system and then isolated by Ni²⁺ precharged HisTrap chelating column, according to the manufacturer's procedures (GE Healthcare) (1). All protein concentrations were measured on a SimpliNano spectrometer (GE Healthcare). *E. coli* tRNA, phenylalanine specific was purchased from Sigma. Aminoacylation was performed by incubating 1 μ M tRNA at 37°C for 30 min in 50 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 60 mM NH₄Cl, 7 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 2 mM ATP, 30 μ M phenylalanine and 1 μ M PheRS. Stalled ribosomes were obtained by incubating 70S ribosomes (1 μ M) with 2 μ M of an mRNA consisting of the **AGGAGGUGAGGUUUU** sequence containing a Shine-Dalgarno sequence (bold) and a phenylalanine (underlined) and *E. coli* aminoacylated tRNA^{Phe} (2 μ M), for 30 min at 37°C in buffer III (5 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 10mM NH₄Cl, 10 mM MgOAc, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA and 6 mM β -mercaptoethanol). The final complexes were obtained by mixing 1 μ M of stalled ribosomes with 20 μ M of EF-G in the presence of 2 mM GTP for 15 min at 42°C.

Cryo-electron microscopy

EM sample preparation and data acquisition

After dilution ribosomes at 150nM concentration in buffer III, 2 uL of the complexes were applied to glow-discharged holey carbon grids (Quantifoil R2/2, Germany), and flash-frozen in liquid ethane using FEI Vitrobot Mark III (FEI, the Netherland). Then, the grids were transferred to Titan Krios cryo-transmission electron microscope (FEI Company) with CS correction, operated at 300 kV. Using the FEI EPU software, images were automatically recorded on a Falcon II direct electron detector, at a nominal magnification of 59 000x, corresponding to a calibrated pixel size of 1,162 Å/pixel, and with the defocus ranging from -

1,5 to -3 μm . Images were acquired in movie mode using seven movie frame per exposure (1s).

Image processing

The direct detector device micrographs were aligned and summed using a robust optical flow approach, Xmipp (2). This procedure was accessed through Scipion, a software framework toward integration, reproducibility and validation in 3D electron microscopy (3). Contrast transfer function (CTF) parameters and defocus values for each micrograph were determined by using CTFFIND4 (4). EMAN2 e2boxer (5) was used for semi-automatic particle picking and RELION-1.4 (6) for all subsequent steps.

Single-particle 3D image reconstruction

A total of 96,509 particles were extracted from 949 micrographs. Particles were split into height classes during the first round of 3D classification, with a map of the mature 60S ribosomal subunit (low-pass filtered to 60 \AA) as the initial model. Bases on the presence of EF-G, three classes were combined for a total of 61404 particles, reflecting EF-G rather high occupancy on stalled ribosome. To boost the resolution the particle polishing procedure of Relion was applied which after subsequent 3D auto-refinement and post processing yielded a 3.7 \AA (gold-standard Fourier shell correlation (FSC) 0.143 criteria) map with fuzzy densities for EF-G domains III and IV. To further improve the quality of the map, the theoretical pixel size was first re-assessed by calculating the cross-correlation between our map and an X-ray. The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the post-translocational state as a reference structure (PDB accession number: 4V5F). This lead to a readjustment of the pixel size of 1.162 to 1.103 $\text{\AA}/\text{pixel}$. The defocus values for each micrograph were re-calculated and the 3D auto-refinement and post processing were re-performed on the 61404 particles subset leading to an improved density map with 3.51- \AA resolution. To deal with the structural heterogeneity we then performed a focused classification on EF-G with subtraction of the signal from the rest of the complex (Supplementary Figure S1) (7). The best class made of 30,000 particles gave rise to a density map with better definition of EF-G the domain III and IV. The refined maps were corrected for the modulation transfer function of the detector, and the high spatial frequencies were boosted using B-factor sharpening (8) resulting in a 3.83- \AA density map. The local resolution map was estimated using ResMap (fig. S7) (9).

Model building and refinement

Crystal structure of the thermus thermophilus EF-G-Ribosome complex in a Pretranslocation State ribosome (PDB accession number: 4V90) was used as the initial template for modelling. The models of the rRNAs (25S, 5.8S) and ribosomal proteins were docked separately into the density map manually using UCSF Chimera (2). The atomic model was then refined against the density map first by real-space refinement in PHENIX (10) with secondary structure and geometry constraints applied. After refinement, alternating rounds of manual model adjustment using COOT (11) and model refinement using PHENIX (12) were applied. A final round of model refinement was done in Fourier space using REFMAC (13) with secondary structure, base pair and planarity restraints applied, according to previously established protocols (14). To avoid overfitting, different weights of the density map for refinement were tested. Cross-validation against overfitting was performed following the procedures previously described (14, 15). The atom positions of the atomic model were randomly displaced by 0.5Å before the model was refined against a map reconstructed from half of the data produced by RELION during the last iteration of high-resolution structural refinement. The absence of overfitting was verified by comparing the FSC between our model and the two half maps. Statistics of final model was evaluated using MolProbity (16) (Extended Data Table 1b).

Supplementary Figures

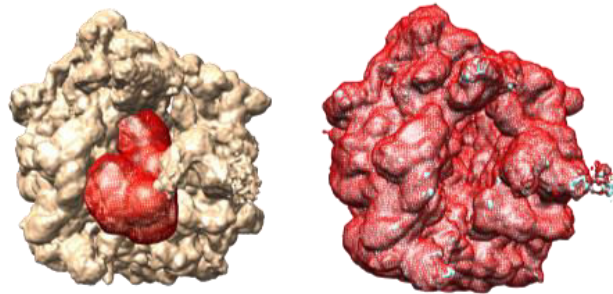


Figure S1: Visualisation of the mask position

Cryo-EM map obtained from the 61K micrographs (gold). The mask applied around EF-G to improve the classification is highlighted in red (see Material and Methods).

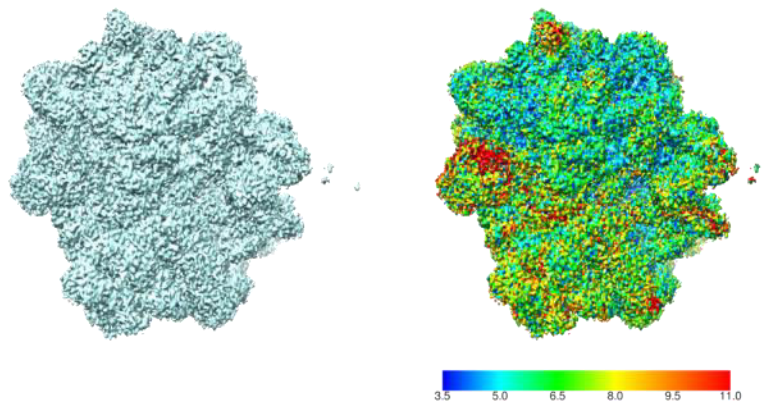


Figure S2: Final map and global resolution of the EF-G-ribosome complex and

(a) Gold-standard Fourier shell correlation (FSC) curves for the EF-G ribosome complex after 3D refinement and statistical movie processing in RELION (17, 6). (b) Final map obtained at 3.9Å global resolution. (c) Surface view of the unsharpened final map colored according to local resolution calculated with the ResMap software package (9).

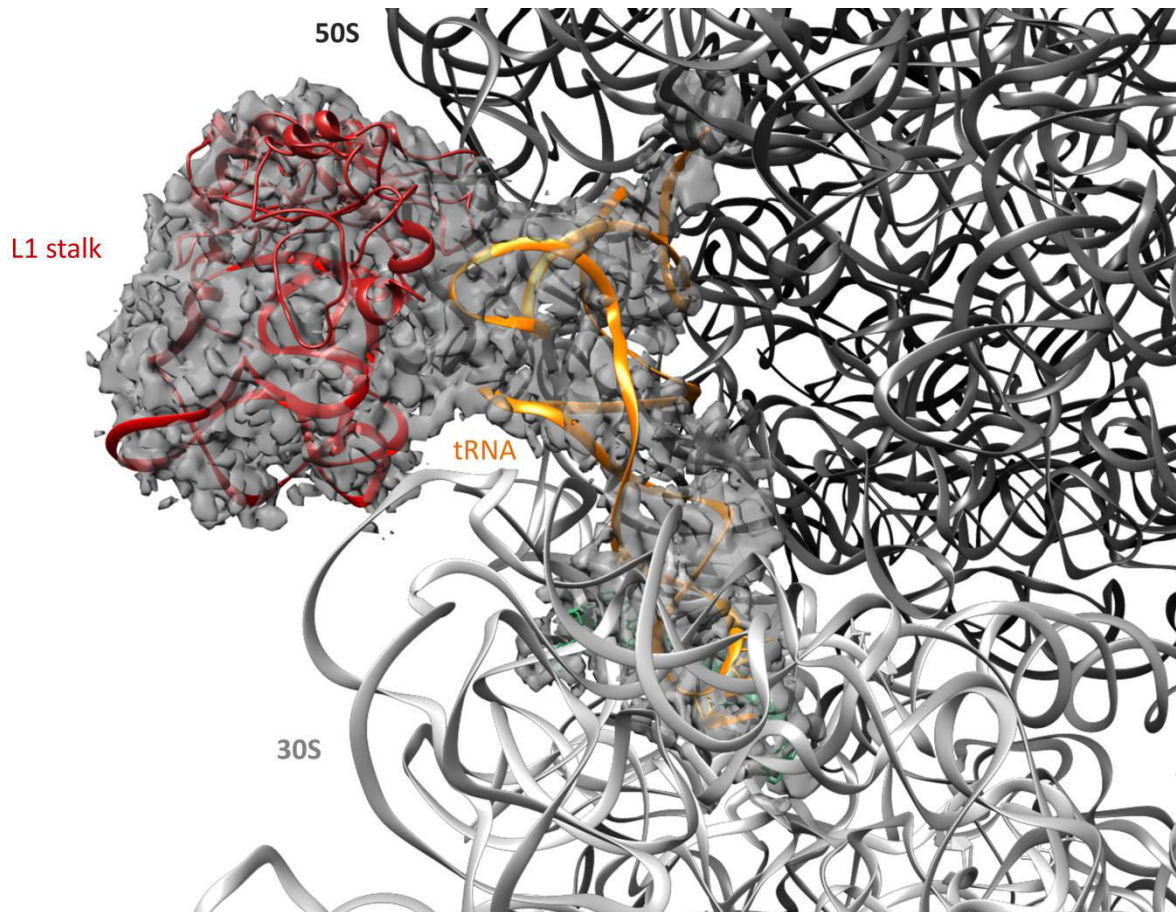
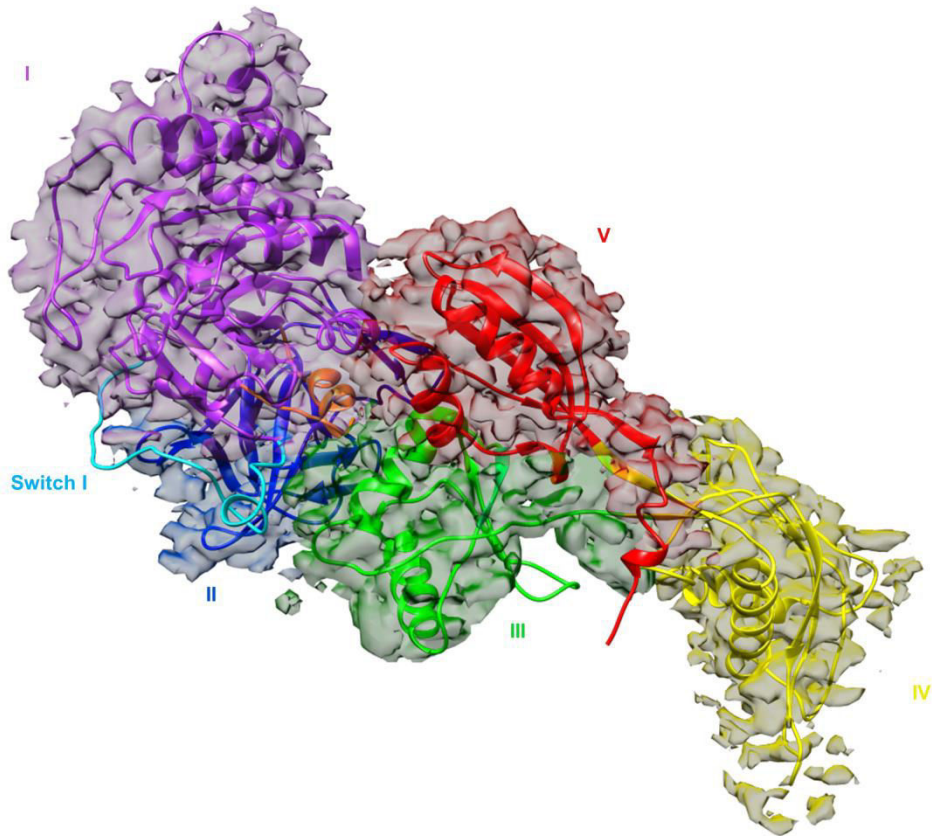


Figure S3: Interactions between tRNA and ribosomal L1 stalk.

In red L1 stalk in an intermediate state, in orange pe*/E-state tRNA and mRNA in green.

**Figure S4: View of switch I disorganized**

The switch I region (cyan) is completely disordered in the current map (no volume corresponding). The region of EF-G showing additional density that corresponds to GDP does not accommodate GTP (white arrow: the third phosphate that does not fit into the map, event at high threshold).

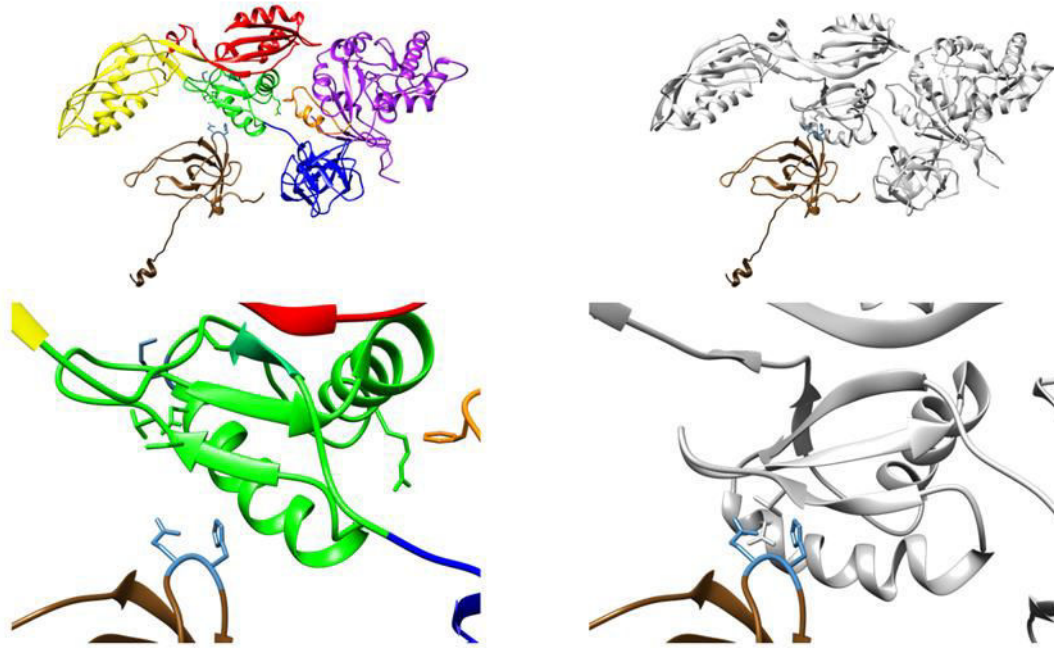


Figure S5: Lost of interactions between domain III and s12 ribosomal protein, after GTP hydrolysis.

(a) Global view of EF-G in our current structure (cyan) with (b) focus on interaction between s12 (16S RNAr). Residue XXX and YYY of s12 are steel blue and EF-G is same color in figure 1. (c & d) Identical view of (a & b) with EG-F Fus complexe (PDB 0000) in grey. The data show lost interaction in our structure after GTP hydrolysis compare to EF-G Fus complex, showing clearly an interaction between MMM and KKK residue of domain III and s12.

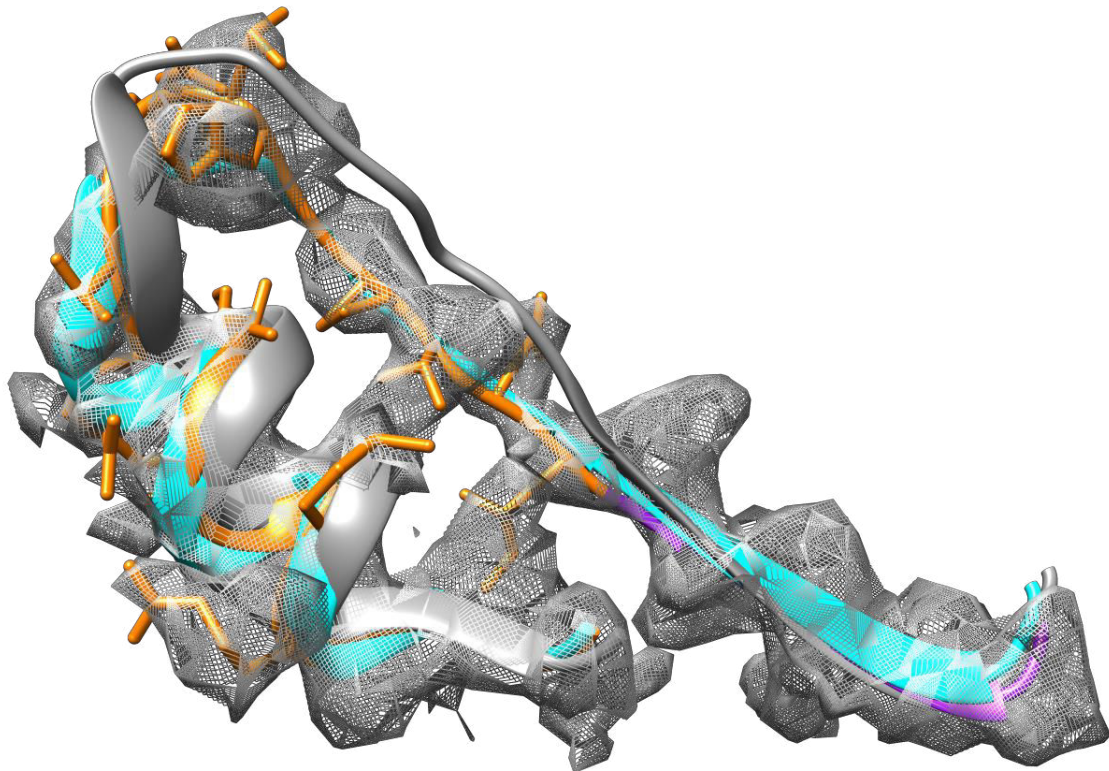


Figure S6: Switch II changes in EF-G after GTP hydrolyze

(a) Unbiased difference Fourier maps obtained after initial refinement with an empty ribosome as a starting model, showing switch II. (b) Comparison of the switch II of isolated EF-G•GDP free (cyan; PDB 2BM0) (18), EF-G•GDP ribosome in this current structure (orange) and EF-G•GDP ribosome with FA (Gray; PDB 4V9L) (19).

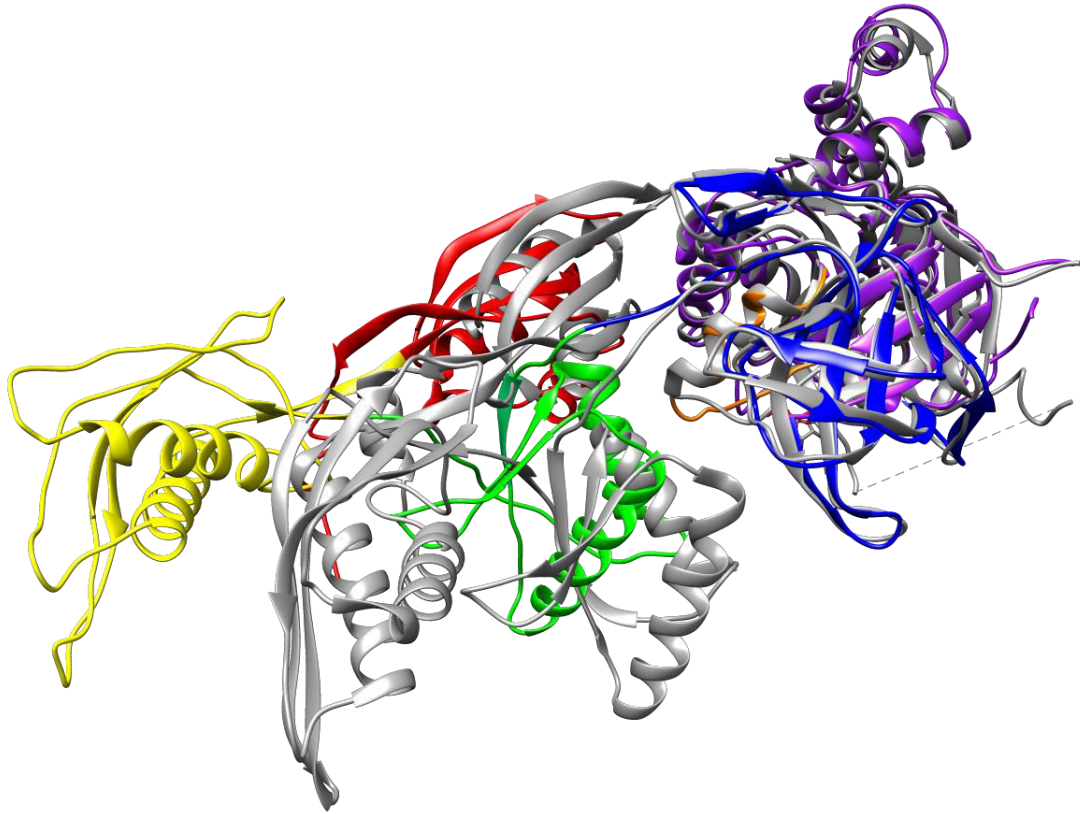


Figure S7: Comparison between EF-G•GDP free and the current structure

Comparison between the isolated EF-G•GDP free (Gray; PDB 2BM0) and EF-G•GDP ribosome in this current structure (multicolor). Except for domain I and II which are totally identical, the rest of the structure is completely different. It is therefore impossible to use as reference the crystal structure of EF-G•GDP to analyze the interactions between the switch II and domain III in ribosomal context.

References Supplementary Materials

1. F. Weis *et al.*, tmRNA-SmpB: a journey to the centre of the bacterial ribosome. *EMBO J.* **29**, 3810–3818 (2010).
2. V. Abrishami *et al.*, Alignment of direct detection device micrographs using a robust Optical Flow approach. *J. Struct. Biol.* **189**, 163–176 (2015).
3. J. M. de la Rosa-Trevín *et al.*, Scipion: A software framework toward integration, reproducibility and validation in 3D electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **195**, 93–99 (2016).
4. A. Rohou, N. Grigorieff, CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J. Struct. Biol.* **192**, 216–221 (2015).
5. G. Tang *et al.*, EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **157**, 38–46 (2007).
6. S. H. W. Scheres, RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* **180**, 519–530 (2012).
7. X. Bai, E. Rajendra, G. Yang, Y. Shi, S. H. Scheres, Sampling the conformational space of the catalytic subunit of human γ -secretase. *eLife*. **4**, e11182 (2015).
8. S. Chen *et al.*, High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy*. **135**, 24–35 (2013).
9. A. Kucukelbir, F. J. Sigworth, H. D. Tagare, Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nat. Methods*. **11**, 63–65 (2014).
10. P. D. Adams *et al.*, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
11. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).

12. P. V. Afonine *et al.*, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 352–367 (2012).
13. G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255 (1997).
14. A. Amunts *et al.*, Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science*. **343**, 1485–1489 (2014).
15. I. S. Fernández, X.-C. Bai, G. Murshudov, S. H. W. Scheres, V. Ramakrishnan, Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell*. **157**, 823–831 (2014).
16. V. B. Chen *et al.*, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).
17. X.-C. Bai, I. S. Fernandez, G. McMullan, S. H. W. Scheres, Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles. *eLife*. **2**, e00461 (2013).
18. S. Hansson, R. Singh, A. T. Gudkov, A. Liljas, D. T. Logan, Structural Insights into Fusidic Acid Resistance and Sensitivity in EF-G. *J. Mol. Biol.* **348**, 939–949 (2005).
19. J. Zhou, L. Lancaster, J. P. Donohue, H. F. Noller, Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation. *Science*. **340**, 1236086 (2013).

VI.3 - Conclusion de l'Article #2

La structure obtenue par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) permet de visualiser le facteur d'élongation EF-G dans une nouvelle conformation, après un mouvement de son domaine III. Malgré une forte concurrence dans ce domaine scientifique (voir Annexe N°1 – Partie I) cette conformation d'EF-G n'avait encore jamais été directement observée lors de précédentes analyses en cristallographie aux rayons X ou en cryo-microscopie électronique (AEvarsson et al., 1994; Hansson et al., 2005; Laurberg et al., 2000) Il est à noter que les récents progrès en cryo-EM permettent aujourd'hui d'observer des complexes à haute résolution et d'améliorer la classification afin de mieux traiter l'hétérogénéité des échantillons (voir Annexe N°2 – Partie I). L'utilisation de ces approches a une grande importance dans notre cas, puisque la visualisation du domaine III, très flexible en l'absence d'antibiotiques, a été obtenue grâce à utilisation d'un masque. Cette technique permet d'obtenir une reconstruction 3D en soustrayant le signal du ribosome (bruit) des images 2D afin d'augmenter le signal d'EF-G seul (voir la méthode en Annexe N°3 – Partie I).

Nos résultats s'intègrent à de précédentes observations obtenues par pontage chimique suggérant que ce mouvement puisse repositionner uS12 et faciliter ainsi la translocation (Nechifor and Wilson, 2007). Ce mouvement d'EF-G a également été récemment suggéré par des études de fluorescence polarisée (polTIRF) (Chen *et al.*, 2016). Le mouvement du domaine III y est abordé d'un point de vue structural avec une incroyable anticipation: « *The large and variable motions of the EF-G domain III we observe during normal translocation have not generally been detected among the X-ray and cryo-EM structures obtained using antibiotics and/or non-hydrolyzable GTP analogs that inhibit normal translocation and prolong the dwell time of EF-G on the ribosome. These blockers may rigidify the conformation of ribosome-bound EF-G. It is possible that time-resolved cryo-EM with single-particle sorting into different classes, by resolving structural heterogeneities in the sample, could reveal the motions of domain III detected by polTIRF.* ». Les auteurs concluent que le mouvement du domaine III de EF-G sur le ribosome génère une force mécanique qui soit, se déplace vers l'ARNm et l'ARNt directement, soit facilite un déverrouillage du ribosome, ce qui permet la réalisation de la translocation.

Il faut noter également qu'une rotation différente du domaine III a déjà été observée dans une structure cristalline d'EF-G complexé avec l'antibiotique dityromycine (Lin *et al.*, 2015). Cette structure compacte possède un domaine III tourné d'environ 90 ° par rapport à la position des domaines I et II d'EF-G. Cependant, le domaine III n'est pas le seul domaine en rotation et c'est tout l'ensemble III-IV-V qui tourne comme un corps rigide, ce qui est incompatible avec les données de polTIRF (montrant que seul le domaine III tourne indépendamment des autres). Cette structure est une étape précoce de l'état de pré-translocation alors que la rotation du domaine III observée ici a lieu en post hydrolyse du GTP.

Les données de notre structure permettent d'émettre un nouveau modèle de l'hydrolyse du GTP par EF-G. Ce modèle, présenté sous forme d'une vidéo dans l'article, montre l'enchaînement des événements depuis l'arrivée d'EF-G au ribosome jusqu'à sa conformation GDP (Figure 19, page suivante).

Les informations obtenues permettent également de mieux comprendre le fonctionnement de

l'antibiotique acide fusidique (Fus) ciblant EF-G.

Box N°10 – L'acide fusidique est utilisé pour le traitement de l'impétigo et se présente sous forme de crème pour application cutanée.

La comparaison des structures d'EF-G•GDP cristallisé seul (Hansson *et al.*, 2005) avec EF-G•GDP en présence de Fus dans le ribosome (Gao *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2013) montre que la

position de Fus dans le complexe EF-G-70S chevauche celle du switch I, stabilisant ainsi EF-G dans sa conformation initiale, ceci malgré l'hydrolyse du GTP en GDP. Cependant, ces données ne permettent pas de savoir si c'est le switch II qui vient au contact du domaine III et induit le changement conformationnel (Gao *et al.*, 2009), ou inversement, si c'est la déstructuration du switch I qui induit un changement de conformation du domaine III (Zhou *et al.*, 2013). D'après nos données, l'acide fusidique empêche le domaine III de venir au contact du switch II en empêchant la liaison entre l'Arg465 et la Phe90.

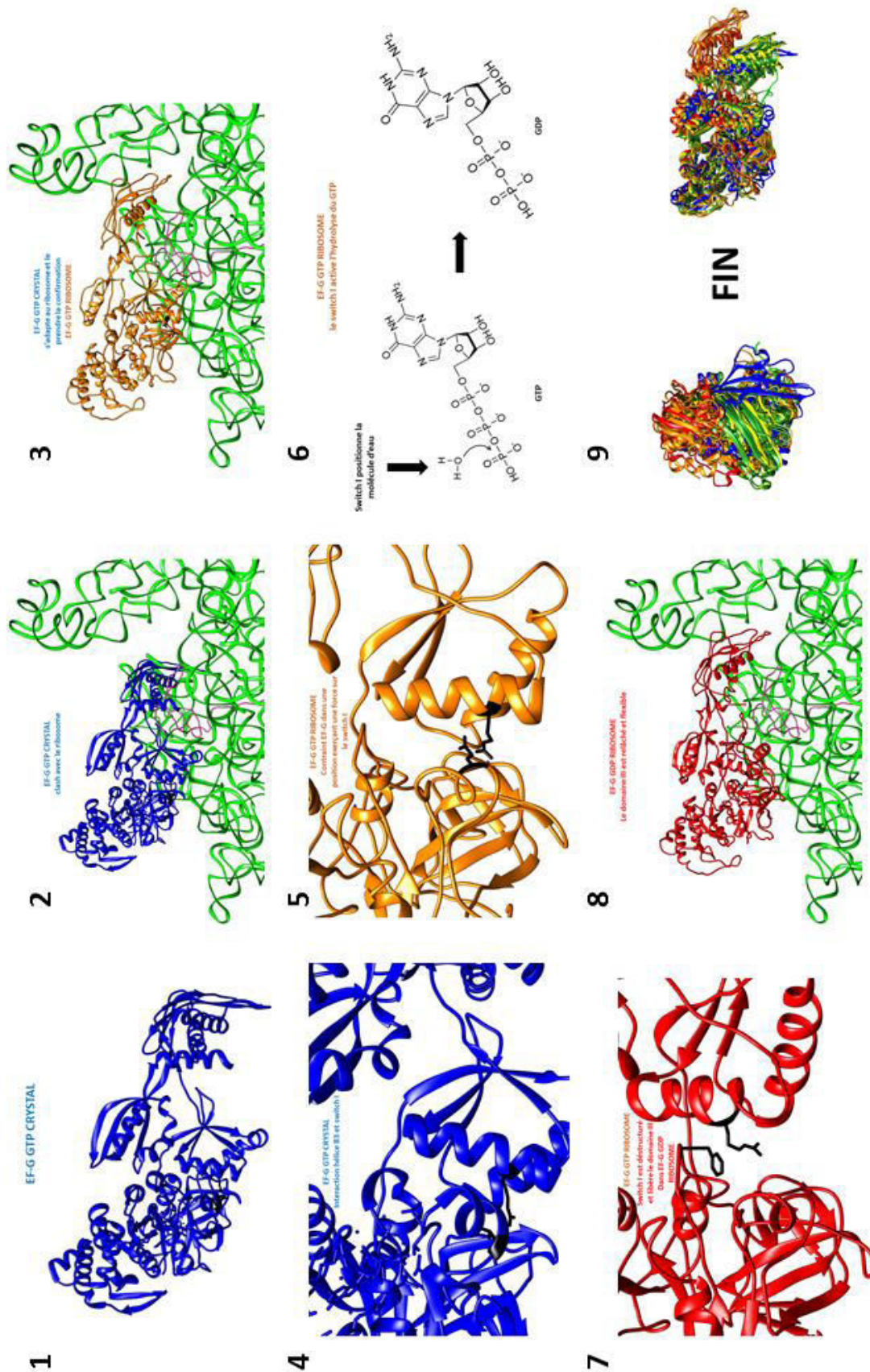


Figure 19. Modèle de l'hydrolyse du GTP. Planche de la réalisation du mini film pour l'article EF-G. EF-G•GTP x-ray (2DY1) en bleu, en orange EF-G•GTP ribosome (4V9J), EF-G•GDP ribosome en rouge (notre structure). L'ARN16S en vert et S12 en rose/violet.

Partie II

La *trans*-traduction

I - Introduction Partie II – La *trans*-traduction

La synthèse protéique est un mécanisme complexe et fascinant. Afin d'assurer son fonctionnement, les cellules possèdent différents systèmes de contrôle-qualité. Nous nous intéresserons ici au « sauvetage de la synthèse protéique », lorsqu'un ribosome en cours de traduction reste bloqué sur un ARNm. Ce blocage intervient dans de nombreuses situations (Moore and Sauer, 2007). Ici nous aborderons un mécanisme de sauvetage en particulier, la *trans*-traduction. Ce mécanisme bactérien ancestral – voir Article #1 – joue aujourd'hui d'autres rôles que le simple sauvetage de la traduction, ce qui fait de la *trans*-traduction une cible particulièrement intéressante pour le développement de nouveaux antibiotiques, thème qui sera abordé dans la deuxième partie de ce chapitre.

II - Article #3 | E. Giudice, K. Macé and R. Gillet. - 2014 - Frontiers in Microbiology

II.1 - Introduction de l'Article #3

***Trans*-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB**

E. Giudice, K. Macé & R. Gillet

Front Microbiol. 2014 Mar 21;5:113.

Les ribosomes qui se bloquent lors de la traduction doivent être secourus afin de maintenir la synthèse des protéines. Le blocage se produit lorsque les ribosomes sont emprisonnés sur l'extrémité 3' d'un ARNm, sans codon disponible dans le site A, ce qui conduit à l'arrêt de l'élongation. Le principal système de contrôle-qualité bactérien permettant de sauver les ribosomes est la *trans*-traduction. Deux autres systèmes alternatifs sont médiés par les protéines ArfA et ArfB (Alternative ribosome-rescuing factor A and B). Ces systèmes de sauvetage sont indispensables à la survie bactérienne. Cette revue en guise d'introduction rassemble les différentes connaissances du mécanisme de la *trans*-traduction.

II.2 - Article #3

REVIEW ARTICLE

Front. Microbiol., 21 March 2014 | <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00113>

Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB

 Emmanuel Giudice¹,  Kevin Macé¹ and  Reynald Gillet^{1,2*}

¹Translation and Folding Team, Université de Rennes 1, CNRS UMR 6290 IGDR, Rennes, France

²Institut Universitaire de France, France

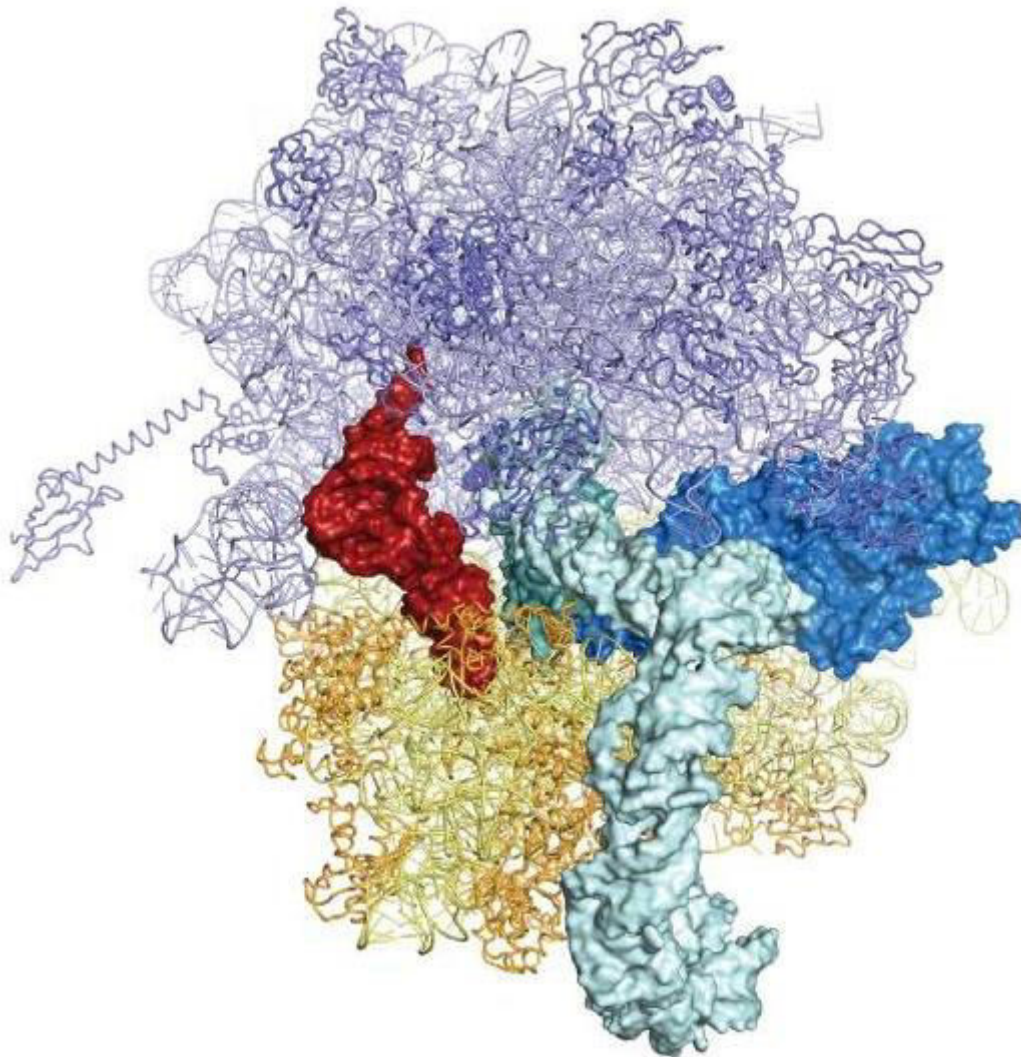


Illustration réalisée d'après Agata L. Starosta et al., 2014, FEMS Microbiol Rev.



Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB

Emmanuel Giudice¹, Kevin Macé¹ and Reynald Gillet^{1,2*}

¹ Translation and Folding Team, Université de Rennes 1, CNRS UMR 6290 IGDR, Rennes, France

² Institut Universitaire de France, France

Edited by:

Kenneth C. Keiler, Pennsylvania State University, USA

Reviewed by:

Sean D. Moore, University of Central Florida, USA

Olga A. Dontsova, Lomonosov Moscow State University, Russia

*Correspondence:

Reynald Gillet, Translation and Folding Team, Institut Universitaire de France, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6290, Bât. 13 - Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, Rennes, France
e-mail: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

Ribosome stalling is a serious issue for cell survival. In bacteria, the primary rescue system is *trans*-translation, performed by tmRNA and its protein partner small protein B (SmpB). Since its discovery almost 20 years ago, biochemical, genetic, and structural studies have paved the way to a better understanding of how this sophisticated process takes place at the cellular and molecular levels. Here we describe the molecular details of *trans*-translation, with special mention of recent cryo-electron microscopy and crystal structures that have helped explain how the huge tmRNA-SmpB complex targets and delivers stalled ribosomes without interfering with canonical translation.

Keywords: ribosome, tmRNA, SmpB, *trans*-translation, structure

INTRODUCTION

Protein synthesis, also called translation, allows for an accurate correspondence between the genetic information stored in cells and synthesized polypeptides. In bacteria, when ribosomes reach the 3'-end of "non-stop" messenger RNAs (mRNAs), they become non-productive translation complexes (NTCs). This ribosome stalling is a serious issue for bacterial survival, and rescue systems are needed in order to maintain cell viability. The primary rescue system that permits ribosome release is *trans*-translation, mediated by transfer-messenger RNA (tmRNA) and small protein B (SmpB) (Giudice and Gillet, 2013). In a sophisticated ballet, this "all-in-one" complex uses available translation factors to restore protein synthesis, eject the truncated mRNA from the stalled ribosome, and tag the nascent protein for immediate destruction by proteases (Figure 1).

tmRNA was first discussed in the literature in 1979, when Ray and Apirion described a new stable "10S RNA" molecule in *Escherichia coli* (Ray and Apirion, 1979). Although the gene encoding for this small stable RNA was described more than 10 years later in the *E. coli* chromosome (Oh et al., 1990), it was not until 1996 that its physiological role was finally understood. At that time, Keiler et al. described tmRNA's peptide tagging activity in the degradation of proteins synthesized from damaged mRNA (Keiler et al., 1996). Who would have expected then that this new RNA, which surprisingly contains both a tRNA-like structure (Komine et al., 1994) and an mRNA open reading frame (ORF), would occupy the time and efforts of so many laboratories? This was however just the beginning of a long journey that led to the naming of the process as "*trans*-translation." *Trans*-translation is carried out by hybrid transfer-messenger RNA (tmRNA, formerly SsrA, 10S or 10Sa RNA), in company with small protein B (SmpB), a unique RNA-binding protein essential to the process (Karzai et al., 1999). Since then, more than 450 articles

have been published in the field, yielding an accurate description of this finely-tuned process at the molecular level (Moore and Sauer, 2007; Giudice and Gillet, 2013). Thus, almost 35 years after its discovery, tmRNA finally came of age, and it was designated molecule of the month by the RCSB Protein Data Bank in January 2013 (<http://www.rcsb.org>). This article, part of the first special issue dedicated to *trans*-translation and alternative pathways, aims at elucidating the mechanistic details of the process at the molecular level, with particular attention paid to how structural data has helped explain the manner in which the tmRNA-SmpB complex targets and frees stalled ribosomes in all bacteria types.

TRANSFER-MESSENGER RNA (tmRNA) STRUCTURES

tmRNA is a remarkable chimeric molecule with both transfer and messenger RNA activities. It ranges from 230 to 400 nucleotides in length. Its modular and highly-structured architecture includes a tRNA-like domain (TLD), a huge ring made of pseudoknots (PKs), a long and disrupted helix H2 connecting the TLD to the PKs, and a short mRNA-like domain (MLD) made of a single strand portion as well as a conserved helix H5 carrying a termination codon (Figure 2).

THE tRNA-LIKE DOMAIN (TLD)

The interactions between the 5'- and 3'-ends of the mature tmRNA molecule form an acceptor stem. Like regular tRNA, this stem is extended by a 3'-terminal cytidine-cytidine-adenosine trinucleotide (CCA), but it can only be aminoacylated with alanine (Komine et al., 1994; Ushida et al., 1994). The domain also has a tRNA-like T stem-loop, but its D-loop is reduced and has no stem. Specific interactions between these two loops are required for SmpB binding and function (Barends et al., 2002). The T-loop is also subject to post-transcriptional modifications, and contains

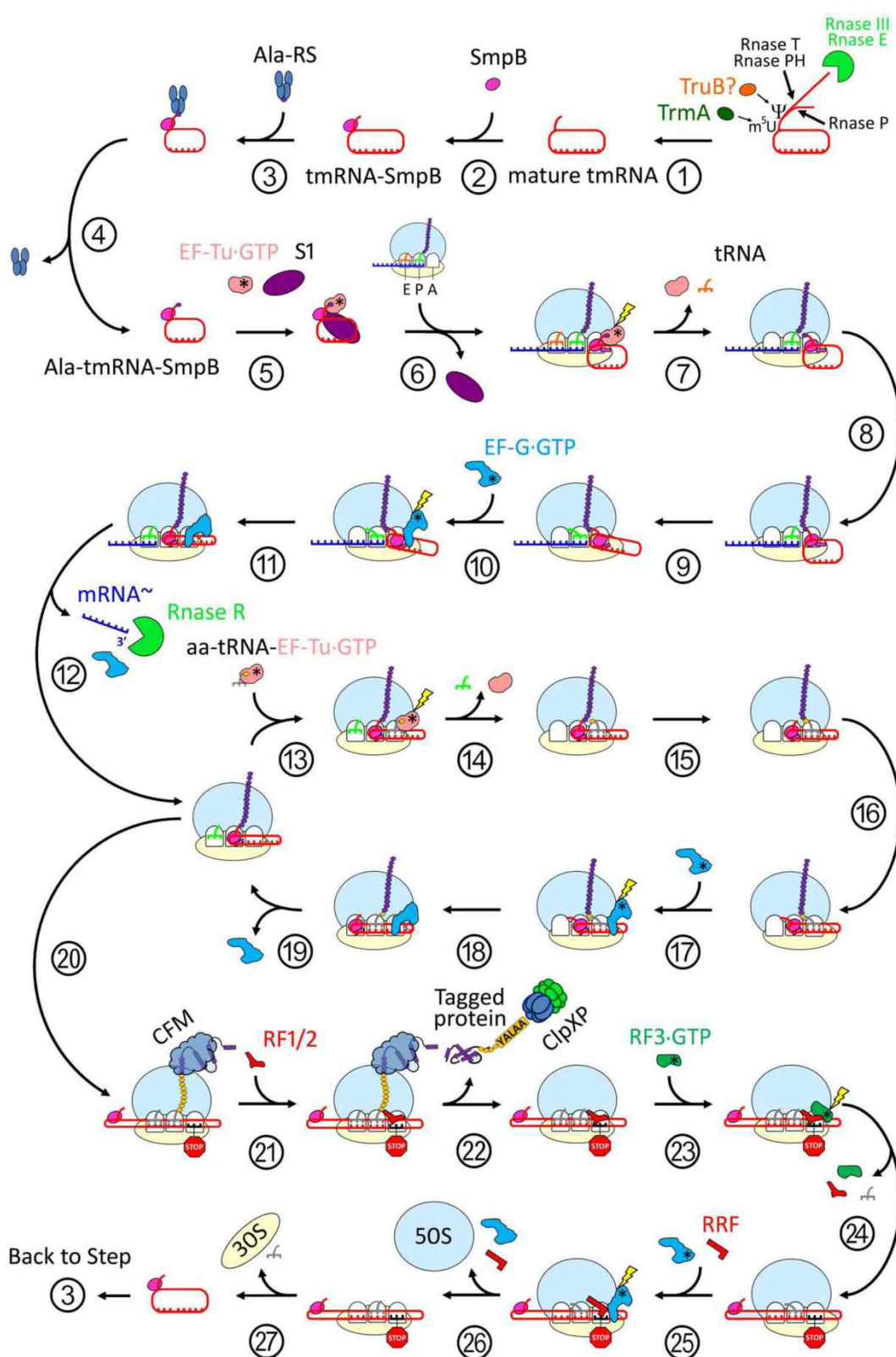


FIGURE 1 | The cycle of trans-translation. Maturation: (1) The tmRNA primary transcript 5'-terminus is processed by the endonuclease RNase P, while the 3'-terminus is first cleaved by endonucleases RNases III or E then trimmed by exonucleases RNases T and/or PH. Nucleotides in the T-loop are

modified at least twice: a 5-methyluridine is catalysed by TrmA, and a pseudouridine may be catalysed by TruB. (2) The tmRNA-SmpB complex is formed. (3) Ala-RS charges the deacyl tmRNA-SmpB with a new alanine. (Continued)

FIGURE 1 | Continued

(4) Ala-RS is released. (5) EF-Tu•GDP and S1 bind to Ala-tmRNA^{Ala}-SmpB, and the complex is ready to rescue a stalled ribosome. Re-registration: (6) Pre-accommodation. The ala-tmRNA^{Ala}-SmpB-EF-Tu•GTP quaternary complex binds to a stalled ribosome. SmpB recognizes the vacant A-site. S1 is released. (7) SmpB simulates the codon-anticodon recognition and induces GTPase activity on EF-Tu. Ala-tmRNA^{Ala}-SmpB accommodates into the A-Site. EF-Tu•GDP and E-Site deacyl tRNA are released. (8) Peptidyl transfer. The nascent peptide is transferred from the P-Site tRNA to the Ala-tmRNA^{Ala}. The nascent peptide is elongated by one Ala. (9) Ratchet. The 30S subunit spontaneously rotates in an anticlockwise direction relative to the 50S. This ratchet-like motion brings TLD-SmpB and tRNA into hybrid states of binding (A/P and P/E respectively). (10) EF-G•GTP binds to the ribosome, stabilizing the ratchet formation and inducing a unique 12° head tilt. (11) GTP hydrolysis. TLD-SmpB and tRNA are translocated to the P- and E-sites, respectively. The tmRNA internal ORF is positioned in the A-site. (12) EF-G•GDP and non-stop mRNA release. Subsequent degradation of non-stop mRNA by RNase R. Elongation: translation restart on the tmRNA internal ORF: (13) aa-tRNA^{aa}-EF-Tu•GDP ternary complex binds to the ribosome. (14) The recognition of tmRNA internal ORF codon by the aminoacyl tRNA induces GTP hydrolysis. The aa-tRNA^{aa} is accommodated in the A-site. EF-Tu•GDP and the E-Site deacyl tRNA are released. (15) Peptidyl transfer. The nascent peptide is transferred to the incoming aa-tmRNA^{aa} and is elongated by one amino-acid. (16) Ratchet. (17) EF-G•GTP binding. (18) GTP hydrolysis and translocation. (19) EF-G•GDP release. The process is repeated until the tmRNA STOP codon is reached. After the first cycle, like deacyl tRNAs, the TLD and SmpB are released from the E-site. Termination-recycling: (20) The

tmRNA STOP codon is reached. (21) RF1 or RF2 recognize the STOP codon and bind to the A-site. (22) The class I release factor triggers P-site tRNA deacylation. The new peptide (if unfolded) or protein (if already folded by the CFM) carrying the tmRNA tag is released. A protease such as ClpXP recognizes the tag and degrades the potentially-hazardous product. (23) Class II release factor binds to the ribosome. (24) GTP hydrolysis induces a ratchet-like movement and rapid dissociation of class I and II release factors and E-site deacyl-tRNA. (25) RRF and EF-G•GTP binding. (26) GTP hydrolysis. RRF acts as a wedge, inducing dissociation and recycling of the large ribosomal subunit. RRF and EF-G•GDP are also released. (27) Deacyl tmRNA-SmpB and tRNA dissociate from the small ribosomal subunit. The 30S can be used for a new round of translation. tmRNA-SmpB is recycle. Abbreviations: Rnase III, endoribonuclease III; Rnase E, endoribonuclease E; Rnase T, exoribonuclease T; Rnase PH, exoribonuclease PH; Rnase P, endoribonuclease P; Y: pseudouridine; m5U, 5-methyluridine; TruB, tRNA pseudouridine synthase II; TrmA, S-adenosyl methionine-dependent rna methyltransferase; tmRNA, transfer-messenger RNA; SmpB, small protein B; tmRNA-SmpB, deacyl transfer-messenger RNA and small protein B binary complex; AlaRS, alanyl-tRNA synthetase; ala-tmRNA-SmpB, alanyl transfer-messenger RNA and small protein B binary complex; EF-Tu, elongation factor thermo unstable; GTP, guanosine-5'-triphosphate; S1, small ribosomal subunit protein 1; t-RNA deacyl transfer RNA; EF-G, elongation factor G; mRNA, non-stop mRNA; Rnase R, exoribonuclease R; aa-tRNA, amino-acyl transfer RNA; CFM, co-translational folding machinery; RF1/2, release factor 1 or 2; ClpXP, a protease complex; RF3, release factor 3; RRF, ribosome recycling factor; 50S, large ribosomal subunit; 30S, small ribosomal subunit.

