

Université de Montréal

**Étude du rôle de la protéine ribosomique S7 dans le
fonctionnement du ribosome bactérien.**

par
Francis Robert

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Biochimie

Septembre, 2003

© Francis Robert, 2003



W

4

U58

2004

V.015

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Étude du rôle de la protéine ribosomique S7 dans le
fonctionnement du ribosome bactérien.**

présentée par:
Francis Robert

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Pascal Chartrand, président-rapporteur
Dr Léa Brakier-Gingras, directeur de recherche
Dr Guy Boileau, membre du jury
Dr Robert A. Zimmermann, examinateur externe
Dr Marc Drolet, représentant du doyen

Résumé

La traduction des ARN messagers (ARNm) cellulaires en protéines est effectuée dans tous les organismes par un énorme complexe ribonucléoprotéique, le ribosome, composé de deux sous-unités de taille inégale. Mes travaux ont eu pour objectif d'étudier le rôle de la protéine ribosomique S7 de la bactérie *Escherichia coli* dans la synthèse protéique. Cette protéine organise le repliement d'un domaine de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S, le domaine 3' majeur, localisé dans la tête de la petite sous-unité (30S), ce qui permet la liaison des autres protéines ribosomiques qui forment la tête. En outre, la protéine S7 agit comme répresseur traductionnel en se liant à son ARNm et en empêchant la traduction de cet ARNm lorsqu'elle est présente en excès par rapport à l'ARNr 16S. La première partie de mon projet de recherche a consisté à caractériser les positions de la protéine S7 impliquées dans son interaction avec l'ARNr 16S. Pour ce faire, le gène de S7 d'*E. coli* a été cloné dans un vecteur d'expression procaryote et plusieurs mutations ont été introduites dans des endroits choisis dans la séquence de la protéine. Les protéines mutantes ont été exprimées et purifiées, et leur liaison à un fragment de l'ARNr 16S contenant le site de liaison de S7 a été étudiée. Les résultats montrent que divers segments de cette protéine, à savoir l'extrémité N-terminale, une portion de l'hélice α C-terminale, le feuillet β et deux boucles qui relient des hélices α sont importants pour l'interaction S7-ARNr 16S. La protéine utilise donc plusieurs déterminants pour interagir avec l'ARNr. Nos résultats ont été confirmés par la structure cristalline de la 30S, qui a été publiée après que cette étude soit achevée, démontrant un accord parfait entre la structure cristalline statique du complexe S7-ARNr 16S de la sous-unité 30S et la structure du complexe entre S7 et son site de liaison, examinée en solution. La structure secondaire du site de liaison de S7 sur l'ARNr 16S, qui est composé de jonctions de plusieurs hélices, diffère de celle de son site de liaison sur son ARNm. Il a en effet été proposé que ce site fait partie d'une hélice irrégulière. La seconde partie de mon projet de recherche a montré cependant que la protéine utilise les mêmes déterminants pour se lier à l'ARNr 16S et à son ARNm, ce qui suggère que S7 reconnaît des portions de structures tridimensionnelles identiques dans ses deux cibles.

La structure cristalline de la sous-unité 30S a révélé que l'extrémité C-terminale de la protéine S7, dans la tête de la 30S, interagit avec une boucle de la protéine S11 sur la plate-forme. L'interaction entre les deux protéines constitue un contact entre deux régions distinctes de la 30S et forme un tunnel par lequel passe l'ARNm. Nous nous sommes intéressés, dans le dernier volet de mon travail de recherche, à étudier l'effet de mutations qui brisent l'interaction entre S7 et S11. Nous avons cloné le gène de la protéine S11 d'*E. coli* dans un vecteur d'expression procaryote et avons utilisé ce plasmide, ainsi que celui exprimant S7, pour muter les résidus de S7 et de S11 impliqués dans l'interaction entre ces protéines. Les mutations n'empêchent pas l'incorporation des protéines dans les sous-unités 30S, mais affectent le fonctionnement du ribosome. Nos résultats indiquent que les sous-unités 30S mutées dans S7 ou S11 lient les ARNm avec une capacité accrue. De plus, les sous-unités 30S qui contiennent S7 mutée, mais non celles contenant S11 mutée, s'associent moins bien avec les 50S que les sous-unités sauvages. Des essais *in vivo* ont aussi montré que les ribosomes mutants font plus d'erreurs de lecture, que ce soit dans la sélection des ARNt, dans la suppression de codons stop ou dans le changement du cadre de lecture. Nos résultats suggèrent que la rupture de l'interaction S7-S11 affecte les changements conformationnels de la 30S qui sont requis pour la liaison des ARNm et pour la sélection des ARNt durant l'élongation. Les mutations dans S7 perturberaient en outre la conformation de la 30S requise pour sa liaison à la sous-unité 50S. L'ensemble des résultats de ce dernier volet démontrent que les protéines ribosomiques interviennent activement dans la dynamique du ribosome durant la synthèse protéique.