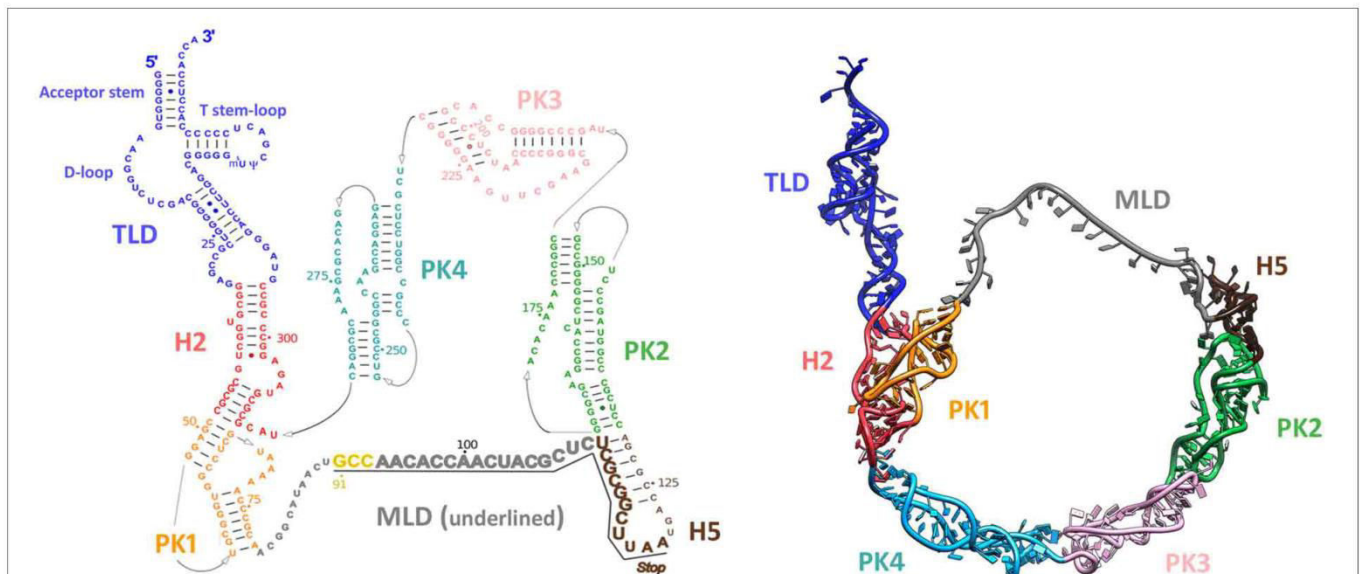


FIGURE 2 | Structure of tmRNA. Left: Diagram of the secondary structure of *Thermus thermophilus* tmRNA. Watson-Crick base pairs are connected by lines, and GU pairs are represented by dots. Domains are highlighted with colors: tRNA-like domain (TLD) is blue; helix 2 (H2) is red; pseudoknot 1 (PK1) is orange; the single strand portion carrying the messenger-like domain (MLD) is gray; helix 5 (H5) is brown; pseudoknot 2 (PK2) is green; pseudoknot 3 (PK3) is

pink; and pseudoknot 4 (PK4) is teal. The codons are underlined and shown in a larger font. The resume codon is yellow and the stop codon is indicated. Right: 3D molecular model of tmRNA (PDB entry: 3IYQ chain A). The model was constructed using homology modeling on each independent domain, followed by flexible fitting into the cryo-EM density map of the translocated step (EMDB entry: EMD-5189). The same color codes are used as in the left panel.

two modified nucleosides: 5-methyluridine and pseudouridine (Felden et al., 1998; Ranaei-Siadat et al., 2013).

THE mRNA-LIKE DOMAIN (MLD)

The MLD contains a short internal ORF which includes a stop codon and encodes for a tag immediately recognizable

by proteases. This conserved tag is usually made up of 10 residues (AANDENYALAA in *E. coli*, with the first A carried by tmRNA) (Moore and Sauer, 2007), although it can contain 8–35 residues. Contrary to canonical mRNA, it does not carry any start sites positioned upstream to the AUG initiation codon, such as a Shine-Dalgarno sequence. Instead, the resume codon

is in most cases an alanine and sometimes a glycine codon. The five nucleotides immediately upstream of this first codon appear to direct frame selection (Watts et al., 2009). Once released, the tagged protein is degraded by various enzymes. In the *E. coli* cytoplasm, this is done mainly by ClpXP, ClpAP, and FtsH proteases (Karzai et al., 2000), while Tsp, an energy-independent protease, performs the same task within the periplasm. Within the usual tagging sequence AANDENYALAA, ClpX binds the C-terminal residues LAA, while ClpA binds the C-ter residues ALA and makes additional contacts with the N-terminal residues AA (Janssen and Hayes, 2012). ClpXP performs the majority of degradation, with FtsH degrading just a small subset of proteins that are present in the inner membrane.

THE RING OF PSEUDOKNOTS

Generally, tmRNA has four pseudoknots (PKs). PK1 is upstream from the MLD and PK2-PK4 are located downstream. tmRNA tagging requires PK1 but not the others, and the functioning of tmRNA is not seriously affected by the replacement or interchange of any of the other pseudoknots in *E. coli* (Nameki et al., 2000). However, recent research has shown that *in vitro* or *in vivo* substitution of a small and stable RNA hairpin for PK1 still permits tmRNA tagging (Tanner et al., 2006). This suggests that instead of having a direct role in ribosome binding, PK1 must help stabilize the region enclosed by the TLD and the MLD, and prevent tmRNA misfolding (Tanner et al., 2006; Wower et al., 2009). The primary role of PK2, PK3, and PK4 is the folding and maturation of tmRNA rather than its *trans*-translational activity (Wower et al., 2004). Accordingly, in certain classes of active tmRNAs ("two-piece tmRNAs"), a dramatic reduction in pseudoknot number is observed without a decrease in tagging efficiency (Gaudin et al., 2002). These two-piece tmRNAs have been observed in alpha-proteobacteria, cyanobacteria, and some beta-proteobacteria lineages, and result from gene circular permutation that split them into two molecules (Keiler et al., 2000; Sharkady and Williams, 2004). They have a TLD and an MLD, but fewer pseudoknots than their one-piece ancestors (Gaudin et al., 2002).

SMALL PROTEIN B (SmpB) STRUCTURE

SmpB is a small basic protein (160 amino-acids in *E. coli*) essential for *trans*-translation (Karzai et al., 1999). All bacterial genomes contain the *smpB* gene with high primary sequence conservation. Deleting this gene results in the same phenotypes as those observed in cells lacking tmRNA. The first SmpB structure was solved with NMR studies (Dong et al., 2002; Someya et al., 2003). These revealed that the protein adopts an oligonucleotide-binding (OB) fold made up of six antiparallel β -strands arranged in the typical closed β -barrel surrounded by three α -helices. Two conserved RNA-binding domains on opposite sides of the protein are thus exposed (Figure 3). Further X-ray studies have shown that SmpB binds with high specificity to the TLD elbow region, stabilizing the single-stranded D-loop in an extended conformation (Gutmann et al., 2003; Bessho et al., 2007). The binding activity increases the elbow angle to about 120° (as opposed to 90° in canonical tRNAs), a change which electrical and birefringence studies had already suggested (Stagg et al., 2001). This puts

SmpB where one usually finds the anticodon and D stems of tRNA, and the tmRNA H2 helix (Figures 4, 5, 6A) mimics a long tRNA variable arm. SmpB also has a C-terminal tail (residues 131–160 in *E. coli*) which, although always unstructured in solution, forms an α -helix in the ribosome (Figures 4B, 5B, 6A). This tail is essential for tmRNA tagging (Dong et al., 2002; Someya et al., 2003; Jacob et al., 2005; Sundermeier et al., 2005; Shimizu and Ueda, 2006; Gillet et al., 2007) and was recently shown to bind to the 30S A-site (Neubauer et al., 2012) as previously predicted (Kaur et al., 2006; Nonin-Lecomte et al., 2009; Kurita et al., 2010). Notably, the most conserved residues are not in the helix but just upstream (Miller et al., 2011). The conservation of this unstructured portion may be necessary to maintain flexibility and ensure the correct positioning of the helix. Acting together with the residues forming the second RNA-binding domain site, it may also play a role in the selection of the correct codon. It has to be noted that it is only the body of SmpB that is responsible for its binding affinity in the decoding center, while the entering of the C-terminal tail into the mRNA channel would account for the release of EF-Tu and the proper accommodation of tmRNA-SmpB in the decoding center (Miller and Buskirk, 2014).

OTHER tmRNA PARTNERS

SmpB is not the only RNA-binding protein needed for tmRNA's *trans*-translational activities. Other necessary proteins include: processing enzymes; enzymes catalyzing post-transcriptional modifications; alanyl tRNA synthetase (AlaRS); EF-Tu; S1; and RNase R (Saguy et al., 2005). All of the known tmRNA partners bind to its TLD (Figure 6), with the notable exception of S1 which can interact with the PK ring.

PROCESSING ENZYMES

As with canonical tRNA genes, the tmRNA-encoding *ssrA* gene also encodes for a primary transcript that needs to be processed before yielding to the fully-mature molecule (Keiler et al., 2000). This precursor is 457-nucleotides long in *E. coli*, and is processed at the 5'-terminus by the endonuclease RNase P (Komine et al., 1994). The 3'-terminus is cleaved by the endonucleases RNase III or E, then trimmed by exonucleases RNase T and/or PH (Li et al., 1998). The result is a 363 nt-long mature *E. coli* tmRNA with a conserved 3'-terminal CCA trinucleotide (Lin-Chao et al., 1999).

ENZYMES CATALYZING POST-TRANSCRIPTIONAL MODIFICATIONS

As in regular tRNA, post-transcriptional modifications occur in tmRNA. In particular, two modified nucleosides, 5-methyluridine (m5U) and pseudouridine (Ψ), have been identified in the T-loop of the molecule's TLD (Felden et al., 1998). In *E. coli*, three methyltransferases can catalyze the C5-methylation of uridine: TrmA (formerly RumT); RlmD; and RlmC. However, it has been recently demonstrated that only TrmA is responsible for this process in tmRNA (see Figure 6B for a model of the interaction) (Ranaei-Siadat et al., 2013). Since this enzyme is absent in Gram-positive bacteria, a methylene-tetrahydrofolate dependent enzyme, TrmFO, probably takes over this responsibility in such bacteria (Ranaei-Siadat et al., 2013). Pseudouridylation, meanwhile, is probably performed by the tRNA Ψ 55 synthase

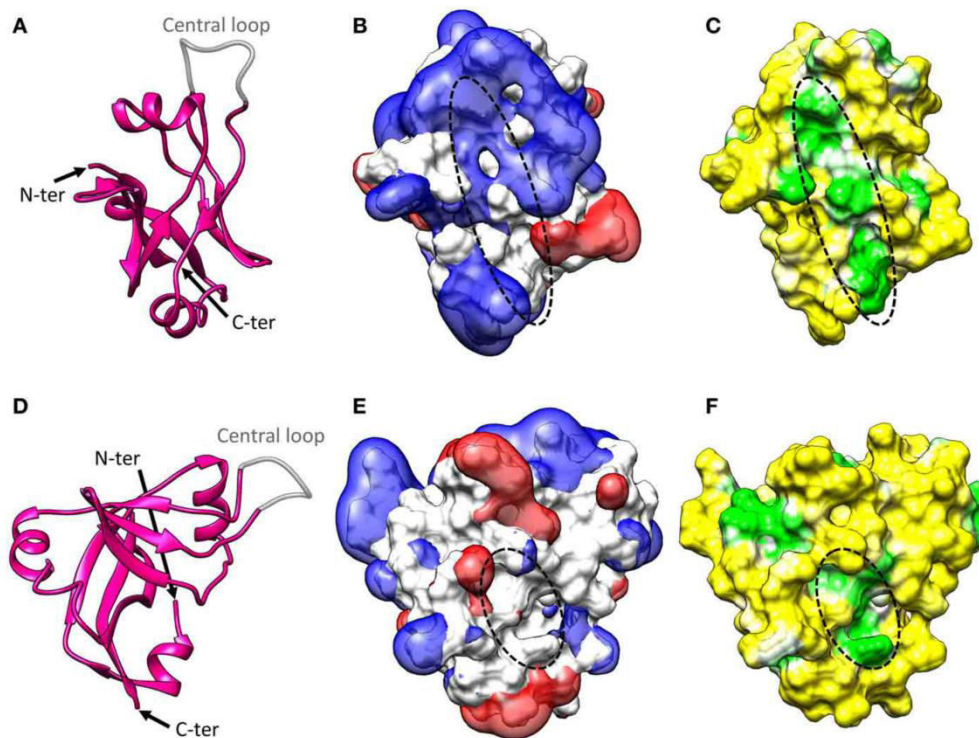


FIGURE 3 | SmpB structure. (A) Cartoon representation of the crystal structure of *Thermus thermophilus* SmpB (PDB entry: 1WJX). The N-terminal end, C-terminal end, and central loop are indicated. SmpB adopts an oligonucleotide-binding fold (OB fold) with a central β -barrel and three flanking α -helices. The C-terminal tail is unstructured in solution but folds into a fourth α -helix once SmpB is inserted into the ribosome. The central loop is disordered in the crystal, suggesting that it must be flexible when the protein is alone. (B) Electrostatic potential of SmpB. Two isocontours at -1 V (red) and $+1$ V (blue) are represented with the solvent-accessible surface of SmpB (white). The potential was calculated using the APBS program (Baker et al., 2001) with CHARMM force field parameters and an ionic strength of 50 mM. The primary

tmRNA binding site interacting with the TLD (indicated with a dotted line) is surrounded by a strong electropositive field. (C) Molecular hydrophobicity potential projected on the solvent-accessible surface of SmpB. The potential was computed with the Platinum server using Ghose force field parameters (Pyrkov et al., 2009). The hydrophobicity scale is green-white-yellow, with yellow representing the most hydrophilic regions and green the most hydrophobic. The primary tmRNA binding site interacting with the TLD (indicated with a dotted line) is formed by a deep hydrophobic patch. (D-F) Side views of the information presented in (A-C). Note that in (E,F), a dotted line indicates the secondary tmRNA binding site that interacts with the nucleotides upstream from the resume codon after translocation of tmRNA-SmpB into the ribosomal P-site.

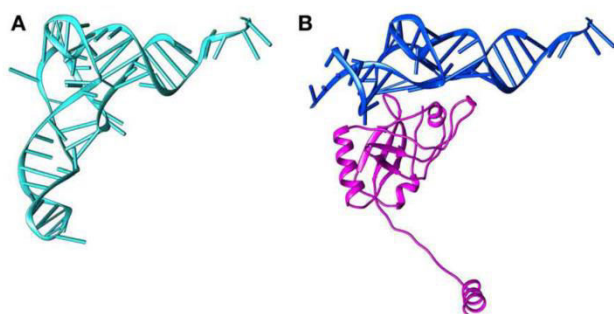


FIGURE 4 | Structural comparison between tRNA and the tRNA-like domain of tmRNA bound to SmpB. (A) The structure of tRNA (PDB entry 2WRN). (B) The structure of TLD-SmpB (PDB entry 4ABR). The TLD is blue and SmpB is magenta. The TLD resembles the upper part of a tRNA, with SmpB replacing the tRNA anticodon stem-loop.

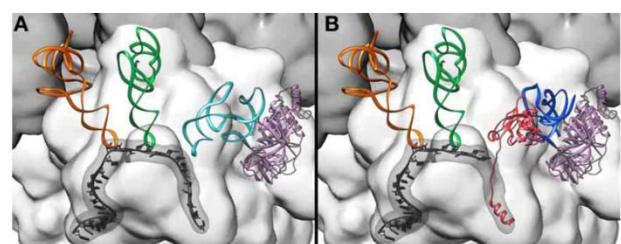
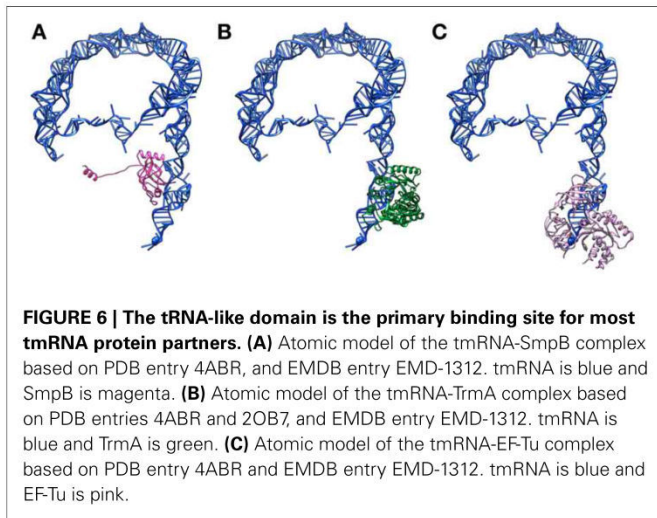


FIGURE 5 | Comparing ribosomal A-site recognition by canonical tRNA and tmRNA-SmpB. (A) tRNA pre-accommodated on the ribosome (Schmeing et al., 2009) (PDB entries 2WRN, 2WRO). The large 50S subunit is dark gray, the small 30S subunit is light gray, mRNA is black (the mRNA path is also highlighted), the E-site tRNA is orange, the P-site tRNA is green, EF-Tu is pink, and the incoming tRNA is light blue. (B) The TLD-SmpB complex pre-accommodated on the ribosome (Neubauer et al., 2012) (PDB entries 4ABR 4ABS). The C-terminal tail of SmpB folds into an α -helix inserted within the empty mRNA path. The color code is as (A), with TLD in blue and SmpB in red.



(“TruB”), which is responsible for the same modification in the tRNA T-loop (Felden et al., 1998; Ranaei-Siadat et al., 2013).

ALANYL-tRNA SYNTHETASE (AlaRS)

The conserved 3′-terminal tail of tmRNA is always charged with an alanine by alanyl-tRNA synthetase (AlaRS), a class II tRNA synthetase that catalyzes the esterification of alanine to tRNA^{Ala}. The presence of the G3 U70 wobble base pair (found in the acceptor stem of all tRNA^{Ala} isoacceptors) and of an adenosine at the discriminator position adjacent to the 3′-terminal CCA are the keys to specific recognition of tRNA^{Ala} by AlaRS (Hou and Schimmel, 1988). Interestingly, this same wobble base pair is conserved in all *ssrA* sequences, which makes AlaRS the only amino-acid synthetase working on tmRNA *in vivo*. Although the structural details of the AlaRS-tmRNA interaction have not yet been elucidated, it is possible that one of the SmpB loops is involved in the interaction with alanyl-tRNA synthetase, which would explain why the protein encourages tmRNA alanylation (Bessho et al., 2007).

ELONGATION FACTOR EF-Tu

EF-Tu accounts for up to 5% of the total cellular protein, making it the most abundant protein in the bacterial cell. It forms a ternary complex with aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) and GTP, bringing aa-tRNA to the ribosome (Kavaliuskas et al., 2012). The same goes for *trans*-translation, where EF-Tu•GTP interacts with tmRNA-SmpB to form a quaternary complex and initiate the rescue of the stalled ribosomes (Figure 6C). A *trans*-translating ribosome in its pre-accommodated stage has a very similar structure to that of the equivalent EF-Tu-aa-tRNA complex, including the specific 3′-CCA end and acceptor arm conformations along with a T-arm that interacts with EF-Tu. However, EF-Tu and SmpB do not interact (Neubauer et al., 2012). Surprisingly, EF-Tu•GDP can also bind to charged or deacylated tmRNA (Zvereva et al., 2001; Stepanov and Nyborg, 2003). In cases such as these, EF-Tu also interacts with regions outside the TLD, and this unexpected activity may protect tmRNA from degradation. Last but not least, it was recently shown that release of EF-Tu from the

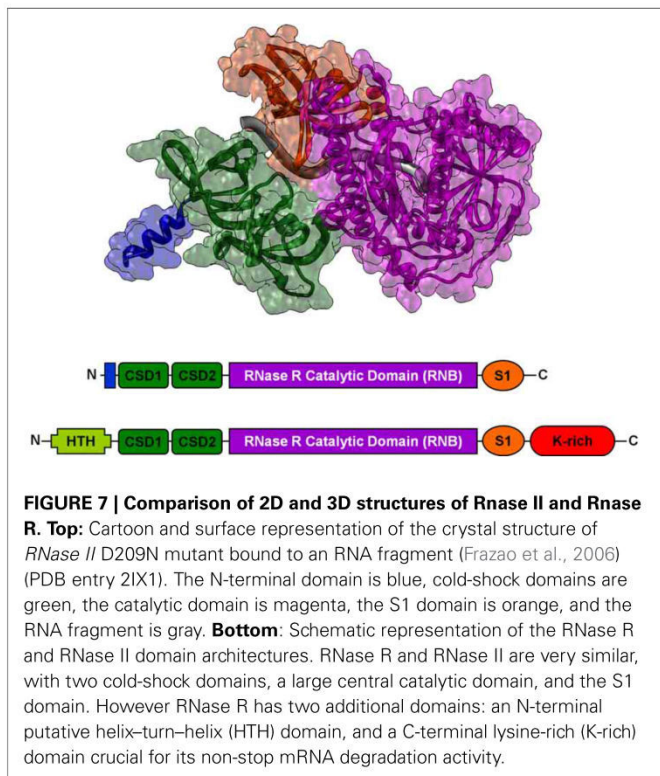
tmRNA-SmpB complex on the ribosome may occur prior to GTP hydrolysis (Miller and Buskirk, 2014).

RIBOSOMAL PROTEIN S1

S1 is the *rpsA* gene product and the longest and largest of the ribosomal proteins. In Gram-negative bacteria, its weak association with the 30S small subunit makes it a key mRNA-binding protein, as it facilitates ribosomal recognition of most mRNAs during translation initiation (Sorensen et al., 1998; Hajnsdorf and Boni, 2012). The protein is made of six homologous domains (“S1” domains) that characterize the OB-fold family of RNA-binding proteins (Bycroft et al., 1997). S1’s N-terminal domain binds to the ribosome, leaving its elongated C-terminal RNA-binding domain protruding into solution (Subramanian, 1983). Since S1 binds to tmRNA 600 times better than to tRNA, S1 must play an important role in *trans*-translation, forming complexes with free tmRNA and then promoting ribosomal binding (Wower et al., 2000). While the TLD remains unaffected, significant conformational changes have been observed in tmRNA pseudoknots upon S1 binding. This suggests that S1 binds tmRNA by contacting the PK ring, interacting most strongly with PK2 (Bordeau and Felden, 2002). Interesting clues to the role played by S1 during *trans*-translation come from cryo-electron microscopic (cryo-EM) data showing how tmRNA binds to the ribosome in a pre-accommodated step (Valle et al., 2003; Gillet et al., 2007). Without S1, the tmRNA ribosome complex displays an extra density which corresponds to the MLD. This suggests that S1 is involved in the unwinding of the MLD outside the ribosome before initiation of *trans*-translation. Thus even before tmRNA-SmpB binds to the ribosome, S1 might enter the PK ring (which has an inner diameter of about 80Å), facilitating the access to the internal ORF (Bordeau and Felden, 2002). Then once the tmRNA binds to the stalled ribosome, S1 would be released, and the ORF placed in the decoding site (Gillet et al., 2007). Recent data on the Gram-positive *Actinobacteria* group confirm the indispensability of S1 for *trans*-translation. Indeed, the first-line anti-tuberculosis drug pyrazinamide inhibits *trans*-translation by transforming into pyrazinoic acid, a molecule which binds to S1 (Shi et al., 2011).

EXORIBONUCLEASE R

Exoribonuclease R (RNase R) is a member of the RNase II superfamily, a group of enzymes that degrade RNA through hydrolysis, moving progressively in a sequence-independent manner in the 3–5′ direction. In *E. coli*, RNase R is a ubiquitous *rnr*-encoded 92 kDa protein. RNase R has helicase activity, and helps degrade structured RNAs, including small, ribosomal, and messenger RNAs (Cheng and Deutscher, 2002; Matos et al., 2011). During *trans*-translation, to avoid being recruited over and over in a feedback loop of translation and *trans*-translation, problematic mRNA transcripts must be degraded quickly. Thanks to its unique K-rich domain (Figure 7), RNase R is recruited to stalled ribosomes to degrade the defective mRNAs in a *trans*-translation-dependent manner (Richards et al., 2006; Ge et al., 2010). Strikingly, tmRNA-SmpB has several distinct roles in regulating the stability and action of RNase R. tmRNA-SmpB binding



to the C-terminal K-rich domain of RNase R is required for the enzyme's recruitment to stalled ribosomes (Ge et al., 2010). RNase R acetylation, observed mostly during the exponential phase, also promotes tmRNA-SmpB binding to the C-terminal domain. However, this in turn stimulates the degradation of RNase R by HslUV and Lon proteases (Liang and Deutscher, 2012, 2013). In *Caulobacter crescentus*, tmRNA cycle-regulated degradation is ensured by RNase R, but its action is regulated by SmpB (Hong et al., 2005). Finally, it was recently shown in *Streptococcus pneumoniae* that SmpB and RNase R are both cross-regulated and co-transcribed (Moreira et al., 2012). *Trans*-translation and RNase R are thus obviously tightly interdependent.

STRUCTURAL ASPECTS OF *TRANS*-TRANSLATION

Most of the initial steps of *trans*-translation have been made clear by cryo-EM studies. These studies resulted in several structures of the pre-accommodation, accommodation, and first translocation steps of tmRNA-SmpB on the ribosome (Figure 8). Crystal and NMR structures of isolated SmpB and TLD-SmpB also paved the way for an accurate positioning of tmRNA and partners into the cryo-EM maps. More recently, the crystal structure of a tmRNA fragment with SmpB and EF-Tu bound to the ribosome has greatly increased the understanding of how the tmRNA-SmpB complex interacts with a stalled ribosome without interfering in normal translation (Figure 1).

PRE-ACCOMMODATION

The first structure of the tmRNA-SmpB-EF-Tu•GDP pre-accommodation step was obtained by cryo-EM (Valle et al., 2003)

and was helpful in understanding how the ribosome and the huge tmRNA molecule interact. The images demonstrated that the TLD is associated with EF-Tu, and that it is guided to the ribosome in the same manner as an aminoacyl tRNA (Figure 8). Combining the crystal structures of the TLD-SmpB complex in solution (Gutmann et al., 2003; Bessho et al., 2007) and chemical probing experiments (Kurita et al., 2007), it was suggested that SmpB must mimic tRNA's codon-anticodon pairing and D stem-loop, with the TLD playing the role of tRNA's upper half (Figure 4). There has been some controversy about the number of SmpB molecules involved in *trans*-translation (Felden and Gillet, 2011). However, in keeping with the most recent crystal and cryo-EM studies of pre- and post-accommodated states, the agreed upon model has a 1:1 SmpB:tmRNA molar ratio. The cryo-EM maps were also helpful in understanding how the ribosome and the huge tmRNA molecule interact. In fact, the helix H2 mimics a long tRNA variable arm, leaning along the 30S subunit and pointing out of the ribosome toward the beak. The other domains (PK1, the MLD, H5, PK2, PK3, and PK4) wrap around the 30S beak like a ribbon (Figures 8, 9). The recent crystal structure of TLD-SmpB-EF-Tu on the ribosome has revealed even more details about how the tmRNA-SmpB complex identifies stalled ribosomes (Neubauer et al., 2012). Acting in every way as a tRNA molecule, after binding to the ribosome the TLD-SmpB complex shows no major distortions (Figure 9). A *trans*-translating ribosome in its pre-accommodated stage has an overall conformation closely resembling that of an equivalent complex of EF-Tu with aminoacylated tRNA. Similarities include the conformations of the 3'-CCA end, the acceptor arm, and the T-arm portions (Figure 5). To bring the shoulder domain of the 30S subunit (containing the key residue G530) closer to its 3' major domain (containing the decoding residues A1492 and A1493), SmpB interacts with the 30S subunit. In doing so, SmpB tricks it into adopting a "closed" conformation, as if in the presence of a cognate codon-anticodon, with the shoulder and head domains rotated toward the subunit's center (Ogle et al., 2002). In the unoccupied mRNA pathway downstream of the decoding center, the SmpB C-terminal tail simultaneously folds into an α -helix (Figure 5B). This allows the protein to undergo specific interactions with regions only accessible in the absence of mRNA, thus stabilizing SmpB and permitting an accurate identification of the vacant A-site. The pre-accommodation structure therefore explains the functional relevance of the SmpB C-terminal tail in tmRNA tagging. Interestingly, the same strategy is adopted by ArfB, a recently-discovered alternative rescue factor. ArfB possesses a structure similar to the catalytic domain of class I release factors. It also has a helical C-terminal tail which binds in the mRNA entry channel of the small subunit, allowing discrimination between active and stalled ribosomes (Gagnon et al., 2012).

ACCOMMODATION

After GTP hydrolysis, EF-TU•GDP is released and the tmRNA-SmpB complex accommodates into the A-site. The TLD contacts with the large ribosomal subunit look like those of an accommodated canonical tRNA (Cheng et al., 2010; Fu et al., 2010; Weiss et al., 2010a,b). In this step, the D-loop interacts with helix H38

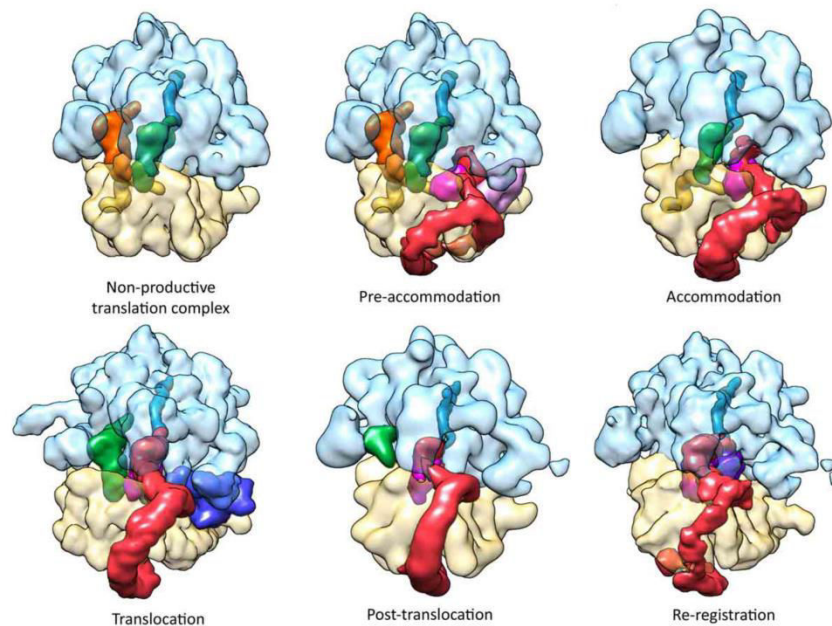


FIGURE 8 | Cryo-EM maps of the currently-solved *trans*-translation functional complexes. Non-productive translation complex (NTC): the ribosome stalls at the 3'-end of the mRNA, the A-site lacks a complete codon. Pre-accommodation: The alanyl-tmRNA•SmpB•EF-Tu•GTP quaternary complex enters the vacant A-site of a non-stop stalled ribosome (EMDB entry: EMD-1312) (Valle et al., 2003; Kaur et al., 2006). Accommodation: EF-Tu dissociates after GTP hydrolysis, allowing tmRNA-SmpB to occupy the A-site (EMDB entry: EMD-5188) (Weis et al., 2010a). Translocation: EF-G•GTP catalyzes the translocation of tmRNA-SmpB to the P-site. The ribosome is in a ratcheted state and a unique swivel of the head is observed (EMDB entry: EMD-5386) (Ramrath

et al., 2012). Post-translocation: After dissociation of EF-G•GDP, the subunits return to normal positioning, and the resume codon of tmRNA is correctly placed into the A-site (EMDB entry: EMD-5189) (Weis et al., 2010a). Re-registration: Translation switches on the tmRNA internal ORF, and a new aminoacyl-tRNA binds to the resume codon (EMDB entry: EMD-5234) (Fu et al., 2010). Color code: the large 50S subunit is light blue; the small 30S subunit is pale yellow; the truncated mRNA is yellow; the nascent polypeptide is teal; the tRNA initially occupying the E-site is orange; the tRNA initially occupying the P-site is green; the tmRNA is red; the SmpB is magenta; the EF-Tu is light pink; the EF-G is blue; and the A site-tRNA is purple.

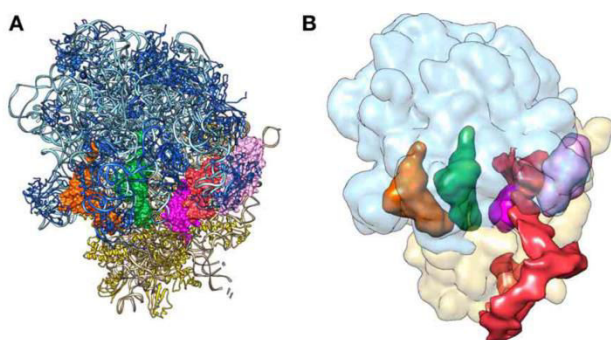


FIGURE 9 | The pre-accommodation step of *trans*-translation as solved by X-ray diffraction and to cryo-electron microscopy. (A) Crystal structure of the alanyl-TLD-SmpB-EF-Tu•GDP quaternary complex bound to a stalled ribosome (Neubauer et al., 2012) (PDB entries 4ABR 4ABS). **(B)** Cryo-EM map of the alanyl-tmRNA-SmpB-EF-Tu•GTP quaternary complex bound to a stalled ribosome (Valle et al., 2003) (EMDB entry: EMD-1312). Color code: tmRNA or TLD is red; SmpB is magenta; the small 30S subunit is yellow; the large 50S subunit is light blue; the E-Site tRNA is orange; the P-site tRNA is green; and the EF-Tu is pink.

and the acceptor branch guides the CCA 3'-end into the peptidyl transfer center. The TLD swings into the A-site, and SmpB follows, rotating by about 30° while still mimicking an anticodon stem-loop (Figure 8). Helix H2 therefore realigns itself toward

the large subunit, interacting with protein L11. The PK ring does not undergo large movements and stays wrapped around the beak of 30S.

TRANSLOCATION

After transpeptidation, nascent peptides are elongated by one alanine, and there is a spontaneous rotation of the 30S subunit in an anticlockwise direction from the 50S. This ratchet-like motion brings tmRNA and tRNA into hybrid states of binding (A/P and P/E, respectively). During this translocation reaction, EF-G binds to SmpB as it does to tRNA, but it triggers a unique 12° tilt of the 30S head (Ramrath et al., 2012). The tmRNA-SmpB complex is in a hybrid state, with the TLD bound to the 50S P-site, and SmpB still pointing toward the A-site. The opening of the inter-subunit B1a bridge (or "A-site finger") during the ratchet movement allows helix H2 to go through (Weis et al., 2010a). Thus the A-site finger, whose mutations are known to alter tmRNA function (Crandall et al., 2010), interacts with PK1. After the head moves, the pseudoknot ring rotates, allowing H5/PK2 to come into contact with proteins S2 and S3 at the 30S subunit's surface at the same time as the tmRNA internal ORF extends into the mRNA path (Figure 8). After EF-G•GDP dissociates, the subunits return to their usual positions, and the tmRNA resume codon is placed into the A-site (Weis et al., 2010a). Translation then re-registers on the tmRNA internal

ORF, and a new aminoacyl-tRNA complex binds to the resume codon. During these “post-translocation” and “re-registration” steps, SmpB remains bound to the tmRNA (Shpanchenko et al., 2005) and the TLD-SmpB takes up the same space in the P-site as a regular tRNA would. Helix H2 is inserted tightly between the two ribosomal subunits, forming several contacts with both. The PK ring’s conformation and orientation mostly remains the same, with H5 and PK2 staying at the 30S subunit’s surface. At this stage, since helix H5 is still present, the internal ORF is only partially unfolded. However the distance separating PK1 and H5 increases, which suggests that the single strand connecting the two domains must be fully extended during its insertion into the mRNA path. While this single-strand section of the tmRNA cannot be directly seen in the cryo-EM structure, the ribosomal environment is sufficiently restrained so that it can be modeled precisely. Molecular dynamics flexible fitting showed that the upstream region of the tmRNA resume codon interacts with the C-terminal tail of SmpB and with the hydrophobic pocket at the bottom of the protein (Fu et al., 2010; Weis et al., 2010a). These interactions place the resume codon directly in the 30S decoding center. This explains the essential role in frame selection of the five nucleotides upstream from the tmRNA resume codon (Williams et al., 1999; Lee et al., 2001; Miller et al., 2008), of the SmpB C-terminal tail (Miller et al., 2011), and of four specific residues on the SmpB surface (Watts et al., 2009). Comparing the accommodation and post-translocation electron density maps confirms the release of truncated mRNA during the translocation of tmRNA to the P-site (Weis et al., 2010a).

MOVING FORWARD INTO THE RIBOSOME

The remaining steps have not yet been observed, but a *trans*-translation model can be proposed by comparing it to canonical translation. It is certain that tRNA and the tmRNA-SmpB complex are translocated into the P- and E-sites, respectively, and that this process is repeated until reaching the tmRNA stop codon. Along the way, the TLD and H2 of SmpB and tmRNA are rapidly released. The messenger part of tmRNA is extended, leading to a deconstruction of helix H5 (Wower et al., 2005; Bugaeva et al., 2009). The tmRNA-SmpB complex stays near the ribosome, as the internal ORF is on the mRNA pathway. When the stop codon is reached, a class I release factor (either RF1 or RF2) binds to the A-site, inducing hydrolysis of the nascent peptide from the P-site tRNA. The protein is then released from the ribosome and immediately targeted by proteases because of its tagged C-terminal tail. At the end of the termination/recycling step, the deacyl-tRNA, deacyl-tmRNA-SmpB, and ribosomal small subunits separate, and the tmRNA-SmpB complex is recycled (Figure 1).

CONCLUDING REMARKS

tmRNA-SmpB structures inside and out of the bacterial ribosome have provided a framework for understanding how bacteria cope with stalled protein synthesis. In combination with genetic and biochemical studies, such data have yielded a clear model of *trans*-translation at the molecular level (Figure 1). Finally, several decades after the discovery of this process, technological and therapeutic developments should be possible. The recent discovery that *trans*-translation can be a target for several antibiotics

confirms its high therapeutic potential. We hope that researchers will now be able to exploit structural insights into the *trans*-translating ribosome, leading to new antibiotics that target the bacterial ribosome at the quality control level (Ramadoss et al., 2013).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the members of the “Translation and Folding” laboratory and Juliana Berland for insightful comments on the manuscript. These studies were supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-08JCJC-0027-01 and ANR-09-MIE) and from the Institut Universitaire de France.

REFERENCES

- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10037–10041. doi: 10.1073/pnas.181342398
- Barends, S., Bjork, K., Gultyaev, A. P., de Smit, M. H., Pleij, C. W., and Kraal, B. (2002). Functional evidence for D- and T-loop interactions in tmRNA. *FEBS Lett.* 514, 78–83. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02306-2
- Beshko, Y., Shibata, R., Sekine, S., Murayama, K., Higashijima, K., Hori-Takemoto, C., et al. (2007). Structural basis for functional mimicry of long-variable-arm tRNA by transfer-messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8293–8298. doi: 10.1073/pnas.0700402104
- Bordeau, V., and Felden, B. (2002). Ribosomal protein S1 induces a conformational change of tmRNA; more than one protein S1 per molecule of tmRNA. *Biochimie* 84, 723–729. doi: 10.1016/S0300-9084(02)01442-6
- Bugaeva, E. Y., Surkov, S., Golovin, A. V., Ofverstedt, L. G., Skoglund, U., Isaksson, L. A., et al. (2009). Structural features of the tmRNA-ribosome interaction. *RNA* 15, 2312–2320. doi: 10.1261/rna.1584209
- Bycroft, M., Hubbard, T. J., Proctor, M., Freund, S. M., and Murzin, A. G. (1997). The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* 88, 235–242. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81844-9
- Cheng, K., Ivanova, N., Scheres, S. H., Pavlov, M. Y., Carazo, J. M., Hebert, H., et al. (2010). tmRNA-SmpB complex mimics native aminoacyl-tRNAs in the A site of stalled ribosomes. *J. Struct. Biol.* 169, 342–348. doi: 10.1016/j.jsb.2009.10.015
- Cheng, Z. F., and Deutscher, M. P. (2002). Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *J. Biol. Chem.* 277, 21624–21629. doi: 10.1074/jbc.M202942200
- Crandall, J., Rodriguez-Lopez, M., Pfeiffer, M., Mortensen, B., and Buskirk, A. (2010). rRNA mutations that inhibit transfer-messenger RNA activity on stalled ribosomes. *J. Bacteriol.* 192, 553–559. doi: 10.1128/JB.01178-09
- Dong, G., Nowakowski, J., and Hoffman, D. W. (2002). Structure of small protein B: the protein component of the tmRNA-SmpB system for ribosome rescue. *EMBO J.* 21, 1845–1854. doi: 10.1093/emboj/21.7.1845
- Felden, B., and Gillet, R. (2011). SmpB as the handyman of tmRNA during translation. *RNA Biol.* 8, 440–449. doi: 10.4161/rna.8.3.15387
- Felden, B., Hanawa, K., Atkins, J. E., Himeno, H., Muto, A., Gesteland, R. F., et al. (1998). Presence and location of modified nucleotides in *Escherichia coli* tmRNA: structural mimicry with tRNA acceptor branches. *EMBO J.* 17, 3188–3196. doi: 10.1093/emboj/17.11.3188
- Frazaio, C., McVey, C. E., Amblar, M., Barbas, A., Vonrhein, C., Arraiano, C. M., et al. (2006). Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. *Nature* 443, 110–114. doi: 10.1038/nature05080
- Fu, J., Hashem, Y., Wower, I., Lei, J., Liao, H. Y., Zwieb, C., et al. (2010). Visualizing the transfer-messenger RNA as the ribosome resumes translation. *EMBO J.* 29, 3819–3825. doi: 10.1038/emboj.2010.255
- Gagnon, M. G., Seetharaman, S. V., Bulkley, D., and Steitz, T. A. (2012). Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome. *Science* 335, 1370–1372. doi: 10.1126/science.1217443
- Gaudin, C., Zhou, X., Williams, K. P., and Felden, B. (2002). Two-piece tmRNA in cyanobacteria and its structural analysis. *Nucleic Acids Res.* 30, 2018–2024. doi: 10.1093/nar/30.9.2018
- Ge, Z., Mehta, P., Richards, J., and Karzai, A. W. (2010). Non-stop mRNA decay initiates at the ribosome. *Mol. Microbiol.* 78, 1159–1170. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07396.x

Giudice et al.

Structures and functions of tmRNA-SmpB

- Gillet, R., Kaur, S., Li, W., Hallier, M., Felden, B., and Frank, J. (2007). Scaffolding as an organizing principle in trans-translation. The roles of small protein B and ribosomal protein S1. *J. Biol. Chem.* 282, 6356–6363. doi: 10.1074/jbc.M609658200
- Giudice, E., and Gillet, R. (2013). The task force that rescues stalled ribosomes in bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 38, 403–411. doi: 10.1016/j.tibs.2013.06.002
- Gutmann, S., Haebel, P. W., Metzinger, L., Sutter, M., Felden, B., and Ban, N. (2003). Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature* 424, 699–703. doi: 10.1038/nature01831
- Hajnsdorf, E., and Boni, I. V. (2012). Multiple activities of RNA-binding proteins S1 and Hfq. *Biochimie* 94, 1544–1553. doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.010
- Hong, S. J., Tran, Q. A., and Keiler, K. C. (2005). Cell cycle-regulated degradation of tmRNA is controlled by RNase R and SmpB. *Mol. Microbiol.* 57, 565–575. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04709.x
- Hou, Y. M., and Schimmel, P. (1988). A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature* 333, 140–145. doi: 10.1038/333140a0
- Jacob, Y., Sharkady, S. M., Bhardwaj, K., Sanda, A., and Williams, K. P. (2005). Function of the SmpB tail in transfer-messenger RNA translation revealed by a nucleus-encoded form. *J. Biol. Chem.* 280, 5503–5509. doi: 10.1074/jbc.M409277200
- Janssen, B. D., and Hayes, C. S. (2012). The tmRNA ribosome-rescue system. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 86, 151–191. doi: 10.1016/B978-0-12-386497-0.00005-0
- Karzai, A. W., Roche, E. D., and Sauer, R. T. (2000). The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.* 7, 449–455. doi: 10.1038/75843
- Karzai, A. W., Susskind, M. M., and Sauer, R. T. (1999). SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J.* 18, 3793–3799. doi: 10.1093/emboj/18.13.3793
- Kaur, S., Gillet, R., Li, W., Gursky, R., and Frank, J. (2006). Cryo-EM visualization of transfer messenger RNA with two SmpBs in a stalled ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16484–16489. doi: 10.1073/pnas.0607438103
- Kavaliuskas, D., Nissen, P., and Knudsen, C. R. (2012). The busiest of all ribosomal assistants: elongation factor Tu. *Biochemistry* 51, 2642–2651. doi: 10.1021/bi300077s
- Keiler, K. C., Shapiro, L., and Williams, K. P. (2000). tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all known bacterial genomes: A two-piece tmRNA functions in Caulobacter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7778–7783. doi: 10.1073/pnas.97.14.7778
- Keiler, K. C., Waller, P. R., and Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271, 990–993. doi: 10.1126/science.271.5251.990
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Inokuchi, H. (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9223–9227. doi: 10.1073/pnas.91.20.9223
- Kurita, D., Muto, A., and Himeno, H. (2010). Role of the C-terminal tail of SmpB in the early stage of trans-translation. *RNA* 16, 980–990. doi: 10.1261/rna.1916610
- Kurita, D., Sasaki, R., Muto, A., and Himeno, H. (2007). Interaction of SmpB with ribosome from directed hydroxyl radical probing. *Nucleic Acids Res.* 35, 7248–7255. doi: 10.1093/nar/gkm677
- Lee, S., Ishii, M., Tadaki, T., Muto, A., and Himeno, H. (2001). Determinants on tmRNA for initiating efficient and precise trans-translation: some mutations upstream of the tag-encoding sequence of *Escherichia coli* tmRNA shift the initiation point of trans-translation *in vitro*. *RNA* 7, 999–1012. doi: 10.1017/S1355838201010342
- Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M. P. (1998). 3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2856–2861. doi: 10.1073/pnas.95.6.2856
- Liang, W., and Deutscher, M. P. (2012). Transfer-messenger RNA-SmpB protein regulates ribonuclease R turnover by promoting binding of HslUV and Lon proteases. *J. Biol. Chem.* 287, 33472–33479. doi: 10.1074/jbc.M112.375287
- Liang, W., and Deutscher, M. P. (2013). Ribosomes regulate the stability and action of the exoribonuclease RNase R. *J. Biol. Chem.* 288, 34791–34798. doi: 10.1074/jbc.M113.519553
- Lin-Chao, S., Wei, C. L., and Lin, Y. T. (1999). RNase E is required for the maturation of ssrA RNA and normal ssrA RNA peptide-tagging activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12406–12411. doi: 10.1073/pnas.96.22.12406
- Matos, R. G., Barbas, A., Gomez-Puertas, P., and Arraiano, C. M. (2011). Swapping the domains of exoribonucleases RNase II and RNase R: conferring upon RNase II the ability to degrade ds RNA. *Proteins* 79, 1853–1867. doi: 10.1002/prot.23010
- Miller, M. R., and Buskirk, A. R. (2014). An unusual mechanism for EF-Tu activation during tmRNA-mediated ribosome rescue. *RNA* 20, 228–235. doi: 10.1261/rna.042226.113
- Miller, M. R., Healey, D. W., Robison, S. G., Dewey, J. D., and Buskirk, A. R. (2008). The role of upstream sequences in selecting the reading frame on tmRNA. *BMC Biol.* 6:29. doi: 10.1186/1741-7007-6-29
- Miller, M. R., Liu, Z., Cazier, D. J., Gebhard, G. M., Herron, S. R., Zaher, H. S., et al. (2011). The role of SmpB and the ribosomal decoding center in licensing tmRNA entry into stalled ribosomes. *RNA* 17, 1727–1736. doi: 10.1261/rna.2821711
- Moore, S. D., and Sauer, R. T. (2007). The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 101–124. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142733
- Moreira, R. N., Domingues, S., Viegas, S. C., Amblar, M., and Arraiano, C. M. (2012). Synergies between RNA degradation and trans-translation in *Streptococcus pneumoniae*: cross regulation and co-transcription of RNase R and SmpB. *BMC Microbiol.* 12:268. doi: 10.1186/1471-2180-12-268
- Namecki, N., Tadaki, T., Himeno, H., and Muto, A. (2000). Three of four pseudoknots in tmRNA are interchangeable and are substitutable with single-stranded RNAs. *FEBS Lett.* 470, 345–349. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01349-1
- Neubauer, C., Gillet, R., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2012). Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. *Science* 335, 1366–1369. doi: 10.1126/science.1217039
- Nonin-Lecomte, S., Germain-Amiot, N., Gillet, R., Hallier, M., Ponchon, L., Dardel, E., et al. (2009). Ribosome hijacking: a role for small protein B during trans-translation. *EMBO Rep.* 10, 160–165. doi: 10.1038/embor.2008.243
- Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., and Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 111, 721–732. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01086-3
- Oh, B. K., Chauhan, A. K., Isono, K., and Apirion, D. (1990). Location of a gene (ssrA) for a small, stable RNA (10Sa RNA) in the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* 172, 4708–4709.
- Pyrkov, T. V., Chugunov, A. O., Krylov, N. A., Nolde, D. E., and Efremov, R. G. (2009). PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics* 25, 1201–1202. doi: 10.1093/bioinformatics/btp111
- Ramadoss, N. S., Alumasa, J. N., Cheng, L., Wang, Y., Li, S., Chambers, B. S., et al. (2013). Small molecule inhibitors of trans-translation have broad-spectrum antibiotic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 10282–10287. doi: 10.1073/pnas.1302816110
- Ramrath, D. J., Yamamoto, H., Rother, K., Witteck, D., Pech, M., Mielke, T., et al. (2012). The complex of tmRNA-SmpB and EF-G on translocating ribosomes. *Nature* 485, 526–529. doi: 10.1038/nature11006
- Ranaei-Siadat, E., Fabret, C., Seijo, B., Dardel, E., Grosjean, H., and Nonin-Lecomte, S. (2013). RNA-methyltransferase TrmA is a dual-specific enzyme responsible for C5-methylation of uridine in both tmRNA and tRNA. *RNA Biol.* 10, 572–578. doi: 10.4161/rna.24327
- Ray, B. K., and Apirion, D. (1979). Characterization of 10S RNA: a new stable rna molecule from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 174, 25–32. doi: 10.1007/BF00433301
- Richards, J., Mehta, P., and Karzai, A. W. (2006). RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. *Mol. Microbiol.* 62, 1700–1712. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05472.x
- Saguy, M., Gillet, R., Metzinger, L., and Felden, B. (2005). tmRNA and associated ligands: a puzzling relationship. *Biochimie* 87, 897–903. doi: 10.1016/j.biochi.2005.03.014
- Schmeing, T. M., Voorhees, R. M., Kelley, A. C., Gao, Y. G., Murphy, F. V. T., Weir, J. R., et al. (2009). The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science* 326, 688–694. doi: 10.1126/science.1179700
- Sharkady, S. M., and Williams, K. P. (2004). A third lineage with two-piece tmRNA. *Nucleic Acids Res.* 32, 4531–4538. doi: 10.1093/nar/gkh795
- Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry, C. E., et al. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 333, 1630–1632. doi: 10.1126/science.1208813

- Shimizu, Y., and Ueda, T. (2006). SmpB triggers GTP hydrolysis of elongation factor Tu on ribosomes by compensating for the lack of codon-anticodon interaction during trans-translation initiation. *J. Biol. Chem.* 281, 15987–15996. doi: 10.1074/jbc.M512165200
- Shpanchenko, O. V., Zvereva, M. I., Ivanov, P. V., Bugaeva, E. Y., Rozov, A. S., Bogdanov, A. A., et al. (2005). Stepping transfer messenger RNA through the ribosome. *J. Biol. Chem.* 280, 18368–18374. doi: 10.1074/jbc.M409094200
- Someya, T., Nameki, N., Hosoi, H., Suzuki, S., Hatanaka, H., Fujii, M., et al. (2003). Solution structure of a tmRNA-binding protein, SmpB, from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* 535, 94–100. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03880-2
- Sorensen, M. A., Fricke, J., and Pedersen, S. (1998). Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 280, 561–569. doi: 10.1006/jmbi.1998.1909
- Stagg, S. M., Frazer-Abel, A. A., Hagerman, P. J., and Harvey, S. C. (2001). Structural studies of the tRNA domain of tmRNA. *J. Mol. Biol.* 309, 727–735. doi: 10.1006/jmbi.2001.4632
- Stepanov, V. G., and Nyborg, J. (2003). tmRNA from *Thermus thermophilus*. Interaction with alanyl-tRNA synthetase and elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.* 270, 463–475. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03401.x
- Subramanian, A. R. (1983). Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 28, 101–142. doi: 10.1016/S0079-6603(08)60085-9
- Sundermeier, T. R., Dulebohn, D. P., Cho, H. J., and Karzai, A. W. (2005). A previously uncharacterized role for small protein B (SmpB) in transfer messenger RNA-mediated trans-translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2316–2321. doi: 10.1073/pnas.0409694102
- Tanner, D. R., Dewey, J. D., Miller, M. R., and Buskirk, A. R. (2006). Genetic analysis of the structure and function of transfer messenger RNA pseudoknot 1. *J. Biol. Chem.* 281, 10561–10566. doi: 10.1074/jbc.M600167200
- Ushida, C., Himeno, H., Watanabe, T., and Muto, A. (1994). tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 22, 3392–3396. doi: 10.1093/nar/22.16.3392
- Valle, M., Gillet, R., Kaur, S., Henne, A., Ramakrishnan, V., and Frank, J. (2003). Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science* 300, 127–130. doi: 10.1126/science.1081798
- Watts, T., Cazier, D., Healey, D., and Buskirk, A. (2009). SmpB contributes to reading frame selection in the translation of transfer-messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 391, 275–281. doi: 10.1016/j.jmb.2009.06.037
- Weis, F., Bron, P., Giudice, E., Rolland, J. P., Thomas, D., Felden, B., et al., (2010a) tmRNA-SmpB: a journey to the centre of the bacterial ribosome. *EMBO J.* 29, 3810–3818. doi: 10.1038/emboj.2010.252
- Weis, F., Bron, P., Rolland, J. P., Thomas, D., Felden, B., and Gillet, R. (2010b) Accommodation of tmRNA-SmpB into stalled ribosomes: a cryo-EM study. *RNA* 16, 299–306. doi: 10.1261/rna.1757410
- Williams, K. P., Martindale, K. A., and Bartel, D. P. (1999). Resuming translation on tmRNA: a unique mode of determining a reading frame. *EMBO J.* 18, 5423–5433. doi: 10.1093/emboj/18.19.5423
- Wower, I. K., Zwieb, C. W., Guven, S. A., and Wower, J. (2000). Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the *Escherichia coli* ribosome. *EMBO J.* 19, 6612–6621. doi: 10.1093/emboj/19.23.6612
- Wower, I. K., Zwieb, C., and Wower, J. (2004). Contributions of pseudo-knots and protein SmpB to the structure and function of tmRNA in trans-translation. *J. Biol. Chem.* 279, 54202–54209. doi: 10.1074/jbc.M410488200
- Wower, I. K., Zwieb, C., and Wower, J. (2005). Transfer-messenger RNA unfolds as it transits the ribosome. *RNA* 11, 668–673. doi: 10.1261/rna.7269305
- Wower, I. K., Zwieb, C., and Wower, J. (2009). *Escherichia coli* tmRNA lacking pseudoknot 1 tags truncated proteins *in vivo* and *in vitro*. *RNA* 15, 128–137. doi: 10.1261/rna.1192409
- Zvereva, M. I., Ivanov, P. V., Teraoka, Y., Topilina, N. I., Dontsova, O. A., Bogdanov, A. A., et al. (2001). Complex of transfer-messenger RNA and elongation factor Tu. Unexpected modes of interaction. *J. Biol. Chem.* 276, 47702–47708. doi: 10.1074/jbc.M106786200

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 20 December 2013; accepted: 05 March 2014; published online: 21 March 2014.