Mots-clés: Synthèse protéique, structure-fonctionnement du ribosome procaryote, ARN ribosomique, protéines ribosomiques, interactions ARN-protéines.

Abstract

A large ribonucleoprotein complex, the ribosome, translates messenger RNA (mRNA) into proteins in all organisms. In bacteria, the ribosome consists of two subunits of unequal size. The aim of my research consisted in studying the role of ribosomal protein S7 in protein synthesis. This protein initiates the folding of the 3' major domain of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA (rRNA) in the head of the 30S subunit and enables other proteins to bind to this domain. S7 also prevents the translation of its mRNA, the polycistronic *str* mRNA, when this protein is in excess relative to 16S rRNA. The aim of the first part of my research project was to define which portions of the protein are involved in its binding to 16S rRNA. We cloned the gene of S7 from *E. coli* into an appropriate expression vector and used this plasmid to introduce mutations in specific locations of the protein. Each protein mutant was overexpressed, purified, and its binding to a fragment of the 16S rRNA containing the S7 binding site was assessed. Our results show that different segments of the protein, *i. e.* the N-terminal region, the β -sheet, a portion of helix 6 and loops II and V connecting different helices are important for the S7-16S rRNA interaction, showing that there are several sites of contact between S7 and the 16S rRNA. These sites which were thus identified are in perfect agreement with the information provided by the crystal structure of the 30S subunit that was published after our study was completed. This indicates that the static structure of the S7-16S rRNA complex in the 30S crystal corresponds to that of the complex in solution. The secondary structure of the binding site of S7 on the 16S rRNA that encompasses junctions of different helices differs drastically from that of the binding site of the protein on its mRNA, which was proposed to be part of an irregular hairpin. The second part of my project showed that S7 uses the same determinants to bind to both RNA targets, suggesting the protein recognizes identical elements in the three-dimensional structure of these RNAs.

The structure of the 30S ribosomal subunit revealed that the C-terminal tail of ribosomal protein S7, in the head, interacts with protein S11, on the platform of the subunit. This interaction constitutes a contact between two distinct domains of the 30S

and forms a tunnel through which passes the 30S-bound mRNA. The last part of my research project aimed at investigating the effects of mutations that break the S7-S11 interaction. We first cloned the S11 gene from *E. coli* into a prokaryotic expression vector and used this plasmid, and the plasmid expressing S7, to mutate the residues involved in the interaction between these two proteins. We found that the mutations do not prevent the incorporation of the mutant proteins into the 30S, but affected its function. Our results show that the 30S containing either mutated S7 or S11 have an enhanced capacity to bind mRNA, compared to the WT subunits. Furthermore, the 30S containing the mutated S7, but not those with mutated S11, associate less efficiently with the 50S subunits than the WT subunits. *In vivo* assays show that the mutated ribosomes are altered in translation fidelity, having an increased capacity for codon misreading, readthrough of a nonsense codon and frameshifting. Our results suggest that the mutations in S7 and S11 perturb the conformational changes that occur in the 30S for mRNA binding and for tRNA selection in the elongation step. In addition, the mutations in S7 perturb the 30S conformation required for its association to the 50S. Taken altogether, our results demonstrate that ribosomal proteins actively participate in the control of the dynamics of the ribosome.

Keywords: Translation, structure-function of the prokaryotic ribosome, ribosomal RNA, ribosomal proteins, RNA-protein interactions.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Léa Brakier-Gingras pour faire de la formation des étudiants sa priorité. J'ai particulièrement apprécié sa disponibilité, sa patience et ses qualités d'enseignante grâce auxquelles j'ai pu parfaire bien des aspects de ma personnalité dont l'intégrité et la rigueur scientifique. Je dirais toujours avec fierté que j'étais votre étudiant.

Je voudrais aussi remercier les agents de recherche du laboratoire des ribosomes avec qui j'ai eu la chance de travailler, c'est-à-dire Pierre Melançon, Catherine Payant et Catherine Spickler, qui m'ont montré les rudiments du travail en laboratoire et avec lesquels il a été très plaisant de travailler. Ensuite, je voudrais remercier tous les étudiants que j'ai côtoyés au laboratoire et que je considère maintenant mes amis. J'ai eu autant de plaisir à l'intérieur qu'à l'extérieur du laboratoire en votre compagnie. Parmi ces gens, il y a tout particulièrement, les « ribosomologistes », François et Mélissa, et les gens du frameshift, Marie-Noëlle, Dominic, Martin et Karine. Ensuite, je voudrais remercier tous les stagiaires du laboratoire qui ont été sous ma supervision, Katia, Dimitri, Matthieu, Josée et Benjamin, et tous les autres stagiaires du laboratoire. Il a été très stimulant de travailler en votre compagnie. Aussi, je tiens à souligner l'aide précieuse du Dr Sergey Steinberg et les membres de son laboratoire et dans l'analyse de la structure cristallographique du ribosome et de ses sous-unités.

Je voudrais aussi remercier mes parents, Serge et Danielle, pour m'avoir inculqué les rudiments de l'approche scientifique comme la curiosité, le goût d'apprendre et de communiquer, des atouts essentiels pour un chercheur. Merci, à vous, ainsi qu'à mon frère Patrick, et ma sœur Caroline, pour votre support, votre attention et votre intérêt. De plus, je voudrais dire merci à mes beaux-parents, Yves et Claire, que j'apprécie beaucoup. Merci pour l'intérêt que vous me portez et votre aide dans plusieurs aspects de la vie.

Finalement, on dit que derrière chaque grand homme il y a une femme. Dans mon cas, ceci s'applique particulièrement bien. Non pas parce que je suis un grand

homme, mais parce derrière moi il y a toujours eu une femme que j'admire beaucoup pour me supporter. Merci beaucoup à toi Annie, pour ton soutien, ton aide, ta bonne humeur et ta présence. Tes encouragements ont été pour moi la source de ma persévérance.

*À Annie pour ton
soutien inébranlable.*

Table des matières

Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations.....	xxvii
Chapitre I - Introduction.....	1
1.1 Description générale des constituants du ribosome procaryote et des fonctions qui leur sont associées.....	3
1.2 Structure du ribosome bactérien.....	4
1.2.1 Structure du ribosome à faible résolution.....	5
1.2.1.1 Morphologie du ribosome	5
1.2.1.2 Structure des ARN ribosomiques et leur repliement dans les sous-unités ribosomiques.....	7
1.2.1.2.1 Structure secondaire	7
1.2.1.2.2 Structure tertiaire.....	10
1.2.1.3 Positionnement des protéines dans le ribosome et localisation de leur site de liaison sur l'ARN ribosomique	11
1.2.1.4 Les modèles de la structure du ribosome.....	20
1.2.2 Structure à haute résolution du ribosome et de ses composantes.....	24
1.2.2.1 Étude des composantes isolées du ribosome	24
1.2.2.2 Microscopie cryo-électronique.....	29
1.2.2.3 La cristallographie aux rayons X.....	35
1.2.2.3.1 Structure cristallographique des sous-unités ribosomiques	36
1.2.2.3.1.1 Structure de la sous-unité 30S.....	36
1.2.2.3.1.2 Structure de la sous-unité 50S	44
1.2.2.3.2. Structure du ribosome 70S	49
1.2.2.3.3 Motifs d'interaction à l'ARNr dans les protéines ribosomiques.....	50
1.2.2.3.4 Analyse des données génétiques, biophysiques et biochimiques face à la structure cristallographique du ribosome et de ses sous-unités.	62
1.3 Assemblage du ribosome	65
1.4 Les étapes de la traduction: une relation structure-fonction	71