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

This article was submitted to *Microbial Physiology and Metabolism*, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2014 Giudice, Macé and Gillet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

III - Résultats préliminaires de l'étude structurale de la *trans*-traduction

III.1 - Introduction – Résultats préliminaires de l'étude structurale de la *trans*-traduction

Si le mécanisme général de la *trans*-traduction est bien admis, un certain nombre de points restent encore obscurs. Par exemple, les mécanismes permettant le passage du complexe ARNm-SmpB (Small Protein B), environ six fois plus grand qu'un ARNt classique, au travers du ribosome (Figure 20). De plus, l'intervention du partenaire RNase R chargé de détruire l'ARNm défectueux au cours de la *trans*-traduction n'a jamais été observée.

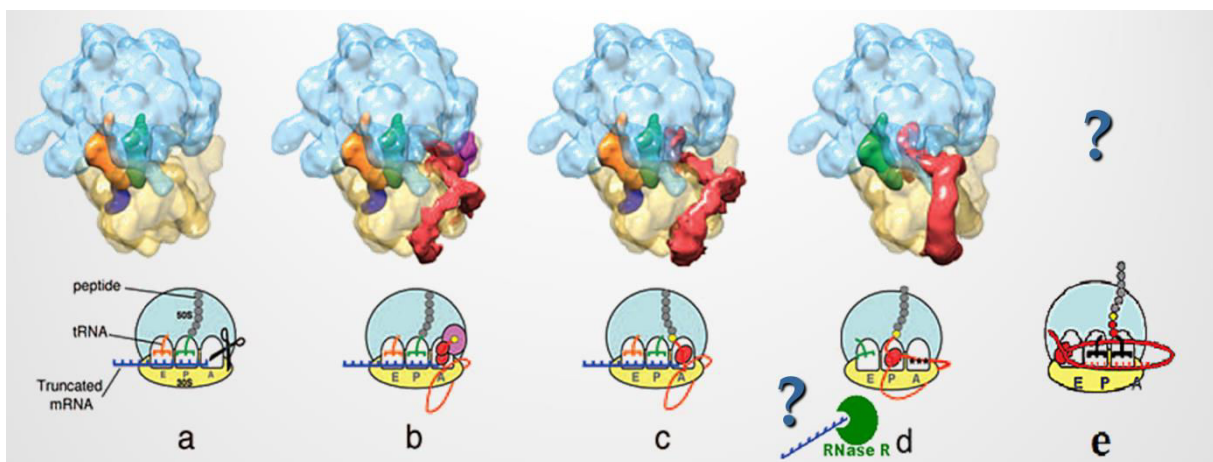


Figure 20. Les étapes précoces de la *trans*-traduction en structure 3D et schématique. (a) Ribosome bloqué lors de la traduction d'un ARNm défectueux. (b) Pré-accommodation : L'ARNtm se positionne au niveau du site A vide en complexe avec SmpB et EF-Tu. (c) Accommodation : Le peptide incomplet est transféré sur l'ARNtm. (d) Translocation : La traduction passe de l'ARNm défectueux à la partie codant de l'ARNtm. L'ARNm tronqué est éjecté puis dégradé. (e) Post-translocation : Le premier codon de l'ARNtm est traduit et le peptide est transféré sur l'ARNt. Le point d'interrogation symbolise que la structure de cette étape n'est pas connue.

III.2 - Complexe ribosomique en cours de *trans*-traduction en présence de RNase R

III.2.1 - Introduction : étude de la *trans*-traduction en présence de la RNase R

L'étude bibliographique ainsi que des données préliminaires suggèrent que la RNase R se lie au ribosome lors de l'arrivée du complexe ARNtm/SmpB/EF-Tu (Liang and Deutscher, 2012; Richards *et al.*, 2006; Venkataraman *et al.*, 2014). L'objectif de ce projet est d'obtenir la structure par cryo-MET des complexes de *trans*-traduction en présence de la RNase R. Le premier complexe en état de pré-accommodation, Ribosome/ARNtm/SmpB/RNase R/EF-Tu en présence de kirromycine, permettrait d'observer pour la première fois l'interaction de la RNase R avec le complexe ARNtm/SmpB dans le contexte ribosomique. Un second complexe, constitué du Ribosome/RNase R avec ARNtm/SmpB en cours de translocation *via* le blocage d'EF-G par l'acide fusidique, permettrait d'observer l'éjection de l'ARNm défectueux du ribosome ainsi que sa prise en charge par la ribonucléase chargée de le détruire. L'ARNm est alors pris directement en charge par la RNase R, qui est supposée être ancrée à proximité du canal d'ARNm.

Pour les précédents projets du laboratoire nous avons utilisé des ribosomes, l'ARNtm et SmpB de *Thermus thermophilus*. Cependant aucune RNase R n'a été identifiée dans le génome de cet organisme. Par conséquent pour l'étude structurale de la RNase R tous les complexes sont réalisés chez *E. coli*. Cela nécessite donc la mise au point de nouveaux protocoles de purification pour cet organisme (voir Annexe N°1 – Partie II).

Pour la purification de la RNase R-Hist, nous utilisons une RNase R spécifique D280N mutée dans son site catalytique (Matos *et al.*, 2009). Effectivement, l'utilisation d'une RNase R fonctionnelle n'est pas compatible avec l'étude ribosomique *in vitro*, puisque cette dernière dégrade les ARN ribosomiques dans ces conditions (résultats non publiés).

Un protocole de purification des ribosomes d'*E. coli* adapté pour l'étude de cryo microscopie a été également réalisé. Nous utilisons des ribosomes étiquetés par modification génétique sur le gène *rpsO* (uS15) grâce à l'ajout constitutif d'une étiquette Streptavidine (C Blanco, non publié). L'utilisation de ces ribosomes modifiés permet par la suite de purifier les complexes 70S-ARNtm-SmpB-RNaseR sur colonnes de chromatographie (Figure 21). Tout d'abord le complexe est passé sur une colonne HiTrap™ Streptavidin. Les ribosomes sont retenus et tous les éléments non liés au ribosome sont éliminés. Puis après élution, les complexes sont passés sur une colonne Histidine afin de retenir les complexes *via* la RNase R. Cela permet d'éliminer tous les ribosomes ou sous-unité ribosomiques n'ayant pas de complexe RNase R/ARNtm/SmpB. Cette méthode a pour avantage d'augmenter au maximum l'homogénéité de l'échantillon pour l'étude par cryo-EM.

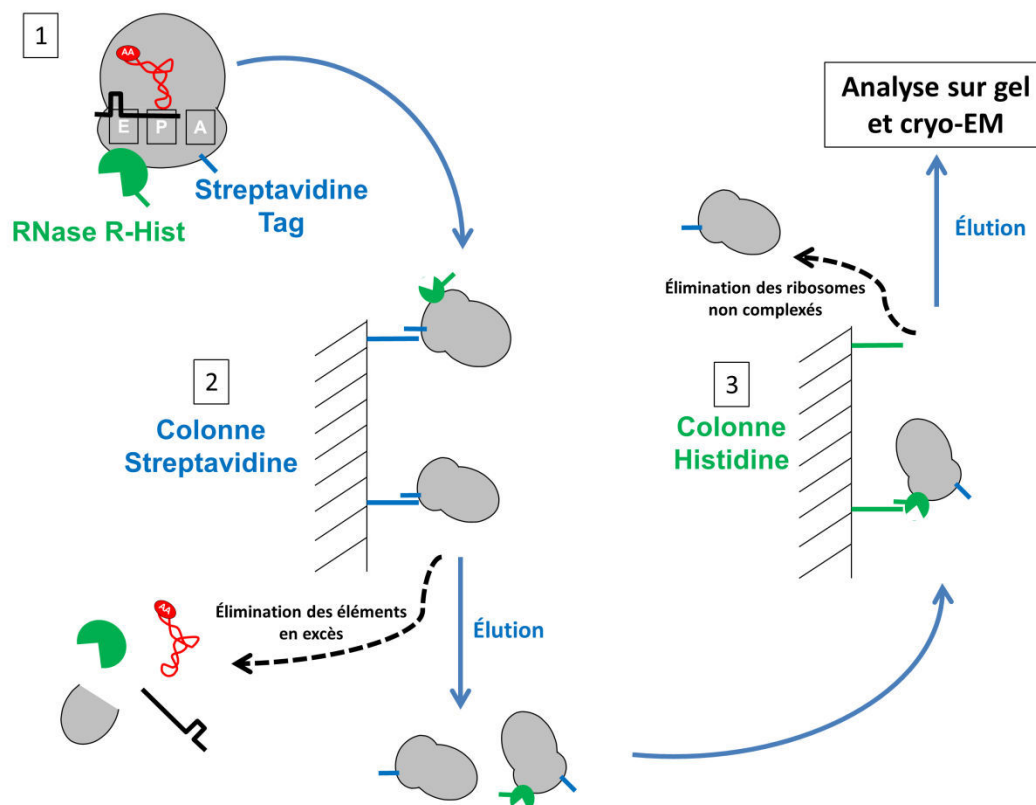


Figure 21. Les étapes de la purification des complexes 70S-RNase R. **Étape 1 :** mélange et incubation des différents éléments constituant le complexe. **Étape 2 :** première purification sur colonne Streptavidine (Ribosome retenu). **Étape 3 :** seconde purification sur colonne Histidine (RNase R retenu)

III.2.2 - Résultats préliminaires de l'étude de la trans-translation en présence de la RNase R

Tout d'abord des complexes 70S-RNase R sont formés afin de vérifier la possible fixation de l'enzyme au ribosome, en l'absence de tout facteur de traduction ou de *trans*-translation. Après plusieurs essais, il s'est avéré nécessaire de conserver la RNase R dans une forte concentration de glycérol (>50 %) afin d'éviter sa précipitation lors du mélange avec les ribosomes. Les complexes formés sont ensuite purifiés sur les deux colonnes HiTrap™ Streptavidin (Figure 22) et HisTrap™ et concentrés sur Amicon® pour analyse.

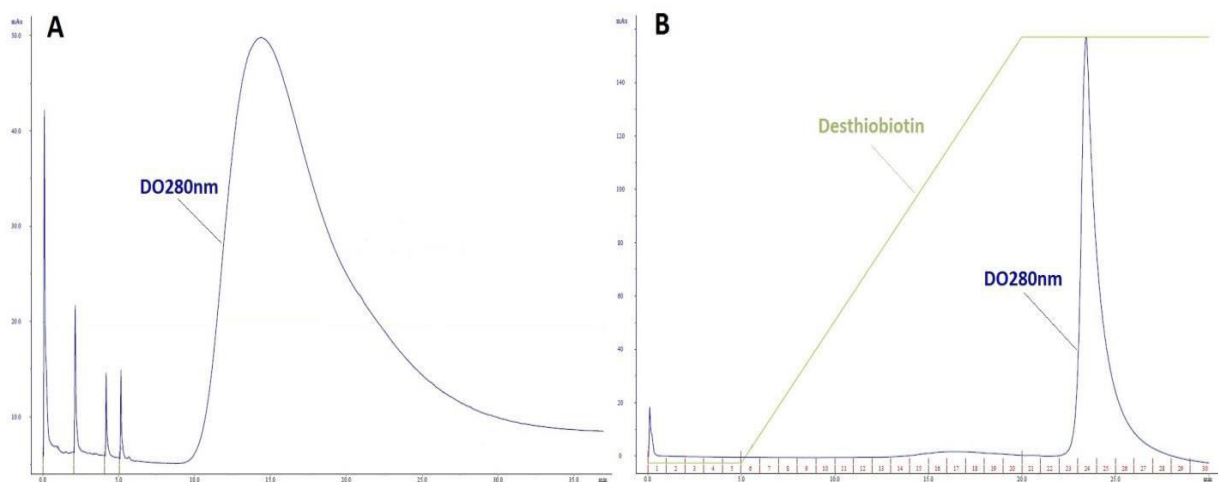


Figure 22. Chromatogramme de la purification du complexe sur colonne Streptavidine. En bleu la DO à 280nm, en vert la concentration en desthiobiotin. (A) Rétention des ribosomes et élimination des autres molécules non liées aux ribosomes (pic de DO280). (B) Éluion des ribosomes complexés ou non (pic de DO280).

L'échantillon obtenu est analysé sur gel gradient et en coloration négative (Figure 23, B). Nous observons bien une bande correspondant à la RNase sur le gel (figure 23, A), signifiant la formation d'un complexe stable RNase R/70S.

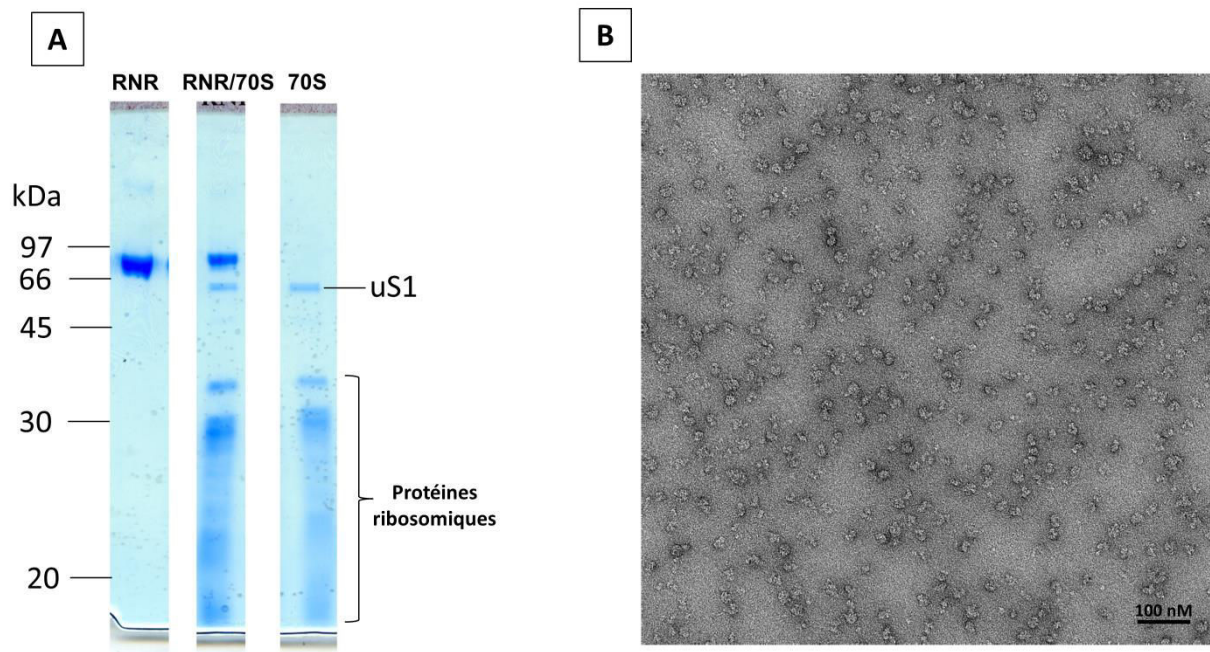


Figure 23. Analyse du complexe 70S-RNase R par gel d'acrylamide et coloration négative. (A) Gel gradient (4-20%) SDS-PAGE après purification du complexe. **(B)** Coloration négative à l'acétate d'uranyle du complexe après purification, permettant de contrôler l'association des sous-unités ribosomales.

Cet échantillon est ensuite vitrifié dans une fine couche de glace amorphe et observé par cryo-MET sur un microscope TECNAI G2 SPHERA opérant à 200 kV (plateforme MRic, Rennes). Nous avons procédé à environ 200 acquisitions à faibles doses d'électrons. Les particules isolées de chaque image sont ensuite sélectionnées et analysées à l'aide du logiciel IMAGIC-V. Une première reconstruction à faible résolution est obtenue, et comparée à la structure d'un ribosome vide (Figure 24).

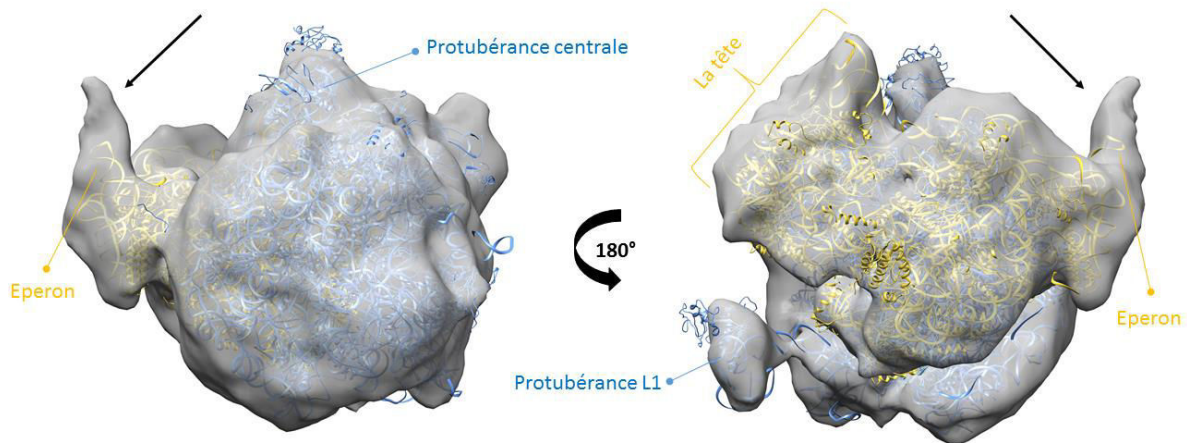


Figure 24. Reconstruction à faible résolution du complexe ribosome/RNase R. En gris, le volume obtenu après traitement des images. En jaune, le 30S et en bleu le 50S de la structure d'un ribosome vide. La flèche noire indique l'excès de volume observé au niveau de l'éperon.

Nous observons la présence d'un volume inhabituel au niveau de l'éperon de la sous-unité 30S. Ces résultats préliminaires sont en cohérence avec de précédentes observations. Effectivement, l'éperon se situe à proximité du canal de l'ARNm et de la protéine uS12 avec laquelle la RNase R interagit spécifiquement (Strader *et al.*, 2013). Après cette première étape prometteuse, nous sommes passés à la réalisation du complexe 70S-RNaseR-ARNtm-SmpB-EF-Tu-Kirromycine.

Les complexes 70S/ARNtm/SmpB/EF-Tu/RNase R, en phase de pré-accommodation *via* l'utilisation de kirromycine bloquant EF-Tu•GDP aux ribosomes, ont été réalisés et purifiés de la même manière, sur colonnes HiTrap™ Streptavidin et HisTrap™ (histidine). Une analyse sur gel d'agarose est également réalisée afin de contrôler la présence d'ARNtm dans le complexe (Figure 25).

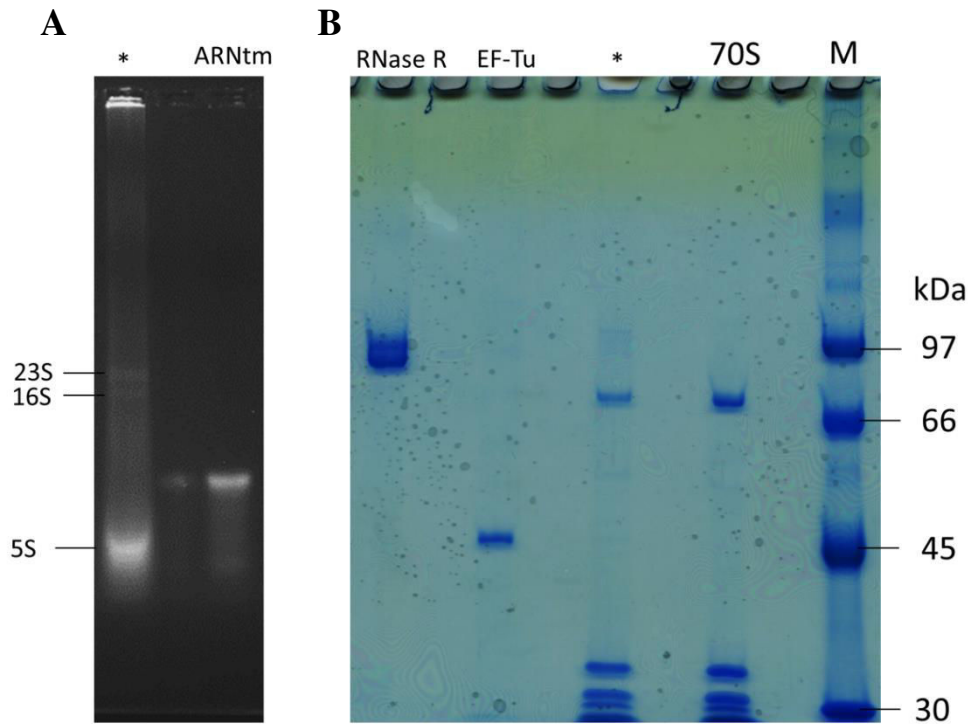


Figure 25. Analyses du complexe 70S/ARNtm/SmpB/EF-Tu/RNase R sur gels. (A) Gel d'Agarose 1,8% (MOPS 40mM pH7, NaOAc 10mM, EDTA 1mM) révélé au BET. Le puit * correspond au complexe 70S/ARNtm/SmpB/EF-Tu/RNase R (4pmoles) et le puit ARNtm, ARNtm *E. coli* pur (1 μ g). (B) Gel SDS-PAGE 10%, révélé à l'Instant Blue™. Le puit RNase R : RNase R (275pmoles) ; EF-Tu : EF-Tu (55pmoles) ; * : Complexe 70S/ARNtm/SmpB/EF-Tu/RNase R (10pmoles) ; 70S : ribosome pur (10pmoles) ; M : marqueur de taille.

D'après les résultats obtenus sur le gel A, la présence des ARN ribosomiques (5S) est observée. Cependant, pas ou peu d'ARNtm est présent dans le complexe. En effet, la bande correspondant aux ARNtm, n'est pas retrouvée sur l'échantillon (Figure 25, gel A, piste ARNtm). D'après les résultats obtenus pour la piste correspondant au complexe en pré-accommodation du gel B, une bande de faible intensité est observée à environ 97kDa correspondant à la présence de la RNase R dans l'échantillon. Une bande faiblement visible, d'environ 45kDa correspondant à EF-Tu est également observée. Les autres bandes correspondent aux protéines ribosomiques. L'analyse des gels montre que le ratio ribosomes complexés/ribosomes seuls est très faible. En conséquence il est impossible de passer à l'étape d'analyse par cryo-MET. En effet, il est indispensable d'avoir un échantillon concentré en complexes et le plus homogène possible, afin d'obtenir une structure tridimensionnelle de haute résolution.

III.2.3 - Discussion et conclusion des résultats préliminaires

Nous avons rencontré de nombreux problèmes tout au long de ce projet. Tout d'abord pour l'étape de purification des complexes, qui permet de séparer les différents facteurs en excès et d'analyser le contenu des complexes par SDS-PAGE et gel d'agarose. Effectivement, la plupart des complexes ribosomiques sont instables et font intervenir des liaisons faibles. Ainsi la méthode utilisée ici – ribosome retenu par l'étiquette streptavidine – n'est peut-être pas suffisamment rapide et douce. De plus, l'utilisation d'un tampon riche en desbiothine (tampon d'élution) est peut-être néfaste pour la stabilité des complexes. D'autres méthodes sont à tester, notamment celle utilisée classiquement pour l'étude du ribosome : l'ultracentrifugation sur cousin de sucrose. Cette technique de séparation facile et rapide, basée sur la séparation des molécules selon leur coefficient de sédimentation, est tout à fait compatible pour la réalisation de l'étape de purification. Une dernière solution possible est de ne pas purifier, ainsi nous pouvons réaliser les grilles de cryo-MET juste après préparation du complexe. Mais dans ce cas nous ne pouvons pas valider la présence ou non de complexe par analyse biochimique.

De plus, le passage chez *E. coli* des éléments du complexe pour l'étude de la *trans*-translation pose deux problèmes majeurs : (i) la répartition des ribosomes *E. coli* dans la glace pour l'étude en cryo-MET n'était pas optimale. Après plusieurs essais, le protocole de purification des ribosomes en présence d'anti oxydant a permis d'améliorer ce problème. (ii) le second problème est la présence de SmpB dégradé et d'un mauvais rendement durant la purification de cette protéine. Pour améliorer le protocole actuel de purification de SmpB, plusieurs stratégies sont actuellement testées, notamment une induction à basse température, et des étapes supplémentaires de passage sur colonnes échangeuses d'ions.

IV - Les autres rôles de la *trans*-traduction

IV.1 - Introduction – Les autres rôles de la *trans*-traduction

La *trans*-traduction est un système élégant qui combine le sauvetage des ribosomes, l'élimination de l'ARNm défectueux et de la protéine incomplète. De plus, des observations récentes font état de la régulation spécifique de la traduction d'un petit nombre de gènes par *trans*-traduction. Ce chapitre met l'accent sur le rôle spécifique de la *trans*-traduction dans la régulation physiologique des bactéries, notamment dans la pathogénicité.

IV.1.1 - Les autres rôles de la *trans*-traduction

La *trans*-traduction régule l'expression de nombreux gènes, dont notamment celle du facteur alternatif ArfA, produit uniquement lorsque la *trans*-traduction est insuffisante. La *trans*-traduction intervient également dans le cycle cellulaire, comme chez *Caulobacter crescentus* (Russell and Keiler, 2009) ou *Bradyrhizobium japonicum* (Ebeling *et al.*, 1991) par exemple. Plusieurs bactériophages nécessitent également la *trans*-traduction pour leur développement, comme le phage P22 (Withey and Friedman, 1999) ou le phage Mu (Ranquet *et al.*, 2001). Il a été également démontré que la *trans*-traduction régule le quorum-sensing (Kumar *et al.*, 2016).

IV.1.2 - Régulation de la pathogénicité

D'importants changements du profil d'expression génique sont retrouvés au cours de la pathogénèse, lorsque les bactéries sont confrontées à différents stress et à l'attaque par les systèmes de défense de l'hôte. La résistance aux stress et le pouvoir pathogène sont liés, et aujourd'hui nous commençons à comprendre le rôle de la *trans*-traduction dans les souches pathogènes.

IV.1.2.1 - Le stress

La *trans*-traduction permet aux bactéries de répondre efficacement à une variété de stress. Les cellules dépourvues d'ARNtm ont une phase de latence retardée après la phase stationnaire (Oh and Apirion, 1991), sont plus sensibles aux manques d'acides aminés (Li *et al.*, 2008), aux chocs thermiques (Oh and Apirion, 1991) et aux antibiotiques ciblant le ribosome (Abo *et al.*, 2002). Les bases moléculaires de ces phénotypes ne sont pas connues, mais certains phénotypes peuvent être causés par un dérèglement de RpoS (« RNA polymérase sigma S

factor »), un facteur sigma alternatif qui est exprimé lors de la phase stationnaire ou lors de conditions de stress (Ranquet and Gottesman, 2007). De la même manière, les niveaux d'ARNtm et SmpB augmentent au cours du stress thermique, et sont indispensables pour y répondre (Shin and Price, 2007). La sensibilité accrue aux antibiotiques dans les cellules dépourvues de l'activité de *trans*-traduction est quant à elle probablement due à un niveau plus élevé de ribosomes bloqués causée par la lecture erronée ou bloquée de l'ARNm (Li *et al.*, 2013).

La *trans*-traduction influe également sur d'autres résistances aux stress qui sont particulièrement intéressantes dans les mécanismes de pathogénicité, comme le stress oxydatif qui a lieu lors de phagocytoses. Idem pour *Helicobacter pylori*, qui ne vit que dans l'estomac de l'Homme, dans un milieu très acide (Thibonnier *et al.*, 2008). Le rôle central de la *trans*-traduction pour la virulence de *H. pylori* est essentiel, grâce au sauvetage très fréquent des ribosomes dans les conditions de stress rencontrées dans l'environnement gastrique.

Box n°11 - Les ulcères de l'estomac sont maintenant considérés comme des maladies dues à l'infection par *Helicobacter pylori* et se traitent, comme toute maladie infectieuse bactérienne, avec des antibiotiques. Pour cette découverte, le Professeur Barry J. Marshall et le Dr J. Robin Warren ont reçu en 2005 le Prix Nobel de Médecine.

IV.1.2.1 - La pathogénicité

La *trans*-traduction est directement nécessaire pour la virulence de certains agents pathogènes. Par exemple les souches *Y. pseudotuberculosis* Δ *ssrA* (pour « small and stable RNA A » gène codant pour l'ARNtm), sont incapables de proliférer dans des macrophages chez la souris. Au moins une partie de ce défaut de virulence est due à un retard dans la production de protéines effectrices sécrétées, connues sous le nom Yops. Après l'invasion des macrophages, le facteur de transcription *virF* régule la production et la sécrétion de Yops, mais en l'absence d'ARNtm, *virF* est dérégulé et la sécrétion Yop est retardée (Okan *et al.*, 2006).

Chez *Salmonella enterica*, l'ARNtm est nécessaire à la fois pour la prolifération dans les macrophages et pour la virulence chez la souris. L'expression de plusieurs gènes de virulence est perturbée dans la souche Δ *ssrA*, mais la base moléculaire pour le phénotype de virulence est inconnu (Julio *et al.*, 2000). Des résultats similaires sont retrouvés chez *Salmonella Typhimurium*, où Hfq et SmpB modulent directement ou indirectement un éventail de

protéines qui sont requises pour de nombreux processus biologiques, y compris l'invasion de la cellule hôte, la motilité, le métabolisme central, la biosynthèse des LPS (lipopolysaccharides), des systèmes de régulation à deux composants et le métabolisme des acides gras. Ces résultats suggèrent que les voies de contrôle-qualité de la synthèse protéique jouent un rôle important dans la régulation de la virulence et l'adaptation de l'environnement (Ansong *et al.*, 2009).

Chez *Staphylococcus aureus* Δ ssrA, on constate une augmentation du pigment de la bactérie. Le pigment caroténoïde doré de *S. aureus*, la staphyloxanthine, est un facteur de virulence important qui altère les neutrophiles et possède une activité antioxydante (Lan *et al.*, 2010).

Cette fois ce n'est pas l'intervention de la *trans*-traduction qui est en jeu, puisque la couleur des bactéries ne change pas lorsque le gène *smpb*

est inactivé. En fait, l'ARNtm agit comme un ARN antisens en se liant à la région contenant la séquence de Shine-Dalgarno de l'ARNm codant pour la protéine crtMN, enzyme nécessaire à la synthèse du pigment. Ainsi, l'ARNtm, et non la *trans*-traduction, joue un rôle important dans la pathogénèse de *S. aureus* (Liu *et al.*, 2010).

Box n°12 - *Staphylococcus aureus* est observé pour la première fois par Pasteur en 1880, tient son nom de staphylē, "grappe de raisin" et Kokkos, "granule".

Chez *Francisella tularensis*, les souches mutantes Δ ssrA perdent leur virulence. Cette perte est due à la baisse de synthèse de facteurs de virulence, tel que le locus de croissance intracellulaire C (IglC) et le facteur de macrophage infectiosité (Mif) (Svetlanov *et al.*, 2012).

IV.2 - Conclusion – Les autres rôles de la *trans*-traduction

En conclusion, la *trans*-traduction est essentielle à la survie de nombreuses bactéries pathogènes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella flexneri* etc.) et elle est requise pour la virulence d'autres espèces. Lorsqu'elle n'est pas létale, la délétion de l'ARNtm ou de SmpB entraîne l'apparition de phénotypes hypersensibles chez de nombreuses espèces bactériennes, et ces mutants ne sont pas viables en présence de faibles doses d'inhibiteurs de la synthèse protéique (chloramphénicol, lincomycine, spiramycine, tylosine, érythromycine, ou spectinomycine). Ces différences de phénotypes en absence de *trans*-traduction dépendent essentiellement de la présence de système de sauvetage du ribosome alternative.

V - Article #4 | K. Macé, E. Giudice and R. Gillet. - 2015 - Med Sci

V.1 - Introduction de l'Article #4

La synthèse des protéines par le ribosome : Un chemin semé d'embûches

K. Macé, E. Giudice & R. Gillet
90.

Med Sci (Paris). 2015 Mar;31(3):282-

La *trans*-traduction est omniprésente chez toutes les bactéries et, comme nous venons de le voir, son rôle va bien au-delà du sauvetage des ribosomes bloqués. Après l'âge de la recherche fondamentale concernant ce processus captivant, arrive celui des applications, notamment médicales. C'est dans ce sens que nous avons rédigé cette revue, afin d'exposer les possibilités d'applications thérapeutiques qu'offre le mécanisme de *trans*-traduction.

V.2 - Article #4

Med Sci (Paris) 2015 ; 31 : 282-290

La synthèse des protéines par le ribosome Un chemin semé d'embûches

Protein synthesis by the ribosome: a pathway full of pitfalls

Kevin Macé¹, Emmanuel Giudice¹ et Reynald Gillet^{1,2*}

¹ Université de Rennes 1, CNRS UMR 6290 IGDR, équipe traduction et repliement, Campus de Beaulieu, Bâtiment 13, 35042 Rennes, France

² Institut universitaire de France



Photographie réalisée par Reynald Gillet



médecine/sciences 2015 ; 31 : 282-90

► La synthèse des protéines, également appelée traduction, est assurée dans chaque cellule par des machines moléculaires très sophistiquées : les ribosomes. Compte tenu de l'immense quantité de données biologiques à traiter, il arrive régulièrement que ces machines se bloquent et mettent en péril la survie de la cellule. Chez les bactéries, le principal processus de sauvetage des ribosomes bloqués est la *trans*-traduction. Il est assuré par un acide ribonucléique (ARN) hybride, l'ARN transfert-messenger (ARNtm), associé à une petite protéine basique, SmpB (*small protein B*). Plusieurs autres systèmes de contrôle qualité ont récemment été mis en évidence, révélant un réseau de maintien de la survie cellulaire très sophistiqué. Cette machinerie du contrôle qualité de la synthèse protéique est une cible très prometteuse pour le développement de futurs antibiotiques. ◀

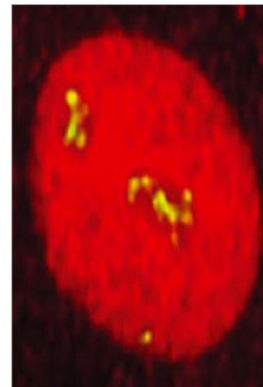
La traduction : un équilibre délicat entre vitesse et fidélité

L'ADN est le support de l'information génétique chez tous les êtres vivants. Il est fabriqué à partir d'un alphabet de seulement quatre lettres (A, T, G, C), les nucléotides. L'enchaînement de ces nucléotides forme le génome, dont une partie est traduite sous forme de protéines, nécessaires à la vie. L'information portée par l'ADN est d'abord transcrite en un ARN messager (ARNm), également fabriqué à partir de quatre nucléotides (A, U, G, C). Cette première étape, nommée transcription, permet d'amplifier le message de départ tout en préservant l'ADN de la chimie caustique de la cellule. Les ARNm sont ensuite traduits par triplets de nucléotides (ou codons) en l'un des vingt-deux acides aminés composant les protéines. Cette synthèse protéique, ou traduction, permet le passage

La synthèse des protéines par le ribosome

Un chemin semé d'embûches

Kevin Macé¹, Emmanuel Giudice¹, Reynald Gillet^{1,2}



¹ Université de Rennes 1, CNRS UMR 6290 IGDR, équipe traduction et repliement, Campus de Beaulieu, Bâtiment 13, 35042 Rennes, France ;
² Institut universitaire de France. reynald.gillet@univ-rennes1.fr

d'un alphabet de quatre lettres (les nucléotides qui composent l'ADN et l'ARNm) à un alphabet de vingt-deux lettres (les acides aminés qui composent les protéines). Elle est portée par une machine moléculaire très complexe et dynamique : le ribosome [1]. Les ribosomes sont constitués de deux sous-unités distinctes, elles-mêmes composées d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines. La petite sous-unité permet le décodage de l'information génétique portée par les ARNm, tandis que la grande sous-unité est le siège de la synthèse des protéines *via* la catalyse des liaisons entre acides aminés (les liaisons peptidiques). Le ribosome possède trois sites de liaison aux ARN de transfert (ARNt), chargés de lui apporter les acides aminés. Le site A, auquel les ARNt aminoacylés se lient après reconnaissance spécifique des codons, le site P, qui est occupé par un ARNt lié à la chaîne polypeptidique naissante, et le site E, par lequel les ARNt déacylés transitent avant d'être éjectés.

La traduction s'effectue en quatre étapes majeures (Figure 1) : le démarrage (ou initiation), l'élongation, la terminaison et le recyclage (pour une description détaillée du processus voir [2]). Chez les bactéries, le démarrage débute par la fixation de l'ARNm à la petite sous-unité ribosomique 30S, *via* une séquence riche en purines, dite de Shine-Dalgarno (SD). Cette fixation, assistée par trois facteurs d'initiation (IF1, IF2 et IF3), permet de placer précisément le codon de démarrage (AUG, ou, moins communément, GUG ou UUG) dans le site P du ribosome, afin qu'il soit reconnu par un ARNt porteur de l'acide aminé formyl-méthionine. L'arrimage de la grande sous-unité 50S à ce complexe de démarrage permet de reconstituer le ribosome complet 70S, signant ainsi le début de la phase d'élongation. Dans un processus itératif, les codons de l'ARNm sont ensuite décodés dans

Vignette (Photo © Inserm-Stefano Fumagalli).

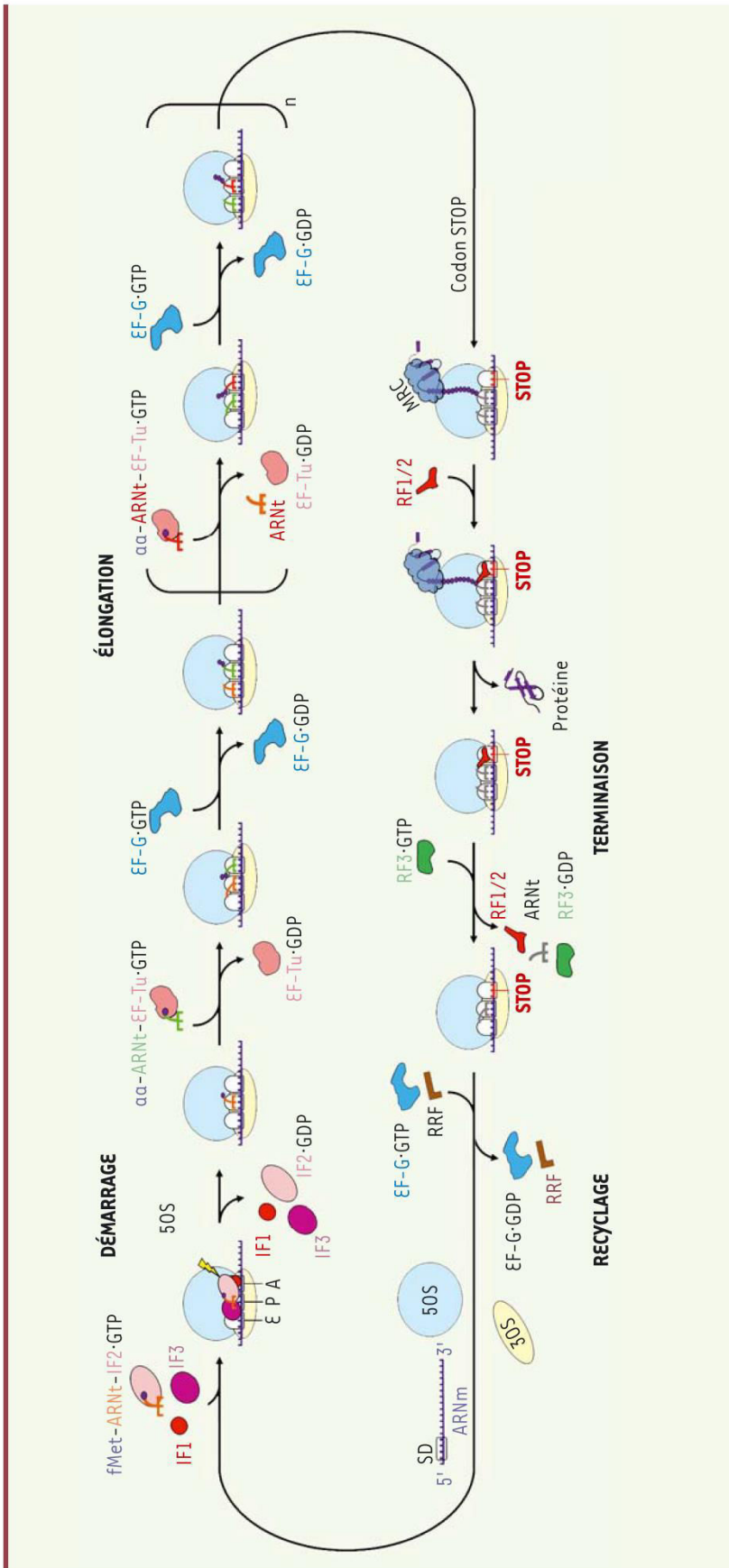


Figure 1. Présentation sommaire de la traduction canonique bactérienne. Démarrage : après appariement entre l'ARNm et le 30S via des séquences complémentaires d'ARN (interactions Shine-Dalgarno/anti-Shine-Dalgarno), le codon d'initiation AUG (voire GUG ou UUG) est positionné dans le site P. Un complexe initiateur, constitué de l'ARNt-fMet, d'IF2 et de GTP, s'y fixe, en présence des deux autres facteurs d'initiation, IF1 et IF3. La grande sous-unité ribosomique 50S se lie alors au complexe, provoquant l'hydrolyse du GTP et le départ des facteurs d'initiation. Élongation : le facteur d'élongation EF-Tu amène les ARNt aminoacylés (aa-ARNt) au site A du ribosome sous la forme d'un complexe ternaire aa-ARNt-EF-Tu-GTP. S'il y a correspondance entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt, EF-Tu hydrolyse le GTP et se dissocie, tandis que l'ARNt pénètre profondément dans le site A (étape d'accommodation). Le peptide naissant est transféré à l'ARNtaa accommodé dans le site A, entraînant l'allongement du peptide d'un acide aminé. Par un mouvement de cliquet spontané (*ratchet*) entre ses deux sous-unités, le ribosome oscille alors entre deux conformations. Le facteur d'élongation EF-G-GTP se lie alors au ribosome, et l'hydrolyse du GTP permet la translocation des ARNt du site A au site P, et du site P au site E. S'ensuit le départ d'EF-G-GDP. Le processus est itératif, ce qui provoque l'allongement séquentiel du peptide naissant, tandis que les ARNt se déplacent à travers les sites ribosomiques A, P et E. Terminaison : lorsqu'un codon de terminaison (ou codon stop UAA, UAG ou UGA) atteint le site A, un facteur de libération de classe I (RF1 ou RF2) se lie et catalyse la séparation entre la chaîne polypeptidique et l'ARNt en place dans le site P. La protéine néosynthétisée est libérée du ribosome, après prise en charge par des machines de repliement co-traductionnel (MRC). Un complexe binaire composé de RF3, un facteur de libération de classe II, et d'une molécule de GTP, facilite la dissociation de RF1 ou RF2 et de l'ARNt déacylé. Recyclage : le facteur de recyclage ribosomique (RRF) associé à EF-G recycle le ribosome en séparant les deux sous-unités, libérant les ARNt et l'ARNm. Un nouveau cycle de traduction peut alors démarrer. aa-ARNt : ARN de transfert aminoacylé ; ARNm : ARN messager ; fMet-ARNt : ARN de transfert N-formylméthionine ; EF-G : facteur d'élongation G ; GDP : guanosine diphosphate ; GTP : guanosine 5'-triphosphate ; IF : facteur d'initiation ; IF : facteur d'élongation thermosensible ; IF : facteur d'élongation thermosensible ; MRC : machine de repliement co-traductionnel ; RF : facteur de libération ; RRF : facteur de recyclage ribosomique ; SD : séquence de Shine-Dalgarno ; 30S : petite sous-unité ribosomique ; 50S : grande sous-unité ribosomique.

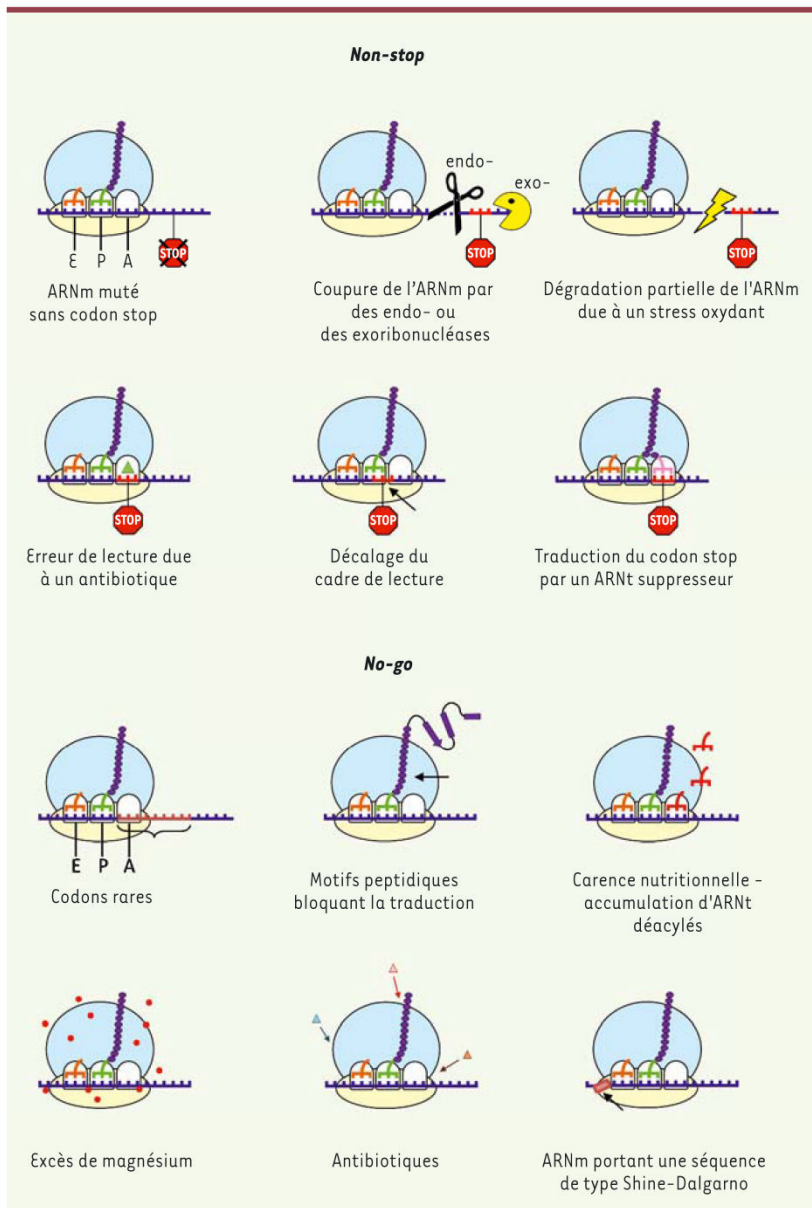


Figure 2. Illustration des différentes situations conduisant à la production de complexe non-stop en haut et de complexe no-go en bas. Les sous-unités 30S et 50S sont en jaune et bleu clair, respectivement. L'ARNm est en bleu foncé (les codons rares en marron et le codon stop en rouge). Le peptide naissant est en violet. L'ARNt du site P est en vert, du site E en orange, les ARNt déacylés en rouge et les ARNt suppresseurs en rose pâle. Les ions Mg^{2+} sont symbolisés par des points rouges et les antibiotiques par des triangles. Les endo- et exonucléases sont respectivement représentées par une paire de ciseaux et un symbole *pac-man* ; le stress oxydant par un éclair jaune.

se liant et se détachant continuellement du ribosome. Il permet ainsi un équilibre entre rapidité (15 à 20 liaisons peptidiques à la seconde) et fidélité au code génétique (une erreur d'incorporation environ tous les 1 000 à 10 000 acides aminés) [4, 5]. Compte tenu de la taille moyenne des protéines chez *E. coli* (environ 300 acides aminés), ce faible taux d'erreurs assure à quasiment toutes les protéines produites une bonne activité. Les cellules possèdent un large répertoire de systèmes de contrôle qualité permettant d'affronter les nombreuses situations, notamment de stress, susceptibles de rompre ce délicat équilibre entre vitesse de synthèse et fidélité au code génétique.