1.4.1 L'initiation	74
1.4.2 L'élongation.....	81
1.4.2.1 Sélection de l'ARN de transfert.....	82
1.4.2.2 La formation du lien peptidique.....	91
1.4.2.3 La translocation.....	97
1.4.2 La terminaison	103
1.5 L'autorégulation de l'expression des protéines ribosomiques.....	105
1.6 Description du projet de recherche	109
Chapitre II - Mapping of the RNA recognition site of <i>Escherichia coli</i> ribosomal protein S7	112
Chapitre III - Ribosomal protein S7 from <i>Escherichia coli</i> uses the same determinants to bind 16S rRNA and its messenger RNA	140
Chapitre IV - A functional interaction between ribosomal protein S7 and S11 within the bacterial ribosome	158
Chapitre V - Discussion	187
5.1 Identification des déterminants de la protéine ribosomique S7 d' <i>Escherichia coli</i> contrôlant sa liaison à l'ARNr 16S	189
5.2 Les mêmes déterminants de la protéine ribosomique S7 d' <i>Escherichia coli</i> contrôlent la liaison de la protéine à l'ARNr 16S et à son ARN messenger	201
5.3 Rôle de l'interaction entre les protéines ribosomiques S7 et S11 dans le fonctionnement du ribosome bactérien.....	205
5.4 Conclusion et perspectives.....	212
Bibliographie.....	217

Liste des tableaux

Page

Tableau 1-1: Liste des protéines ribosomiques ou des fragments d'ARNr isolés dont la structure à haute résolution a été déterminée par cristallographie aux rayons X ou par RMN.....	25
Tableau 1-2: Liste des ponts entre les deux sous-unités ribosomiques. Les contacts sont indiqués entre parenthèses. M indique un contact impliquant le sillon majeur de l'ARN, m, un contact impliquant le sillon mineur de l'ARN, L, un contact avec une boucle de l'ARNr et B, un contact avec le squelette de l'ARN. Des combinaisons de lettres précisent la nature de l'interaction. Par exemple, L,m indique un contact avec une boucle de l'ARN, du côté du prolongement du sillon mineur de l'hélice précédant cette boucle (adapté de Yusupov <i>et al.</i> , 2001).....	51
Tableau 2-1: Affinity for 16S rRNA of wild-type S7 and deletion mutants.....	133
Tableau 2-2: Affinity for 16S rRNA of various point mutants of S7.....	134
Tableau 3-1: Affinity for wild-type and mutated S7 for its mRNA.....	153
Tableau 3-2: Effect of overexpression of S7 and its mutant derivatives on bacterial growth.....	154

Liste des figures

Page

- Figure 1-1: Structure du ribosome bactérien et de ses sous-unités obtenue par microscopie électronique (adapté de Oakes *et al.*, 1986a). Les différentes portions de ces structures sont dénommées d'après leur morphologie..... 6
- Figure 1-2: Modèles les plus récents de la structure secondaire des ARNr prédite par l'équipe de Gutell (<http://www.rna.icmb.utexas.edu/>). Les lignes rouges indiquent des interactions tertiaires prédites par l'étude des covariations des bases. Les hélices sont numérotées de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (Brimacombe, 1991)..... 9
- A. ARNr 16S. Les quatre domaines de l'ARNr 16S, le domaine 5', le domaine central, le domaine 3' majeur et le domaine 3' mineur sont indiqués.
- B. ARNr 23S. Les chiffres romains correspondent aux différents domaines de l'ARNr.
- C. ARNr 5S. Les hélices sont numérotées de I à V et les boucles sont identifiées par une lettre (A à E).
- Figure 1-3: Positionnement des protéines ribosomiques dans les sous-unités ribosomiques par microscopie électronique combinée à l'immunologie (adapté de Stöffler et Stöffler-Meilicke, 1986)..... 13
- A. Les sous-unités sont présentées avec leur interface vers le lecteur.
- B. C. D. Les sous-unités subissent une rotation successive de 90° vers la gauche.
- Figure 1-4: Localisation par diffraction aux neutrons de protéines ribosomiques dans les sous-unités ribosomiques déterminée. Les sous-unités sont présentées avec l'interface vers le lecteur..... 14
- A. Position des protéines sur la 30S (adapté de Capel *et al.*, 1987).
- B. Position des protéines sur la 50S (adapté de Willumeit *et al.*, 2001).