Cette revue vise à mieux appréhender la manière dont les bactéries affrontent en permanence le blocage ou le ralentissement

des ribosomes sur leur ARNm. Les stratégies de sauvetage sont redoutablement efficaces et font de ces systèmes de contrôle qualité une cible particulièrement attractive pour le développement de futurs antibiotiques.

le site A de la petite sous-unité. S'ensuit un transfert de la chaîne peptidique de l'ARNt occupant le site P vers l'ARNt aminoacylé du site A, ajoutant ainsi un acide aminé à la protéine en cours de synthèse. Après ce transfert peptidique, l'ARNt déacylé (dans le site P) et l'ARNt porteur du peptide (dans le site A) sont transloqués avec leurs codons correspondants vers les sites E et P, respectivement. Les facteurs d'élongation EF-G et EF-Tu permettent de faciliter le processus. La traduction se termine lorsqu'un codon de terminaison (ou codon stop ; UAA, UAG ou UGA) est rencontré sur l'ARNm. Ce codon est reconnu dans le site A par un facteur de terminaison (RF1 [*release factor*] ou RF2) qui provoque la libération de la protéine nouvellement synthétisée. Les ribosomes sont recyclés dans une ultime étape par la fixation d'un facteur de recyclage RRF (*ribosome recycling factor*) (pour une revue complète voir [3]). Ce processus est très dynamique et implique de nombreux partenaires protéiques et ARN

des ribosomes sur leur ARNm. Les stratégies de sauvetage sont redoutablement efficaces et font de ces systèmes de contrôle qualité une cible particulièrement attractive pour le développement de futurs antibiotiques.

Quand la traduction se grippe...

Les ribosomes avancent à pleine vitesse sur les ARNm afin de les décoder. Deux situations majeures provoquent cependant un arrêt brutal ou un ralentissement conséquent du processus (Figure 2) :

(1) Lorsque les ribosomes atteignent la fin de l'ARNm sans avoir rencontré de signal de terminaison ; on parle d'ARNm *non-stop*. Cette situation est généralement causée par l'altération de l'ARNm qui perd son signal de

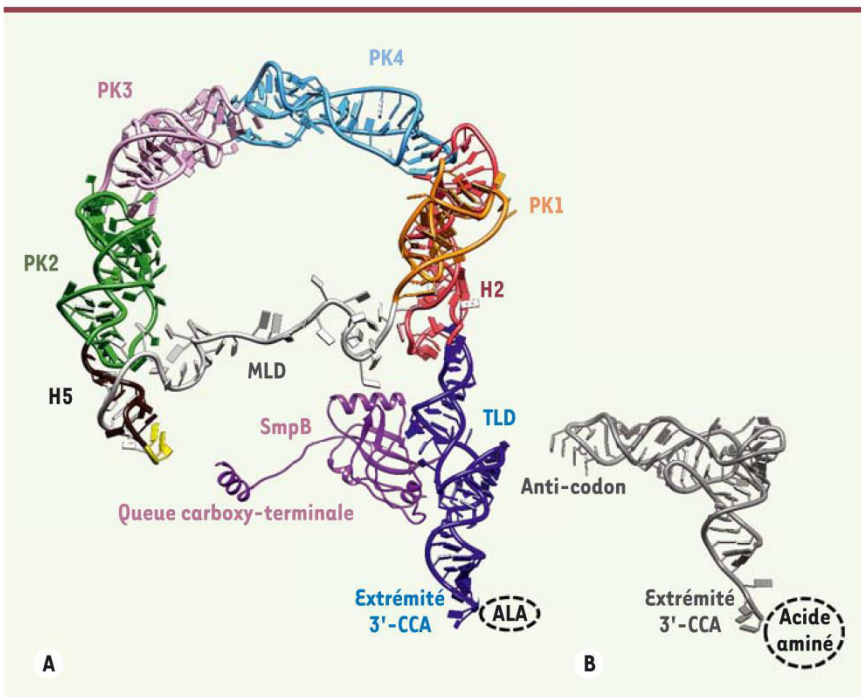


Figure 3. Comparaison des structures tridimensionnelles du complexe ARNtm-SmpB et d'un ARNt. **A.** Complexe ARNtm-SmpB. SmpB est en violet et les domaines de l'ARNtm sont représentés dans différentes couleurs : les deux domaines principaux, le TLD en bleu et le MLD en gris, allant jusqu'au codon stop représenté en jaune. H : hélices ; PK : pseudo-nœuds. **B.** Un ARNt canonique afin de comparer la similitude structurale entre le complexe ARNtm-SmpB et un ARNt. Les deux extrémités 3'-CCA sont liées à un acide aminé (pour l'ARNtm, c'est toujours une alanine).

terminaison. Plusieurs raisons à cela : une mutation, une dégradation partielle de l'ARNm (ribonucléases, stress oxydant, etc.), une erreur de lecture due à un antibiotique, un cadre de lecture aberrant ou, plus rarement, quand un codon stop est traduit à tort. Le ribosome se retrouve alors bloqué à l'extrémité 3' de l'ARNm, avec un codon imparfait (zéro, un ou deux nucléotides au lieu de trois) dans son site de décodage (Figure 2, haut).

(2) Lorsque les ribosomes s'arrêtent ou ralentissent fortement en cours de traduction, avant que le codon stop soit atteint, on parle alors d'ARNm *no-go*. Cette situation se produit lorsque le ribosome synthétise des protéines à partir de séries de codons rares (définis par une fréquence inférieure à 1 % chez *E. coli* [6]), lorsque les protéines portent des motifs peptidiques bloquants, en conditions de faible croissance (par exemple en cas de déficit en acides aminés), en présence de fortes concentrations de Mg^{2+} , en présence d'inhibiteurs du ribosome (par exemple des antibiotiques bloquant le transfert peptidique ou la translocation), ou encore lorsque l'ARNm porte une séquence de type Shine-Dalgarno capable de s'apparier à l'ARNr de la petite sous-unité (Figure 2, bas).

Les deux situations *non-stop* et *no-go* sont fréquentes et conduisent à la formation de complexes non productifs composés de ribosomes bloqués, de protéines incomplètes, d'ARNt et d'ARNm. Ces blocages sont graves pour la survie des bactéries, car ils mobilisent une partie du *pool* de ribosomes, tout en entraînant la synthèse de protéines incomplètes et potentiellement toxiques si elles venaient à être libérées.

Blocage des ribosomes sur des ARNm *non-stop*

Parvenus à l'extrémité d'un ARNm sans avoir subi l'étape de terminaison, les ribosomes s'accumulent sur l'ARNm en formant des poly-

somes et bloquent ainsi la machinerie traductionnelle. Trois systèmes de contrôle qualité principaux permettent de rapidement régler ce problème chez la bactérie : la *trans*-traduction, ainsi que les deux systèmes alternatifs ArfA (*alternative ribosome rescue factor A*) et ArfB.

La *trans*-traduction, un système tout-en-un

Chez les bactéries, le principal mécanisme de contrôle qualité permettant de libérer les ribosomes bloqués est la *trans*-traduction, portée par un ARN particulier : l'ARN transfert-messager (ARNtm) associé à une petite protéine, SmpB (*small protein B*). L'ARNtm est une molécule hybride possédant à la fois les propriétés d'un ARN de transfert et d'un ARN messager (Figure 3). Il possède donc deux domaines importants ayant pour nom le TLD (*tRNA-like domain*) et le MLD (*mRNA-like domain*). Le domaine TLD se lie à la protéine SmpB afin de maintenir sa conformation tridimensionnelle et mimer un ARNt canonique. SmpB permet la distinction entre les ribosomes bloqués ou non en insérant et structurant sa partie carboxy-terminale en fonction de la présence ou de l'absence d'un ARNm dans le canal de lecture du ribosome [7]. Malgré l'absence d'un codon dans le site A, cette partie TLD-SmpB entre dans le ribosome tel un ARNt canonique. Le domaine MLD, correctement positionné grâce à SmpB [8, 9], est aussitôt traduit. Il permet ainsi de redémarrer le processus traductionnel, tout en codant pour un signal marquant le peptide incomplet. Cette étiquette sera spécifiquement reconnue par des protéases qui dégraderont le peptide. La séquence codante du MLD se termine par un codon stop, de telle sorte que le peptide nouvellement marqué est libéré, et le ribosome recyclé. Ainsi, dans un ballet sophistiqué, ce

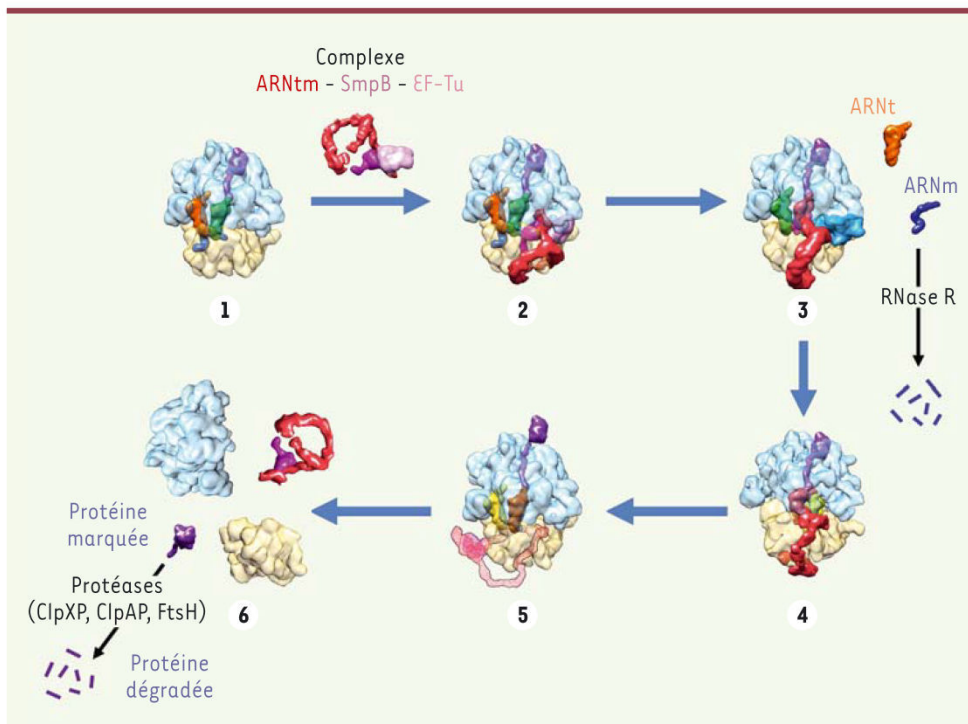


Figure 4. Schéma des différentes étapes de la trans-translation. (1) Ribosome bloqué lors de la traduction d'un ARNm défectueux (bleu) avec un ARNt dans le site E (orange) et un ARNt dans le site P (vert) lié à la protéine naissance (violet). Le site A est vide. (2) Le complexe ARNtm-SmpB-EF-Tu reconnaît le ribosome bloqué. (3) Aidé par EF-G (bleu ciel), le complexe est transloqué dans le ribosome et l'ARNm tronqué est éjecté pour être dégradé par la RNase R. (4) Le peptide incomplet est transféré sur l'ARNtm et la traduction redémarre sur sa partie codante (MLD). (5) Il en résulte l'addition d'une étiquette peptidique à la protéine incomplète. L'ARNtm est

translucide car les détails structuraux de cette étape ne sont pas encore connus. (6) Le ribosome bloqué est recyclé grâce à la présence d'un codon de terminaison sur la séquence codante de l'ARNtm, tandis que le peptide étiqueté est dégradé par des protéases.

complexe tout-en-un éjecte l'ARNm défectueux du ribosome pour le conduire à sa dégradation par la ribonucléase R, marque la protéine naissante pour une dégradation rapide par les protéases, et enfin permet le recyclage des ribosomes bloqués (Figure 4) (pour une revue complète voir [10]).

Il y a environ 700 molécules d'ARNtm par cellule, ce qui correspond à un rapport de 1 pour 10-20 ribosomes, et la *trans*-traduction survient au moins une fois toutes les 250 traductions [11, 12]. À l'exception de quelques rares organismes primitifs (certaines algues et diatomées), la *trans*-traduction est exclusivement retrouvée dans le monde bactérien. Bien que confrontées à la même nécessité de contrôle qualité de la synthèse protéique, les cellules eucaryotes sont dépourvues d'ARNtm et de SmpB. Les systèmes de surveillance mis à leur disposition ont évolué différemment, faisant appel à des mécanismes très distincts [13, 14].

La *trans*-traduction n'est pas toujours indispensable à la survie cellulaire

Bien que l'ARNtm et SmpB soient toujours présents chez les bactéries, la perturbation du système n'est pas toujours létale. L'explication de ce paradoxe est venue de la récente découverte de deux autres systèmes de secours chez certaines bactéries (y compris *Escherichia coli*) : ArfA (*alternative ribosome rescue factor A*) et ArfB, anciennement YhdL et YaeJ, respectivement (Figure 5).

En effet, ArfA est une petite protéine qui prend en charge le sauvetage des ribosomes bloqués en l'absence de *trans*-traduction. ArfA coopère avec le facteur de terminaison RF2 pour que ce der-

nier relâche le peptide incomplet bloqué dans le site P [15]. Le positionnement d'ArfA dans le ribosome en présence de RF2 n'est pas encore connu, mais un scénario est proposé : de façon similaire à SmpB, ArfA pourrait se loger dans le site A vacant du ribosome pendant ou juste avant que RF2 ne déclenche la libération du peptide bloqué. La régulation d'ArfA est particulièrement intéressante puisque son ARNm induit la *trans*-traduction. Lorsque l'ARNtm et SmpB sont actifs, ils dégradent ArfA en ajoutant le signal de dégradation à la protéine et son ARNm est détruit. En revanche, si la *trans*-traduction devient inefficace, ArfA n'est plus *trans*-traduit, et il peut alors prendre le relais [16, 17].

Le second système alternatif, ArfB, est une petite protéine mimant le domaine catalytique de RF2. Contrairement à ArfA, il possède une queue carboxy-terminale qui rentre dans le canal de l'ARNm de la petite sous-unité, permettant ainsi la discrimination entre les ribosomes actifs et bloqués, tout comme le fait SmpB. Il est très certainement moins important que la *trans*-traduction et ArfA, puisque la double suppression des gènes qui codent pour l'ARNtm et ArfA est mortelle chez *E. coli*, ce qui n'est pas le cas pour la double mutation ARNtm/ArfB [18, 19].

Pour résumer, la *trans*-traduction est la première ligne de défense permettant aux bactéries de lutter contre

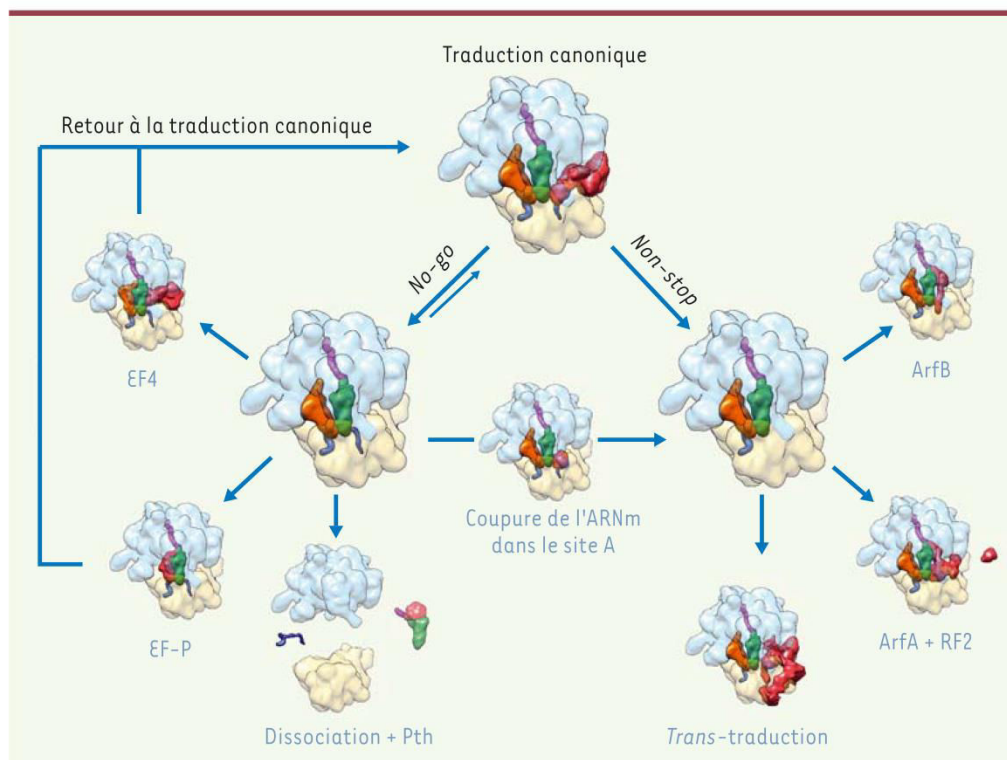


Figure 5. Illustration des différents systèmes de sauvetage contre le blocage des ribosomes bactériens.

Pendant la traduction, le ribosome peut se gripper de deux façons différentes. On parle de *no-go* lorsqu'il ralentit ou s'arrête avant que le codon d'arrêt ne soit atteint, ou de *non-stop* lorsqu'il atteint l'extrémité 3' d'un ARNm. Les complexes ribosomiques *no-go* peuvent retourner à la traduction canonique grâce à EF-P, qui aide la lecture des séquences riches en codons proline, ou grâce à EF4, qui remobilise les ribosomes lorsque la concentration intracellulaire en Mg^{2+} est élevée. Ces mêmes complexes peuvent être recyclés par la PTH qui sépare le peptide naissant lié à l'ARNt lorsque le ribosome est dissocié. Enfin, ces complexes peuvent être convertis en *non-stop* lorsque l'ARNm est clivé dans le site A. Les complexes *non-stop* peuvent être sauvés par *trans*-traduction, par ArfA, en coopération avec RF2, ou par ArfB.

Entrées PDB 3HUW pour EF-P ; 3DEG pour EF4 ; 3VJR pour PTH ; 3KIQ pour RelE ; 2WH1 pour RF2 ; 4DH9 pour ArfB ; et 3IYQ pour ARNm-SmPB. La structure ArfA a été modélisée avec I-TASSER (*iterative threading assembly refinement*). Son positionnement exact dans le ribosome est encore inconnu. Les éléments des systèmes de sauvetage sont en rouge. Les autres codes couleurs sont les mêmes que ceux employés dans la Figure 4.

l'accumulation des ribosomes sur des ARNm *non-stop*. Cependant, chez certaines bactéries, d'autres systèmes de sauvetage moins sophistiqués peuvent partiellement prendre le relais du complexe ARNm/SmPB quand celui-ci est défaillant ou dépassé [20].

Blocage des ribosomes sur des ARNm *no-go*

Plusieurs systèmes de contrôle qualité permettent le sauvetage des ribosomes bloqués sur des complexes *no-go*. En fonction du problème rencontré, la bactérie adapte une réponse spécifique (Figure 4).

Remobilisation ou dissociation des ribosomes bloqués en *no-go*

Lors d'une trop forte concentration cellulaire en Mg^{2+} , l'étape de translocation dépendante d'EF-G est déficiente, entraînant une accumulation de ribosomes bloqués. Chez *E. coli*, le facteur d'élongation 4 (EF4, anciennement LepA) est stocké dans les membranes, mais il est libéré dans le cytoplasme en conditions de force ionique élevée. EF4 reconnaît alors les ribosomes bloqués et restaure l'étape de translocation déficiente [21].

Les séquences protéiques riches en prolines aboutissent également à des complexes *no-go*. En raison de leur nature chimique, les prolines sont en effet de faibles donneurs et accepteurs de peptides. Intervient

alors EF-P, un facteur de traduction identifié depuis près de 40 ans, mais dont le rôle biologique exact était jusqu'à récemment inconnu. Il vient d'être démontré qu'il soulage les ribosomes bloqués sur des portions peptidiques riches en prolines en stimulant la formation de liaison peptidique entre deux prolines [22, 23]. Cette situation est fréquente chez *E. coli* qui possède jusqu'à 270 protéines contenant des successions de plus de trois prolines consécutives. Chez les eucaryotes, la lecture de ces motifs polyprolines est promue par le facteur d'initiation eIF5A (*eukaryotic initiation factor 5A*), orthologue d'EF-P.

Tout comme EF-P, une nouvelle fonction de la peptidyl-ARNt hydrolase (PTH) a récemment été découverte [24]. La PTH est une estérase qui hydrolyse la liaison ester entre le peptide et l'ARNt. Cette réaction permet de libérer l'ARNt, qui peut être réutilisé pour la synthèse protéique. Au-delà de son rôle traditionnellement attribué, et en collaboration avec plusieurs facteurs de la synthèse protéique (IF1, IF3, EF-G, RF1, RF2, RF3 et RRF), la PTH est capable de libérer un ribosome bloqué avec un peptide-ARNt dans le site P, en hydrolysant la liaison

ester entre le peptide naissant et l'ARNt. Toutefois, la coopération entre ces facteurs et PTH dans le cas d'un peptidyl-ARNt bloqué est encore controversée [25].

Lorsque le *no-go* devient *non-stop*

Si aucun retour à la traduction canonique ne se produit, les ribosomes bloqués en *no-go* sont transformés en *non-stop*, afin d'être secourus par les systèmes vus précédemment. Cette situation est notamment retrouvée lors de la réponse « stringente », par activation de toxines bactériennes [26]. L'exemple qui illustre le mieux ce cas est le système toxine antitoxine RelBE. L'opéron relBE code pour une toxine stable RelE et son antitoxine instable RelB. RelB enveloppe la toxine RelE, bloquant son activité RNase [27]. RelB est instable, en raison de sa dégradation par la protéase Lon, et doit être continuellement synthétisée afin d'empêcher RelE d'agir. En cas de carence en acides aminés, les ribosomes se bloquent par la liaison d'ARNt non chargés dans leur site A, et l'opéron relBE est régulé à la baisse, entraînant une diminution de RelB et une libération de RelE. Une fois disponible, RelE se loge dans le site A et clive spécifiquement les ARNm, convertissant ainsi les complexes *no-go* en *non-stop* [28, 29]. Ces derniers peuvent alors être pris en charge par la *trans*-traduction, ArfA ou ArfB, comme décrit précédemment. À noter que d'autres attaques, que ce soit par d'autres toxines comme MazF ou bien des ribonucléases encore inconnues, peuvent jouer le même rôle et induire le clivage de l'ARNm dans le site A (Figure 5).

Intérêts thérapeutiques

Les systèmes de sauvetage de la traduction forment un réseau de régulation indispensable à la vie des bactéries. De fait, ils représentent des cibles très attractives pour des applications biotechnologiques et médicales. Parmi tous les systèmes décrits ici, la *trans*-traduction fait l'objet d'une attention particulière et de recherches croissantes. Après le temps de la génétique, de la biochimie et de la structure, qui a permis de comprendre la *trans*-traduction à l'échelle moléculaire, vient en effet celui des applications. On distinguera l'utilisation de ce système comme cible pour de futurs inhibiteurs de la synthèse protéique bactérienne, pour le développement de vaccins vivants atténués, ou encore comme outils de diagnostic pour l'identification de bactéries.

La *trans*-traduction, cible pour des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique

Les antibiotiques sont des molécules permettant d'attaquer spécifiquement les bactéries, en bloquant leur croissance (antibiotiques bactériostatiques) ou en les détruisant (antibiotiques bactéricides). Ils agissent en inhibant une étape essentielle du développement bactérien : fabrication de leur paroi, de leur ADN, de leur ARN, ou encore de leurs protéines. Malheureusement, l'usage intensif des antibiotiques a rapidement introduit une pression de sélection aboutissant au développement inquiétant de populations de micro-organismes antibiorésistants et à une baisse générale de l'efficacité thérapeutique. L'émergence de ces résistances antimicrobiennes, couplées à

la pauvreté actuelle du nombre de nouvelles molécules antibiotiques en cours de développement, font de ce problème l'un des principaux enjeux de santé de notre siècle. C'est pourquoi la découverte de nouvelles cibles constitue un enjeu majeur de santé publique.

Compte tenu de l'absence de *trans*-traduction chez les eucaryotes [30], le couple ARNtm-SmPB est une cible particulièrement attractive pour de nouveaux antibiotiques à large spectre ou pour augmenter l'activité des inhibiteurs actuels de la synthèse protéique (qui représentent la moitié des antibiotiques utilisés en clinique) [31, 32]. En effet, la *trans*-traduction est essentielle à la survie de nombreuses bactéries pathogènes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, ou *Shigella flexneri*) et elle est requise pour la virulence d'autres espèces (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ou *Yersinia pestis*) [33]. Lorsqu'elle n'est pas létale, la délétion de l'ARNtm ou de SmPB entraîne l'apparition de phénotypes hypersensibles chez de nombreuses espèces bactériennes (par exemple *Cyanobacterium Synechocystis* sp. strain PCC6803, *Escherichia coli*, ou *Salmonella typhimurium*) [34, 35]. Ces mutants ne sont pas viables en présence de faibles doses d'inhibiteurs de la synthèse protéique (chloramphénicol, lincomycine, spiramycine, tylosine, érythromycine, ou spectinomycine). Cela indique que la *trans*-traduction libère les ribosomes bloqués par ces antibiotiques, et que l'inhibition de l'ARNtm ou de SmPB permettrait d'augmenter fortement l'efficacité de ces antibiotiques couramment employés (effet synergique) [36].

La preuve de concept existe puisqu'il a récemment été démontré que la pyrazinamide, traitement de référence et de première intention contre la tuberculose depuis 60 ans et dont on ne connaissait jusqu'alors pas le mode d'action [37], inhibe la *trans*-traduction. Cet antibiotique cible uniquement la *trans*-traduction et non la traduction canonique de *M. tuberculosis* [38]. Enfin, un criblage réalisé à partir de 663,000 molécules a récemment permis de révéler de nouvelles molécules capables d'inhiber cette voie, ayant un effet bactéricide et à spectre large [39]. Ces travaux valident l'inhibition de cette voie comme une piste majeure de recherche de futurs antibiotiques.

Des mutants ARNtm-SmPB comme vaccins vivants atténués

L'altération de la *trans*-traduction conduit à une grande variété de phénotypes, selon les espèces bactériennes touchées. Cependant, il est à noter qu'elle peut conduire à l'inhibition de la virulence de plusieurs agents pathogènes, comme *Yersinia pestis* (l'agent causal de la peste) ou *Francisella tularensis* (l'agent étiologique de la tula-

rédié). Ainsi, des mutants atténués, dont les gènes codant pour SmPB ou l'ARNtm sont supprimés, induisent une forte réponse immunitaire chez la souris [40]. La mutation spécifique de la voie de *trans*-traduction est donc particulièrement prometteuse pour le développement de vaccins vivants atténués.

Utilisation des séquences d'ARNtm à des fins diagnostiques

Les séquences d'ARN ribosomiques (notamment l'ARNr 16S, issu de la petite sous-unité) sont couramment utilisées pour l'identification *in situ* des bactéries. Pourtant, dans certains cas, les comparaisons d'ARNr ne suffisent pas à distinguer des bactéries phylogénétiquement liées. L'ARNtm peut alors représenter une alternative efficace. En effet, les séquences hautement conservées des deux extrémités 5' et 3' de l'ARNtm, couplées à sa petite taille, permettent la conception d'amorces universelles qui permettent d'amplifier aisément la partie centrale des gènes codant pour l'ARNtm, dont la divergence est a *contrario* considérable entre les espèces [41, 42]. La méthode a été employée avec succès pour discriminer de nombreuses espèces bactériennes, que ce soit dans des échantillons biologiques humains ou divers aliments [43].

Conclusion

Les systèmes de sauvetage des ribosomes renferment un côté prodigieux que l'on n'attendait pas. Ils rythment la vie cellulaire tout en étant les mécaniciens de l'indispensable machinerie ribosomique. Alors qu'apparaissent de plus en plus de souches multi-résistantes contre lesquelles nous ne disposons d'aucun traitement efficace, la *trans*-traduction, universellement conservée dans le monde bactérien, mais étrangement absente des cellules eucaryotes, est une cible très prometteuse pour le développement de futurs antibiotiques. Ce fabuleux mécanisme n'a donc pas fini de nous surprendre ; nul ne doute que des années fastes en termes de développement médical parsèmeront encore la voie de synthèse des protéines par le ribosome, une voie qui n'a pas fini de rencontrer des embûches. ♦

SUMMARY

Protein synthesis by the ribosome: a pathway full of pitfalls

Protein synthesis is accomplished through a process known as translation and is carried out by the ribosome, a large macromolecular complex found in every living organism. Given the huge amount of biological data that must be deciphered, it is not uncommon for ribosomes to regularly stall during the process of translation. Any disruption of this finely tuned process will jeopardize the viability of the cell. In bacteria, the main quality-control mechanism for rescuing ribosomes that undergo arrest during translation is *trans*-translation, which is performed by transfer-messenger RNA (tmRNA) in association with small protein B (SmPB). However, other rescue systems have been discovered recently, revealing a far more complicated network of factors dedicated to ribosome rescue. These discoveries make it possible to consider inhibition of these pathways as a very promising target for the discovery of new antibiotics. ♦

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Rennes Métropole, la Ligue contre le cancer, et l'Agence nationale de la recherche (programmes JJC, Blanc et ASTRID) pour leur soutien financier.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Romy P, Marzi S, Westhof E. La structure atomique du ribosome en pleine lumière. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 977-81.
- Gillet R, Felden B. Lost in translation : le déblocage des ribosomes bactériens par le mécanisme de *trans*-traduction. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 633-9.
- Schmeing TM, Ramakrishnan V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 2009 ; 461 : 1234-42.
- Zaher HS, Green R. Quality control by the ribosome following peptide bond formation. *Nature* 2009 ; 457 : 161-6.
- Wilson DN. Less is more for leaderless mRNA translation. *Mol Cell* 2009 ; 33 : 141-2.
- Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1995 ; 6 : 494-500.
- Neubauer C, Gillet R, Kelley AC, Ramakrishnan V. Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. *Science* 2012 ; 335 : 1366-9.
- Weis F, Bron P, Giudice E, et al. tmRNA-SmpB: a journey to the centre of the bacterial ribosome. *EMBO J* 2010 ; 29 : 3810-8.
- Weis F, Bron P, Rolland JP, et al. Accommodation of tmRNA-SmpB into stalled ribosomes: a cryo-EM study. *RNA* 2010 ; 16 : 299-306.
- Giudice E, Mace K, Gillet R. Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB. *Front Microbiol* 2014 ; 5 : 113.
- Ito K, Chadani Y, Nakamori K, et al. Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS One* 2011 ; 6 : e28413.
- Moore SD, Sauer RT. Ribosome rescue: tmRNA tagging activity and capacity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2005 ; 58 : 456-66.
- Graille M, Seraphin B. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 ; 13 : 727-35.
- Inada T. Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1829 : 634-42.
- Shimizu Y. ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes. *J Mol Biol* 2012 ; 423 : 624-31.
- Schaub RE, Poole SJ, Garza-Sanchez F, et al. Proteobacterial ArfA peptides are synthesized from non-stop messenger RNAs. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 29765-75.
- Hayes CS, Keiler KC. Beyond ribosome rescue: tmRNA and co-translational processes. *FEBS Lett* 2010 ; 584 : 413-9.
- Handa Y, Inaho N, Nameki N. YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 1739-48.
- Gagnon MG, Seetharaman SV, Bulkley D, Steitz TA. Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome. *Science* 2012 ; 335 : 1370-2.
- Keiler KC, Feaga HA. Resolving nonstop translation complexes is a matter of life or death. *J Bacteriol* 2014 ; 196 : 2123-30.
- Pech M, Karim Z, Yamamoto H, et al. Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 3199-203.
- Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, et al. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 2013 ; 339 : 85-8.
- Ude S, Lassak J, Starosta AL, et al. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 2013 ; 339 : 82-5.
- Vivanco-Dominguez S, Bueno-Martinez J, Leon-Avila G, et al. Protein synthesis factors (RF1, RF2, RF3, RRF, and tmRNA) and peptidyl-tRNA hydrolase rescue stalled ribosomes at sense codons. *J Mol Biol* 2012 ; 417 : 425-39.

VI - Conclusion – La *trans*-traduction

Comme détaillé dans l'article, les intérêts thérapeutiques de la *trans*-traduction sont multiples : vaccins, diagnostics ou antibiotiques.

Pour la recherche de nouveaux antibiotiques ciblant la *trans*-traduction il est nécessaire de développer un outil rapporteur efficace de cette activité (Alumasa and Keiler, 2015). Les connaissances du laboratoire sur la *trans*-traduction, notamment au niveau structural, ainsi qu'en microbiologie et génétique moléculaire, nous ont offert la possibilité de réaliser un outil génétique rapporteur de la *trans*-traduction, original et performant. Avec l'aide de cet outil et de collaborations multidisciplinaires, nous avons également débuté une recherche active de nouveaux antibiotiques.

Partie III

Recherche d'antibiotiques ciblant la *trans*-traduction

I - Généralités sur les antibiotiques

I.1 - Bref historique sur les antibiotiques

Un antibiotique est une substance naturelle ou synthétique qui détruit (bactéricide) ou qui bloque la croissance (bactériostatique) des bactéries. Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une étape essentielle de leur développement. Les antibiotiques sont habituellement classés en fonction de leur mécanisme d'action, de leur structure chimique, ou de leur spectre d'activité. Ceux qui ciblent la paroi cellulaire bactérienne (pénicillines et céphalosporines), la membrane cellulaire (polymyxines) ou interfèrent avec des enzymes essentielles (rifamycines, lipiarmycins, quinolones et sulfamides) ont des activités bactéricides. A l'inverse, ceux qui ciblent la synthèse des protéines (macrolides, lincosamides et tétracyclines) sont généralement bactériostatiques (à l'exception des aminoglycosides).

Box n°13 – Antibiotique
provient du grec ancien *anti* :
“contre” et *bios* : “la vie”.

Un grand nombre d'antibiotiques est fabriqué par des micro-organismes : champignons, végétaux supérieurs, lichens ou bactéries elles-mêmes. Ces dernières produisent ces substances pour éliminer les autres micro-organismes concurrents, pour l'occupation d'un biotope par exemple. C'est comme cela qu'en 1928 Sir Alexander Fleming a découvert le premier antibiotique, par l'observation sur une boîte de Petri d'une inhibition de *Staphylococcus aureus* par un champignon, le *Penicillium notatum*. Il émit l'hypothèse que l'inhibition était due à une substance sécrétée par le champignon et lui donna le nom de pénicilline. Ce phénomène de concurrence entre micro-organismes est aujourd'hui encore utilisé (Zipperer *et al.*, 2016), mais pour des raisons variées (toxicité, dégradation, diffusion etc) seul un petit nombre de ces antibiotiques naturels sont utilisables en thérapie humaine.

L'introduction généralisée des antibiotiques après la Seconde Guerre mondiale a été l'un des progrès thérapeutiques les plus importants du XXe siècle. Les traitements antibiotiques ont fait progresser l'espérance de vie de plus de dix ans. Mais dès 1945, dans un article publié dans le New York Times (Penicillin's finder Assay

Box n°14 – Alexander Fleming, Ernst Boris Chain et Howard Walter Florey ont obtenu le prix Nobel de médecine en 1945 pour la découverte de la pénicilline et de ses effets curatifs dans diverses maladies infectieuses.

its future) le « père » de la pénicilline avait prévenu des risques liés à un mauvais usage du médicament en indiquant qu'un usage massif des antibiotiques « aboutirait, non à l'élimination de l'infection, mais à apprendre aux microbes à résister à la pénicilline, microbes qui seraient ensuite transmis à un individu [...] chez qui ils provoqueraient une pneumonie ou une septicémie que la pénicilline ne pourrait plus guérir ». Malheureusement ces déclarations allaient se confirmer rapidement (Figure 26).

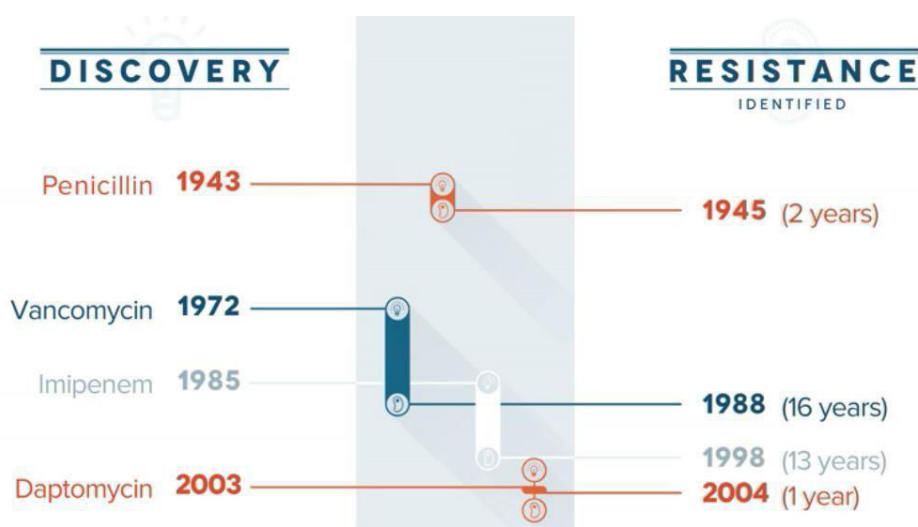


Figure 26. Utilisation thérapeutique des antibiotiques et apparition des premières résistances.
Image internet (<http://www.vitamindwiki.com/Antibiotics+and+Vitamin+D+are+associated+with+many+of+the+same+diseases>)

L'usage généralisé voire abusif des antibiotiques entraîne une adaptation des bactéries par pression de sélection. Elles peuvent muter et modifier la cible des antibiotiques, devenir imperméables aux antibiotiques ou acquérir des gènes qui produisent des enzymes qui détruisent ou expulsent les antibiotiques. Elles deviennent résistantes et se multiplient, tout en transférant parfois cette résistance à d'autres bactéries. Enfin, certaines bactéries peuvent devenir résistantes à plusieurs antibiotiques. Elles sont dites multi-résistantes.

Faute de traitement adapté contre certains germes particulièrement résistants, on observe en milieu hospitalier une baisse générale de l'efficacité thérapeutique et à une augmentation du risque nosocomial. De plus, l'assèchement des découvertes et en conséquence de la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques n'annonce pas un avenir meilleur. Effectivement, malgré des sommes considérables investies au cours des vingt dernières années, aucune nouvelle

classe d'antibiotiques pour les bactéries à gram négatif n'a été homologuée au cours des 30 dernières années (Lewis, 2012) (Figure 27). Ces dernières années sont pourtant particulièrement marquées par la recrudescence de bactéries multi-résistantes (Di Pilato *et al.*, 2016). Face aux problèmes sanitaires et économiques qu'elles entraînent, la recherche doit aujourd'hui s'intensifier afin de découvrir de nouvelles cibles antibiotiques.

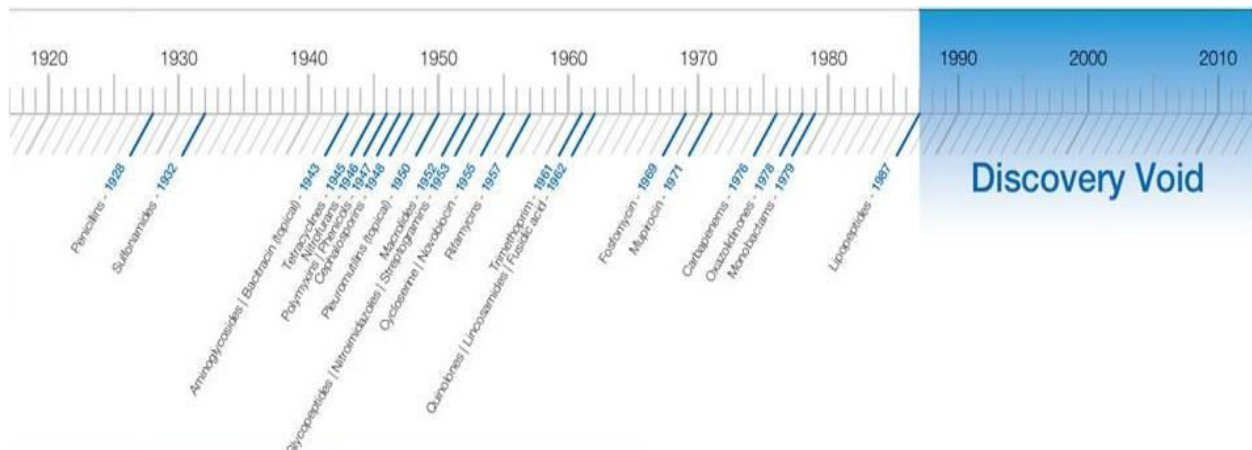


Figure 27. Frise chronologique des découvertes de nouvelles classes d'antibiotique. *Image internet* (<http://www.businessinsider.com/massive-risk-of-antibiotic-resistant-bacteria-in-three-charts-2013-1?IR=T>)

I.3 - Les antibiotiques ciblant le ribosome

Le ribosome est la cible principale des antibiotiques efficaces cliniquement (Figure 28). La recherche actuelle s'oriente vers le développement d'antibiotiques semi-synthétiques avec de meilleures propriétés antimicrobiennes à partir de molécules naturelles connues. Actuellement, plusieurs nouveaux antibiotiques ciblant le ribosome sont au stade d'essais cliniques, comme l'aminoglycoside plazomizin (Achaogen), la cethromycin (Advanced Life Sciences) ou bien l'oxazolidinones PF-02341272 (Pfizer). Même si ces molécules offrent des avantages comme une meilleure absorption ou sont moins sujettes à efflux, l'inconvénient majeur est qu'ils ciblent le même site de liaison que les composés parents dont ils sont issus, et n'offrent donc pas de nouvelles cibles (Butler and Cooper, 2011).

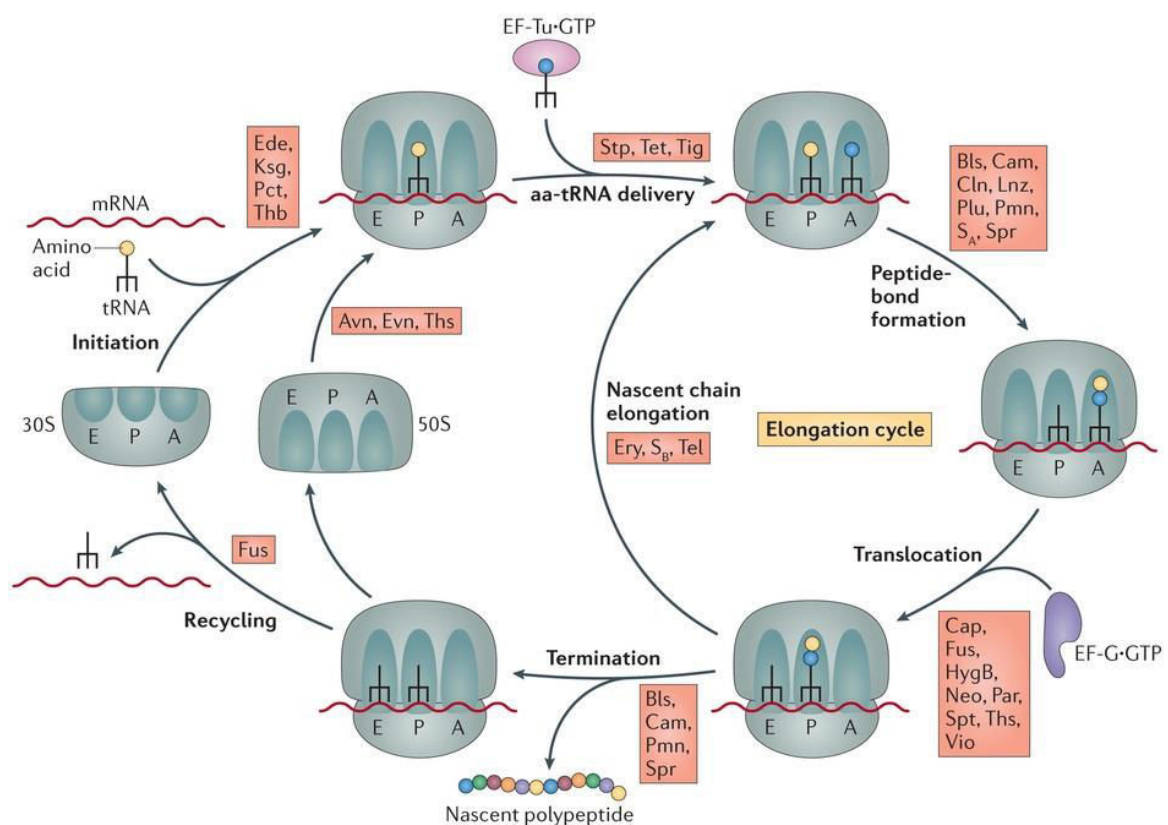


Figure 28. Vue des étapes de la synthèse protéique ciblées par les principaux antibiotiques. D'après Daniel N. Wilson, 2014, *Nature Reviews Microbiology*

Des antibiotiques ayant de nouvelles cibles ribosomiques sont également en cours de développement, mais à des stades plus précoces. La stratégie est de modifier des antibiotiques produits naturellement et dont la toxicité ou la solubilité empêchent actuellement leur utilisation thérapeutique (Nicolaou *et al.*, 2009). Cependant, il existe une cible voisine de la synthèse protéique mais pas encore exploitée : les mécanismes de contrôle qualité de la synthèse protéique, et plus particulièrement la *trans*-transduction.

II - État de l'art des antibiotiques ciblant la *trans*-traduction

II.1 - Introduction – État de l'art des antibiotiques ciblant la *trans*-traduction

La *trans*-traduction peut être ciblée de manière non spécifique par des antibiotiques qui bloquent la traduction canonique (Vioque and de la Cruz, 2003). Avant 2011, aucun antibiotique n'était connu pour cibler la *trans*-traduction ou d'autres voies de sauvetage des ribosomes (Shi *et al.*, 2011). La découverte de la *trans*-traduction comme cible principale de la pyrazinamide, un antituberculeux de première ligne découvert et utilisé depuis 1956, a enfin apporté la preuve de concept manquante (Kalinda and Aldrich, 2012). Depuis, une seconde molécule inhibant la *trans*-traduction - le KKL-35 - a été découverte en 2013 à partir d'une chimiothèque de plus de 663 000 molécules (Ramadoss *et al.*, 2013).

II.2 - La pyrazinamide

II.2.1 - Introduction : la pyrazinamide

La pyrazinamide (ou PZA) est spécifique du genre *Mycobacterium*. Cliniquement, elle est toujours utilisée en association avec d'autres antibiotiques comme l'isoniazide, la rifampicine et l'éthambutol contre le bacille de Koch. La pyrazinamide permet de réduire la durée globale du traitement (2 mois environ contre 9 mois sans la PZA).

Box n°15 – *Le bacille de Koch est l'autre nom de Mycobacterium tuberculosis, Découvert en 1882 par Robert Koch.*

La pyrazinamide est un pro-médicament, puisqu'il est converti par la pyrazinamidase en molécule active : l'acide pyrazinoïque (POA) (Figure 29).

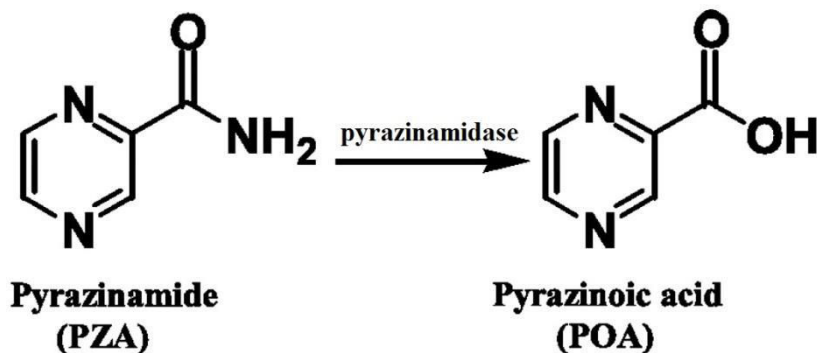


Figure 29. Conversion de la pyrazinamide en acide pyrazinoïque.

L'acide pyrazinoïque a plusieurs cibles. D'une part, il inhibe la synthèse des acides gras nécessaire à la bactérie *via* inhibition de l'enzyme FAS I (Fatty Acid Synthase) (Boshoff *et al.*, 2002). Des études *in vivo* et *in vitro* ont confirmé cette inhibition par l'acide pyrazinoïque et de plusieurs analogues (Sayahi *et al.*, 2012). L'augmentation de la concentration de POA pourrait également perturber le potentiel de membrane et ainsi limiter la production d'énergie. Autre cible, l'acide pyrazinoïque acidifie le milieu cytoplasmique et, de manière inattendue, inhibe également la *trans*-traduction (Zhang *et al.*, 2013) (Figure 30).

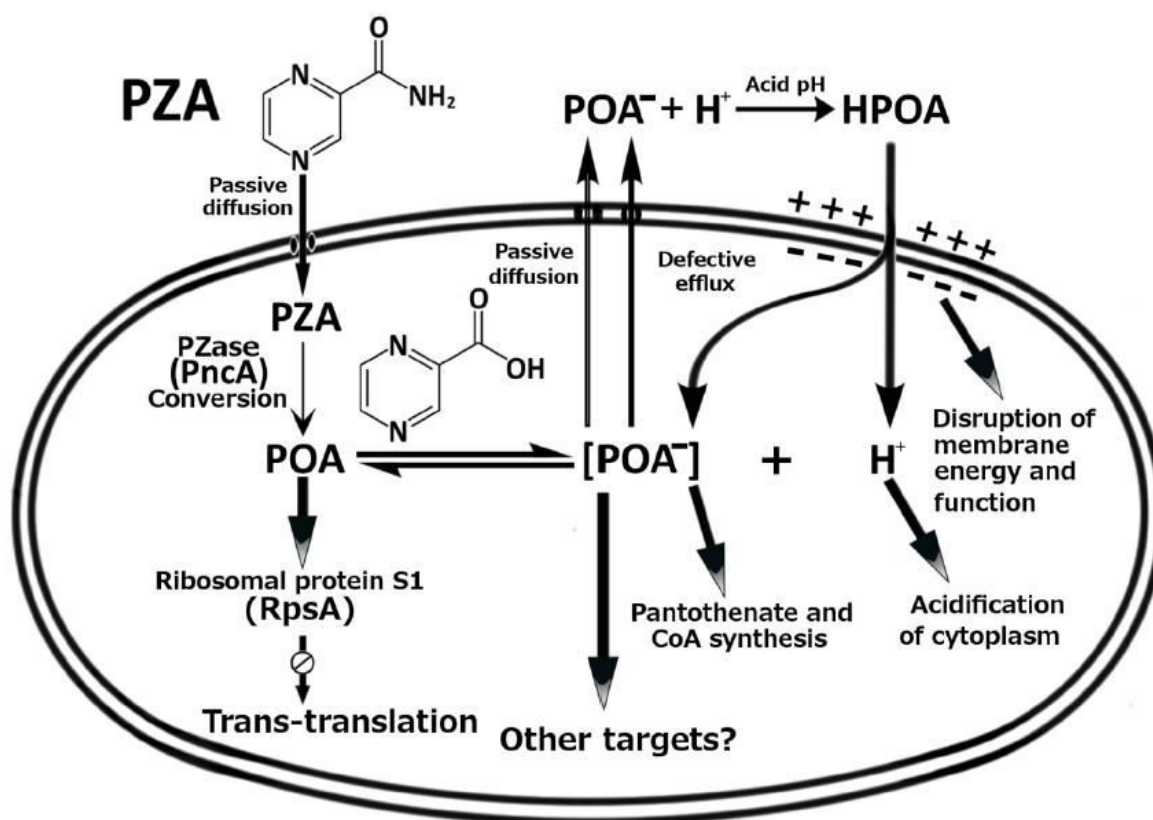


Figure 30. Mécanisme d'action de la pyrazinamide. D'après Zhang *et al.*, 2013, *MicrobiolSpectrum*.

II.2.2 - Effet de l'acide pyrazinoïque sur la trans-traduction

L'acide pyrazinoïque inhibe la *trans*-traduction en bloquant l'interaction entre l'ARNtm et la protéine ribosomique bS1 de *M. tuberculosis*, mais pas d'*E. coli* ou *M. smegmatis* (Shi et al., 2011).

Chez *M. tuberculosis*, bS1 codé par le gène *rpsA*, est composé de six domaines dont les deux premiers sont impliqués dans la liaison au ribosome. bS1 de *M. tuberculosis* possède également une queue d'environ 100 acides aminés à son extrémité C-terminale (Salah et al., 2009). Des tests d'interactions entre différents domaines de bS1 et l'acide pyrazinoïque ont démontré que POA se fixe sur le quatrième domaine de bS1 (figure 31). Ainsi POA inhiberait la *trans*-traduction de *M. tuberculosis* en bloquant et / ou modifiant le site de liaison de l'ARNtm à bS1, empêchant ainsi la formation d'un complexe bS1-ARNtm-SmpB et donc la *trans*-traduction (Yang et al., 2015).

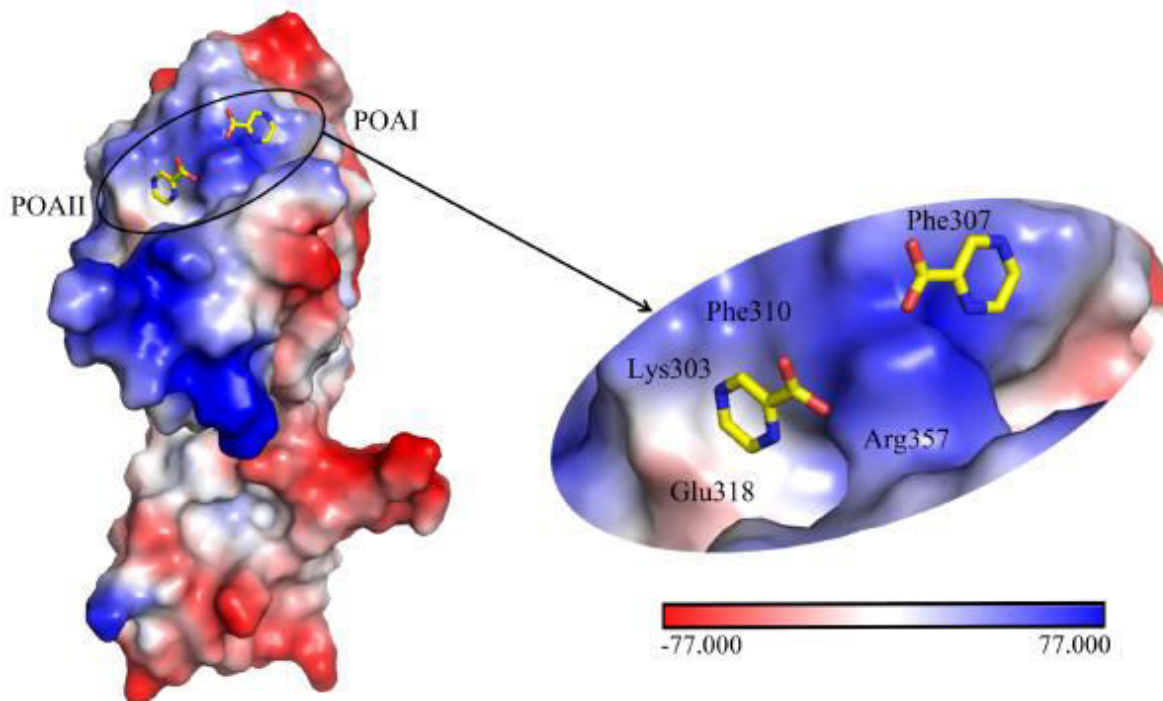


Figure 31. Structure aux rayons X de bS1 lié à l'acide pyrazinoïde. D'après Juanjuan Yang et al, 2015, *Molecular Microbiology*. En volume (rouge à bleu) le quatrième domaine de bS1 de chez *M. tuberculosis* complexé avec deux molécules de POA.

La plupart des résistances à la pyrazinamide ont pour origine des mutations sur le gène *pncA* codant pour la pyrazinamidase, une enzyme transformant la pro-drogue PZA en POA actif. Mais il a été également observé des résistances sur des souches présentant des mutations sur le gène *rpsA*. L'étude structurale de S1 muté à la position 438 connu pour être résistant à la PZA a permis de montrer des modifications structurales dans le site de fixation de l'antibiotique (Figure 32).

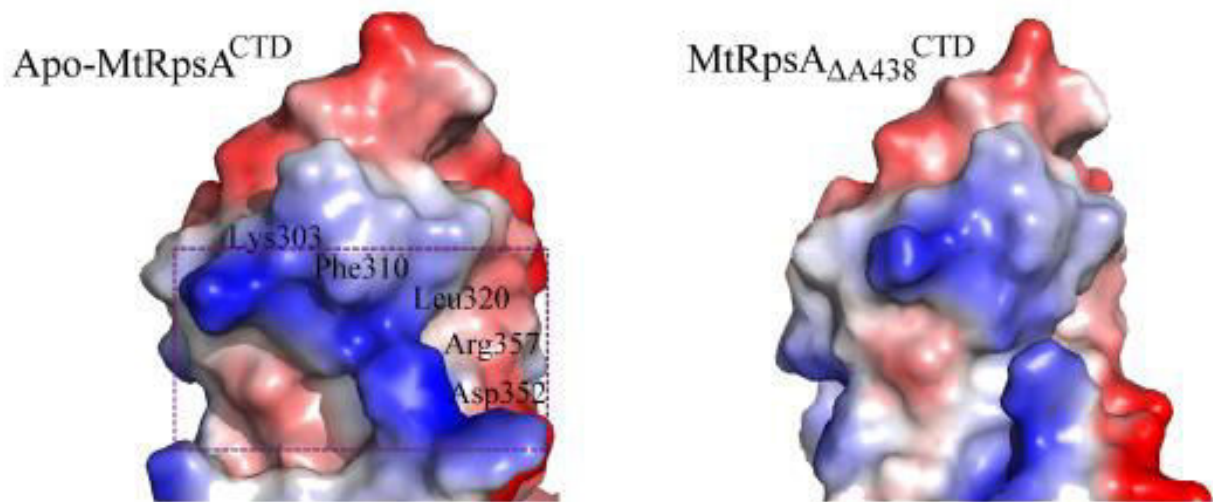


Figure 32. Structure aux rayons X de bS1 muté. D'après Juanjuan Yang et al, 2015, *Molecular Microbiology*. Focus sur la région de bS1 muté de chez *M. tuberculosis* résistant à la PZA.

Malheureusement le spectre très étroit de l'activité de la pyrazinamide - dû peut-être à la structure particulière de bS1 chez *M. tuberculosis* - ne permet pas d'utiliser cet antibiotique contre d'autres agents pathogènes.

II.3 - Le KKL-35

Le second antibiotique connu pour cibler spécifiquement la *trans*-traduction est le KKL-35 ainsi que certains de ses dérivés (Figure 33 ; (Ramadoss *et al.*, 2013)). Certains composés sont spécifiques de la *trans*-traduction et d'autres ciblent les protéases impliquées dans la *trans*-traduction. Afin de confirmer que le KKL-35 inhibe bien la *trans*-traduction et non une cible secondaire, de nombreux tests *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés (Ramadoss *et al.*, 2013). Curieusement, KKL-35 a également été identifié lors d'un criblage haut débit de molécules inhibant la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (Reynolds *et al.*, 2012). Cependant, la cible précise du KKL-35 et de ses dérivés n'est pas identifiée.

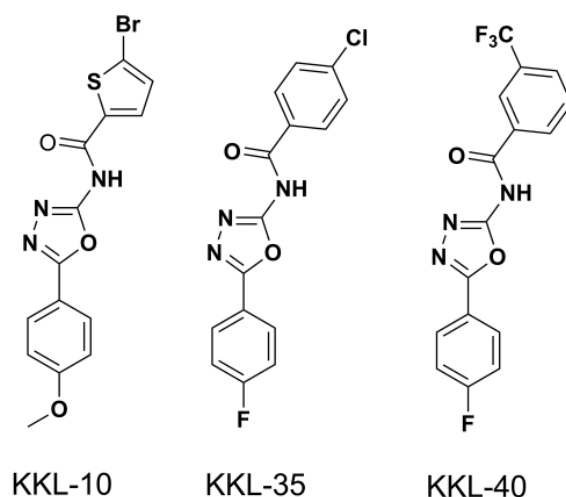


Figure 33. Structure des composés actifs contre la *trans*-traduction découverte par l'équipe de Kenneth Keiler.

L'équipe de Kenneth Keiler à l'origine de cette découverte a poursuivi ces recherches en testant l'activité du KKL-35 et de ses dérivés sur une souche dépourvue de systèmes alternatifs à la *trans*-traduction, *Francisella tularensis* (sans ArfA ni ArfB) (Figure 34). Après plusieurs analyses, dont des inhibitions de la prolifération de *Francisella tularensis* dans des macrophages, les composés KKL-10 et KKL-40 sont aussi jugés comme étant de bons composés pour le développement d'antibiotiques (Goralski *et al.*, 2016).

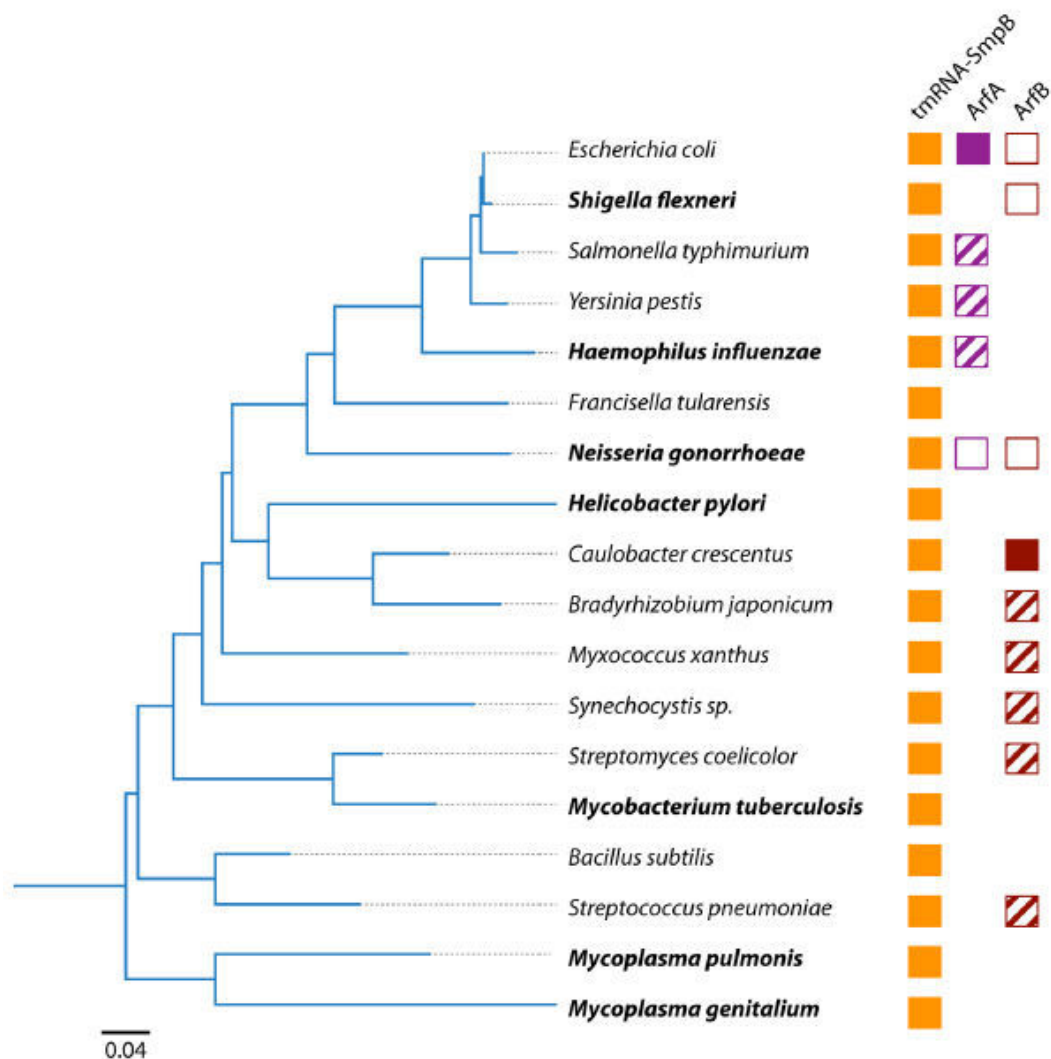


Figure 34. Répartition de la présence d'ArfA et ArfB dans différentes espèces. D'après Kenneth C. Keiler and Heather A. Feaga, 2014, *J Bacteriol.* Les noms en gras indiquent les espèces dans lesquelles l'ARNtm ou SmpB sont vitaux.

III - Le développement d'un outil pour la recherche d'antibiotiques ciblant la *trans*-traduction

III.1 - Introduction – Le développement d'un outil pour la recherche d'antibiotiques ciblant la *trans*-traduction

Dans l'objectif de développer un outil fiable pour mesurer *in vivo* l'activité de composés anti *trans*-traduction, nous avons mis au point un système rapporteur bicolore chez *E. coli*. Pour cela, nous avons combiné un mécanisme rapporteur de la *trans*-traduction, le test, (Keiler and Feaga, 2014) à celui des protéases, le contrôle (Cheng *et al.*, 2007). Ainsi, deux protéines fluorescentes ont été clonées en opéron : la première protéine est mCherry (rouge) complétée en N-terminal par une étiquette identique à celle ajoutée par l'ARNtm d'*E. Coli* : A*ANDENYALAA (l'alanine avant l'étoile est celle apportée par le domaine ARN^t de l'ARNtm, le TLD). Cette construction protéique que nous nommerons « mCHERRY_tag » est reconnue par des protéases et dégradée. La seconde protéine est une GFP (verte) (« Green Fluorescent Protein »). Une séquence correspondant à un terminateur ARN fort est rajoutée à son gène, avant le codon-stop. Cette séquence codante est transcrite sous la forme d'un ARNm GFP non-stop qui bloquera les ribosomes lors de sa traduction, provoquant ainsi l'intervention de la *trans*-traduction. L'étiquette spécifique de la *trans*-traduction est rajoutée à la GFP bloquée qui une fois libérée est reconnue par des protéases et dégradée (Figure 35, A).

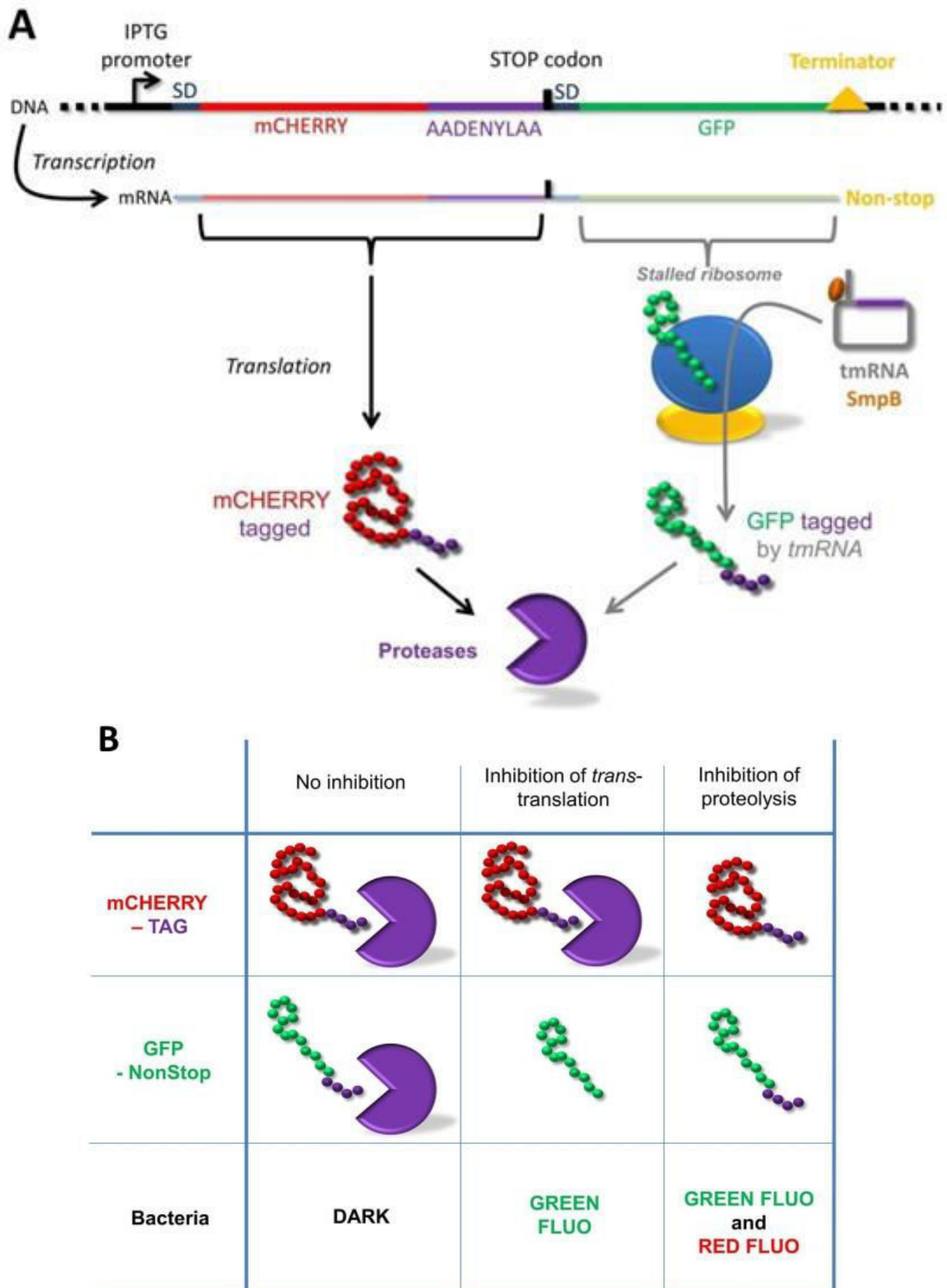


Figure 35. Modèle du système rapporteur. (A) Schéma explicatif du système rapporteur de la *trans*-traduction et (B) les différents résultats possibles.

Trois situations sont possibles (Figure 35, B). Si la mutation ou le composé testé n'a pas d'effet sur la *trans*-traduction ou les protéases, les deux protéines fluorescentes sont dégradées et les cellules ne sont pas fluorescentes. En revanche, si le composé testé inhibe la *trans*-traduction, la GFP bloquée dans le ribosome n'est plus étiquetée. La GFP stable s'accumule donc dans les cellules, conduisant à une fluorescence dans le vert. Enfin, si la mutation ou le composé testé inhibe les protéases, les protéines mCherry et GFP, qu'elles soient étiquetées ou non, ne sont pas dégradées et s'accumulent dans les cellules, induisant une fluorescence rouge et verte.

Notre système présente de nombreux avantages par rapport aux solutions préexistantes. D'abord, ce système « deux en un » (test et contrôle associés) permet d'éliminer les faux positifs grâce à la présence d'un témoin interne. La présence de ce témoin n'est pas négligeable, puisque l'expression conjointe des deux protéines est maîtrisée par une seule induction. En conséquence une même quantité de protéines est exprimée entre le test et le témoin, pour chaque bactérie, évitant ainsi des biais. Ce système est donc très spécifique, et sa sensibilité et reproductibilité sont suffisamment performantes pour juger de l'efficacité d'une molécule.

De plus, ce système peut être utilisé dans différentes conditions de cultures (par exemple : biofilm vs culture liquide | phase exponentielle vs phase stationnaire | milieu solide (boite de Petri) vs milieu liquide (plaque de 96 puits)). L'utilisation de protéines fluorescences est une technique versatile qui permet la visualisation des résultats par différents moyens (Microscopie de fluorescence, fluorimètre, etc.). Cela permet d'utiliser ce système, non seulement pour le criblage de molécule, mais également pour la recherche fondamentale.

Enfin, le système est conçu de manière à être facilement transposable dans différentes espèces bactériennes (Espèces/souches différentes).

III.2 - Détail et construction du système rapporteur

Pour construire la séquence du système rapporteur (voir la séquence Annexe N°1 – Partie III), nous avons choisi un promoteur constitutif d'*E. coli* de consensus TTGACA-TATAAT (Kanaya and Kudo, 1991). Ce promoteur est directement suivi par la séquence lacO : séquence non codante sur laquelle vient se fixer la forme active du répresseur LacI, empêchant l'action de l'ARN polymérase. Ce promoteur avec l'opérateur permet d'induire l'opéron de manière maîtrisée avec de l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Des sites de restrictions placés de part et d'autre permettent de modifier ce promoteur (voir Annexe N°2 – Partie III).

Le premier gène codant pour la protéine mCHERRY débute par un site de fixation au ribosome (SD ou RBS pour « Ribosome Binding Site ») de consensus AGGAGG (Barrick *et al.*, 1994). Une séquence de 7 nucléotides sépare le site de fixation au ribosome du codon de démarrage AUG. Cette séquence, SD + les 7 nucléotides, est identique pour la seconde protéine GFP.

La séquence mCHERRY est modifiée avant le codon stop par l'insertion d'une séquence codant pour l'étiquette de l'ARNtm d'*E. coli* (A*ANDENYALAA). Cette séquence est également flanquée par des enzymes de restriction afin de pouvoir la modifier facilement. Effectivement chaque espèce bactérienne possède une étiquette différente. Ainsi si l'on souhaite transposer le système dans une autre espèce, il est nécessaire de changer l'étiquette (voir site web des étiquettes de l'ARNtm en fonction des espèces : <http://www.ag.auburn.edu/mirror/tmRDB/peptide/peptidephylolist.html>). Après le codon stop, une séquence intermédiaire de 12 nucléotides (TCTAGATTTAAG) est insérée contenant également des sites de restrictions.

Le second gène codant pour la protéine GFP débute donc par la même séquence que la mCHERRY (SD + 7 nucléotides). Avant le codon stop est ajouté un terminateur synthétique fort. Nous nous sommes appuyés sur une publication ayant testé un grand nombre de terminateurs naturels et synthétiques (Chen *et al.*, 2013b). Nous avons choisi de placer trois terminateurs à la suite (figure N°36). Le premier nommé L3S2P56 est synthétique, le second ECK12002960 est naturel. Enfin le troisième est un terminateur naturel de l'opéron *rnC* chez *E. coli* (Young, 1979).

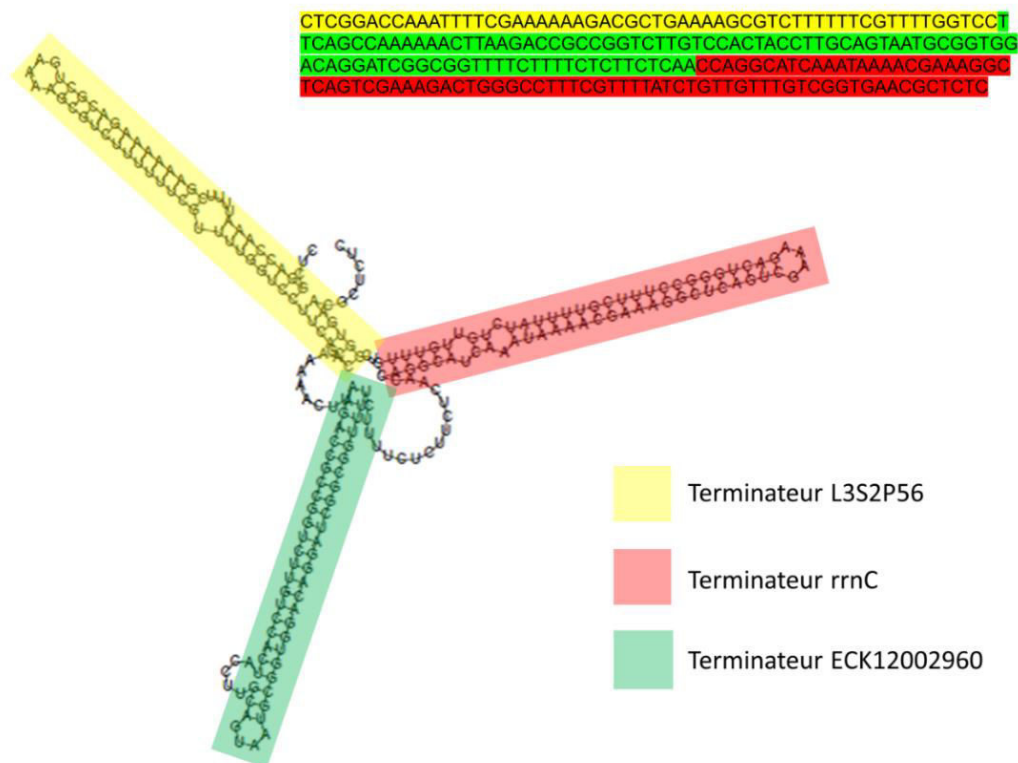


Figure 36. Prédiction de structure secondaire du terminateur. En haut à droite la séquence codant les trois terminateurs, au centre la prédiction de la structure secondaire de cette séquence réalisée avec le logiciel Oligo Analyzer.

Ce « méga » terminateur ne possède pas de codon stop. Lorsque ce terminateur est transcrit par l'ARN polymérase, trois grandes tige-boucles se forment, bloquant prématurément la transcription, ce qui génère un ARNm « non-stop ». L'ensemble de cette séquence est également flanqué par des enzymes de restrictions permettant de le déplacer facilement dans d'autres plasmides.

La séquence entière a été commandée et vérifiée chez Thermo Fisher Scientific (GeneArt®). Puis par clonage avec les enzymes de restriction, la construction a été placée dans un vecteur pBAD24 (inductible à l'arabinose) et un vecteur pET15b (inductible à l'IPTG). Pour le premier plasmide pBAD24 nous n'avons pas obtenu de résultat satisfaisant, nous avons donc poursuivi la mise au point sur le plasmide pET15b. Aussi, ce plasmide a été modifié en remplaçant l'étiquette de l'ARNtm d'*E. coli* (A*ANDENYALAA) par celle de *Staphylococcus aureus* (A* GKSNNNFVAA).

La mise au point de l'utilisation de ce système rapporteur a nécessité de nombreux essais. Il est aujourd'hui opérationnel pour l'utilisation sur plaque 96 puits et lecture au spectrofluorimètre. Cette technique est particulièrement adaptée à la réalisation de criblages haut débit. De plus, ce système a également été mis au point afin de pouvoir effectuer des suivis dans le temps par microscopie à fluorescence (Figure 37). Cette technique, consistant à observer la croissance bactérienne et la fluorescence au cours du temps, est réalisée en déposant une faible concentration de bactéries ($DO = 0.1$) sur un gel d'agar. Ce support permet de fixer les bactéries tout en les maintenant en vie. Après dépôt des bactéries, le gel d'agar placé entre lame et lamelle est scellé afin d'éviter l'assèchement. La visualisation par microscopie est complémentaire de la lecture sur plaques – moyenne de la fluorescence – car elle permet d'observer directement le système dans la bactérie au cours de son cycle cellulaire.

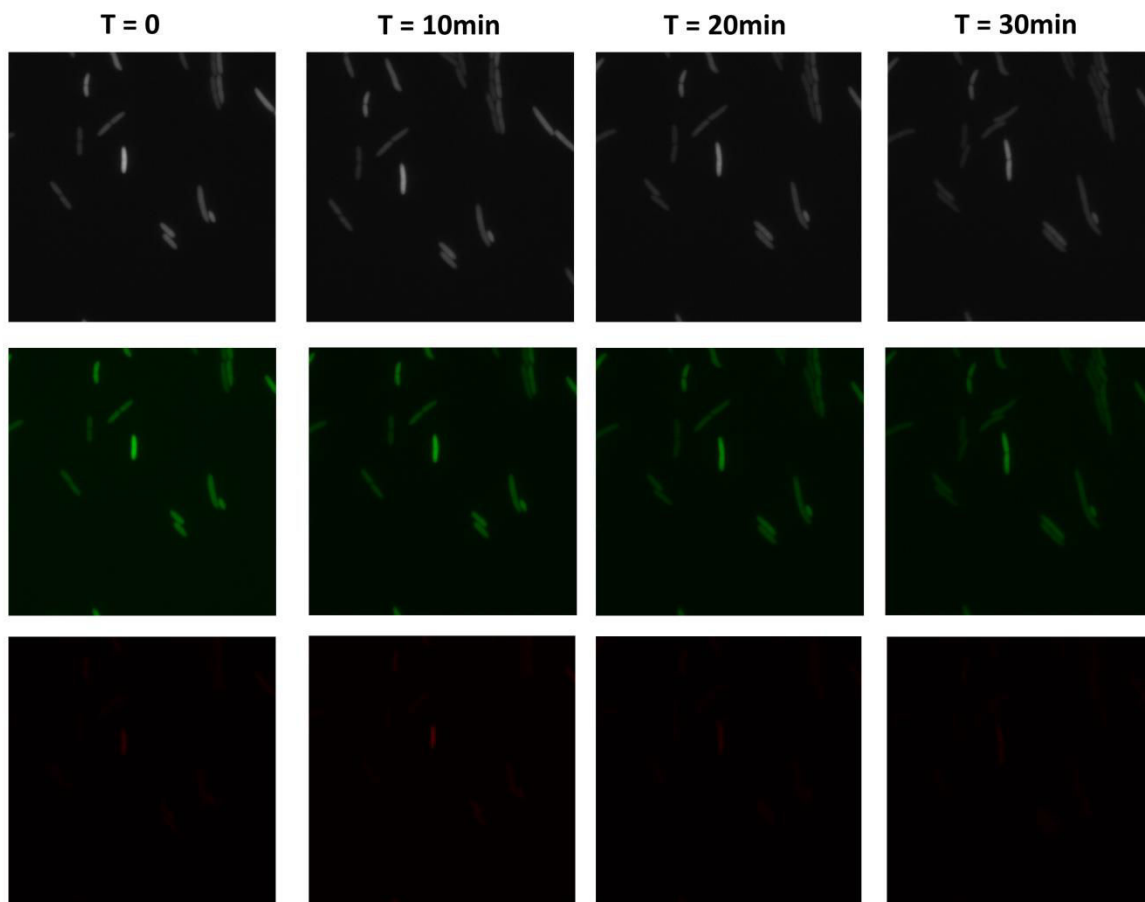


Figure 37. Time lapse en microscopie à fluorescence de la souche *E. coli* $\Delta ssrA$. Le temps est indiqué en minutes. La ligne du haut correspond à l'observation en lumière blanche. Les bactéries sont clairement visibles. La ligne du milieu correspond à une visualisation avec le filtre GFP, et la ligne du bas avec le filtre mCHERRY. Comme expliqué dans la Figure 35B, les bactéries $\Delta ssrA$ fluorescent dans le vert et non dans le rouge. Les images sont acquises sur un vidéo microscope Olympus IX71 inversé API DeltaVision de la plateforme MRic.

III.3 - Conclusion - Le développement d'un outil pour la recherche d'antibiotiques ciblant la *trans*-traduction

Ce système rapporteur *in vivo* de la *trans*-traduction est opérationnel pour le criblage haut débit et pour l'étude fondamentale de la *trans*-traduction. L'objectif final est d'adapter ce système bicolore chez différentes espèces afin de réaliser un « Kit de screening » commercial. Ses particularités, et notamment l'utilisation d'un témoin interne et sa transposabilité à d'autres espèces qu'*E. coli*, en font un système particulièrement novateur. C'est la raison pour laquelle l'ensemble de ce travail a été valorisé par la réalisation d'un brevet. Le dépôt de brevet est réalisé en partenariat avec la SATT Ouest Valorisation (Sociétés d'Accélération du Transfert de Technologies), en lien avec le cabinet de propriété industrielle Plasseraud. En plus de protéger ce système et de pouvoir le vendre à des industriels, ce brevet permettra également d'avoir des droits sur toutes les molécules ayant une activité anti *trans*-traductionnelle, découvertes et/ou validées par cette méthode. Actuellement, ce système est utilisé au laboratoire et les premiers résultats sont présentés dans l'article suivant. Cet article de méthode est en cours de rédaction et sera soumis une fois le brevet déposé.

IV - Article #5 | K. Macé *et al.*

IV.1 - Introduction de l'Article #5

A new antibiotic screening assay targeting *trans*-translation *in vivo*

K. Macé *et al.*

Nous avons d'abord validé le système de détection de la *trans*-traduction chez *E. coli* (wt, $\Delta ssrA$, $\Delta clpP$). Nous avons observé des résultats intéressants comme la spécificité de l'étiquette de l'ARNtm pour la reconnaissance et la dégradation des protéines *trans*-traduites mais également un changement des voies de dégradations en fonction du cycle cellulaire, ou encore une complémentation de la dégradation des produits *trans*-traduits par les protéases ClpAP et ClpXP. Puis dans un second temps, nous avons testé la seule molécule connue pour inhiber la *trans*-traduction chez *E. coli*, le KKL-35. Étonnamment nous n'avons pas observé d'effet tangible du KKL-35 sur la *trans*-traduction, mais un léger effet sur les protéases. Après approfondissement des recherches, la *trans*-traduction et les protéases ne sont pas les cibles principales du KKL-35.

IV.2 - Article #5

***Trans*-translation is not the main target of the antibiotic KKL-35**

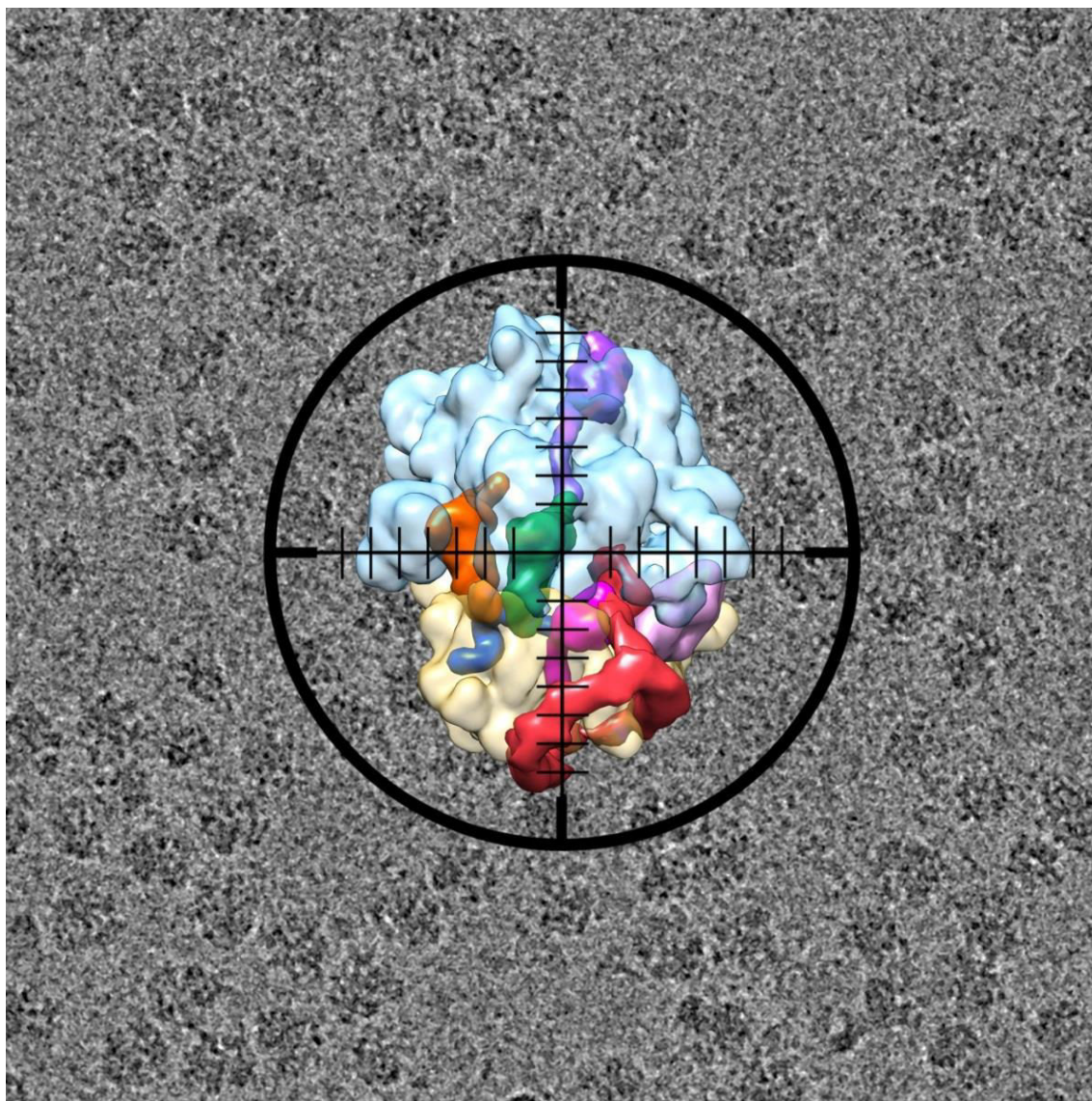
Kevin Macé, Fanny Demay, Charlotte Guyomar, Sylvie Georgeault, Emmanuel Giudice, Renan Goude, Annie Trautwetter, Gwennola Ermel, Carlos Blanco, and Reynald Gillet*

Univ. Rennes, CNRS, UBL, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR) UMR6290 35000 Rennes, France

*Corresponding author. Tel: +33 (0)2 23 23 45 07; E-mail: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

Running title: KKL-35 and *trans*-translation inhibition

Keywords: Antibiotics, KKL-35, Ribosome, tmRNA, *trans*-translation



***Trans*-translation is not the main target of the antibiotic KKL-35**

Kevin Macé, Fanny Demay, Charlotte Guyomar, Sylvie Georgeault, Emmanuel Giudice, Renan Goude, Annie Trautwetter, Gwennola Ermel, Carlos Blanco, and Reynald Gillet*

Univ. Rennes, CNRS, UBL, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR) UMR6290 35000 Rennes, France

*Corresponding author. Tel: +33 (0)2 23 23 45 07; E-mail: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

Running title: KKL-35 and *trans*-translation inhibition

Keywords: Antibiotics, KKL-35, Ribosome, tmRNA, *trans*-translation

ABSTRACT

The reality and intensity of antibiotic resistance in pathogenic bacteria means that new reporter systems are needed for the rapid development of new antimicrobial drugs. In bacteria, *trans*-translation is the primary quality control mechanism for rescuing ribosomes arrested during translation. This key process is universally conserved and plays a critical role in the viability and virulence of many pathogens. In a recent work, several oxadiazole derivatives were found to inhibit *trans*-translation, and among these the compound KKL-35 shows strong bactericidal activity against a large number of bacteria. To explore how KKL-35 works, we developed a useful double fluorescence reporter system which allows for the simultaneous *in vivo* detection of bacterial *trans*-translation and proteolysis activities. The assay was validated using various strains that lack tmRNA, SmpB, and the ClpP protease. Surprisingly, it turns out that KKL-35 does not directly effect on *trans*-translation, and the antibiotic has only a minor impact on *trans*-translation-mediated proteolysis.

INTRODUCTION

The rapid development of novel antimicrobial drugs is needed to address the emergence and gravity of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. One of the main antibiotic targets is the ribosome, where the fundamental process of protein synthesis (translation) takes place (1). Despite its very promising potential, quality control of bacterial protein synthesis is a pathway that has not yet been exploited (2). Ribosomal stalling is a serious issue for cell survival. In bacteria, the primary rescue system for this is *trans*-translation, performed by transfer-messenger RNA (tmRNA) and its partner SmpB, small protein B. *Trans*-translation has been identified in all bacterial species but is absent in eukaryotes (3). tmRNA, encoded by the *ssrA* gene, is a large RNA molecule with two major domains: the TLD (tRNA-like domain), always aminoacylated by an alanine; and the MLD (mRNA-like domain), a short internal open reading frame (ORF) that acts as an mRNA template and carries a stop codon (4). When the tmRNA-SmpB complex enters the vacant A-site of a stalled ribosome, the nascent polypeptide is transferred to the alanine on tmRNA (5). The ORF is then inserted into the mRNA channel, and translation resumes using the ORF as mRNA. This translation event adds a short degradation tag to the C-terminus of the incomplete polypeptide. The tag sequence varies between bacterial types, although elements at the beginning and end are both highly conserved (6). *Escherichia coli* cytoplasm-tagged proteins are mostly degraded by ClpXP and ClpAP proteases (7, 8), while the inner membrane or periplasm proteins are respectively degraded by FtsH and Tsp proteases. Two alternative ribosome rescue factors A and B (ArfA and ArfB) can take over when *trans*-translation is absent or overwhelmed. ArfA (formerly YhdL) binds to stalled ribosomes and recruits the RF2 release factor to the A-site to hydrolyze the peptidyl-tRNA, while ArfB (formerly YaeJ) directly catalyzes the hydrolysis (9). Although ArfB seems minor, ArfA is an essential factor in *E. coli* viability in the absence of tmRNA (10). Accordingly, when *ssrA* is deleted, bacteria devoid of *arfA* (*Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Legionella pneumophila*) cannot survive (9, 11, 12). The presence of ArfA, however, does not make *trans*-translation superfluous in all bacterial species (11). Interestingly, when pathogenic bacteria such as *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, and *Neisseria gonorrhoeae* survive in the absence of *trans*-translation, they generally lose their virulence (13–16). Taken together, these facts strongly suggest that inhibitors of *trans*-translation may act as antibiotics and have minimal side effects on eukaryotic hosts (17, 18). After high-throughput screening, several compounds active against a wide array of bacteria were recently identified as inhibitors of *trans*-translation. One of the most active ones, KKL-35, shows strong bactericidal activity

against various non-related bacteria, making it a promising molecule for future development (2). Unfortunately, neither the molecular target of KKL-35 nor its mechanism of action have yet been solved. In order to better understand how it affects *trans*-translation, we first confirmed its antibacterial activity in *E.coli*, using various strains deleted for the efflux pumps of the TolC system, which are known to transport KKL-35 out of the cell. Surprisingly, the compound has the same inhibitory activity with or without tmRNA, challenging the theory that *trans*-translation is the main target for KKL-35 and other oxadiazole derivatives. We therefore developed a double-fluorescence reporter system for simultaneous and specific detection of bacterial *trans*-translation and proteolysis activity. The system was designed to be easily adapted to a large range of bacterial species, and should be very useful for the screening of new *trans*-translation inhibitors. And in fact, by using this system we were able to show that KKL-35 has no direct effect on *trans*-translation, and only minor effects on proteolysis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids

Table 2 lists the details of the bacterial strains and plasmids used. *E. coli* DH5 α and NM522 strains were used for cloning experiments, and all other experiments were done using BW25113 and its derivatives. Mutations were transduced using the bacteriophage P1 Cml (19). Most of the mutations were from the Keio collection (20), and were created by deleting genes and replacing them with a kanamycin resistance (KanR) cassette flanked by flippase recognition target (FRT) sites. When necessary, the cassette was removed using pCP20, a thermoconditional plasmid encoding the FLP recombinase (21). This allowed us to obtain mutated strains without antibiotic resistance, and facilitated the transduction of new mutations. Plasmid pCP20 was eliminated by growing the strains at 42°C. Restriction enzymes, T4 DNA ligase, Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs), and Thermo-Start Master Mix (Thermo Scientific) were used following the manufacturers' instructions. Ligation products were transformed into DH5 α through electroporation with a Bio-Rad Gene Pulser II (22). They were then isolated using a Nucleobond PC 20 miniprep kit (Macherey-Nagel), and introduced into the *E. coli* strain of interest by electroporation. Routine molecular biology procedures were performed as previously described (23). Bacteria were grown aerobically at 37°C in Lysogeny broth (LB) (19). When necessary, we added ampicillin (100 μ g/mL), kanamycin (50 μ g/mL), gentamicin (5 μ g/mL), and increasing

concentrations of KKL-35 to growth medium. All antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich.

Construction of ptCnsG plasmid

The reporter system was created from a two-gene operon. The first gene encodes for the red fluorescent protein mCHERRY (24), with an AANDENYALAA *E. coli* tmRNA-tag at its C-terminus. The second non-stop GFP (nsGFP) gene encodes a GFPmut3 (25) whose stop codon has been replaced by a strong terminator. We used a chimerical terminator that combines three terminal sequences already known to be particularly effective: **CTCGGACCAAATTTTCGAAAAAAGACGCTGAAAAGCGTCTTTTTTCGTTTTG** *GTCC TTCAGCCAAAAA ACTTAAGACCGCCGGTCTTGTCCACTACCTTGCAGTAATGCG* GTGGACAGGATCGGCGGTTTTCTTTCTCTTCTCAACCAGGCATCAAATAAAACGAA AGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCT CTC. These terminators are synthetic L3S2P56 (bold); the natural *E. coli* operon ECK12002960 (italics) (26); and another *E. coli* operon, *rrnC* (underlined) (27). The two fluorescent proteins both carry the same AGGAGG Shine-Dalgarno (SD) sequence, and the same TATACAT sequence between the SD and ATG initiation codons. The whole operon was synthesized and controlled by Thermo Fisher Scientific's GeneArt service, and provided in a kanamycin resistant cloning vector. It was cloned between pET15's *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites to yield ptCnsG plasmid (Fig. S1).

Construction of plasmids that encode *ssrA/smpB* and *clpP* genes

Using the corresponding primers, *ssrA-smpB* and *clpP* genes were amplified from *E. coli* genomic DNA (see Table 2 and Supplementary Materials). Amplicons were cloned into pBBR1-MCS5, yielding pBBss (carrying the *ssrA-smpB* operon) and pBBclp (carrying the *clpP* gene). In order to do complementation assays, $\Delta ssrA$, $\Delta smpB$, and $\Delta clpP$ strains carrying ptCnsG were transformed with pBBss or with pBBclp. The pBBR1-MCS5 vector was used as a control. The strains were cultured in the presence of 50 μ g/mL kanamycin, 100 μ g/mL ampicillin, or 5 μ g/mL gentamicin. These plasmids were used for complementation assays.

Fluorescence analysis

LB medium was used to dilute pre-cultures in the stationary phase to an initial cell density of $OD_{600} = 0.025$. Cell suspensions were cultivated by shaking at 190 rpm until the OD_{600} reached 0.1. IPTG was then added to the culture at a final concentration of 1 mM. After 30

min. of induction at 37°C, 50 µL cell suspension was distributed into 96-well microplates, pre-incubated (in at least 3 wells) with 50 µL LB, in the presence of either DMSO or KKL-35. The microplates were incubated at 37°C under constant shaking (190 rpm). The intensities of GFP (excitation 485 nm / emission 535 nm / exposure: 0.06 sec) and mCherry fluorescence (excitation 550 nm / emission 610 nm / exposure: 1.5 sec) were regularly measured with a Berthold Twinkle LB 970 fluorometer. In order to plot the growth of each sample, duplicate microplates were prepared in exactly the same conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

KKL-35 activity in *E. coli*

Our intention was to look for the molecular targets of KKL-35, an oxadiazole derivative recently described to be an active inhibitor of the *trans*-translation tagging reaction (18, 20). We began by doing disk diffusion assays and by calculating minimum inhibitory concentrations (MIC), thus confirming the compound's antibacterial activity in *E. coli* BW25113 (Table 1). Initial experiments were conducted using strains deleted for TolC efflux system, known to transport many small chemical compounds including KKL-35 (2). In fact, BW25113 is only sensitive to KKL-35 when TolC is deleted: the $\Delta tolC$ strain has a 22 mm inhibition diameter and a 2 µM MIC, while wild-type *E. coli* BW25113 had no inhibition zone and the MIC over 32 µM (Table 1). The TolC system pumps are formed by the assembly of two conveyors: TolC for the external membrane and variable pumps in the inner membrane. We therefore measured the inhibition diameters of 18 strains mutated for the internal pumps in order to pinpoint the efflux mechanism (Table S2). The AcrA and AcrB mutants have 13 mm inhibition diameters, lower than that of $\Delta tolC$, but the other mutants lacked inhibition altogether. This indicates that KKL-35 is ejected by the AcrAB-TolC multidrug efflux pump in *E. coli*.

The same assays were then performed on various strains involved in protein synthesis quality control that were mutated to delete for *tolC* to avoid KKL-35 efflux. Assuming that KKL-35 inhibited *trans*-translation, we expected that it would kill bacteria in conditions requiring *trans*-translation (2). We therefore began by testing KKL-35 in the absence of the ArfA and ArfB alternative rescue systems. Although the double deletion of *ssrA* and *arfA* is lethal in *E. coli* (10), in the absence of ArfA we did not observe a larger inhibition diameter around a KKL-35-containing disk than was seen for $\Delta tolC$ (Table 1). We thus performed the same

experiment in the absence of the putative targets ($\Delta ssrA$ and $\Delta smpB$), and this again yielded the same inhibition diameters as with the $\Delta tolC$ strain.

These results suggested that KKL-35's antibacterial effects in *E. coli* are not due to the direct inhibition of *trans*-translation. In order to confirm that theory, we decided to create a new double-reporter system which would allow for the simultaneous *in vivo* monitoring of both *trans*-translation and related proteolysis activities. Indeed, KKL-35 was discovered using a single fluorescent screening assay (2). Double reporter systems permit concurrent measurements in the same bacteria and under the exact same growth conditions, thus minimizing false positives caused by background effects.

Assembly of a double reporter

Our goal was to construct a double reporter system that could be used with a large variety of bacterial species. (Fig. 1, S1). The operon was designed to display similar levels of translational expression in both the control and the test. It was placed under the control of the *tac1* promoter (28) to ensure moderate and controlled overexpression, as GFP overproduction is known to be harmful to bacteria. Red fluorescence is used as a control. The mCherry gene ends with the *E. coli ssrA* C-terminal tag AANDENYALAA, and the proteases involved in *trans*-translation recognize this tag and degrade the protein. The *trans*-translation activity is followed using the green fluorescence. The GFP gene is followed by a strong synthetic terminator, and produces a non-stop mRNA GFP on which the ribosome will stall, triggering *trans*-translation. The chimeric terminator is formed by three successive strong terminators chosen from the large collection described by Chen et al (26). We selected L3S2P56, *ECK12002960*, and *rrnC*, as they could all be associated in-frame with GFP without a stop codon. In the absence of IPTG, no fluorescence was seen, demonstrating that LacI was sufficient to repress *ptac1*.