- Figure 1-5: Positions de l'ARNr 16S protégées contre les attaques d'agents chimiques lors de la liaison des protéines ribosomiques S7 et S11. L'intensité de la protection est directement proportionnelle à la taille des cercles (adapté de Powers et Noller, 1995)..... 17
- A. Bases de l'ARNr protégées par la protéine S7 contre les attaques d'agents chimiques.
- B. Squelette de l'ARNr protégé par S7 contre les attaques de radicaux libres.
- C. Bases de l'ARNr protégées par S11 contre les attaques d'agents chimiques.
- D. Squelette de l'ARNr protégé par S11 contre les attaques de radicaux libres.
- Figure 1-6: Représentation des interactions ARN-protéines entre l'ARNr 16S et les protéines ribosomiques de la 30S. Les interactions ARN-protéines observées sont identifiées par le nombre correspondant à la protéine suivi d'un A, s'il s'agit d'une protection contre l'attaque des radicaux libres, d'un B s'il s'agit de toute autre protection contre les attaques par des agents chimiques et d'un X pour un pontage (adapté de Mueller et Brimacombe, 1997a)..... 19
- Figure 1-7: Fragments minimaux d'ARNr capables de lier des protéines ribosomiques..... 21
- A. Le fragment minimal du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S, dénommé D3M, auquel se lie la protéine S7 (adapté de Dragon *et al.*, 1994).
- B. Le fragment minimal du domaine central de l'ARNr 16S auquel se lie la protéine S8 (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).
- C. Le fragment minimal du domaine V de l'ARNr 23S auquel se lie la protéine L1 (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).

- Figure 1-8: Principaux modèles de la structure de la sous-unité 30S, présentés avant la publication de la structure cristallographique de cette sous-unité..... 23
- A. Modèle du groupe de Brimacombe. L'ARNr 16S a été positionné dans la structure de la 30S déterminée par cryo-microscopie électronique (en bleu pâle). Les régions hélicoïdales de l'ARNr sont en blanc, les régions à simple brin qui connectent les hélices sont en rouge et les boucles coiffant les hélices sont en bleu. Les protéines qui interagissent avec le domaine 3' majeur de l'ARNr 16S sont représentées par des sphères en bleu pâle, celles qui interagissent avec le domaine 5' par des sphères rouges et celles qui interagissent avec le domaine central par des sphères noires (adapté de Mueller et Brimacombe, 1997a et b).
- B. Modèle du groupe de Noller. L'ARNr 16S est en blanc et l'emplacement des protéines ribosomiques est représenté par des nuages de points. Ce modèle a également été utilisé pour montrer la proximité entre trois cystéines (rouge, jaune et verte) de la protéine S5 (en bleu) et différentes régions de l'ARNr 16S (adapté de Heilek et Noller, 1996).
- C. Modèle du groupe de Harvey. Les cylindres représentent les hélices de l'ARNr 16S et les sphères noires, les protéines ribosomiques (adapté de Malhotra et Harvey, 1994).
- D. Modèle du groupe d'Altman. Les cylindres représentent les hélices de l'ARNr 16S et les ovoïdes, les protéines ribosomiques (adapté de Fink *et al.*, 1996).

- Figure 1-9: Structure à haute résolution de diverses protéines ribosomiques..... 27
- A. Structure de protéines de la sous-unité 30S et leur localisation par diffraction aux neutrons (adapté de Ramakrishnan et White, 1998). La

structure de S1 présentée correspond à un seul des sept domaines qu'elle contient (voir section 1.2.2.3.3).

B. Structure de protéines de la sous-unité 50S et leur localisation par microscopie électronique couplée à l'immunologie (adapté de Ramakrishnan et White, 1998).

C. Structure détaillée de la protéine S7 isolée (adapté de Wimberly *et al.*, 1997; Hosaka *et al.*, 1997). C et N désignent respectivement l'extrémité C-terminale et N-terminale de la protéine.

D. Comparaison de la structure cristallographique de S7 avec celle des protéines HU et IHF liant l'ADN (adapté de Wimberly *et al.*, 1997). Les hélices sont indiquées par H, suivi d'un numéro.

Figure 1-10: Modèle de l'interaction entre la protéine S7 et son site de liaison sur l'ARNr 16S (Tanaka *et al.*, 1998). La structure de S7 déterminée par cristallographie aux rayons X (en vert) a été positionnée par rapport au modèle du repliement de l'ARNr 16S (en bleu foncé) du groupe de Brimacombe. Les nucléotides colorés en jaune, noir et blanc sont protégés contre l'attaque des radicaux hydroxyles par la liaison de S7 et ceux en rose et en orange ont été pontés à S7. Le tube en bleu pâle en bas à gauche correspond à l'ARNt au site E et le tube rouge en bas représente l'ARNm..... 28

Figure 1-11: Structure du ribosome 70S d'*E. coli* et de ses sous-unités obtenues par cryo-microscopie électronique..... 32

A. Structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 40 Å obtenue par le groupe de Frank (adapté de Frank *et al.*, 1991). Le ribosome est présenté avec le dos de la 30S vers le lecteur. L1: bras L1, PC: protubérance centrale, PF: plate-forme.

B. Structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 20 Å obtenue par le groupe de Frank. À gauche, une coupe transversale du ribosome vu du haut montre le tunnel par où il a été suggéré que passe l'ARNm (présenté par un trait orange) et l'espace entre les sous-unités où se

positionnent les ARNt aux sites A et P (modélisés en rose et en vert, respectivement). À droite est présentée une coupe longitudinale du côté du site A du ribosome qui montre le tunnel où passerait le peptide en croissance. Le peptide est présenté par un trait jaune ou vert selon qu'il utilise, respectivement, la sortie du tunnel E1 ou E2 pour émerger du ribosome (adapté de Frank *et al.*, 1995). h: tête, CP: protubérance centrale, L1: bras L1, Ch: tunnel, sp: « spur », p: plate-forme.

C. Structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 23 Å obtenue par le groupe de van Heel (adapté de Stark *et al.*, 1995). Le ribosome est présenté avec le site E vers le lecteur.

D. Structure du ribosome 70S complexé à l'ARNt initiateur au site P, à une résolution d'environ 11.5 Å. Cette structure a été obtenue par le groupe de Frank (adapté de Gabashvili *et al.*, 2000). La section en rouge à l'intérieur du ribosome correspond à l'hélice 44 de l'ARNr 16S, alors que celle en vert correspond au fmet-ARNt^{fmet}. La densité correspondant à cet ARNt est montrée dans la section encadrée. Le ribosome est présenté avec le site A vers le lecteur. PC: protubérance centrale, st: tige L7/L12, Sh: épaule.

E. Structure de la sous-unité 50S à une résolution d'environ 7.5 Å obtenue par le groupe de van Heel (Matadeen *et al.*, 1999). La sous-unité est présentée avec l'interface vers le lecteur.

F. Positionnement de composantes ribosomiques dans la structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 11.5 Å (Gabashvili *et al.*, 2000). Les sous-unités sont présentées avec l'interface vers le lecteur et la position de plusieurs protéines ribosomiques y est indiquée. La position du facteur d'élongation EF-G est également indiquée.

Figure 1-12: Localisation des contacts entre les sous-unités 30S et 50S dans la structure du ribosome 70S d'*E. coli* en complexe avec le fmet-ARNt^{fmet} au site P à une résolution d'environ 11.5 Å. Cette structure a été obtenue par cryo-microscopie électronique par le groupe de Frank

(adapté de Frank *et al.*, 2000). Les sous-unités sont présentées avec l'interface vers le lecteur. L'hélice 44 de l'ARNr 16S dans la 30S est colorée en rouge et le fmet-ARNt^{fmet} en vert..... 34

Figure 1-13: Structure de la sous-unité 30S de la bactérie *T. thermophilus* obtenue par cristallographie aux rayons X..... 37

A. Structure obtenue par le groupe de Ramakrishnan à une résolution de 3.0 Å (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). L'ARNr est coloré en gris et les protéines de différentes couleurs. La sous-unité est présentée de deux côtés pour montrer la différence entre le nombre de protéines à l'interface et du côté du solvant.

B. Structure obtenue par le groupe de Yonath à une résolution de 3.3 Å (adapté de Schlünzen *et al.*, 2000). L'ARNr est coloré en orange et les protéines de différentes couleurs.

Figure 1-14: Répartition des domaines de l'ARNr 16S dans la structure de la sous-unité 30S obtenue par cristallographie aux rayons X (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). Le domaine 5' est en rouge, le domaine central est en vert, le domaine 3' majeur en jaune et le domaine 3' mineur en bleu..... 39

Figure 1-15: Différents motifs d'interaction entre les hélices de l'ARNr 16S (voir détails dans le texte)..... 41

A. Motif d'interaction le plus commun, dénommé motif A-mineur. Les adénines en bleu font la majorité des ponts hydrogènes entre deux hélices (rose et jaune) (adapté de Wimberly *et al.* 2000). La figure montre l'interaction entre les hélices 6 et 8 de l'ARNr 16S.

B. Second motif d'interaction en importance qui consiste en l'insertion d'une série de phosphates d'une hélice (jaune) dans le sillon mineur d'une hélice adjacente (rose). Les guanines en bleu sont impliquées dans la formation des ponts hydrogènes avec les oxygènes des groupements phosphates de l'autre hélice (adapté de Wimberly *et al.*

2000). La figure montre l'interaction entre le squelette de l'hélice 7 avec le sillon mineur de l'hélice 21.

C. Motif d'interaction plus rare qui utilise une purine non-appariée (en bleu) d'une hélice (en jaune) pour permettre l'interaction entre deux autres hélices (en rose) (adapté de Wimberly *et al.* 2000). La figure montre l'interaction entre les hélices 1 et 28 qui est contrôlée par une purine non-appariée de l'hélice 27.

D. Motif d'interaction, nommé motif à récepteur GU, qui consiste en l'interaction des sillons mineurs de deux hélices. Dans ce motif, une paire G-U (en bleu) d'une hélice s'empile sur une paire Watson-Crick (en rouge) d'une autre hélice (adapté de Gagnon et Steinberg, 2002).

Figure 1-16: Structure tridimensionnelle de la protéine ribosomique S11 obtenue à partir de la structure cristalline de la sous-unité 30S (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). La protéine contient un feuillet β (en turquoise) à brins parallèles et anti-parallèles sur lequel se superposent deux hélices α (en rouge). C et N désignent respectivement l'extrémité C-terminale et N-terminale de la protéine..... 43

Figure 1-17: Structure de la sous-unité 50S obtenue par cristallographie aux rayons X..... 45

A. Structure de la sous-unité 50S de l'archaebactérie *H. marismortui* déterminée par le groupe de Steitz à une résolution de 2.4 Å (Ban *et al.*, 2000). L'ARNr est coloré en gris et les protéines en orange. La sous-unité est présentée de deux côtés pour montrer la différence entre le nombre de protéines à l'interface et du côté du solvant.

B. Structure de la sous-unité 50S de la bactérie *D. radiodurans* déterminée par le groupe de Yonath à une résolution de 3.0 Å (Harms *et al.*, 2001). L'ARNr est coloré en violet et les protéines sont de différentes couleurs.

Figure 1-18: Localisation des domaines de l'ARNr 23S et de l'ARNr 5S dans la structure de la sous-unité 50S obtenue par cristallographie aux rayons

X (image du haut) (Ban *et al.*, 2000). L'ARNr 5S est coloré en violet et les domaines de l'ARNr 23S sont colorés comme indiqué dans la structure secondaire de l'ARNr 23S (image du bas)..... 47

- Figure 1-19: Structure du ribosome 70S complexé aux ARNt et à l'ARNm à une résolution de 5.5 Å, déterminée par cristallographie aux rayons X par le groupe de Noller (Yusupov *et al.*, 2001, adapté de Ramakrishnan, 2002). Les ARNt aux sites A, P et E sont indiqués en rouge, vert et jaune, respectivement..... 52
- A. Structure du ribosome 70S vue du haut.
- B. Localisation des ponts entre les deux sous-unités du ribosome 70S de *T. thermophilus*. Les composantes de chaque sous-unité participant à la formation des ponts sont colorées en jaune lorsqu'il s'agit de contacts ARN-protéines ou protéines-protéines et en mauve s'il s'agit de contacts ARN-ARN.
- C. Positionnement des ARNt et de l'ARNm par rapport à la 30S. L'ARNm est positionné autour du cou de la 30S et est coloré en beige. Le site de décodage, où s'effectue l'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt au site A, est indiqué.
- D. Positionnement des ARNt et de l'ARNm par rapport à la 50S. L'endroit dans le ribosome où se trouve l'activité peptidyltransférase est indiqué.

- Figure 1-20: Exemple d'interactions entre l'ARNr 16S et des protéines ribosomiques contenant des motifs connus d'interactions avec l'ARN. Les bases de l'ARNr sont numérotées selon la séquence de *E. coli* et les résidus d'acides aminés des protéines sont numérotés selon la séquence de *T. thermophilus* (adapté de Brodersen *et al.*, 2002)..... 58
- A. Structure du complexe entre l'ARNr et les protéines S11 et S6 qui contiennent le motif RNP. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui interviennent dans la liaison sont colorés en

vert et en rouge, respectivement. La protéine S18, avec laquelle S11 et S6 interagissent, est aussi représentée en blanc.