In such systems, GFP proteins are released after being tagged by tmRNA then recognized and degraded by the proteases involved in *trans*-translation (Fig. 1A). When *trans*-translation tagging and proteolysis activities are not impaired, the mCherry and GFP fluorescent proteins are simultaneously degraded, and no significant fluorescence can be detected in the bacteria. On the other hand, when the activity of the proteases involved in *trans*-translation is impaired, the proteins are not degraded, so they accumulate in the cell and cause both red and green fluorescence. Lastly, if only *trans*-translation tagging activity and not proteolysis is inhibited,

proteases take charge of the mCherry protein and degrade it, leaving the GFP alone and stuck on the stalled ribosomes. Stalled GFP proteins can be released by the other rescue systems (including ArfA and ArfB) (5), but without tmRNA tagging. They therefore accumulate in the cells without being triggered by specific proteases like mCherry, and the cells display a green fluorescence. In summary, if the compound inhibits *trans*-translation, bacteria will glow green, and if it inhibits proteases, the bacteria show simultaneous green and red fluorescence (Fig. 1B).

Reporter system activity

The ptCnsG (plasmid carrying tagged mCherry and non-stop GFP) reporter plasmid was checked in different *E. coli* genetic backgrounds before being used to detect inhibitor activity. It was first tested in a wild-type (WT) strain and in mutants deleted for tmRNA ($\Delta ssrA$), SmpB ($\Delta smpB$), and ClpP ($\Delta clpP$), before and after IPTG-induced fluorescence. In line with previous studies, the $\Delta ssrA$ and $\Delta smpB$ strains grew slightly slower than the WT (29). Conversely, the $\Delta clpP$ strain was faster, as ClpP protease affects the protein FtsZ that is responsible for bacterial septum formation (16) (Fig. 2A). Nevertheless, these small differences did not affect our conclusions because the differences in fluorescence intensities considered to be significant are much larger.

With or without IPTG induction, *E. coli* WT (BW25113) that contained the ptCnsG reporter system showed no significant fluorescence, suggesting that GFP and mCherry proteins are properly recognized and degraded by proteases (Fig. 2B-E). The system was then tested in $\Delta ssrA$ and $\Delta smpB$ mutants, where *trans*-translation is inefficient. Without induction, both mutants displayed a small green fluorescence, suggesting a slight leak in system expression before induction (Fig. 2B). When the system was induced by the addition of IPTG, a strong increase in green fluorescence was observed, with no significant red fluorescence. The fluorescence continued to increase, growing 14 times brighter after 400 minutes of induction (Fig. 2C) even though the cells had stopped growing. This confirms that the artificial terminator was highly efficient in prematurely stopping the transcription of non-stop GFP mRNA.

The system was then introduced into a $\Delta clpP$ mutant. In this strain, tmRNA-tagged proteins should not be degraded because there is no main protease system, and without induction it also displays a slight red fluorescence (Fig. 2D). However, after 240 minutes of IPTG-

induced induction, both red and green fluorescence strongly increased, with red markedly prevalent, growing 17 times brighter after 400 minutes of induction (Fig. 2E). At the same time, the $\Delta clpP$ strain produced four times more green fluorescence than the WT, but three times less than strains lacking *trans*-translation. This suggests that in the absence of Clp proteases, other (probably less efficient) proteases can degrade ssrA-tagged proteins (30). The increase of green fluorescence in this mutant emphasizes the importance of checking Clp protease efficiency to avoid false positives when reporting *trans*-translation activity.

Trans-complementation testing of *trans*-translation in the mutant strains $\Delta ssrA$ and $\Delta smpB$ was then conducted by reintroducing tmRNA and SmpB, respectively (see Materials and Methods). As indicated in Fig. S2, the basal level of green fluorescence was restored by the complementation assays, indicating that the absence of *trans*-translational activity is responsible for the increase in GFP. It also confirms that this is not a side effect of the lack of SmpB or tmRNA. Similar *trans*-complementation assays were conducted on the $\Delta clpP$ strain, complemented by the protease ClpP. The mCherry red fluorescence was restored in a similar way by adding the protease (Fig. S2). These results together confirm that the two fluorescent proteins are correctly produced and degraded by the *trans*-translation pathway after IPTG induction.

Reporter system specificity

We tested the reporter system in several other mutant strains ($\Delta arfA$, $\Delta arfB$, and Δrnr) that either lack the alternative ribosome rescue factors ArfA and ArfB, or lack RNase R, which is involved in degradation of the problematic RNA during *trans*-translation (5). After IPTG induction, neither type of fluorescence increased in any of the mutants (Fig. 3A-B), confirming the specificity of the reporter system for tmRNA tagging activity and the subsequent protease degradation of tagged proteins. The $\Delta clpP$, $\Delta clpA$, $\Delta clpX$, and $\Delta clpA/X$ strains were then tested to explore the degradation pathway, since ClpA and ClpX are chaperone proteins able to recognize tmRNA-tagged ones then transfer them into the ClpP proteolytic chamber. Contrary to the green one, the red fluorescence slightly increased for the $\Delta clpA$ or $\Delta clpX$ strains. In contrast, for the double mutant $\Delta clpA/X$, we observed a significant increase in both types, comparable to the levels observed with $\Delta clpP$ (Fig. 3 C-D). This confirmed that the tag is specifically recognized by both ClpA and ClpX proteases, and that ClpX compensates for the absence of ClpA chaperone, and *vice versa*.

Therefore, we created a double fluorescence reporter system that can be used for high-throughput screening of compound libraries to identify new molecules that specifically inhibit *trans*-translation. The green fluorescence is used to follow the *trans*-translation activity, while the red is used as a reporter of the tmRNA-dependent degradation pathway and serves as an internal control. Fluorescence intensities can be detected in various ways (such as fluorescence tracking microscopy or spectroscopy), and under various culture conditions (liquid medium, agar, or microplates). However, to set-up a high-throughput screening assay, we optimized our reporter for 96-well microplate fluorescence reading systems. Another big plus is the system's modularity, and we are currently adapting it to a wide range of bacteria.

The effects of KKL-35 on the reporter system

After validation, our reporter system was used to check KKL-35 activity. The addition of KKL-35 to the *E. coli* WT (BW25113) ptCnsG strain did not trigger an increase in green or red fluorescence, even after 8 hours of exposure and in the presence of high concentrations (> 100 μ M) of the compound (Fig. 4A). This is undoubtedly due to the strong TolC efflux (see above and Table 1). Therefore, we decided to do our experiments with the Δ *tolC* strain, which should display a stronger sensitivity to KKL-35. However, even when used on this strain, KKL-35 had no impact on fluorescence levels as compared to the positive controls, which were Δ *ssrA* for green fluorescence and Δ *clpP* for red (Fig 4B). We continued our experiments by using specific mutant strains able to amplify the signal resulting from *trans*-translation impairment. We constructed a Δ (*tolC*, *arfA*, *arfB*) strain deficient for the TolC pump and for the other ArfA and ArfB rescue factors. Again, after KKL-35 was added, there was no increase in basal fluorescence levels (Fig. 4C). The same strategy was then applied to the protease pathway, using Δ *clpA* and Δ *clpX* strains. Indeed, within the classical tagging sequence AANDENYALAA, ClpX binds the C-terminal "LAA" residues, while ClpA binds the "ALA" C-terminal residues and makes additional contacts with the N-terminal ones. In contrast to previous experiments, the Δ *clpA* strain showed a slight increase in red and green fluorescence after 8 hours of KKL-35 exposition, with a higher increase in red fluorescence (Fig. 5). The increase of fluorescence in Δ *clpA* and not Δ *clpX* suggests that KKL-35 has a moderate effect on ClpXP proteases or on their SspB adaptor (31). However, and despite this slight effect, proteases, tmRNA, and SmpB cannot be considered as KKL-35's main targets. These results contradict the results of Keiler and colleagues, who recently proposed that KKL-35 directly targets *trans*-translation (2). We were able to clearly demonstrate that KKL-35 displays strong antibiotic activity, but without directly targeting this quality control

system. This disparity could be explained by indirect effects on *trans*-translation. Since KKL-35 targets the ribosome (32), one possibility is that it leads to ribosomal stalling via an unknown mechanism (*i.e.* misreading or peptidyl-transfer impairment). An accumulation of stalled ribosomes could explain the increased fluorescence observed by Keiler's group when using a single reporter system with a constitutive promoter (2). Indeed, the accumulation of the truncated reporters on stalled ribosomes probably overwhelms the *trans*-translational machine, indirectly leading to a multiplication of non-tagged proteins when the antibiotic is added. In our system, we deliberately chose to work with the inducible pTac1 promoter so we could control transcription levels and avoid constant basal production of truncated reporter proteins.

In conclusion, using a new double reporter system we were able to examine the activity of KKL-35, a molecule described as a promising *trans*-translation inhibitor, and to show that it has no effect on *trans*-translation and only a minor impact on *trans*-translation-mediated proteolysis. Same results were obtained with other oxadiazole derivatives (R Gillet, unpublished). So far, and as previously described by others (2), we have also failed to obtain mutants resistant to KKL-35, which suggests that the target of KKL-35 is either indispensable for survival or there are multiple targets. Despite these surprising results, KKL-35 and its derivatives must still be considered as promising antibiotics to fight a broad spectrum of resistant bacteria. Our efforts are now underway to better understand their exact mechanisms of action. We also hope that the new double reporter system presented here will be used not only for antibiotic screening, but also for basic research in order to better understand *trans*-translation and protein degradation pathways in bacterial cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Xavier Charpentier and Juliana Berland for insightful comments on the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche, the Direction Générale de l'Armement (#ANR-14-ASTR-0001), and by the Institut Universitaire de France. K.Macé, F.Demay, E.Giudice, C.Blanco, and R.Gillet are co-inventors on a patent on the double fluorescence reporter system described here (application #EP 16.200144, November 23, 2016).

REFERENCES

1. Wilson DN (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 12(1):35–48.
2. Ramadoss NS, et al. (2013) Small molecule inhibitors of trans-translation have broad-spectrum antibiotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(25):10282–10287.
3. Macé K, Gillet R (2016) Origins of tmRNA: the missing link in the birth of protein synthesis? *Nucleic Acids Res* 44(17):8041–8051.
4. Neubauer C, Gillet R, Kelley AC, Ramakrishnan V (2012) Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. *Science* 335(6074):1366–1369.
5. Giudice E, Gillet R (2013) The task force that rescues stalled ribosomes in bacteria. *Trends Biochem Sci* 38(8):403–411.
6. Hudson CM, Lau BY, Williams KP (2014) Ends of the line for tmRNA-SmpB. *Front Microbiol* 5:421.
7. Karzai AW, Roche ED, Sauer RT (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* 7(6):449–455.
8. Gottesman S, Roche E, Zhou Y, Sauer RT (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* 12(9):1338–1347.
9. Starosta AL, Lassak J, Jung K, Wilson DN (2014) The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiol Rev* 38(6):1172–1201.
10. Chadani Y, et al. (2010) Ribosome rescue by *Escherichia coli* ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system. *Mol Microbiol* 78(4):796–808.
11. Keiler KC, Feaga HA (2014) Resolving nonstop translation complexes is a matter of life or death. *J Bacteriol* 196(12):2123–2130.
12. Brunel R, Charpentier X (2016) Trans-translation is essential in the human pathogen *Legionella pneumophila*. *Sci Rep* 6:37935.

13. Julio SM, Heithoff DM, Mahan MJ (2000) *ssrA* (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *J Bacteriol* 182(6):1558–1563.
14. Okan NA, Mena P, Benach JL, Bliska JB, Karzai AW (2010) The *smpB-ssrA* mutant of *Yersinia pestis* functions as a live attenuated vaccine to protect mice against pulmonary plague infection. *Infect Immun* 78(3):1284–1293.
15. Svetlanov A, Puri N, Mena P, Koller A, Karzai AW (2012) *Francisella tularensis* tmRNA system mutants are vulnerable to stress, avirulent in mice, and provide effective immune protection. *Mol Microbiol* 85(1):122–141.
16. Huang C, Wolfgang MC, Withey J, Koomey M, Friedman DI (2000) Charged tmRNA but not tmRNA-mediated proteolysis is essential for *Neisseria gonorrhoeae* viability. *EMBO J* 19(5):1098–1107.
17. Li J, Ji L, Shi W, Xie J, Zhang Y (2013) Trans-translation mediates tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 68(11):2477–2481.
18. Vioque A, de la Cruz J (2003) Trans-translation and protein synthesis inhibitors. *FEMS Microbiol Lett* 218(1):9–14.
19. Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory).
20. Baba T, et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:2006.0008.
21. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6640–6645.
22. Meselson M, Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217(5134):1110–1114.
23. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis - Details Trove. Available at: <http://trove.nla.gov.au/work/13615226> [Accessed October 15, 2016].
24. Shaner NC, et al. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22(12):1567–1572.

25. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173(1 Spec No):33–38.
26. Chen Y-J, et al. (2013) Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nat Methods* 10(7):659–664.
27. Young RA (1979) Transcription termination in the *Escherichia coli* ribosomal RNA operon *rrnC*. *J Biol Chem* 254(24):12725–12731.
28. de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M (1983) The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(1):21–25.
29. Oh BK, Apirion D (1991) 10Sa RNA, a small stable RNA of *Escherichia coli*, is functional. *Mol Gen Genet MGG* 229(1):52–56.
30. Farrell CM, Grossman AD, Sauer RT (2005) Cytoplasmic degradation of *ssrA*-tagged proteins. *Mol Microbiol* 57(6):1750–1761.
31. Song HK, Eck MJ (2003) Structural basis of degradation signal recognition by SspB, a specificity-enhancing factor for the ClpXP proteolytic machine. *Mol Cell* 12(1):75–86.
32. Keiler K (2016) Trans-Translation As A Target For Novel Antibiotics. *FASEB J* 30(1 Supplement):242.1–242.1.

Figures

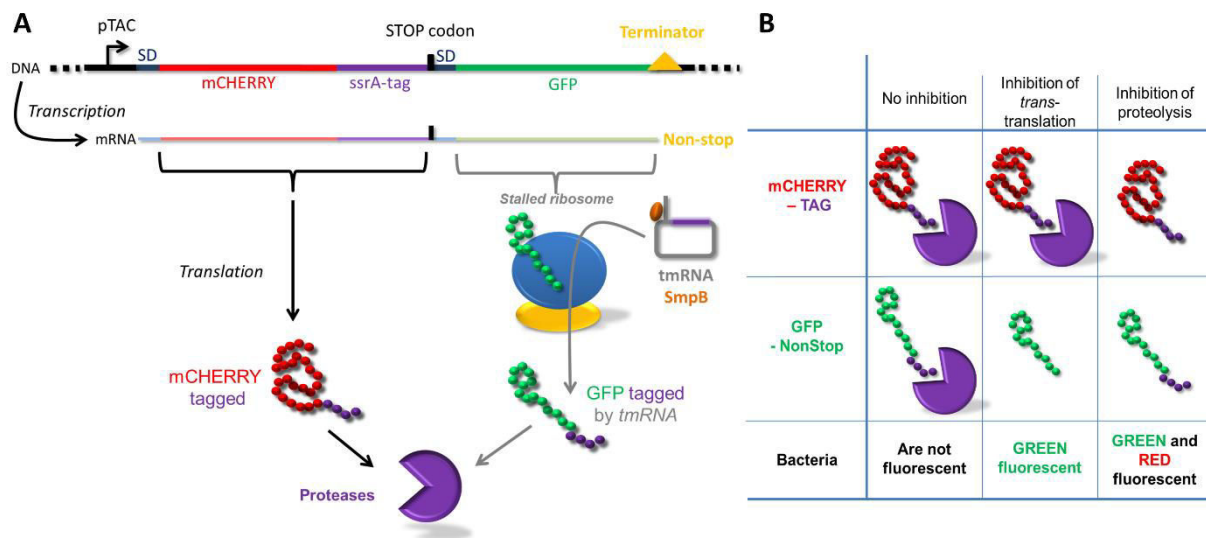


Figure 1. Schematic model of the *in vivo trans*-translation reporter system.

(A) Illustrative diagram of the system using a control (mCHERRY) and a *trans*-translation inhibition reporter (GFP). Transcription is induced by IPTG at pTAC. The polycistronic mRNA encodes an intrinsically tagged mCHERRY and a non-stop GFP. The nsGFP stalls the ribosome and induces *trans*-translation. Both proteins are recognized and degraded by proteases. (B) The possible outcomes of the system. In the absence of inhibition, both proteins are degraded and bacteria are dark. Without efficient *trans*-translation, the GFP protein is not tagged, thus bacteria display green fluorescence. When proteolysis is inhibited, mCHERRY and GFP are not degraded, and bacteria show both green and red fluorescence.

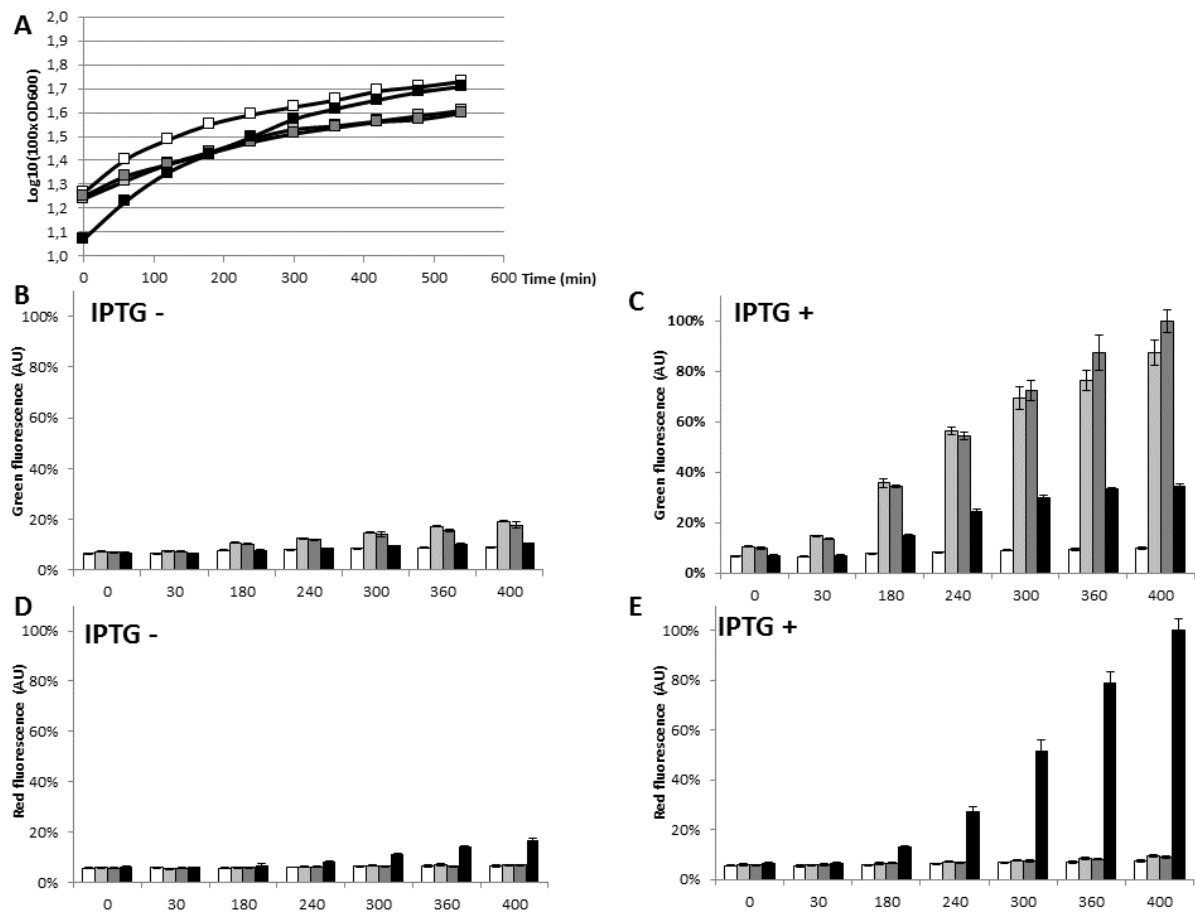


Figure 2. Validation of the reporter system in *E. coli* WT (BW25113), $\Delta smpB$, $\Delta ssrA$, and $\Delta clpP$ strains.

Wild type (WT) is white; $\Delta smpB$ is light gray; $\Delta ssrA$ is dark gray; and $\Delta clpP$ is black. (A) Growth comparison between WT, $\Delta smpB$, $\Delta ssrA$, and $\Delta clpP$. (B, C) Green fluorescent protein (GFP) intensities without and with IPTG induction, respectively. (D and E) mCherry red fluorescent protein intensities without and with IPTG induction, respectively. Measurements are shown of fluorescence (%) over time (minutes), with standard deviations indicated.

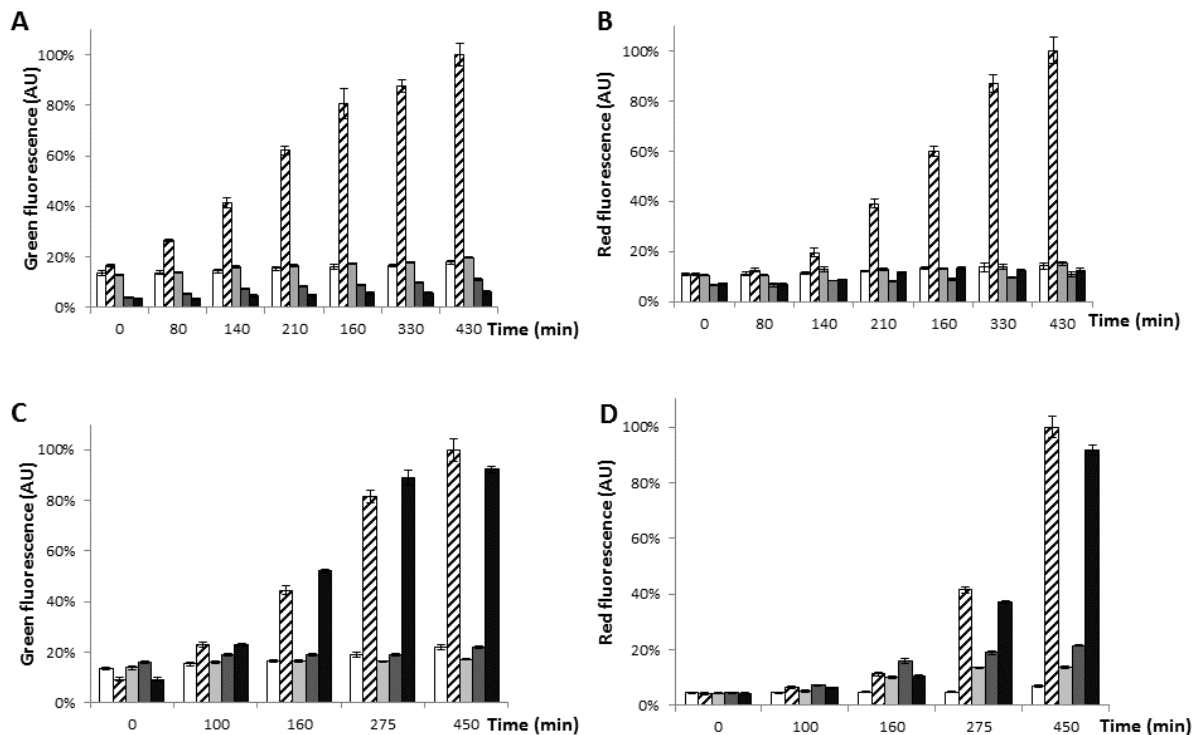


Figure 3. Specificity of the reporter system in *E. coli* in the absence of alternative rescue systems and proteases.

(A and B) Measurement of green (GFP) and red (mCherry) fluorescence over time after IPTG induction in strains deleted for alternative rescue systems or RNase R. WT is in white; $\Delta ssrA$ (positive control) in white with black stripes; $\Delta arfA$ in light gray; $\Delta arfB$ in dark gray; and Δrnv in black. (C and D) Measurement of GFP and mCherry fluorescence over time after IPTG induction in strains deleted for various proteases. WT is in white; $\Delta clpP$ (positive control) in white with black stripes, $\Delta clpA$ in light grey, $\Delta clpX$ in dark grey and double mutant $\Delta clpA/X$ in black. Measurements are shown of fluorescence (%) over time (minutes), with standard deviations indicated.

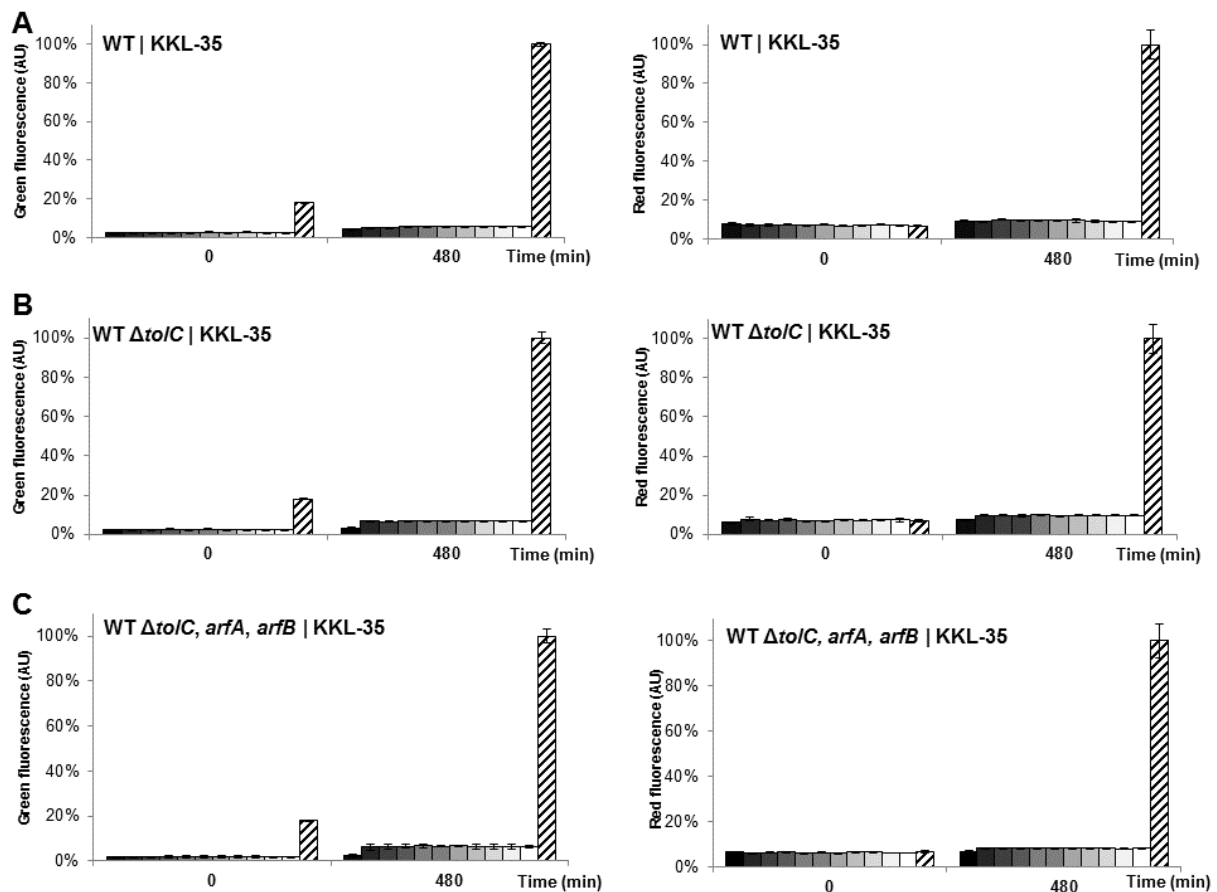


Figure 4. Green and red fluorescence levels of *E. coli* WT, $\Delta tolC$, and $\Delta(tolC, arfA, arfB)$ strains in the presence of increasing concentrations of KKL-35.

(A) GFP green fluorescence and mCHERRY red fluorescence were measured in wild-type (WT) *Escherichia coli* in the presence of serial dilutions of the antibiotic KKL-35. Only two times are indicated here, 0 and 480 min; for complete fluorescence information, see Fig. S3. The maximum concentration (100 μ M) is black; the minimum concentration (0 μ M) is white; and the positive control is striped. The control for GFP green fluorescence was $\Delta ssrA$, for mCHERRY red fluorescence it was $\Delta clpP$. (B and C) Same as (A), but for *E. coli* $\Delta tolC$ and $\Delta(tolC, arfA, arfB)$ and with different KKL-35 serial dilutions going from 1 μ M (black) and lightening to 0 μ M (white). Standard deviations are indicated for each value.

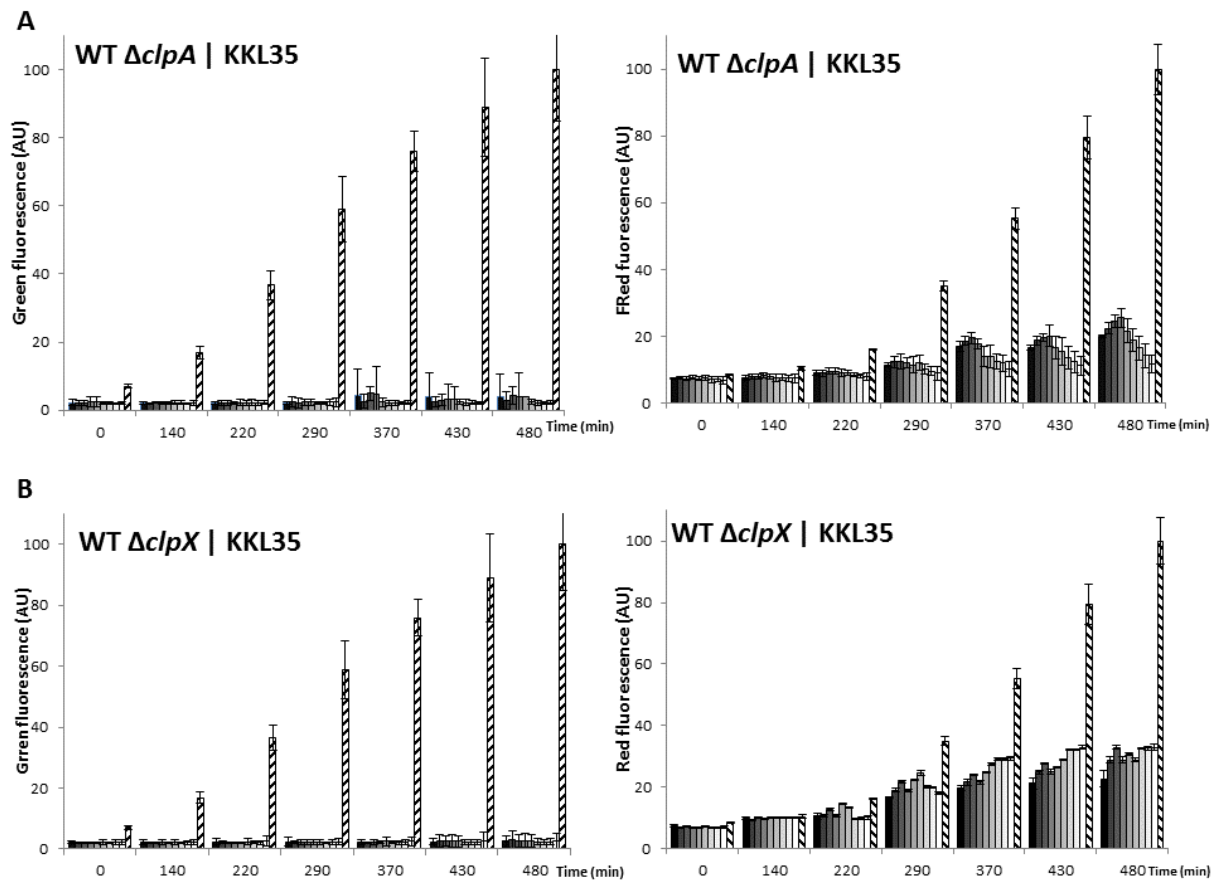


Figure 4. Measurements of green and red fluorescence for *E. coli* $\Delta clpA$ and $\Delta clpX$ mutants in the presence of increasing concentrations of the antibiotic KKL-35.

GFP green and mCHERRY red fluorescence in *E. coli* $\Delta clpA$ (A) and $\Delta clpX$ (B) were measured in the presence of serial dilutions of KKL-35. The maximum concentration (100 μM) is black, and the minimum (0 μM) is white. The positive control is striped: $\Delta ssrA$ for GFP green fluorescence, and $\Delta clpP$ for mCHERRY red fluorescence. The standard deviation is indicated for each value.

Table 1. Antibacterial activity of KKL35

| Strains | Inhibition diameter (mm) | Strains | MIC (μM) |
|---|--------------------------|--|-----------------------|
| <i>E. coli</i> WT (BW25113) | 0 | <i>E. coli</i> WT (BW25113) | >32 |
| ΔtolC | 22.3 (0.6) | <i>E. coli</i> UPEC | >32 |
| $\Delta(\text{tolC}, \text{ssrA})$ | 22.7 (1.5) | <i>E. coli</i> NM522 | >32 |
| $\Delta(\text{tolC}, \text{arfA})$ | 21.7 (1.5) | <i>E. coli</i> BL21 | >32 |
| $\Delta(\text{tolC}, \text{arfB})$ | 22.0 (1.7) | <i>E. coli</i> K10 | >32 |
| $\Delta(\text{tolC}, \text{arfA}, \text{arfB})$ | 21.7 (1.5) | <i>E. coli</i> BW25113 ΔtolC | 2 |
| ΔacrA | 13.3 (0.5) | <i>Bacillus subtilis</i> | 1 |
| ΔacrB | 12.3 (0.5) | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2 |

WT, wild-type; UPEC, uropathogenic *E. coli*; MIC, minimum inhibitory concentrations. Standard deviations are shown in parentheses after the inhibition diameters.

Supporting Information

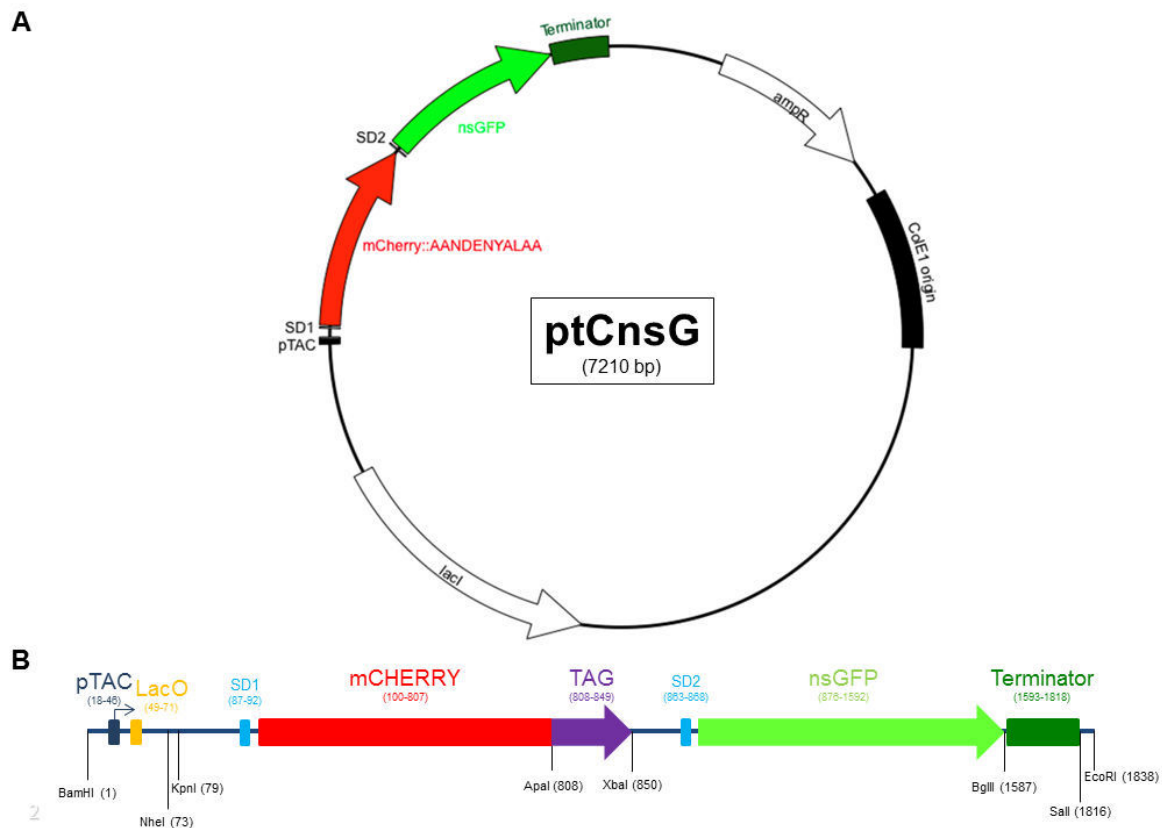


Figure S1. Plasmid map of the ptCnsG double reporter system

A. The pTAC promoter (thin black circular line) is a strong hybrid promoter composed of the -35 region of the *trp* promoter and the -10 region of the *lacUV5* promoter/operator. Two Shine-Dalgarno (SD) sequences are indicated by fine black lines (SD1 and SD2). The mCherry fluorescent protein ORF is fused to the AANDENYALAA *ssrA*-tag of *E. coli*. The non-stop GFP fluorescent protein ORF (nsGFP) is a green arrow. The strong terminator is symbolized by a dark green box. The gene AmpR which codes for ampicillin resistance is indicated by a white arrow, and the replication origin (ColE1) by a black rectangle. **B.** Details of the movable cassette, with various elements indicated, including restriction sites.

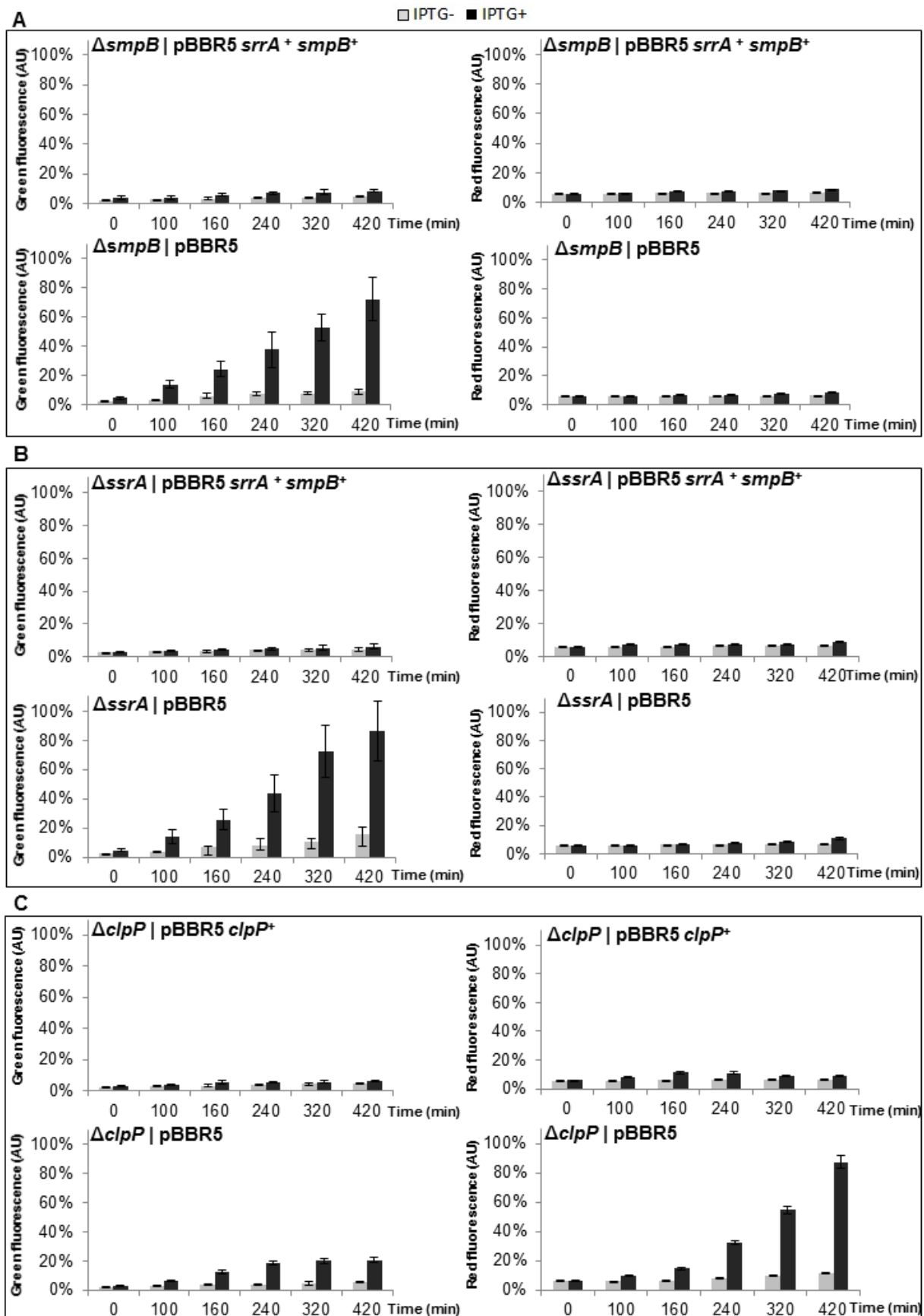


Figure S2. SsrA, SmpB, and ClpP complementation assays.

Complementation assays in the presence of the ptCnsG were performed on $\Delta ssrA$, $\Delta smpB$, and $\Delta clpP$ strains. **(A and B)** In the presence of the pBBR1-MCS5 empty vector, $\Delta smpB$ and $\Delta ssrA$ strains display green (GFP) but no red (mCherry) fluorescence, as described here. When complementation with the pBBss vector is performed, SmpB proteins and tmRNA are restored in bacteria, and the green fluorescence vanishes in both strains, as occurs in the WT strain **(C)** In the same circumstances as above, $\Delta ClpP$ strain displays red and some green fluorescence. When complementation is done, the ClpP proteases are restored and both types of fluorescence vanish, as happens with the WT. The standard deviation is indicated for each value. For each graph grey is without IPTG and black with 1mM IPTG.

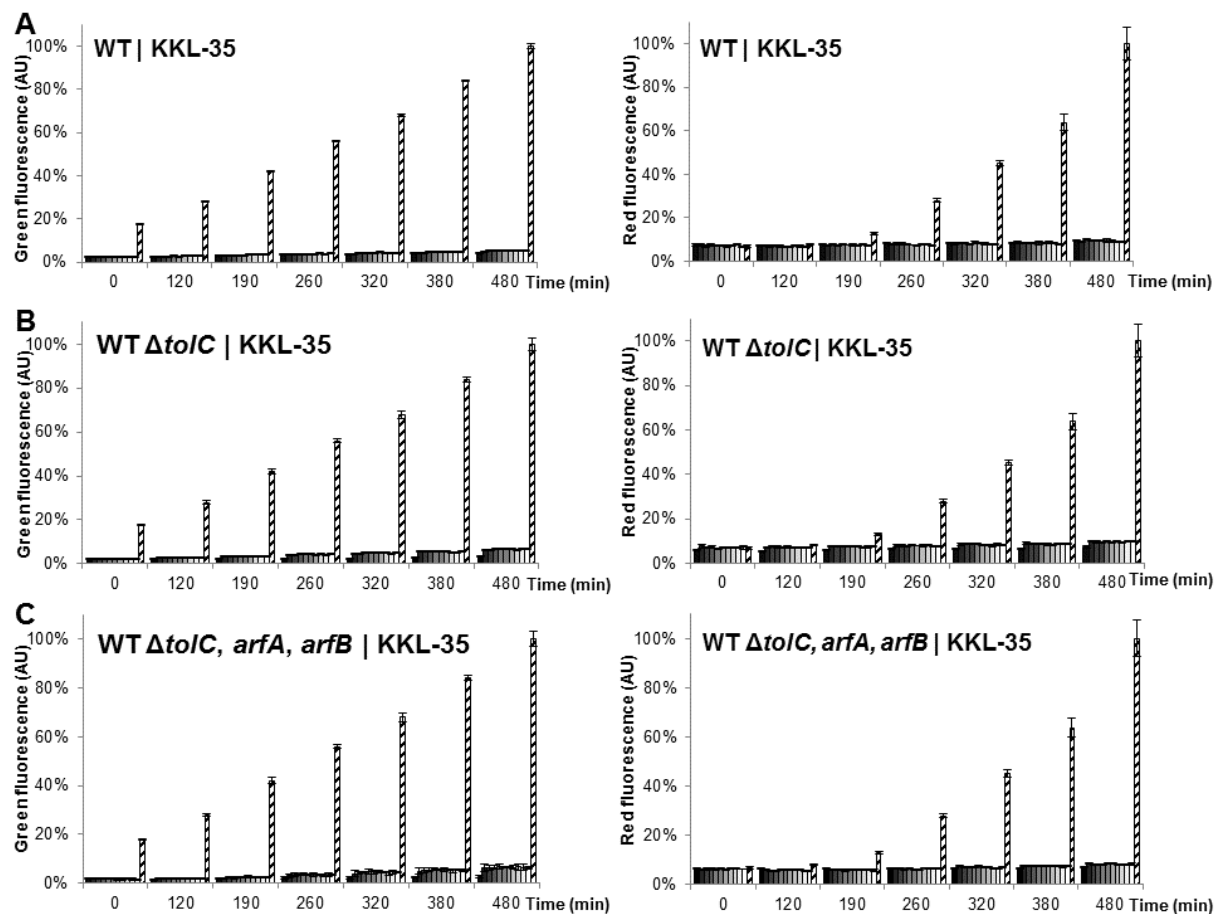


Figure S3. Monitoring of green and red fluorescence in *E. coli* WT, $\Delta tolC$, and $\Delta(tolC, arfA, arfB)$ strains in the presence of increasing concentrations of KKL-35.

(A) *E. coli* WT GFP (green) and mCHERRY (red) fluorescence levels were measured over time in the presence of serial dilutions of KKL-35. The spectrum starts with the maximum concentration (100 μ M) in black and shades through to the minimum (0 μ M) in white. The positive controls ($\Delta ssrA$ for GFP green fluorescence and $\Delta clpP$ for mCHERRY red fluorescence) are striped. (B and C) Same as previous, but showing *E. coli* $\Delta tolC$ (B) and $\Delta(tolC, arfA, arfB)$ (C). Here the serial dilution of KKL-35 is different, going from 1 μ M (black) to 0 μ M (white). The standard deviation is indicated for each value.

Table S1. List of plasmids used in this study.

| NAME | SPECIFICITY | REFERENCE |
|-------------------|---|-----------------------|
| pET-15b | ori ColE1, ampR, lacI+, T7 promoter | Obtained from Novagen |
| ptCnsG | pET-15b derivative carrying tagged mCHERRY and non-stop GFP | <i>This study</i> |
| E8895 | pGEM-T carrying <i>srrA</i> and <i>smpB</i> | <i>This study</i> |
| pBBR1-MCS5 | cloning vector | (1) |
| pBBss | pBBR1-MCS5 carrying <i>smpB/ssrA</i> | <i>This study</i> |
| pBBclp | pBBR1-MCS5 carrying <i>clpP</i> | <i>This study</i> |

Table S2. List of bacterial strains used in this study.

| NAME | GENOTYPE | Target/relevant characteristics | Reference |
|---------------------------------|---|--|-------------------|
| <i>E. coli</i> BW25113 | F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ-, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514 | Used as Wild Type (WT) | CSGC 7636 (2) |
| <i>E. coli</i> JW0427-1 | BW25113 Δ <i>clpP723::kan</i> | Clp AAA+ proteolysis pathway | CGSC 8590 (3) |
| <i>E. coli</i> JW2601-1 | BW25113 Δ <i>smpB776::kan</i> | SmpB ; inactive <i>trans</i> -translation | CGSC 10058 (3) |
| <i>E. coli</i> WT Δ <i>ssrA</i> | <i>E. coli</i> strain W3110 <i>ssrA</i> | tmRNA ; inactive <i>trans</i> -translation | (4) |
| <i>E. coli</i> JW3253-1 | BW25113 Δ <i>yhL728::kan</i> | alternative rescue system A (ArfA) | CGSC 10454 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0187-1 | BW25113 Δ <i>yaеJ788::kan</i> | alternative rescue system B (ArfB) | CGSC: 8433 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0866-1 | BW25113 Δ <i>clpA783::kan</i> | ClpAP protease activity | CGSC: 8898 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0428-1 | BW25113 Δ <i>clpX724::kan</i> | ClpXP protease activity | CGSC: 8591 (3) |
| <i>E. coli</i> 6414 | BW25113 Δ <i>clpX724</i> , Δ <i>clpA783::kan</i> | ClpXP or ClpAP protease activities | <i>This study</i> |
| <i>E. coli</i> JW5741-1 | BW25113 Δ <i>rnr-729::kan</i> | Ribonuclease R | CGSC: 11550 (3) |
| <i>E. coli</i> JW5301-1 | BW25113 Δ <i>tolC732::kan</i> | TolC multidrug efflux pump | CGSC 11430 (3) |
| <i>E. coli</i> 6338 | BW25113 Δ <i>tolC732</i> | TolC multidrug efflux pump or KanR | <i>This study</i> |

| | | | |
|-------------------------|--|--|-------------------|
| <i>E. coli</i> 6330 | $\Delta tolC732, \Delta clpP723::kan$ | combination of both <i>tolC</i> and <i>clpP</i> deletions | <i>This study</i> |
| <i>E. coli</i> 6334 | BW25113 $\Delta tolC732::kan$ and $\Delta ssrA$ | combination of both <i>tolC</i> and <i>ssrA</i> deletions | <i>This study</i> |
| <i>E. coli</i> 6338 | BW25113 $\Delta tolC732, \Delta yhdL728::kan,$ and $\Delta yaeJ788$ | combination of <i>tolC</i> , <i>arfA</i> , and <i>arfB</i> deletions | <i>This study</i> |
| <i>E. coli</i> JW0451-3 | BW25113 $\Delta acrA748::kan$ | AcrAB multidrug efflux pump | CGSC: 11843 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0452-2 | BW25113 $\Delta acrB747::kan$ | AcrAB multidrug efflux pump | CGSC: 8609 (3) |
| <i>E. coli</i> JW3233-2 | BW25113 $\Delta acrE783::kan$ | AcrEF multidrug efflux pump | CGSC: 11758 (3) |
| <i>E. coli</i> W3234-1 | BW25113 $\Delta acrF784::kan$ | AcrEF multidrug efflux pump | CGSC: 10446 (3) |
| <i>E. coli</i> JW5738-1 | BW25113 $\Delta sugE775::kan$ | SugE small multidrug resistance (SMR) family | CGSC: 11548 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0862-1 | BW25113 $\Delta macA779::kan$ | MacAB macrolide extrusion system | CGSC: 8894 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0863-1 | BW25113 $\Delta macB780::kan$ | MacAB macrolide extrusion system | CGSC: 8895 (3) |
| <i>E. coli</i> JW5363-1 | BW25113 $\Delta bcr-739::kan$ | Bcr multidrug efflux pump | CGSC: 11343 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0468-1 | BW25113 $\Delta fsr-761::kan$ | Fsr fosmidomycin efflux pump | CGSC: 8620 (3) |
| <i>E. coli</i> JW1043-1 | BW25113 $\Delta yceI726::kan$ | YceI periplasmic protein | CGSC: 9005 (3) |
| <i>E. coli</i> JW2661-1 | BW25113 $\Delta emrB767::kan$ | EmrAB drug efflux system | CGSC: 10099 (3) |
| <i>E. coli</i> JW5634-1 | BW25113 $\Delta emrD779::kan$ | EmrD multidrug efflux pump | CSGC : 11492 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0531-2 | BW25113 $\Delta emrE750::kan$ | EmrE multidrug / betaine / choline efflux pump | CSGC : 8665 (3) |
| <i>E. coli</i> JW1655-1 | BW25113 $\Delta mdtK740::kan$ | MdtABC drug efflux system | CGSC: 9408 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0069-1 | BW25113 $\Delta setA777::kan$ | SetA sugar / lactose exporter | CGSC: 8370 (3) |
| <i>E. coli</i> JW0826-2 | BW25113 $\Delta cmr-742::kan$ | Cmr multidrug efflux pump | CGSC: 8865 (3) |
| <i>E. coli</i> BL21 | $fhuA2$ [lon] $ompT$ gal (λ DE3) [dcm] $\Delta hsdS$ λ DE3 = λ sBamHIo $\Delta EcoRI$ -B int::(<i>lacI</i> ::PlacUV5::T7 gene1) i21 $\Delta nin5$ | <i>E. coli</i> B – BL21 DE3 | (5) |
| <i>E. coli</i> NM522 | F' <i>proA</i> +B+ <i>lacIq</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15/ Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>glnV</i> <i>thi-1</i> Δ (<i>hsdS-mcrB</i>)5 | <i>E. coli</i> K12 – NM522 | (6) |
| <i>E. coli</i> K10 | Hfr(PO2A) <i>bio+</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>cre-510</i> , <i>fhuA22</i> , <i>garB10</i> , <i>ompF627</i> , <i>fadL701</i> , <i>cre-510</i> , <i>mcrB1</i> , <i>pit-10</i> | <i>E. coli</i> K10 | CGSC:4234 (7) |

| <i>E. coli</i> UPEC | - | Uropathogenic <i>E. coli</i> strains | <i>This study</i> |
|-----------------------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | JH642 (trpC2 pheA1) | Gram-positive WT | (8) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | CIP 68.21 | Gram-positive WT | (10) |

REFERENCES

1. Kovach ME, et al. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166(1):175–176.
2. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6640–6645.
3. Baba T, et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:2006.0008.
4. Nameki N, et al. (1999) Functional and structural analysis of a pseudoknot upstream of the tag-encoded sequence in *E. coli* tmRNA. *J Mol Biol* 286(3):733–744.
5. Studier FW, Moffatt BA (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113–120.
6. Gough JA, Murray NE (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* 166(1):1-19.
7. Skaar PD, Garen A (1956) The orientation and extent of gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42(9):619–624.
8. Kappes RM, Kempf B, Bremer E (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* 178(17):5071–5079.
9. Yagi Y, Clewell DB (1980) Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 143(2):966–970.
10. André E, et al. (2006) Novel synthetic molecules targeting the bacterial RNA polymerase assembly. *J Antimicrob Chemother* 57(2):245–251.

IV.3 - Conclusion de l'Article #5

Nous avons voulu pour cet article présenter et valider un système rapporteur de la *trans*-traduction. Excepté la pyrazinamide, qui est un antibiotique spécifique de *Mycobacterium tuberculosis*, la principale molécule connue comme inhibitrice de la *trans*-traduction est le KKL-35. Nous avons donc été surpris par les premiers résultats obtenus avec le KKL-35, ne donnant aucun signal d'inhibition de la *trans*-traduction ou des protéases liées à la *trans*-traduction. En conséquence, nous avons dans un premier temps remis en question notre système et vérifié de nombreux points, à commencer par la souche bactérienne utilisée, qui est bien la même souche utilisée par l'équipe de Kenneth Keiler (BW 25113) lors de la découverte du KKL-35. Nous avons également testé notre système avec d'autres souches d'*E. coli* (BW Δ *tolC*, DH5 α , BL21, XL10). D'autre part, nous avons testé trois molécules de KKL-35 provenant de sources différentes (un KKL-35 synthétisé par l'équipe de Pierre van de Weghe (UMR6226, Institut des Sciences Chimiques de Rennes) et deux commerciaux (Sigma et MolPort)). Enfin, différents protocoles ont été expérimentés (ajout du KKL-35 avant l'induction à l'IPTG, pendant la phase exponentielle ou la phase stationnaire). Après de nombreux échecs d'obtention d'effet du KKL-35 sur le système rapporteur, nous avons conclu que si le KKL-35 inhibe la *trans*-traduction, il ne s'agit pas de sa cible principale. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des antibiogrammes avec le KKL-35 sur des souches délétées des gènes *ssrA*, *smpB*, *arfA* et *arfB*, confirmant que la cible principale du KKL-35 n'est pas la *trans*-traduction.

Nous avons ensuite recherché d'autres molécules potentiellement inhibitrices de la *trans*-traduction afin de valider le système. Bien que la pyrazinamide ne fonctionne que chez *Mycobacterium tuberculosis*, nous l'avons tout de même testée, sans succès. Après plusieurs recherches bibliographiques, nous avons décidé de tester la puromycine, un antibiotique mimant l'extrémité 3' d'un aminoacyl-ARNt. Cet antibiotique n'inhibe pas la *trans*-traduction ou les protéases, mais permet une libération aléatoire du polypeptide lors de la traduction. De plus, à faible dose, la puromycine a la capacité de libérer les ribosomes bloqués en l'absence de *trans*-traduction. Il est donc probable que la puromycine puisse libérer les ribosomes bloqués avant leur prise en charge par la *trans*-traduction. Nous avons bien obtenu une augmentation de la fluorescence (Figure 38) corrélée avec une inhibition de la croissance.

Ainsi, une légère augmentation de la fluorescence rouge et verte est visible à 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de puromycine, puis bien plus forte à 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ contre aucune à 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. L'augmentation simultanée des signaux vert et rouge suggère que la puromycine ne rentre pas en compétition avec la *trans*-traduction, mais libère prématurément les peptides avant la fin de leur synthèse. L'ensemble de la synthèse des protéines semble affecté, ce qui explique la corrélation entre l'augmentation de la fluorescence et l'effet toxique de la molécule.

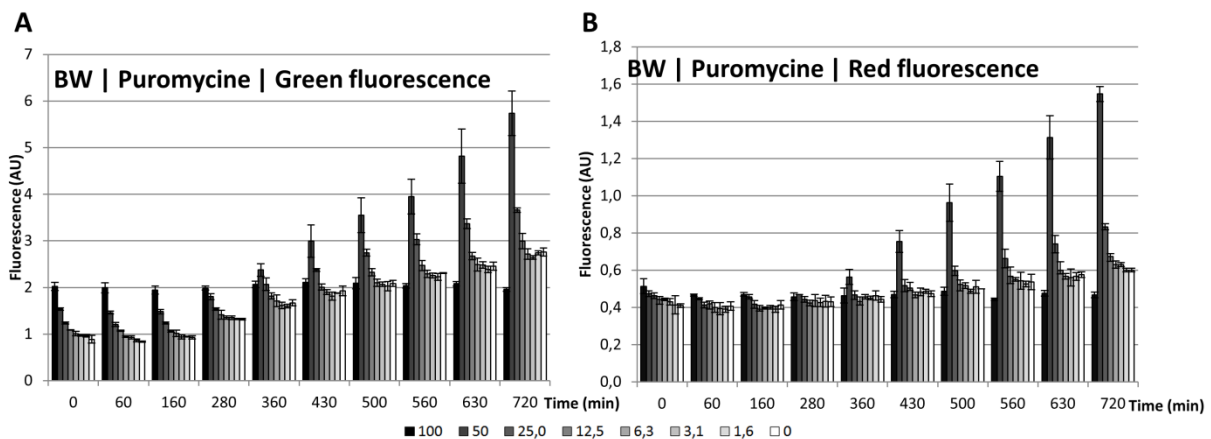


Figure 38. Effet de la puromycine sur le système rapporteur de la *trans*-traduction.

(A) Fluorescence verte avec une gamme de puromycine allant de 0 à 100 $\mu\text{g/mL}$. (B) Identique à (A) pour la fluorescence rouge.

Bien que la puromycine ne soit pas le témoin positif idéal tant recherché, elle témoigne néanmoins de la nécessité d'un contrôle interne au système rapporteur. Effectivement, sans le contrôle mCHERRY, l'augmentation du vert aurait pu être interprétée comme une inhibition de la *trans*-traduction.

L'absence de molécules inhibitrices est un avantage et un inconvénient à la fois. Un avantage car cela démontre l'utilité de notre système pour la recherche de molécules inhibitrices de la *trans*-traduction. Mais l'absence de molécules inhibitrices ne permet pas d'affiner la mise au point du protocole dans des conditions de criblage semi-haut débit, criblage que nous souhaitons réaliser prochainement. En revanche, nous pouvons d'ores et déjà exploiter l'avantage de la transposabilité de notre système pour tester la pyrazinamide chez *M. tuberculosis*.

Enfin, le système peut être utilisé pour des études fondamentales de la *trans*-traduction *in vivo*. Effectivement, comme observé au cours de ces expériences, l'activité de *trans*-traduction et la prise en charge des protéines étiquetées varient en fonction des conditions de croissance de la bactérie.

L'ensemble de ce travail laisse entrevoir des retombées très intéressantes pour la lutte contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. En effet, cet outil servira de base fondamentale pour la conception rationnelle de molécules spécifiques inhibant la *trans*-traduction. Connaissant l'urgence en matière de découverte de nouveaux antibiotiques, la mise au point de molécules bloquant la *trans*-traduction représenterait une avancée majeure vers la découverte de nouvelles molécules à activité anti-bactérienne. Enfin, c'est un exemple de valorisation d'une recherche fondamentale sur la *trans*-traduction.

V - Conclusion générale

Les travaux réalisés durant cette thèse ont contribué à l'amélioration des connaissances, aussi bien fondamentales qu'appliquées, du mécanisme de la synthèse protéique. Tout d'abord l'exploitation, l'analyse et l'interprétation de l'ensemble des connaissances sur l'ARNtm et de son lien avec le monde ARN ont permis de proposer un article, singulier dans sa forme, sur l'origine de synthèse protéique à partir de petites hélices d'ARN. L'obtention d'une structure à haute résolution du facteur d'élongation EF-G en complexe avec le ribosome, nous a plongé au cœur de la translocation et apporte des informations concrètes pour la compréhension de son mécanisme. Notamment dans l'élucidation du fonctionnement de l'acide fusique, un antibiotique ciblant la synthèse protéique. Effectivement de nombreux antibiotiques ciblent ce mécanisme, mais l'augmentation du nombre de bactéries multi-résistantes nous contraint à trouver de nouvelles cibles.

Une voie très prometteuse est le principal mécanisme de contrôle qualité de la synthèse protéique bactérienne : la *trans*-traduction. Ainsi nous avons mis au point un système *in vivo* rapporteur de son activité afin de tester de nouvelles molécules pour le développement de futurs antibiotiques. Ce système rapporteur de la *trans*-traduction, validé par l'utilisation de bactéries génétiquement modifiées, a mis en lumière que le KKL-35 ne cible pas la *trans*-traduction comme précédemment annoncé.

L'ensemble de ces travaux intervient à la croisée de diverses disciplines scientifiques, telles que la génétique, la biologie structurale, la bio-informatique, la biochimie et la microbiologie, offrant une vision transdisciplinaire de la recherche.

Bibliographie

A Abo, T., Ueda, K., Sunohara, T., Ogawa, K., and Aiba, H. (2002). SsrA-mediated protein tagging in the presence of miscoding drugs and its physiological role in *Escherichia coli*. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 7, 629–638.

Achenbach, J., and Nierhaus, K.H. (2015). The mechanics of ribosomal translocation. *Biochimie* 114, 80–89.

AEvarsson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., al-Karadaghi, S., Svensson, L.A., and Liljas, A. (1994). Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* 13, 3669–3677.

Alumasa, J.N., and Keiler, K.C. (2015). Clicking on trans-translation drug targets. *Front. Microbiol.* 6, 498.

Amirnovin, R. (1997). An analysis of the metabolic theory of the origin of the genetic code. *J. Mol. Evol.* 44, 473–476.

Ansong, C., Yoon, H., Porwollik, S., Mottaz-Brewer, H., Petritis, B.O., Jaitly, N., Adkins, J.N., McClelland, M., Heffron, F., and Smith, R.D. (2009). Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation. *PloS One* 4, e4809.

B 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.

Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H.D., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L.J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., et al. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24, 165–169.

Barrick, D., Villanueva, K., Childs, J., Kalil, R., Schneider, T.D., Lawrence, C.E., Gold, L., and Stormo, G.D. (1994). Quantitative analysis of ribosome binding sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 22, 1287–1295.

Beaudry, A.A., and Joyce, G.F. (1992). Directed evolution of an RNA enzyme. *Science* 257, 635–641.

Bergmann, U., and Wittmann-Liebold, B. (1990). Use of a hapten specific anti-dansyl antibody for the localization of ribosomal proteins by immuno electron microscopy. *Biochem. Int.* *21*, 741–751.

Blanchard, S.C., Cooperman, B.S., and Wilson, D.N. (2010). Probing translation using small molecule inhibitors. *Chem. Biol.* *17*, 633–645.

Boshoff, H.I., Mizrahi, V., and Barry, C.E. (2002). Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J. Bacteriol.* *184*, 2167–2172.

Brilot, A.F., Korostelev, A.A., Ermolenko, D.N., and Grigorieff, N. (2013). Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20994–20999.

Butler, M.S., and Cooper, M.A. (2011). Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. *J. Antibiot. (Tokyo)* *64*, 413–425.

Camberg, J.L., Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2011). The interplay of ClpXP with the cell division machinery in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *193*, 1911–1918.

Cech, T.R., and Bass, B.L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Annu. Rev. Biochem.* *55*, 599–629.

Cerletti, M., Martínez, M.J., Giménez, M.I., Sastre, D.E., Paggi, R.A., and De Castro, R.E. (2014). The LonB protease controls membrane lipids composition and is essential for viability in the extremophilic haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Environ. Microbiol.* *16*, 1779–1792.

Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., Kutsukake, K., and Abo, T. (2010). Ribosome rescue by *Escherichia coli* ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system. *Mol. Microbiol.* *78*, 796–808.

Chen, C., Cui, X., Beausang, J.F., Zhang, H., Farrell, I., Cooperman, B.S., and Goldman, Y.E. (2016). Elongation factor G initiates translocation through a power stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 7515–7520.

Chen, Y., Koripella, R.K., Sanyal, S., and Selmer, M. (2010). Staphylococcus aureus elongation factor G--structure and analysis of a target for fusidic acid. *FEBS J.* 277, 3789–3803.

Chen, Y., Feng, S., Kumar, V., Ero, R., and Gao, Y.-G. (2013a). Structure of EF-G-ribosome complex in a pretranslocation state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1077–1084.

Chen, Y.-J., Liu, P., Nielsen, A.A.K., Brophy, J.A.N., Clancy, K., Peterson, T., and Voigt, C.A. (2013b). Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nat. Methods* 10, 659–664.

Cheng, L., Naumann, T.A., Horswill, A.R., Hong, S.-J., Venters, B.J., Tomsho, J.W., Benkovic, S.J., and Keiler, K.C. (2007). Discovery of antibacterial cyclic peptides that inhibit the ClpXP protease. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 16, 1535–1542.

Connell, S.R., Takemoto, C., Wilson, D.N., Wang, H., Murayama, K., Terada, T., Shirouzu, M., Rost, M., Schüler, M., Giesebrecht, J., *et al.* (2007). Structural Basis for Interaction of the Ribosome with the Switch Regions of GTP-Bound Elongation Factors. *Mol. Cell* 25, 751–764.

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

Crick, F.H. (1968). The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38, 367–379.

Deroo, S., Hyung, S.-J., Marcoux, J., Gordiyenko, Y., Koripella, R.K., Sanyal, S., and Robinson, C.V. (2012). Mechanism and rates of exchange of L7/L12 between ribosomes and the effects of binding EF-G. *ACS Chem. Biol.* 7, 1120–1127.

Dinos, G., Kalpaxis, D.L., Wilson, D.N., and Nierhaus, K.H. (2005). Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic Acids Res.* 33, 5291–5296.

Di Pilato, V., Arena, F., Tascini, C., Cannatelli, A., Henrici De Angelis, L., Fortunato, S., Giani, T., Menichetti, F., and Rossolini, G.M. (2016). mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on

a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob. Agents Chemother.* *60*, 5612–5615.

Drainas, D. (2016). *Antibiotics and RNase P*. Antibiot. Basel Switz. *5*.

Ebeling, S., Kündig, C., and Hennecke, H. (1991). Discovery of a rhizobial RNA that is essential for symbiotic root nodule development. *J. Bacteriol.* *173*, 6373–6382.

Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* *346*, 818–822.

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

Feng, S., Chen, Y., and Gao, Y.-G. (2013). Crystal structure of 70S ribosome with both cognate tRNAs in the E and P sites representing an authentic elongation complex. *PloS One* *8*, e58829.

Flynn, J.M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S.H., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2001). Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10584–10589.

Freeland, S.J., and Hurst, L.D. (1998). The genetic code is one in a million. *J. Mol. Evol.* *47*, 238–248.

Freeland, S.J., Knight, R.D., Landweber, L.F., and Hurst, L.D. (2000). Early fixation of an optimal genetic code. *Mol. Biol. Evol.* *17*, 511–518.

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

Gao, H., Zhou, Z., Rawat, U., Huang, C., Bouakaz, L., Wang, C., Cheng, Z., Liu, Y., Zavialov, A., Gursky, R., *et al.* (2007). RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors. *Cell* *129*, 929–941.

Gao, Y.-G., Selmer, M., Dunham, C.M., Weixlbaumer, A., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2009). The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science* 326, 694–699.

Garcia-Ortega, L., Stephen, J., and Joseph, S. (2008). Precise alignment of peptidyl tRNA by the decoding center is essential for EF-G-dependent translocation. *Mol. Cell* 32, 292–299.

Giudice, E., and Gillet, R. (2013). The task force that rescues stalled ribosomes in bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 38, 403–411.

Giudice, E., Macé, K., and Gillet, R. (2014). Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB. *Front. Microbiol.* 5, 113.

Goralski, T.D.P., Dewan, K.K., Alumasa, J.N., Avanzato, V., Place, D.E., Markley, R.L., Katkere, B., Rabadi, S.M., Bakshi, C.S., Keiler, K.C., *et al.* (2016). Inhibitors of Ribosome Rescue Arrest Growth of *Francisella tularensis* at All Stages of Intracellular Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3276–3282.

Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., and Sauer, R.T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* 12, 1338–1347.

Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. (2015). Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 4341–4367.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849–857.

Hansson, S., Singh, R., Gudkov, A.T., Liljas, A., and Logan, D.T. (2005). Structural Insights into Fusidic Acid Resistance and Sensitivity in EF-G. *J. Mol. Biol.* 348, 939–949.

Hiller, D.A., Singh, V., Zhong, M., and Strobel, S.A. (2011). A two-step chemical mechanism for ribosome-catalysed peptide bond formation. *Nature* 476, 236–239.

Hirashima, A., and Kaji, A. (1973). Role of elongation factor G and a protein factor on the release of ribosomes from messenger ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 248, 7580–7587.

Holtkamp, W., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2014). Synchronous tRNA movements during translocation on the ribosome are orchestrated by elongation factor G and GTP hydrolysis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 36, 908–918.

Indrisiunaite, G., Pavlov, M.Y., Heurgué-Hamard, V., and Ehrenberg, M. (2015). On the pH dependence of class-1 RF-dependent termination of mRNA translation. *J. Mol. Biol.* 427, 1848–1860.

Ito, K., Ebihara, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (1996). Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5443–5448.

Ito, K., Ebihara, K., and Nakamura, Y. (1998). The stretch of C-terminal acidic amino acids of translational release factor eRF1 is a primary binding site for eRF3 of fission yeast. *RNA N. Y.* N 4, 958–972.

Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 759–767.

Julio, S.M., Heithoff, D.M., and Mahan, M.J. (2000). *ssrA* (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. *J. Bacteriol.* 182, 1558–1563.

Kalinda, A.S., and Aldrich, C.C. (2012). Pyrazinamide: a frontline drug used for tuberculosis. Molecular mechanism of action resolved after 50 years? *ChemMedChem* 7, 558–560.

Kanaya, S., and Kudo, Y. (1991). Specificity of promoter consensus sequences in *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41–42.

Karzai, A.W., Roche, E.D., and Sauer, R.T. (2000). The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.* 7, 449–455.

Keiler, K.C., and Feaga, H.A. (2014). Resolving nonstop translation complexes is a matter of life or death. *J. Bacteriol.* 196, 2123–2130.

Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., and Klaholz, B.P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature* 520, 640–645.

Knight, R.D., and Landweber, L.F. (1998). Rhyme or reason: RNA-arginine interactions and the genetic code. *Chem. Biol.* 5, R215–R220.

Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Scott, W.G., and Noller, H.F. (2008). Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19684–19689.

Korostelev, A., Zhu, J., Asahara, H., and Noller, H.F. (2010). Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1. *EMBO J.* 29, 2577–2585.

Kraut, D.A., Carroll, K.S., and Herschlag, D. (2003). Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 517–571.

Kumar, S., Kolodkin-Gal, I., Vesper, O., Alam, N., Schueler-Furman, O., Moll, I., and Engelberg-Kulka, H. (2016). Escherichia coli Quorum-Sensing EDF, A Peptide Generated by Novel Multiple Distinct Mechanisms and Regulated by trans-Translation. *mBio* 7, e02034–02015.

Lan, L., Cheng, A., Dunman, P.M., Missiakas, D., and He, C. (2010). Golden pigment production and virulence gene expression are affected by metabolisms in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 192, 3068–3077.

Laurberg, M., Kristensen, O., Martemyanov, K., Gudkov, A.T., Nagaev, I., Hughes, D., and Liljas, A. (2000). Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J. Mol. Biol.* 303, 593–603.

Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H.F. (2008). Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* 454, 852–857.

Lewis, K. (2012). Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature* 485, 439–440.

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

Li, W., Liu, Z., Koripella, R.K., Langlois, R., Sanyal, S., and Frank, J. (2015). Activation of GTP hydrolysis in mRNA-tRNA translocation by elongation factor G. *Sci. Adv.* *1*.

Li, X., Yagi, M., Morita, T., and Aiba, H. (2008). Cleavage of mRNAs and role of tmRNA system under amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *68*, 462–473.

Liang, W., and Deutscher, M.P. (2012). Transfer-messenger RNA-SmpB protein regulates ribonuclease R turnover by promoting binding of HslUV and Lon proteases. *J. Biol. Chem.* *287*, 33472–33479.

Lin, J., Gagnon, M.G., Bulkley, D., and Steitz, T.A. (2015). Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during tRNA translocation. *Cell* *160*, 219–227.

Liu, Y., Wu, N., Dong, J., Gao, Y., Zhang, X., Shao, N., and Yang, G. (2010). SsrA (tmRNA) acts as an antisense RNA to regulate *Staphylococcus aureus* pigment synthesis by base pairing with crtMN mRNA. *FEBS Lett.* *584*, 4325–4329.

M Macé, K., and Gillet, R. (2016). Origins of tmRNA: the missing link in the birth of protein synthesis? *Nucleic Acids Res.* *44*, 8041–8051.

Macé, K., Giudice, E., and Gillet, R. (2015). [Protein synthesis by the ribosome: a pathway full of pitfalls]. *Med. Sci. MS* *31*, 282–290.

Martemyanov, K.A., and Gudkov, A.T. (2000). Domain III of elongation factor G from *Thermus thermophilus* is essential for induction of GTP hydrolysis on the ribosome. *J. Biol. Chem.* *275*, 35820–35824.

Matos, R.G., Barbas, A., and Arraiano, C.M. (2009). RNase R mutants elucidate the catalysis of structured RNA: RNA-binding domains select the RNAs targeted for degradation. *Biochem. J.* *423*, 291–301.

Mohan, S., Donohue, J.P., and Noller, H.F. (2014). Molecular mechanics of 30S subunit head rotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 13325–13330.

Moore, S.D., and Sauer, R.T. (2007). The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 101–124.

N Nakamura, Y., Ito, K., Matsumura, K., Kawazu, Y., and Ebihara, K. (1995). Regulation of translation termination: conserved structural motifs in bacterial and eukaryotic polypeptide release factors. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *73*, 1113–1122.

Nechifor, R., and Wilson, K.S. (2007). Crosslinking of translation factor EF-G to proteins of the bacterial ribosome before and after translocation. *J. Mol. Biol.* *368*, 1412–1425.

Neubauer, C., Gillet, R., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2012). Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. *Science* *335*, 1366–1369.

Nicolaou, K.C., Nold, A.L., and Li, H. (2009). Synthesis of the monomeric unit of the lomaiviticin aglycon. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *48*, 5860–5863.

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

Oh, B.K., and Apirion, D. (1991). 10Sa RNA, a small stable RNA of *Escherichia coli*, is functional. *Mol. Gen. Genet. MGG* *229*, 52–56.

Okan, N.A., Bliska, J.B., and Karzai, A.W. (2006). A Role for the SmpB-SsrA system in *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenesis. *PLoS Pathog.* *2*, e6.

Okan, N.A., Mena, P., Benach, J.L., Bliska, J.B., and Karzai, A.W. (2010). The smpB-ssrA mutant of *Yersinia pestis* functions as a live attenuated vaccine to protect mice against pulmonary plague infection. *Infect. Immun.* *78*, 1284–1293.

Pai, R.D., Zhang, W., Schuwirth, B.S., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J.H.D. (2008). Structural Insights into ribosome recycling factor interactions with the 70S ribosome. *J. Mol. Biol.* *376*, 1334–1347.

Pulk, A., and Cate, J.H.D. (2013). Control of ribosomal subunit rotation by elongation factor G. *Science* *340*, 1235970.

Ramadoss, N.S., Alumasa, J.N., Cheng, L., Wang, Y., Li, S., Chambers, B.S., Chang, H., Chatterjee, A.K., Brinker, A., Engels, I.H., *et al.* (2013). Small molecule inhibitors of translation have broad-spectrum antibiotic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 10282–10287.

Ramrath, D.J.F., Lancaster, L., Sprink, T., Mielke, T., Loerke, J., Noller, H.F., and Spahn, C.M.T. (2013). Visualization of two transfer RNAs trapped in transit during elongation factor G-mediated translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20964–20969.

Ranquet, C., and Gottesman, S. (2007). Translational regulation of the Escherichia coli stress factor RpoS: a role for SsrA and Lon. *J. Bacteriol.* *189*, 4872–4879.

Ranquet, C., Geiselmann, J., and Toussaint, A. (2001). The tRNA function of SsrA contributes to controlling repression of bacteriophage Mu prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10220–10225.

Ratje, A.H., Loerke, J., Mikolajka, A., Brünner, M., Hildebrand, P.W., Starosta, A.L., Dönhöfer, A., Connell, S.R., Fucini, P., Mielke, T., *et al.* (2010). Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature* *468*, 713–716.

Reynolds, R.C., Ananthan, S., Faaleolea, E., Hobrath, J.V., Kwong, C.D., Maddox, C., Rasmussen, L., Sosa, M.I., Thammasuvimol, E., White, E.L., *et al.* (2012). High throughput screening of a library based on kinase inhibitor scaffolds against Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *92*, 72–83.

Rheinberger, H.J., and Nierhaus, K.H. (1983). Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 4213–4217.

Richards, J., Mehta, P., and Karzai, A.W. (2006). RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. *Mol. Microbiol.* *62*, 1700–1712.

Ronneberg, T.A., Landweber, L.F., and Freeland, S.J. (2000). Testing a biosynthetic theory of the genetic code: fact or artifact? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13690–13695.

Rozov, A., Westhof, E., Yusupov, M., and Yusupova, G. (2016). The ribosome prohibits the G•U wobble geometry at the first position of the codon-anticodon helix. *Nucleic Acids Res.* *44*, 6434–6441.

Russell, J.H., and Keiler, K.C. (2009). Subcellular localization of a bacterial regulatory RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16405–16409.

Salah, P., Bisaglia, M., Aliprandi, P., Uzan, M., Sizun, C., and Bontems, F. (2009). Probing the relationship between Gram-negative and Gram-positive S1 proteins by sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* *37*, 5578–5588.

Salsi, E., Farah, E., Dann, J., and Ermolenko, D.N. (2014). Following movement of domain IV of elongation factor G during ribosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 15060–15065.

Sander, G. (1983). Ribosomal protein L1 from *Escherichia coli*. Its role in the binding of tRNA to the ribosome and in elongation factor g-dependent gtp hydrolysis. *J. Biol. Chem.* *258*, 10098–10103.

Sayahi, H., Pugliese, K.M., Zimhony, O., Jacobs, W.R., Shekhtman, A., and Welch, J.T. (2012). Analogs of the antituberculous agent pyrazinamide are competitive inhibitors of NADPH binding to *M. tuberculosis* fatty acid synthase I. *Chem. Biodivers.* *9*, 2582–2596.

Schluzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., *et al.* (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* *102*, 615–623.

Sharma, P.K., Xiang, Y., Kato, M., and Warshel, A. (2005). What are the roles of substrate-assisted catalysis and proximity effects in peptide bond formation by the ribosome? *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 11307–11314.

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J.S., Barry, C.E., Wang, H., Zhang, W., and Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 333, 1630–1632.

Shin, J.-H., and Price, C.W. (2007). The SsrA-SmpB ribosome rescue system is important for growth of *Bacillus subtilis* at low and high temperatures. *J. Bacteriol.* 189, 3729–3737.

Shin, D.H., Brandsen, J., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S.-H. (2004). Structural analyses of peptide release factor 1 from *Thermotoga maritima* reveal domain flexibility required for its interaction with the ribosome. *J. Mol. Biol.* 341, 227–239.

Song, H.K., and Eck, M.J. (2003). Structural basis of degradation signal recognition by SspB, a specificity-enhancing factor for the ClpXP proteolytic machine. *Mol. Cell* 12, 75–86.

Strader, M.B., Hervey, W.J., Costantino, N., Fujigaki, S., Chen, C.Y., Akal-Strader, A., Ihunnah, C.A., Makusky, A.J., Court, D.L., Markey, S.P., *et al.* (2013). A coordinated proteomic approach for identifying proteins that interact with the *E. coli* ribosomal protein S12. *J. Proteome Res.* 12, 1289–1299.

Svetlanov, A., Puri, N., Mena, P., Koller, A., and Karzai, A.W. (2012). *Francisella tularensis* tmRNA system mutants are vulnerable to stress, avirulent in mice, and provide effective immune protection. *Mol. Microbiol.* 85, 122–141.

Svidritskiy, E., Madireddy, R., and Korostelev, A.A. (2016). Structural Basis for Translation Termination on a Pseudouridylated Stop Codon. *J. Mol. Biol.* 428, 2228–2236.

Taylor, F.J., and Coates, D. (1989). The code within the codons. *Biosystems* 22, 177–187.

Thibonnier, M., Thiberge, J.-M., and De Reuse, H. (2008). Trans-translation in *Helicobacter pylori*: essentiality of ribosome rescue and requirement of protein tagging for stress resistance and competence. *PloS One* 3, e3810.

Ticu, C., Nechifor, R., Nguyen, B., Desrosiers, M., and Wilson, K.S. (2009). Conformational changes in switch I of EF-G drive its directional cycling on and off the ribosome. *EMBO J.* 28, 2053–2065.

Trusty, T. (2010). A colorful origin for the genetic code: information theory, statistical mechanics and the emergence of molecular codes. *Phys. Life Rev.* 7, 362–376.

Tourigny, D.S., Fernández, I.S., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2013). Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation. *Science* 340, 1235490.

Trobro, S., and Aqvist, J. (2005). Mechanism of peptide bond synthesis on the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12395–12400.

Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510.

Tworowski, D., Klipcan, L., Peretz, M., Moor, N., and Safro, M.G. (2015). Universal pathway for posttransfer editing reactions: insights from the crystal structure of TtPheRS with puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 3967–3972.

Uemura, S., Dorywalska, M., Lee, T.-H., Kim, H.D., Puglisi, J.D., and Chu, S. (2007). Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome. *Nature* 446, 454–457.

Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003). Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* 114, 123–134.

Vendeix, F.A.P., Dziergowska, A., Gustilo, E.M., Graham, W.D., Sproat, B., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (2008). Anticodon domain modifications contribute order to tRNA for ribosome-mediated codon binding. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 6117–6129.

Venkataraman, K., Zafar, H., and Karzai, A.W. (2014). Distinct tmRNA sequence elements facilitate RNase R engagement on rescued ribosomes for selective nonstop mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* 42, 11192–11202.

Vestergaard, B., Van, L.B., Andersen, G.R., Nyborg, J., Buckingham, R.H., and Kjeldgaard, M. (2001). Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell* 8, 1375–1382.

Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299–1304.

Vioque, A., and de la Cruz, J. (2003). Trans-translation and protein synthesis inhibitors. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 9–14.

Voorhees, R.M., and Ramakrishnan, V. (2013). Structural Basis of the Translational Elongation Cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 203–236.

Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Yoshida, T., Ohkubo, T., Albrecht, R., Buerger, J., Kobayashi, Y., and Fucini, P. (2005). X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit. *EMBO J.* 24, 251–260.

Wilson, K.S., Ito, K., Noller, H.F., and Nakamura, Y. (2000). Functional sites of interaction between release factor RF1 and the ribosome. *Nat. Struct. Biol.* 7, 866–870.

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

Withey, J., and Friedman, D. (1999). Analysis of the role of trans-translation in the requirement of tmRNA for lambdaimmP22 growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 2148–2157.

Wong, J.T. (1980). Role of minimization of chemical distances between amino acids in the evolution of the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1083–1086.

Yamamoto, H., Qin, Y., Achenbach, J., Li, C., Kijek, J., Spahn, C.M.T., and Nierhaus, K.H. (2014). EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 89–100.

Yamamoto, H., Wittek, D., Gupta, R., Qin, B., Ueda, T., Krause, R., Yamamoto, K., Albrecht, R., Pech, M., and Nierhaus, K.H. (2016). 70S-scanning initiation is a novel and frequent initiation mode of ribosomal translation in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E1180–E1189.

Yang, J., Liu, Y., Bi, J., Cai, Q., Liao, X., Li, W., Guo, C., Zhang, Q., Lin, T., Zhao, Y., *et al.* (2015). Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of *Mycobacterium tuberculosis* by pyrazinamide. *Mol. Microbiol.* *95*, 791–803.

Yarus, M., Widmann, J.J., and Knight, R. (2009). RNA-amino acid binding: a stereochemical era for the genetic code. *J. Mol. Evol.* *69*, 406–429.

Young, R.A. (1979). Transcription termination in the *Escherichia coli* ribosomal RNA operon *rrnC*. *J. Biol. Chem.* *254*, 12725–12731.

Young, D.J., Edgar, C.D., Murphy, J., Fredebohm, J., Poole, E.S., and Tate, W.P. (2010). Bioinformatic, structural, and functional analyses support release factor-like MTRF1 as a protein able to decode nonstandard stop codons beginning with adenine in vertebrate mitochondria. *RNA N. Y. N* *16*, 1146–1155.

Zaher, H.S., and Green, R. (2009). Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. *Cell* *136*, 746–762.

Zavialov, A.V., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (2001). A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* *107*, 115–124.

Zavialov, A.V., Mora, L., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (2002). Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. *Mol. Cell* *10*, 789–798.

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

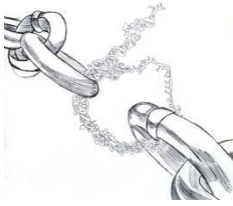
Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., and Mitchison, D. (2013). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol. Spectr.* *2*, 1–12.

Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J.P., and Noller, H.F. (2013). Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation. *Science* *340*, 1236086.

Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J.P., and Noller, H.F. (2014). How the ribosome hands the A-site tRNA to the P site during EF-G-catalyzed translocation. *Science* 345, 1188–1191.

Zipperer, A., Konnerth, M.C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N.A., Slavetinsky, C., Marschal, M., *E.* (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 535, 511–516.

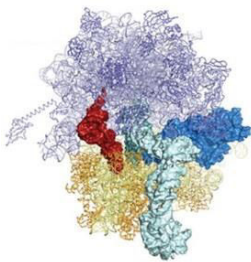
Liste des articles



Partie I - II.2 - **Article #1** | K. Macé and R. Gillet - 2016 - Nucleic Acids Research -----25



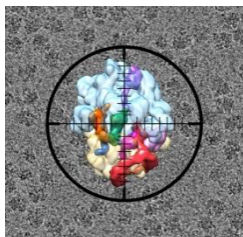
Partie I - VI.2 - **Article #2** | K. Macé, E. Giudice, S. Chat and Gillet R – Non soumis -----77



Partie II - II.2 - **Article #3** | E. Giudice, K. Macé and R. Gillet. - 2014 – Frontiers in Microbiology ----- 111



Partie II - V.2 - **Article #4** | K. Macé, E. Giudice and R. Gillet. - 2015 – Med Sci----- 137



Partie III - V.2 - **Article #5** | K. Macé *et al.* - Non soumis ----- 171

Liste des figures & tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. <i>Le code génétique.</i> | 19 |
| Tableau 2. <i>Nouvelle nomenclature pour les protéines ribosomiques procaryotes de la grande sous unité.</i> | 43 |
| Tableau 3. <i>Nouvelle nomenclature pour les protéines ribosomiques procaryotes de la petite sous unité.</i> | 44 |
| Tableau 4. <i>Diversité et proportion de nucléotides modifiés pour les différents types d'ARN.</i> | 51 |
| | |
| Figure 1. <i>Structures secondaires et tertiaires de 16S, 23S et 5S ARNr.</i> ----- | 41 |
| Figure 2. <i>Structure du ribosome avec une orientation canonique.</i> ----- | 46 |
| Figure 3. <i>Structure du ribosome en représentation « carton ».</i> ----- | 47 |
| Figure 4. <i>Structures secondaires et tertiaires d'un ARNt canonique.</i> ----- | 49 |
| Figure 5. <i>Le cycle de traduction bactérienne.</i> ----- | 53 |
| Figure 6. <i>Schéma simplifié de l'initiation bactérienne.</i> ----- | 55 |
| Figure 7. <i>Les différentes étapes de l'arrivée d'un nouveau ARNt par EF-Tu au ribosome.</i> ----- | 59 |
| Figure 8. <i>Hydrolyse du GTP d'EF-Tu lors de l'élongation.</i> ----- | 61 |
| Figure 9. <i>Le transfert peptidique via l'attaque nucléophile.</i> ----- | 62 |
| Figure 10. <i>Structure du ribosome à l'état canonique et à l'état « ratcheté ».</i> ----- | 64 |
| Figure 11. <i>Comparaison structural entre le complexe ternaire ARNt-EF-Tu •GTP et EF-G •GTP.</i> --- | 65 |
| Figure 12. <i>Structure du facteur de terminaison RF1 et RF2.</i> ----- | 67 |
| Figure 13. <i>Reconnaissance spécifique des codons stop par les facteurs RF1 et RF2.</i> ----- | 68 |
| Figure 14. <i>Schéma de la réaction d'hydrolyse du peptidyl-ARNt.</i> ----- | 68 |
| Figure 15. <i>La rotation de la tête résulte de l'articulation concertée des charnières 1 et 2.</i> ----- | 71 |
| Figure 16. <i>Ouverture et passage de l'ARNt de la porte G1338-A790 pendant la translocation.</i> ----- | 72 |
| Figure 17. <i>Vue des interactions entre l'ARNm et la sous-unité 30S.</i> ----- | 73 |
| Figure 18. <i>Modèle détaillé du mécanisme de translocation.</i> ----- | 74 |
| Figure 19. <i>Modèle de l'hydrolyse du GTP.</i> ----- | 105 |
| Figure 20. <i>Les étapes précoces de la trans-translation en structure 3D et schématique.</i> ----- | 123 |
| Figure 21. <i>Les étapes de la purification des complexes 70S-RNase R.</i> ----- | 125 |

| | |
|--|------------|
| <i>Figure 22. Chromatogramme de la purification du complexe sur colonne Streptavidine. -----</i> | <i>126</i> |
| <i>Figure 23. Analyse du complexe 70S-RNase R par gel d'acrylamide et coloration négative. -----</i> | <i>127</i> |
| <i>Figure 24. Reconstruction à faible résolution du complexe ribosome/RNase R. -----</i> | <i>128</i> |
| <i>Figure 25. Analyses du complexe 70S/ARNtm/SmpB/EF-Tu/RNase R sur gels. -----</i> | <i>129</i> |
| <i>Figure 26. Utilisation thérapeutique des antibiotiques et apparition des premières résistances. ----</i> | <i>151</i> |
| <i>Figure 27. Frise chronologique des découvertes de nouvelles classes d'antibiotique. -----</i> | <i>152</i> |
| <i>Figure 28. Vue des étapes de la synthèse protéique ciblées par les principaux antibiotiques -----</i> | <i>153</i> |
| <i>Figure 29. Conversion de la pyrazinamide en acide pyrazinoïque. -----</i> | <i>156</i> |
| <i>Figure 30. Mécanisme d'action de la pyrazinamide. -----</i> | <i>157</i> |
| <i>Figure 31. Structure au rayon X de bSI lié à l'acide pyrazinoïde. -----</i> | <i>158</i> |
| <i>Figure 32. Structure au rayon X de bSI muté. -----</i> | <i>159</i> |
| <i>Figure 33. Structure des composés actifs contre la trans-translation découverte par l'équipe de Keiler. -</i> | <i>160</i> |
| <i>Figure 34. Répartition de la présence d'ArfA et ArfB dans différentes espèces. -----</i> | <i>161</i> |
| <i>Figure 35. Modèle du système rapporteur. -----</i> | <i>163</i> |
| <i>Figure 36. Prédiction de structure secondaire du terminateur. -----</i> | <i>166</i> |
| <i>Figure 37. Time lapse de la souche ΔssrA. -----</i> | <i>167</i> |
| <i>Figure 38. Effet de la puromycin sur le système rapporteur de la trans-translation. -----</i> | <i>200</i> |

Liste des abréviations

| | |
|----------------|--|
| 30S-IC | « 30S initiation complex » |
| 3D | tridimensionnel |
| Å | ångström |
| aa | acide aminé |
| aa-ARNt | aminoacyl-ARNt |
| aaRS | aminoacyl-ARNt-synthétases |
| ADN | acide desoxyribonucléique |
| Arf | « Alternative ribosome-rescuing factor » |
| ARN | acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ARNr | ARN ribosomique |
| ARNt | ARN de transfert |
| ARNtm | ARN transfert-messenger |
| ASL | «anticodon stem-loop» |
| ATP | adénosine triphosphate |
| cryo-EM | Cryomicroscopie électronique à transmission |
| Da | Daltons |
| EF-G | « Elongation Factor G » |
| EF-Tu | « Elongation Factor Thermo-unsensible » |
| FA | « fusidic acid » |
| fMet | formyl-méthionine |
| GAC | GTPase Activating Center |
| GFP | « Green Fluorescent Protein » |
| GTP | guanosine triphosphate |
| IF | « initiation factor » |
| IPTG | isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside |
| LPS | lipopolysaccharide |
| MLD | « mRNA-like domain » (domaine ARNm de l'ARNtm) |
| nt | nucleotide |
| NTC | «non-productive translation complex» |
| ORF | « open reading frame » |
| PC | protubérance centrale |
| Pi | phosphate inorganique |
| POA | acide pyrazinoïque |

| | |
|-----------------|---|
| POST | post-translocation |
| PRE | pré-translocation |
| pre-IC | « pre-initiation complex » |
| PTC | centre de transfert peptidique |
| PZA | pyrazinamide |
| RBS | « Ribosome Binding Site » |
| RF | « Release Factors » |
| RFF | « Ribosome Recycling Factor » |
| RpoS | « RNA polymerase sigma S factor » |
| S | Svedberg |
| SD | Shine-Dalgarno |
| SDS-PAGE | « Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis » |
| SmpB | « Small Protein B » |
| SPF | motif Serine-Proline-Phenylalanine |
| SRL | α - Sarcin Ricin Loop |
| ssrA | « small and stable RNA A » |
| TIR | « translation initiation region » |
| TLD | « tRNA-like domain » (domaine ARNt de l'ARNtm) |

Annexes

Annexes de la Partie I

Annexe Partie I - N°1

Tableau 1. Comparaison des structures récentes d'EF-G complexé au ribosome.

| PDB | Last author | journal | years | organism | method | resolution | inhibitor | translocation | tRNA | rotation 30S | rotation body | rotation head |
|------|--------------|----------------|-------|-------------------|-----------|------------|-------------------------|---------------|-------------|--------------|---------------|---------------|
| 4V7B | Spain | PNAS | 2013 | <i>E. coli</i> | Cryo-EM | 6,8° | fusidic acid | pre | P/P pe/E | 7°-9° | 2,5 | 18 |
| 4V7D | Grigorieff | PNAS | 2013 | <i>E. coli</i> | Cryo-EM | 7,6° | viomycin | pre | A/P pe/E | | | |
| 4V9H | Ramakrishnan | Science | 2013 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 2,9° | GDP-CP | pre | pe/E | 7° | | 5 |
| 4V5F | Ramakrishnan | Science | 2009 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 3,6° | fusidic acid | post | P/P E/E | | 1,3* | 0* |
| 4V90 | Yong-Gui Gao | Nature struct. | 2013 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 2,95° | GDP-CP | pre | P/E | 7,4° | 7,4 | 9 |
| 4V9L | Noller | Science | 2013 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 3,6° | FA | post | pe*/E | | | |
| 4V9K | Noller | Science | 2013 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 3,5 | GDPNP I | pre | pe*/E | 3 | 2,8 | 15 |
| 4V9J | Noller | Science | 2013 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 4,1 | GDPNP II | pre | pe*/E | 5,0° | 5 | 18 |
| 4WZ9 | Noller | Science | 2014 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 3,8° | fusidic acid & neomycin | pre | P/ap pe/E | | 2,7 | 21 |
| 4V9P | Cate | Science | 2013 | <i>E. coli</i> | crystallo | 3,0° | GMPPCP & viomycin | ? | ? | | 3_4 | 6_10 |
| 3J9Z | Frank, J. | Science adv | 2015 | <i>E. coli</i> | Cryo-EM | 3,6 | Mutation EF-G | post ? | P/P E/E | NR | . | . |
| 3JA1 | Frank, J. | Science adv | 2015 | <i>E. coli</i> | Cryo-EM | 4,2 | Mutation EF-G | pre | pe/E | R | | |
| 4V5M | Spain | nature | 2010 | <i>T. thermus</i> | Cryo-EM | 7,8 | fusidic acid | TI(PRE) | pe/E | 7 | | 5 |
| 4V5N | Spain | nature | 2010 | <i>T. thermus</i> | Cryo-EM | 7,6 | fusidic acid | TI(POST) | P/P pe/E | 4 | | 18 |
| 4WPO | Steitz | Cell | 2015 | <i>T. thermus</i> | crystallo | 2,8 | tRNA non hydrolysable | pre-pre | A/A P/P E/E | NR | . | . |
| 4WQU | Steitz | Cell | 2015 | <i>T. thermus</i> | crystallo | ? | dihyromycin | pre-pre | P/P E/E | NR | | |
| 4WQF | Steitz | Cell | 2015 | <i>T. thermus</i> | crystallo | ? | acid fusidic | pre | P/P E/E | | | |
| 4WQY | Steitz | Cell | 2015 | <i>T. thermus</i> | crystallo | ? | free | pre | P/P | | | |

Annexe Partie I - N°2

Vers la résolution atomique, récentes avancées en Microscopie électronique.

La microscopie électronique à transmission (MET) sur des objets biologiques a parcouru un long chemin depuis le développement du premier microscope électronique et les premières images de bactériophages, par Ruska et ses collaborateurs, dans la première moitié du 20^{ème} siècle.

Le principal problème rencontré par les biologistes en MET est la dégradation de l'échantillon. En effet, le vide poussé de la colonne du microscope est incompatible avec une bonne conservation d'un échantillon hydraté, et l'énergie du faisceau, en rompant les liaisons chimiques, détériore rapidement l'échantillon. Il en résulte que la plupart des études de biologie en MET a été réalisée sur des échantillons biologiques fixés, déshydratés et contrastés. Ces préparations, sources d'artéfacts, limitent la résolution. Préserver l'échantillon dans un état aussi proche que son état natif devenait donc primordial afin d'accéder à une meilleure compréhension de ses fonctions biologiques.

C'est en 1984 que l'équipe de Jacques Dubochet a montré qu'il était possible d'observer des objets hydratés après les avoir congelés dans un film de glace non cristallisé, appelée aussi glace amorphe ou vitreuse. En prenant la précaution de maintenir l'échantillon à la température de l'azote liquide, il devenait possible d'obtenir des images d'MET d'objets biologiques à l'état quasi-natif. Cette technique, maintenant connue sous l'appellation de Cryo-MET, ouvrait une nouvelle ère pour la microscopie électronique en biologie.

Bien auparavant, en 1968, DeRosier et Klug avaient démontré qu'à partir d'images de différentes projections 2D d'un même objet, en MET, il était possible de calculer sa structure 3D. Dès lors, l'utilisation combinée de la Cryo-MET et de la reconstruction 3D sur des cristaux protéiques 2D ou des structures hélicoïdales, montrèrent le potentiel de la technique pour identifier la position d'atomes individualisés (Kühlbrandt, 1994 ; Nogales, 1998).

Si l'existence d'une symétrie facilite la reconstruction 3D, ce n'est pas le cas pour une grande majorité des échantillons, notamment en ce qui nous concerne, le ribosome. Dans ce cas, des

complexes moléculaires purifiés et en solution peuvent être imagés et des reconstructions 3D peuvent être obtenues en utilisant les images des diverses projections des complexes ou particules. Cette méthode, dite « Single Particle Analysis », présente certaines limitations dont l'absence d'orientation connue des objets dans la glace, ceci combiné au faible niveau du rapport signal/bruit notamment dans les hautes fréquences (haute résolution), compliquant l'attribution précise des angles d'Euler à chaque projection. Dans ces conditions, les meilleures résolutions obtenues furent de l'ordre de 10 Å (Gabashvili, 2000). Si le potentiel de cette technique d'atteindre la résolution atomique avait été prédit, même pour des complexes de 100 kDa ; pendant très longtemps, cette prédiction fut considérée comme très optimiste.

C'est à partir de 2013 que les avancées réalisées en Cryo-MET furent si rapides que le terme de « Révolution » fut employé. Quelles sont donc les avancées à l'origine de cette révolution ?

1. Les Caméras à Détection Directe d'électrons.

Etant donné que les dégâts d'irradiations limitent la quantité d'électrons utilisables, les images en Cryo-MET sont intrinsèquement bruitées. Il est donc important d'enregistrer le maximum d'électrons disponibles. La capacité d'un détecteur, ou DQE (Detective Quantum Efficiency), exprime le taux de dégradation du signal dans le processus de détection. Un détecteur idéal enregistrerait tous les électrons sans ajouter de bruit et aurait un DQE de 1. Jusqu'à récemment le film photographique fut le détecteur de choix utilisé pour la haute résolution grâce à ses grands champs d'acquisition et une bonne DQE (0,3). Le fait de ne plus avoir à révéler les films puis de les scanner a favorisé l'utilisation des caméras CCD (Charge Coupled Device) bien qu'ayant une faible DQE (0,1). Cependant, c'est avec la mise sur le marché des caméras à détection directe d'électrons que les avancées spectaculaires ont pu être réalisées. Les trois types de caméra actuellement sur le marché présentent toutes une DQE supérieure au film photographique (de 0.9 dans les basses fréquences à 0.2 à très haute fréquence). Enfin, pour éviter que même à faible dose le détecteur soit saturé par les électrons, leur acquisition est étalée dans le temps sous forme de séquences d'images (films).

2. Le traitement des images.

Deux développements dans le traitement des images, en synergie avec l'arrivée des nouveaux détecteurs ont permis une avancée spectaculaire.

Le premier est directement lié aux propriétés des nouveaux détecteurs. Dès que les premiers électrons du faisceau rencontrent le film de glace, au niveau de l'échantillon des liaisons chimiques se brisent et des charges nouvelles se forment, entraînant des mouvements dans l'échantillon qui conduisent à l'acquisition d'images floues. En 2012, Grigorieff et son équipe ont été les premiers à exploiter les séquences d'images (movie mode) des nouveaux détecteurs pour caractériser ces déplacements induits par le faisceau électronique. Ils démontrèrent que le réalignement entre elles de ces séquences d'images pouvait corriger ces déplacements, et permettre ainsi une amélioration significative du rapport signal sur bruit.

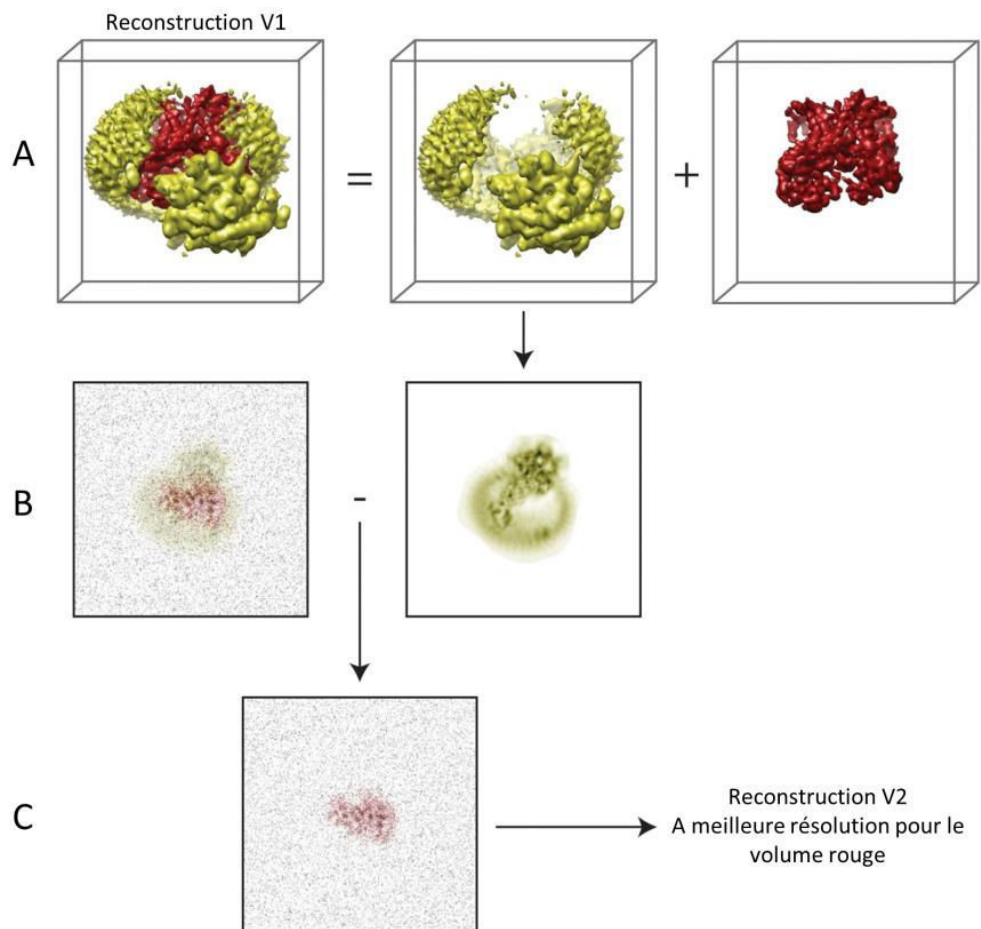
Le deuxième développement est lié à la capacité d'analyser et traiter l'hétérogénéité des échantillons. La plupart des échantillons contiennent différentes structures 3D, résultant à la fois de l'hétérogénéité dans sa composition et dans la conformation des macromolécules présentes. Si ces différentes structures ne sont pas classées en des sous-ensembles structurellement homogènes, leur association en une unique reconstruction 3D résultera au mieux en une reconstruction floue. De plus, le problème de classification se complique par le fait qu'il est souvent difficile de faire la différence entre projections sous différents angles d'un même objet et projections provenant de différentes structures 3D. Une première approche de classification a été fréquemment utilisée. Celle-ci, dite « supervisée », est basée sur une connaissance *a priori* de la variabilité structurale de l'échantillon, connaissance difficilement réalisable, et entraînant inévitablement un biais dans la reconstruction. L'avènement des méthodes de classification 3D non-supervisées vient du développement d'algorithmes statistiques basés sur les procédures du maximum de vraisemblance (maximum-likelihood). Avec l'introduction d'une approche Bayésienne à l'analyse des particules isolées, les paramètres optimums pour réduire le bruit des reconstructions sont déterminés directement à partir des données, sans intervention de l'utilisateur. L'implémentation de cette méthode dans le programme RELION a démontré rapidement la puissance de cet outil dans la classification 3D ainsi que dans les reconstructions à haute résolution.

Ces trois dernières années, les premières améliorations de cartes de reconstruction furent obtenues. Cette synergie entre l'apparition de nouveaux détecteurs et l'amélioration des programmes d'analyse d'image fut inattendue et surprenante. D'une part, les images avec un meilleur signal mènent directement à des cartes à haute résolution. D'autre part, ces images moins bruitées permettent à ces nouveaux algorithmes d'être plus performants. Il en résulte des données plus homogènes, dépourvues du flou lié à la dérive, il devient alors possible de déterminer l'orientation de chaque particule avec précision. Le résultat de cet effet combiné à la résolution finale des reconstructions a certainement été plus prépondérant que ce que nous pouvions espérer. Des résolutions proches de la résolution atomique sont actuellement obtenues pour des complexes de tailles inférieures à 200 kDa, démontrant le potentiel de la Cryo-MET pour l'étude de structure dynamique ou encore d'interactions drogue/cible.

Merci à Daniel Thomas et Sophie Chat.

Annexe Partie I - N°3

Le domaine III d'EF-G a pu être visualisé en utilisant un masque au cours de la reconstruction 3D. Le principe de cette méthode est de soustraire l'information du reste du complexe (ici le ribosome) qui agit ici comme une source supplémentaire de bruit lors de la reconstruction (Figure ci-dessus).



Principe de la soustraction du bruit induit par le reste d'un complexe. *Adapté de X Bai & al, 2015, Elife.* (A) Un modèle 3D d'un complexe d'intérêt dont on voudrait ignorer la partie jaune du complexe et la partie du complexe d'intérêt est en rouge. (B) Une image expérimentale 2D d'une particule entière, auquel on retire le signal qu'on souhaite ignorer. (C) Après soustraction du signal et reconstruction, on obtient une structure mieux résolue pour le domaine d'intérêt.

Annexes de la Partie II

Annexe Partie II - N°1

Les protocoles de purification des ribosomes, de la RNase R et de l'ARNtm de chez *E. coli*.

Annexes du chapitre :

IV.2 - Complexe ribosomique en cours de *trans*-traduction en présence de RNase R

Purification of prokaryotic ribosomes

MATERIALS:

▲ **TIP:** We recommend using ultrapure MiliQ water or RNase-free water and to sterilize it through a 0.22µm filter, to avoid the degradation of the ribosomes and the contamination of the sample.

Buffers:

FP Buffer: *French Press Buffer for prokaryotic 70S ribosomes* ■ **Recommended volume: 25mL**

| | |
|--------------------|-------------------|
| Tris-HCl pH7.5 | → 20mM |
| MgOAc | → 50mM |
| NH ₄ Cl | → 100mM |
| EDTA | → 0.5mM |
| β-Mercaptoethanol | → 6mM |
| H ₂ O | added up to 25 mL |

ribo_A Buffer: *Tight Couples Buffer* ■ **Recommended volume: 1L**

| | |
|--------------------|----------------|
| Tris-HCl pH7.5 | → 10mM |
| MgCl ₂ | → 10mM |
| NH ₄ Cl | → 60mM |
| EDTA | → 0.5mM |
| β-Mercaptoethanol | → 6mM |
| H ₂ O | added up to 1L |

ribo_B Buffer: *Washing Buffer* ■ **Recommended volume: 50mL**

| | |
|--------------------|---------|
| Tris-HCl pH7.5 | → 10mM |
| MgCl ₂ | → 10mM |
| NH ₄ Cl | → 800mM |

▲ **TIP:** This high concentration of salt allows washing the ribosomes

| | |
|-------------------|-------------------------------|
| EDTA | → 0.5mM |
| Sucrose | → 1.1M (certified Rnase free) |
| β-Mercaptoethanol | → 6mM |
| H ₂ O | added up to 50 mL |

ribo_B_dis Buffer: *Dissociating Buffer* ■Recommended volume: 50mL

| | |
|--------------------|---------|
| Tris-HCl pH7.5 | → 10mM |
| MgCl ₂ | → 0.5mM |
| NH ₄ Cl | → 800mM |

▲ **TIP:** This high concentration of salt allows washing the ribosomes

| | |
|-------------------|-------------------------------|
| EDTA | → 0.5mM |
| Sucrose | → 1.1M (certified Rnase free) |
| β-Mercaptoethanol | → 6mM |
| H ₂ O | added up to 50 mL |

STOCK Buffer: *Storing Buffer* ■Recommended volume: 10mL

| | |
|---------------|-------|
| Glycerol | → 10% |
| ribo_A buffer | → 90% |

Sucrose gradients solutions: ■For 6 tubes (rotor SW28)

▲ **TIP:** We recommend heating the solutions at 50°C for a faster dissolution of sucrose in the buffer. We also recommend the use of certified RNase free sucrose to avoid the degradation of the ribosomes.

10% sucrose_Solution 1: ■Recommended volume: 150mL

| | |
|---------------|------------------------------|
| Sucrose | → 15g (certified RNase free) |
| ribo_A buffer | added up to 150mL |

45% sucrose_Solution 2: ■Recommended volume: 150mL

| | |
|---------------|--------------------------------|
| Sucrose | → 67.5g (certified RNase free) |
| ribo_A buffer | added up to 150mL |

Growth Medium:**LB Medium: ■Recommended volume: 2L**

| | |
|------------------|----------------|
| LB Broth | → 40g |
| H ₂ O | added up to 2L |

Equipment:

▲ **TIP:** We recommend following the manufacturer's instructions and safety information for safe and proper operation for each equipment.

- Linear maker gradient system ■**Gradient Master 108 Biocomp**
- Centrifuge for large volumes ■**BECKMAN J2-MC, rotor JA14**
- Ultracentrifuge ■**BECKMAN L-90, rotor TI70 and rotor SW28**

- Centrifuge for falcon tubes ■Eppendorf 5804R
- French pressure cell ■SLM Aminco Thermo, model FA-073
- Incubator ■INFORS AG, model CH-4103

PROCEDURE:

I – Growth of bacteria •TIMING 2 days

1| Pre cultivate *E. coli* streptag (Rpst – Kan) in 100mL of LB medium overnight with Neomycin at a finale concentration of 50µg/mL.

2| Incubate at 37°C under an agitation of 190rpm. ■INFORS AG, model CH-4103

3| Inoculate 2X1L in LB medium supplemented with Neomycin at 0.1g/L by 2X50mL of preculture.

▲TIP: We recommend cultivating the bacteria in large recipients for a better oxygenation.

4| Incubate at 37°C under an agitation of 190rpm. ■INFORS AG, model CH-4103

II – Bacterial cells Retrieval / Elimination of the medium •TIMING 1 hour

5| Once the cultures reach an OD_{600nm} of 0.8, divide the culture in 250mL BECKMAN flacons.

6| Centrifuge at 6,000rpm for 15 minutes at 4°C. ■Rotor JA14, for the BECKMAN J2-MC centrifuge

7| Discard the supernatant and resuspend the pellets in 10 to 20mL of saline at a concentration of 9g/L of NaCl and pool them in 50mL falcon tubes.

8| Centrifuge at 8,000rpm for 20 minutes at 4°C. ■ Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R Rotor JA14 for the BECKMAN J2-MC centrifuge

9| Discard the supernatant.

10| Froze the bacterial pellet at -80°C for ulterior use.

III – Lysis of bacterial cells / Elimination of waste •TIMING 2 hours

11| Thaw the pellet, weigh the sample and resuspend it in FP buffer with a ratio of 1.5mL for 1g of cells.

12| Lyse the cells with the French Pressure Cell Press. ■Pounds per inch: 16,000psi, by the French Pressure Cell SLM Aminco Thermo, model FA-073

13| Centrifuge at 11,000rpm for 1h at 4°C. ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

▲TIP: We recommend storing in ice if not use immediately.

IV – Ribosomes retrieval / Elimination of nonribosomal debris •TIMING 1 day

14| Put carefully the supernatant above the high-salt sucrose cushion: 1 volume of **ribo_B buffer** for 1 volume of supernatant in plastic tubes. ■ **Maximum volume of 16mL**

15| Centrifuge at 30,000rpm for **20h** at 4°C, or 40,000rpm for 10h. ■ **Rotor TI70, for the BECKMAN L-90 ultracentrifuge**

V – Ribosomes separation •TIMING 3 hours

16| After the centrifuge, pellets will appear translucent with a yellow layer. The yellow layer corresponds to the membranes and must be eliminated. The translucent pellet is ribosomes and it's strongly fixed to tube. Discard the supernatant and wash several times with 1mL of **ribo_A buffer**.

▲ **TIP:** Let the tube upright on the ice to let the membranes come off by themselves before washing the pellet.

17| Resuspend the pellet in 1mL of **ribo_A buffer** in ice.

▲ **TIP:** We recommend tipping up the tube in ice to let the buffer onto the pellet and to let the ribosomes resuspend themselves for at least 2 hours. Mix it regularly by reflux to facilitate resuspension.

18| Once the pellet is correctly resuspended, ■ **Measure at OD260nm a hundredth dilution.**

VI – 70S ribosomes isolation by sucrose gradients •TIMING 1 day

19| Prepare the sucrose gradients 10%-45%:

20| The gradient is realized into thin polycarbonate tubes. ■ **By the Gradient Master 108 machine (Biocomp)**

21| Heat up the sample for 5 minutes at 42°C

22| Once the gradients are ready, put the ribosomes sample at an equivalent of 200OD, drop by drop over each sucrose gradient. ■ **Maximum volume of 500µL**

▲ **TIP:** We recommend loading a small volume of ribosome for optimal resolution and a better isolation of the 70S ribosomes.

23| Centrifuge at 23,000rpm, for **18h** at 4°C. ■ **Rotor SW28, for the BECKMAN L-90 ultracentrifuge**

24| Prepare the 1,5mL micro tubes to aliquot the gradients. ■ **About 80 tubes for one gradient**

25| After the centrifugation, aliquot the gradients 0,5mL by 0,5mL on the surface of the tube.

26| Measure the OD_{260nm} and locate the absorbance peak.

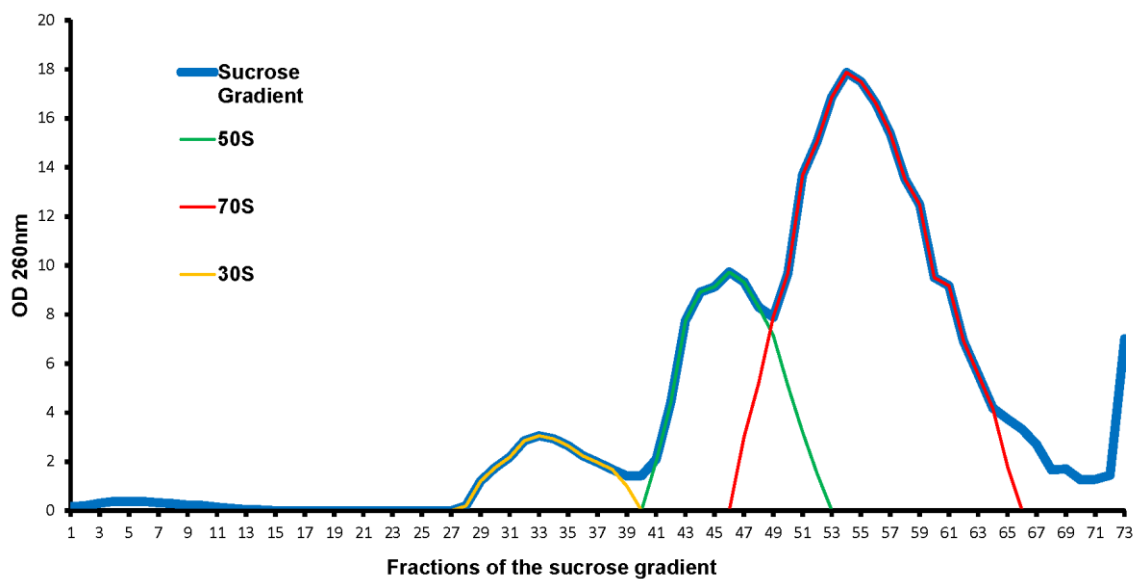


Figure 39: Measure of OD_{260nm} of different fractions of *E. coli* 70S ribosomes purification by a sucrose gradient

■ For example, in this case, the 70S peak is obtained around the fifty-fourth fraction. A weak plateau seems to show around the forty-sixth fraction.

▲ **TIP:** We recommend avoiding taking the fractions too close to the 50S (first fractions) because of the contaminations of the sample. Here, for each tube, we chose to keep the fractions after this plateau, up to the twenty third fraction, before the end of the absorbance peak.

27| Pool the corresponding tubes from the absorbance peak.

VII – Sucrose elimination •TIMING 1 day

28| Dilute into centrifuge tubes to 1 volume of ribosomes sample for 1 volume of ribo_A buffer. ■ **Maximum volume of 16mL**

▲ **TIP:** We recommend gently mix the tubes up before the centrifuge for better sucrose elimination efficiency.

29| Centrifuge at 30,000rpm for 20h at 4°C or 40,000rpm for 10h. ■ **Rotor TI70, for the BECKMAN L-90 ultracentrifuge**

VIII – Storage of the Ribosomes •TIMING 2 hours

30| After the centrifugation, discard the supernatant and wash 2-3 times with 500µL of ribo_A buffer to eliminated a maximum of sucrose.

31| Resuspend one pellet in 100µL of STOCK buffer in ice.

▲ **TIP:** We recommend tipping up the tube in ice to let the buffer onto the pellet and to let the ribosomes resuspend themselves for at least 1 hour. Mix it regularly by reflux to facilitate resuspension.

32| Pools, titrate and aliquots the sample into 20µL and store the sample at -80°C for ulterior use

Purification of *E. coli* RNase R

MATERIALS:

▲ **TIP:** We recommend using ultrapure MiliQ water or RNase free water and to sterilize it through a 0.22µm filter, to avoid the contamination of the sample.

Buffers:

Lyse Buffer pH7.5: ■Recommended volume: 40mL

| | |
|----------------------------------|------------------|
| NaH ₂ PO ₄ | → 50mM |
| NaCl | → 300mM |
| Imidazole | → 10mM |
| H ₂ O | added up to 40mL |

Pro-Buffer pH8: ■Recommended volume: 300mL

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| NaH ₂ PO ₄ | → 50mM |
| NaCl | → 300mM |
| H ₂ O | added up to 300mL |

Washing Buffer: ■Recommended volume: 100mL

| | |
|----------------|-------------------|
| Imidazole | → 20mM |
| NaCl | → 1M |
| Pro-Buffer pH8 | added up to 100mL |

Column Buffer: ■Recommended volume: 100mL

| | |
|----------------|-------------------|
| Imidazole | → 20mM |
| Pro-Buffer pH8 | added up to 100mL |

Elution Buffer: ■Recommended volume: 100mL

| | |
|----------------|-------------------|
| Imidazole | → 250mM |
| Pro-Buffer pH8 | added up to 100mL |

Concentration Buffer pH7: ■Recommended volume: 25mL

| | |
|------------------|-------------------|
| HEPES-KOH | → 10mM |
| KCl | → 500mM |
| EDTA | → 0.5mM |
| Glycerol | → 50% |
| H ₂ O | added up to 250mL |

Growth Medium:

LB Medium: ■Recommended volume: 2x2L

LB Broth → 40g

H₂O added up to 2L

Equipment:

▲TIP: We recommend following the manufacturer's instructions and safety information for safe and proper operation for each equipment.

- Centrifuge for large volume ■**BECKMAN J2-MC, rotor JA14**
- Ultracentrifuge ■**BECKMAN L-90, rotor TI50.2**
- French press ■**SLM Aminco Thermo, model FA-073**
- Centrifuge for falcon tubes ■**Eppendorf 5804R**
- Centrifuge for micro tubes ■**Eppendorf 5804R**
- Incubator ■**INFORS AG, model CH-4103**
- His-trap column ■ **GE life sciences**
- Cations exchange column ■ **GE life sciences**

PROCEDURE:

I – Growth of bacteria ●TIMING 2 days

1| Pre cultivate *E. coli* in 100mL of **LB medium** overnight with Ampicillin.

2| Inoculate 2X1L in LB medium supplemented with Ampicillin by 2X50mL of preculture.

▲TIP: We recommend cultivating the bacteria in large recipients for a better oxygenation.

3| Incubate at 37°C under an agitation of 190rpm ■**INFORS AG, model CH-4103**

4| Once the culture reach an OD600nm of 0.5, add 1mM of IPTG. ■**To induce the production of tmRNA**

5| Incubate at 37°C under an agitation of 190rpm. ■**INFORS AG, model CH-4103**

II – Bacterial cells Retrieval / Elimination of the medium ●TIMING 1 hour

6| After the induction with IPTG for 4 hours, centrifuge at 6,000rpm for 15 minutes at 4°C. ■**Rotor JA14, for the BECKMAN J2-MC centrifuge**

7| Discard the supernatant and pool and resuspend the pellets into 20mL of Saline at a concentration of 9g/L of NaCl in one 50mL falcon tube.

8| Centrifuge at 6,000rpm for 15 minutes at 4°C. ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

9| Discard the supernatant.

10| Store the pellet at -20°C for ulterior use.

III – Lysis of bacterial cells / Elimination of waste •TIMING 2 hours

11| Thaw the pellet, weigh the sample and resuspend it in Lyse buffer with a ratio of 1.5mL for 1g of cells.

12| Lyse the cells with the French Pressure Cell Press. ■Pounds per inch: 16,000psi, by the French Pressure Cell SLM Aminco Thermo, model FA-073

13| Centrifuge at 25,000rpm for 30h at 4°C. ■Rotor TI50.2, for the Ultracentrifuge BECKMAN L-90

14| Keep the supernatant on ice for ulterior use.

IV – RNaseR retrieval •TIMING 1 day

His-trap column

15| Load the sample on the equilibrated His-trap column.

16| Wash the column with the Washing Buffer.

17| Elute the HIST sample ■About 60 tubes

Cations exchange column

18| Equilibrate the cations exchange column with Washing Buffer.

19| Load the sample on the equilibrated cations exchange column

20| Wash the column with five volumes of Washing Buffer.

21| Elute the RNaseR ■Recommended speed of 0.2mL/min and fraction size of 1mL

IV – RNaseR concentration

22| Centrifuge the filtering device ■Amicon Ultra, 15mL of capacity and 50kDa of Millipore with of the Concentration Buffer at 8,000rpm for 15min at 4°C ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

▲TIP: We recommend keeping the filter of drying.

23| Eliminate the supernatant

24| Load the sample with the appropriate fractions depending on the desired concentration.

25| At the end of each centrifugation, eliminate the supernatant.

▲ TIP: We recommend loading a volume of the supernatant on the filtering device at the end of each centrifugation to equilibrate the tubes before loading other fractions.

26| Once all of the fractions are loaded and centrifuged, load of the **Concentration Buffer** and centrifuge at to eliminate the imidazole.

▲ TIP: We recommend centrifuging several times with the **Concentration Buffer** so that the concentration of the imidazole is diluted about 0.001mM of concentration.

***In vivo* purification of *E. coli* tmRNA**

MATERIALS:

▲ **TIP:** We recommend using ultrapure MiliQ water or RNase free water and to sterilize it through a 0.22µm filter, to avoid the degradation of the tmRNA and the contamination of the sample. It is also advisable to sterilize some water, cones, micro pipettes and micro tubes.

Buffers:

TMN Solution: ■Recommended volume: 100mL

| | |
|-------------------|------------------------------|
| NaCl | → 100mM |
| MgCl ₂ | → 50mM |
| Tris-HCl pH9.5 | → 100mM |
| Tween 20 | → 0.05% ■Can't be autoclaved |
| H ₂ O | added up to 100mL |

Sterilized

3M pH5.2 Sodium acetate Solution: ■Recommended volume: 10mL

| | |
|----------------------|------------------|
| Sodium acetate | → 3M |
| H ₂ O | added up to 10mL |
| pH adjustment to 5.2 | |

Sterilized

Elution Buffer: ■Recommended volume: 20mL

| | |
|------------------|------------------|
| Tris-HCl pH7,5 | → 20mM |
| Sodium acetate | → 0.25M |
| EDTA | → 1mM |
| SDS 2% | → 0.25% |
| H ₂ O | added up to 20mL |

Sterilized

5% acrylamide gel: ■Recommended volume: 150mL

| | |
|------------------|--------------------|
| Urea | → 8M |
| TBE | → 1X |
| Acrylamide | → 5% |
| H ₂ O | added up to 150 mL |

▲ **TIP:** We recommend dividing the solution into 3 falcon tubes of 50mL and to incubate the falcon tubes at 37°C for a better dissolution of the urea and to increase the polymerization speed in order to avoid leaks.

| | |
|-------|---------|
| APS | → 0.33% |
| TEMED | → 50 µL |

Formamide Gel-loading Buffer: ■Recommended volume: 10mL

| | |
|---------------------|------------------|
| Deionized formamide | → 95% |
| Bromophenol blue | → 0.025% |
| Xylene cyanol FF | → 0.025% |
| EDTA pH8 | → 5mM |
| H ₂ O | added up to 10mL |

10% polyacrylamide gel: ■Recommended volume: 20mL

| | |
|------------|-------|
| Urea | → 7M |
| TBE | → 1X |
| Acrylamide | → 10% |

▲ **TIP:** We recommend incubating the tube at 37°C for a better dissolution of the urea and to increase the polymerization in order to avoid leaks.

| | |
|-------|---------|
| APS | → 1% |
| TEMED | → 10 µL |

Growth Medium:**LB Medium: ■Recommended volume: 2x2L**

| | |
|------------------|----------------|
| LB Broth | → 40g |
| H ₂ O | added up to 2L |

Equipment:

▲ **TIP:** We recommend following the manufacturer's instructions and safety information for safe and proper operation for each equipment.

- Centrifuge for large volume ■ **BECKMAN J2-MC, rotor JA14**
- French press ■ **SLM Aminco Thermo, model FA-073**
- Centrifuge for falcon tubes ■ **Eppendorf 5804R**

- Centrifuge for micro tubes ■Eppendorf 5804R
- UV shadows ■Thomas Scientific, E-Series Corded Hand-Held UV Lamps
- Incubator ■INFORS AG, model CH-4103

PROCEDURE:

I – Growth of bacteria ●TIMING 2 days

1| Pre cultivate *E. coli* Δ ssrA ■Containing the transformed T7 with the pGEMEX-tmRNA plasmid-E+1 and the pGEMEX-tmRNA-GFP11 helix in 100mL of LB medium overnight with Kan30 ■Cassette of chromosomic resistance integrated in the gene ssrA and with Amp50. ■Resistance of pGEMEX

2| Inoculate 2X1L in LB medium supplemented with Kanamycin and Ampicillin by 2X50mL of preculture.

▲TIP: We recommend cultivating the bacteria in large recipients for a better oxygenation.

3| Incubate at 37°C under an agitation of 190rpm ■INFORS AG, model CH-4103

4| Once the culture reach an OD600nm of 0.5, add 1mM of IPTG. ■To induce the production of tmRNA

5| Incubate at 37°C under an agitation of 190rpm. ■INFORS AG, model CH-4103

II – Bacterial cells Retrieval / Elimination of the medium ●TIMING 30 minutes

6| After the induction with IPTG for 2 hours, centrifuge at 8,000rpm for 10 minutes at 4°C. ■Rotor JA14, for the BECKMAN J2-MC centrifuge

7| Discard the supernatant and resuspend the pellets into 10mL of TMN Solution. and pool them in 50mL falcon tubes.

8| Centrifuge at 8,000rpm for 20 minutes at 4°C. ■ Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

9| Store the pellet at -80°C for ulterior use.

III – Lysis of bacterial cells / DNA, RNA and proteins retrieval ●TIMING 2 hours

10| Thaw the pellet, weigh the sample and resuspend it in TMN solution with a ratio of 1.5mL for 1g of cells.

11| Lyse the cells with the French Pressure Cell Press. ■Pounds per inch: 16,000psi, by the French Pressure Cell SLM Aminco Thermo, model FA-073

12| Add up to 20mL of TMN solution in the Falcon tube.

13| Add 20mL of phenol (especially for RNA use, pH 4.3) and 2mL of SDS 10% ■The phenol allow extracting the proteins and the pH at 4.3 destabilize the DNA

▲TIP: We recommend dividing in two falcon tubes to facilitate the agitation.

14| Shake the tubes up vigorously for 30 minutes.

15| Centrifuge at 12,000rpm for 10 minutes at 20°C ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

16| Gently transfer with a micro pipette the aqueous phase (superior phase) of the two tubes in two new 50mL falcon tubes.

▲TIP: We recommend letting some aqueous phase to be sure not to have some organic phase in your sample and to recentrifuge at 12,000rpm for 10 minutes at 20°C ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R if some organic phase is drawn.

IV – Elimination of the DNA •TIMING 1 hours

17| Add absolute ethanol in each tube: 2.5 volume of absolute ethanol for 1 volume of supernatant.

18| Take the ball of DNA off with a Pasteur pipette bend at the extremity

▲TIP: We recommend bending the Pasteur pipette so that the bend extremity is big enough to move around the bottom of the Falcon tube in order to retrieve a maximum of DNA.

19| After taking off the ball of DNA there is still small filament of DNA in the falcon tubes. Shake the tubes up and let them rest for 15 minutes. Transfer the liquid phase into another tube without drawing the DNA into it.

▲TIP: We recommend letting some liquid to be sure to not transferring the DNA into the new Falcon tube.

20| Centrifuge the rest of the liquid with the DNA at 6,000rpm for 10 seconds at 20°C and pool the supernatant with the previous one. ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

V – RNA retrieval •TIMING 3 hours

21| Add 0.1 volume of sodium acetate 3M for one volume of sample in each tube.

22| Incubate at -80°C for 30 minutes.

23| Centrifuge at 12,000rpm for 10 minutes at 0°C. ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

24| Discard the supernatant.

25| Wash the pellets with 75% ethanol.

26| Let the pellets completely dry off by opening the tubes to eliminate a maximum of ethanol.

▲TIP: We recommend drying the pellets off under a fume hood to speed up the evaporation.

- 27| Pool and resuspend the two pellets in 4mL of **TMN Solution**.
- 28| Add 4mL of phenol (especially for RNA use, pH 4.3) and vortex the sample for 1 minute.
- 29| Centrifuge at 12,000rpm for 10 minutes at 20°C. ■**Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R**
- 30| Transfer the aqueous phase (superior phase) in a smaller falcon tube of 15mL of capacity.
- 31| Add 2.5 volume of absolute ethanol and 0.1 volume of **3M pH5.2 Sodium acetate Solution** for 1 volume of sample.
- 32| Shake by inversion.
- 33| Incubate at -80°C for 30 minutes.
- 34| Centrifuge at 12,000rpm for 10 minutes at 0°C. ■**Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R**
- 35| Discard the supernatant and wash the pellet by 75% ethanol.
- 36| Let the pellets completely dry off by opening the tubes to eliminate a maximum of ethanol.
- ▲ **TIP:** We recommend drying the pellets off under a fume hood to speed up the evaporation.
- 37| Store the pellets at -80°C for ulterior use.
- VI – Elimination of the mRNA • TIMING 30 minutes**
- 38| Resuspend the pellet in 4.5mL of sterile H₂O.
- 39| Add 500µL of **3M pH5.2 Sodium acetate Solution**.
- 40| Aliquot the sample in 5x1mL in 2mL micro tubes.
- 41| Add 500µL of isopropanol in each tube.
- 42| Shake by inversion.
- 43| Centrifuge at 12,000rpm for 5 minutes at 20°C. ■**Rotor for micro tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R**
- 44| Transfer the supernatant into new 2mL micro tubes.
- VI – tmRNA retrieval • TIMING 2 days**
- 45| Add 340µL of isopropanol in each tube.

- 46| Shake by inversion.
- 47| Centrifuge at 12,000rpm for 5 minutes at 20°C. ■Rotor for micro tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R
- 48| Discard the supernatant and wash the pellet by 75% ethanol.
- 49| Let the pellets completely dry off by opening the tubes to eliminate a maximum of ethanol.
▲TIP: We recommend drying the pellets off under a fume hood to speed up the evaporation.
- 50| Premigrate the 5% polyacrylamide gel at 5W, in TBE 1X.
- 51| Resuspend each pellet by 100µL of TMN Solution.
- 52| Pool the samples into 1 tube. ■Finale volume of 500µL
- 53| Add 55µL of DNase buffer 10X and 3µL of DNase I. ■Rnase free; NEB
- 54| Incubate at 37°C for 45 minutes.
- 55| Add 130µL of Formamide Gel-loading Buffer.
- 56| Load the sample in the 5% polyacrylamide gel at 400V, 10W in TBE 1X until the bromophenol blue exit the gel. ■About 3 hours
- 57| Reveal the gel by an UV shadow. ■Thomas Scientific, E-Series Corded Hand-Held UV Lamps
- 58| Cut the stripe corresponding to the tmRNA into small pieces. ■tmRNA ~ 363nt
- 59| Put the pieces into a 15mL falcon tube with 5mL of elution buffer.
- 60| Incubate in -20°C for 1 hour.
- 61| Thaw the sample et incubate overnight at ambient temperature.
- 62| Centrifuge at 11,000rpm for 10 minutes at 20°C. ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R
- 63| Transfer the supernatant in a 15mL falcon tube.
- 64| Centrifuge at 11,000rpm for 10 minutes at 20°C. ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R
- 65| Aliquot the supernatant by 400µL
- 66| Add 1mL of 100% ethanol and 44µL of 3M pH5.2 Sodium acetate Solution.

67| Shake by inversion.

68| Incubate at -80°C for 1 hour.

69| Centrifuge at 11,000rpm for 15m minutes at 0°C. ■Rotor for Falcon tubes, for the centrifuge Eppendorf 5804R

70| Discard the supernatant and let the pellets completely dry off by opening the tubes to eliminate a maximum of ethanol and incubate at 37°C.

▲TIP: We recommend drying the pellets off under a fume hood to speed up the evaporation.

71| Froze the completely dried pellets at -20°C.

▲TIP: We recommend resuspending the pellets in sterile H₂O only at the use.

VII – Verification on a polyacrylamide gel •TIMING 1 hour

72| Premigrate the 10% polyacrylamide gel for 30 minutes at 200V in TBE 1X.

73| Add 5µL of Formamide Gel-loading Buffer.

74| Load the sample in the 10% polyacrylamide gel at V/W in TBE 1X until the blue band exit the gel ■About 1 hour

77| Reveal the 10% polyacrylamide gel with a BET dye (3µL + 50mL of TBE 1X) by an UV table

PICTURES:***I – Lysis of bacterial cells***

Step 10|

**Figure 40:** Before the bacterial lysis

Step 11|

**Figure 41:** After the bacterial lysis***II – DNA, RNA and proteins retrieval***

Step 15|

**Figure 3:** Phenol after centrifugation

Step 16|

**Figure 4:** Pellet and Supernatant

III – Elimination of the DNA

Step 18|



Figure 5: Bend pipette Pasteur

Step18|

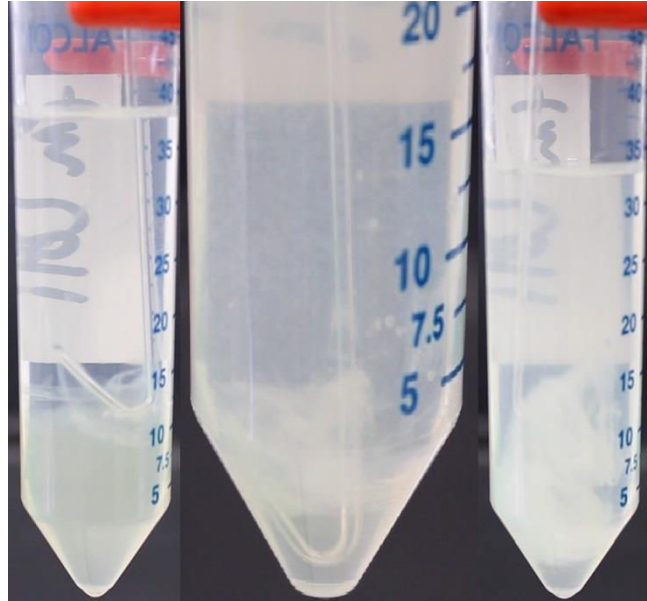


Figure 6: DNA elimination

IV – RNA retrieval

Step 23|



Figure 7: RNA precipitation

VI – tmRNA retrieval

Step 47|



Figure 8: tmRNA precipitation

VI – 5% acrylamide gel assembly

Step 56|



Figure 9: 5% acrylamide gel assembly

VI – 5% acrylamide gel revelation

Step 58

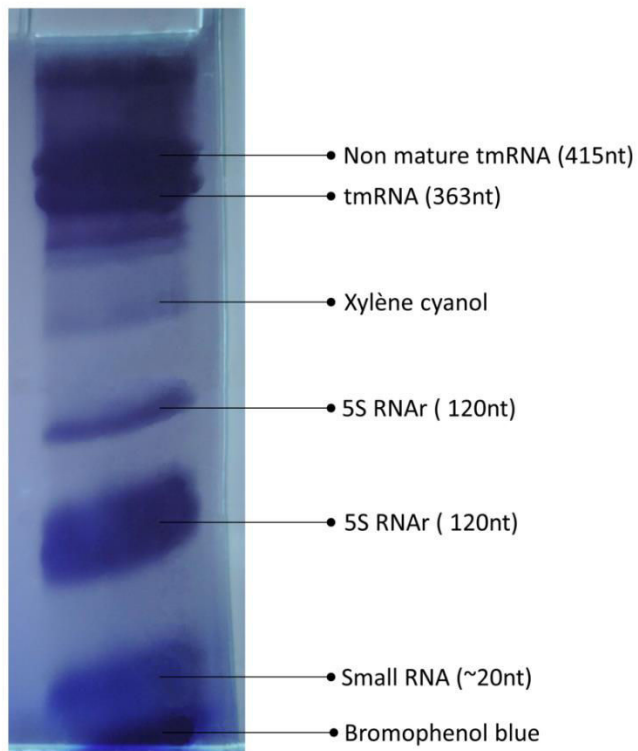


Figure 10: 5% acrylamide gel reveals the gel by an UV shadow

Annexes de la Partie III

Annexe Partie III - N°1

II.1) Séquence du système rapporteur de la *trans*-traduction avec la position des principaux sites de restrictions

AseI at|taat 60
 MseI t|taa 60
 SmaI attt|aaat 46
 BamHI g|gatcc 37
 XhoI c|tcgag 31
 NsiI atgca|t 29
 BfrBI atg|cat 27
 HpaI gtt|aac 19

1 **GTAAAACGACGGCCAGT**taacttatgcatctcgagggatccattaaattg**TTGACA**att
 1 10 20 30 40 50

KpnI ggtac|c 119
 NheI glctagc 109

61 aatcatcggctcg**TATAAT**gtgtggaattgtgagcggataacaattgctagcgtaccg
 61 70 80 90 100 110

NdeI ca|tatg 134

41 G D I H M V S K G E E D N M A I I K E F
 121 **AAGGAGATATACAT**ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGT
 121 130 140 150 160 170

61 M R F K V H M E G S V N G H E F E I E G
 181 TCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCCGAGATCGAGG
 181 190 200 210 220 230

81 E G E G R P Y E G T Q T A K L K V T K G
 241 GCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGG
 241 250 260 270 280 290

101 G P L P F A W D I L S P Q F M Y G S K A
 301 GTGGCCCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGG
 301 310 320 330 340 350

121 Y V K H P A D I P D Y L K L S F P E G F
 361 CCTACGTGAAGCACCCCGCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCT
 361 370 380 390 400 410

141 K W E R V M N F E D G G V V T V T Q D S

421 TCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACT
 421 430 440 450 460 470

PstI ctgcalg 491

161 S L Q D G E F I Y K V K L R G T N F P S
 481 CCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGGGCACCAACTCCCT
 481 490 500 510 520 530

NcoI c|catgg 569

181 D G P V M Q K K T M G W E A S S E R M Y
 541 CCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGT
 541 550 560 570 580 590

201 P E D G A L K G E I K Q R L K L K D G G
 601 ACCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCG
 601 610 620 630 640 650

221 H Y D A E V K T T Y K A K K P V Q L P G
 661 GCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCC
 661 670 680 690 700 710

241 A Y N V N I K L D I T S H N E D Y T I V
 721 GCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATCG
 721 730 740 750 760 770

261 E Q Y E R A E G R H S T G G M D E L Y K
 781 TGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACA
 781 790 800 810 820 830

XbaI t|ctaga 886

ApaI gggcc|c 848

281 G P G K S N N N F A V A A *
 841 AGGGGCCCGCAGCAAACGACGAAAACCTACGCTCTCGCGGCTTAActagatttaagAAGG
 841 850 860 870 880 890

NdeI ca|tatg 910

301 M S K G E E L F T G V V P I L V E
 901 AGATATACATATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGA
 901 910 920 930 940 950

321 L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A
 961 ATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGC
 961 970 980 990 1000 1010

NcoI c|catgg 1077

341 T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W

1021 AACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATG

1021 1030 1040 1050 1060 1070

361 P T L V T T F G Y G V Q C F A R Y P D H

1081 GCCAACACTTGTCACTACTTTTCGGGTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATACCCAGATCA

1081 1090 1100 1110 1120 1130

381 M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T

1141 TATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAC

1141 1150 1160 1170 1180 1190

PmlI cac|gtg 1236

401 I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D

1201 TATATTTTTCAAAGATGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGA

1201 1210 1220 1230 1240 1250

421 T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L

1261 TACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCT

1261 1270 1280 1290 1300 1310

441 G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q

1321 TGGACACAAATTGGAATACAACATACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACA

1321 1330 1340 1350 1360 1370

461 K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q

1381 AAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCA

1381 1390 1400 1410 1420 1430

MfeI c|aattg 1471

481 L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D

1441 ACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGA

1441 1450 1460 1470 1480 1490

501 N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H

1501 CAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCA

1501 1510 1520 1530 1540 1550

521 M V L L E F V T A A G I T H G M D E L Y

1561 CATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATA

1561 1570 1580 1590 1600 1610

BglII a|gatct 1623

541 R S L G P N F R K K T L K S V F F R F G

1621 Cagatc|CTCGGACCAAATTTTCGAAAAAAGACGCTGAAAAGCGTCTTTTTTCGTTTTGG

1621 1630 1640 1650 1660 1670

BfrI c|ttaag 1698

561 P S A K K L K T A G L V H Y L A V M R W

1681 TCCTTCAGCCAAAAAAGCTTAAGACCGCCGGTCTTGTCCACTACCTTGCAGTAATGCGGTG

1681 1690 1700 1710 1720 1730

581 T G S A V F F S L L N Q A S N K T K G S

1741 GACAGGATCGGCGGTTTTCTTTCTCTTCTCAACCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTC

1741 1750 1760 1770 1780 1790

SpeI a|ctagt 1856

Sall g|tcgac 1852

601 V E R L G L S F Y L L F V G E R C R L V

1801 AGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTATCTGTTGTTCGGTGAACGCTGTG gactagt

1801 1810 1820 1830 1840 1850

EcoRI g|aatc 1874

HindIII a|agctt 1868

SstI gagct|c 1866

621 S S S L N S G V V T G K

1861 gagctcaagcttgaattccggaGTCGTGACTGGGAAAAC

1861 1870 1880 1890

Annexe Partie III - N°2

II.2) Tableau répertoriant les positions des sites de restrictions du système rapporteur de la *trans*-traduction.

| Enzyme | Site | Positions |
|----------|-------------|--|
| Aatl | agg cct | 361, 583 |
| AatII | gacgt c | none |
| Acc16I | tgc gca | none |
| AcclI | cg cg | 434, 524, 797 |
| AcclII | t ccgga | 1878 |
| AcII | aa cggt | none |
| AcvI | cac gtg | 1236 |
| Afal | gt ac | 117, 349, 601, 790, 838, 1189 |
| Afel | agc gct | none |
| AfIII | c ttaag | 1698 |
| Agel | a ccggt | none |
| AhII | a ctagt | 1856 |
| Alw441 | g tgcac | 196 |
| Alul | ag ct | 285, 402, 519, 648, 714, 834, 1587, 1864, 1870 |
| Aor51HI | agc gct | none |
| Apal | gggcc c | 848 |
| ApaLI | g tgcac | 196 |
| Ascl | gg cgcgcc | none |
| Asel | at taat | 60 |
| Asp718I | g gtacc | 115 |
| Asull | tt cgaa | 1533, 1643 |
| Aval | c ycgrg | 31, 412, 604 |
| Avill | tgc gca | none |
| AvrII | c ctagg | none |
| Ball | tgg cca | 166, 1082 |
| BamHI | g gatcc | 37 |
| BanIII | at cgat | none |
| Bbel | ggcgc c | 617, 725 |
| BbrPI | cac gtg | 1236 |
| Bbul | gcatg c | none |
| Bcul | a ctagt | 1856 |
| BclI | t gatca | none |
| Bfal | c tag | 110, 887, 1443, 1857 |
| Bfrl | c ttaag | 1698 |
| BfrBI | atg cat | 27 |
| BglII | a gatct | 1623 |
| BlnI | c ctagg | none |
| BseCI | at cgat | none |
| BsePI | g cgcgc | none |
| BseX3I | c ggccg | none |
| BshTI | a ccggt | none |
| Bsp1407I | t gtaca | 836, 1187 |
| Bsp19I | c catgg | 569, 1077 |

| | | |
|---------|-------------|---|
| BspDI | at cgat | none |
| BspEI | t ccgga | 1878 |
| BsrGI | t gtaca | 836, 1187 |
| BssHII | g cgcg | none |
| BstUI | cg cg | 434, 524, 797 |
| Clal | at cgat | none |
| DpnII | gatc | 37, 233, 629, 1136, 1538, 1623, 1746 |
| DraI | ttt aaa | 46, 1301 |
| EagI | c ggccg | none |
| EcoRI | g aattc | 1874 |
| EcoRV | gat atc | none |
| EgeI | ggc gcc | 615, 723 |
| FseI | ggccgg cc | none |
| FspI | tgc gca | none |
| HaeIII | gg cc | 13, 166, 221, 254, 305, 361, 548, 583, 662, 697, 806, 846, 1082, 1483, 1816 |
| HincII | gty rac | 19, 54, 735, 1400, 1854 |
| HindIII | a agctt | 1868 |
| Hinfl | g antc | 478, 1276, 1390, 1882 |
| HpaI | gtt aac | 19, 1400 |
| HpaII | c cgg | 719, 818, 848, 1708, 1879 |
| KasI | g gcgcc | 613, 721 |
| KpnI | ggtac c | 119 |
| MboI | gatc | 37, 233, 629, 1136, 1538, 1623, 1746 |
| MfeI | c aattg | 1471 |
| MluI | a cgcgt | none |
| MscI | tgg cca | 166, 1082 |
| MseI | t taa | 18, 45, 60, 893, 976, 1042, 1270, 1284, 1300, 1399, 1699 |
| MspI | c cgg | 719, 818, 848, 1708, 1879 |
| NaeI | gcc ggc | none |
| NarI | gg cgcc | 614, 722 |
| NcoI | c catgg | 569, 1077 |
| NdeI | ca tatg | 134, 910, 1141 |
| NdeII | gatc | 37, 233, 629, 1136, 1538, 1623, 1746 |
| NgoMIV | g ccggc | none |
| NheI | g ctagc | 109 |
| NlaIII | catg | 165, 186, 204, 348, 573, 828, 1081, 1155, 1175, 1370, 1565, 1605, 1610 |
| NotI | gc ggccgc | none |
| NruI | tcg cga | none |
| NsiI | atgca t | 29 |
| PacI | ttaat taa | none |
| PciI | a catgt | none |
| PhoI | gg cc | 13, 166, 221, 254, 305, 361, 548, 583, 662, 697, 806, 846, 1082, 1483, 1816 |
| PmeI | gtt aaac | none |
| PmlI | cac gtg | 1236 |
| PsiI | tta taa | none |
| PstI | ctgca g | 491 |
| PvuI | cgat cg | none |
| PvuII | cag ctg | 714, 1587 |
| RsaI | gt ac | 117, 349, 601, 790, 838, 1189 |
| SacI | gagct c | 1866 |
| SacII | ccgc gg | none |

| | | |
|--------------|--------------------|--|
| Sall | g tcgac | 1852 |
| Sbfl | cctgca gg | 491 |
| Scal | agt act | none |
| Sfol | ggc gcc | 615, 723 |
| Smal | ccc ggg | none |
| SnaBI | tac gta | none |
| SpeI | a ctagt | 1856 |
| SphI | gcatg c | none |
| Sspl | aat att | none |
| SstI | gagct c | 1866 |
| SstII | ccgc gg | none |
| StuI | agg cct | 361, 583 |
| Swal | attt aaat | 46 |
| TaqI | t cga | 32, 230, 236, 446, 1279, 1533, 1643, 1804, 1853 |
| TliI | c tcgag | 31 |
| VspI | at taat | 60 |
| XbaI | t ctaga | 886 |
| XhoI | c tcgag | 31 |
| XmaI | c ccggg | none |

VU :

VU :

Le Directeur de Thèse

Le Responsable de l'École Doctorale

(Nom et Prénom)

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

David ALIS

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,

(Nom et Prénom)

Résumé

Le travail retranscrit dans cette thèse regroupe l'étude de différents processus biologiques impliqués dans la synthèse protéique bactérienne. Dans un premier chapitre, les origines de la synthèse protéique au temps du monde ARN sont traitées en guise d'introduction. Ce travail théorique se poursuit par la présentation d'une structure à haute résolution du facteur d'élongation G (EF-G) en complexe avec le ribosome par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET). Grâce aux avancées techniques de la cryo-MET, nous avons observé pour la première fois EF-G lié au ribosome en l'absence de tout inhibiteur. Cet état particulier d'EF-G permet de visualiser une flexibilité de son doamaine III. Cette étude permet aussi de rationaliser le fonctionnement de l'antibiotique acide fusidique. Nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de sauvetage de la synthèse protéique et plus particulièrement de la *trans*-traduction. Ce mécanisme fascinant permet le recyclage des ribosomes bloqués sur un ARN messenger défectueux. Cette voie de sauvetage est généralement vitale ou alors indispensable pour la virulence bactérienne. Nous avons réalisé une étude structurale préliminaire de la dégradation de l'ARNm défectueux durant ce processus. Après une revue traitant du sujet, nous présentons une étude de la *trans*-traduction comme cible pour le développement de nouveaux antibiotiques. Pour cela, nous avons mis au point un système rapporteur avec contrôle interne de l'activité *trans*-traductionnelle bactérienne. Après avoir mis au point ce système et validé son utilisation, nous l'avons exploité en testant des molécules ciblant la *trans*-traduction.

Mots clés

Acide fusidique - Antibiotiques - ARNm - Cryo-MET - EF-G - Ribosome - SmpB - Structure - Synthèse protéique – *trans*-traduction - 70S

Abstract

The current PhD work brings together various studies linked to bacterial protein synthesis. The first chapter is about the origins of protein synthesis at the time of the RNA world. This theoretical work continues with the presentation of a high-resolution structure of the elongation factor G (EF-G) in complex with the ribosome by cryo-electron transmission microscopy (cryo-TEM). We describe for the first time EF-G bound to the ribosome in the absence of any inhibitor. This particular structure of EF-G displays a yet unseen positioning of its third domain, which becomes very flexible. This study helps to understand the way the antibiotic fusidic acid blocks translation. The work then switches to a study of *trans*-translation, the main rescuing system of stalled ribosomes in bacteria. *Trans*-translation is generally vital or at least necessary for bacterial virulence. We conducted a preliminary structural study on the way faulty mRNAs are degraded during this process. This is why we present a study of *trans*-translation as a target for the development of new antibiotics. For this we developed and validated a reporter system for *trans*-translation, which is used to screen molecules targeting *trans*-translation.

Key words

Antibiotics - Cryo-EM - EF-G - Fusidic acid - Protein synthesis - Ribosome - SmpB - Structure - tmRNA - *trans*-translation - 70S