B. Structure du complexe entre l'ARNr et les protéines S9 et S13 qui contiennent le motif ARM. Une grande partie des contacts que font ces protéines avec l'ARNr implique des résidus d'arginine et de lysine dans leur longue extrémité C-terminale. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui participent à l'interaction sont colorés en bleu foncé et en rouge, respectivement. La protéine S7, avec qui S9 interagit, et la protéine S19, qui interagit avec S13, sont aussi représentées en blanc.

C. Structure du complexe entre l'ARNr et les protéines S4 et S14 qui contiennent un motif à doigt de zinc. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui sont importants pour la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement. L'atome de zinc et les résidus avec lesquels il interagit sont colorés en jaune. La protéine S5, avec laquelle S4 interagit, est indiquée en blanc.

D. Structure du complexe entre l'ARNr et la protéine S5 avec l'ARNr 16S dont le domaine N-terminal contient le motif dsRBD (bleu foncé). Le contact principal ARN-S5 est indiqué par des résidus identifiés en rouge. Les acides aminés entourés d'un cercle rouge dans l'une des hélices α de S5 sont impliqués dans l'interaction avec la protéine S4.

Figure 1-21: Exemple d'interactions entre l'ARNr 16S et des protéines ribosomiques qui contiennent des motifs connus de liaison à l'ADN. Les bases de l'ARNr sont numérotées selon la séquence de *E. coli* et les acides aminés des protéines sont numérotés selon la séquence de *T. thermophilus* (adapté de Brodersen *et al.*, 2002)..... 61

A. Structure du complexe entre l'ARNr et la protéine S17, qui contient un motif OB. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui interviennent dans la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement..

B. Structure du complexe entre l'ARNr et la protéine S8 dont le domaine N-terminal se replie comme le domaine d'interaction de la DNase I avec l'ADN. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui interviennent dans la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement.

- Figure 1-22: Carte d'assemblage de la sous-unité 30S déterminée par les études de reconstruction *in vitro*. Les protéines primaires sont en noir, les secondaires en rouge et les tertiaires en vert..... 67
- Figure 1-23: Carte de l'assemblage de la 50S déterminée par les études de reconstruction *in vitro*. Les lignes en pointillé correspondent aux protéines impliquées dans l'assemblage à l'ARNr 5S (adapté de Nierhaus, 1990)..... 69
- Figure 1-24: Enroulement de l'ARNm autour la sous-unité 30S (adapté de Culver *et al.*, 2002)..... 77
- A. Chemin suivi par l'ARNm autour du cou de la sous-unité 30S tel qu'établi par cristallographie aux rayons X du ribosome 70S (Ysusupova *et al.*, 2001). Les codons aux sites A et P de l'ARNm sont colorés en orange et rouge, respectivement. Les portions de l'ARNm et de l'ARNr 16S colorées en rose correspondent à l'interaction Shine-Dalgarno. Les protéines impliquées dans la formation des tunnels par lesquels passe l'ARNm sont aussi indiquées.
- B. Portion agrandie de l'interaction de l'ARNm avec la sous-unité 30S.
- Figure 1-25: Schéma représentant l'étape d'élongation de la synthèse protéique (adapté de Ramakrishnan, 2002)..... 83
- Figure 1-26: Changements de conformation induits par la liaison d'un ARNt correct ou de la paromomycine sur la 30S (adapté de Ogle *et al.*, 2001). La tige-boucle anticodon (ASL) de l'ARNt au site A est en doré, celle au site P, en vert, l'ARNm, en mauve, la protéine S12, en brun, les bases

A1492, A1493 et G530, en rouge, et la paromomycine, en jaune..... 86

A. Structure du centre de décodage en absence d'ARNt. Les bases A1492 et A1493 sont positionnées à l'intérieur de l'hélice 44, alors que le G530 est en conformation *syn*.

B. En présence d'un ARNt correct au site A, les bases A1492 et A1493 se déplacent à l'extérieur de l'hélice 44 et le G530 a maintenant une conformation *anti*.

C. En présence de paromomycine, les bases A1492 et A1493 se déplacent hors de l'hélice 44 alors que la base G530 reste immobile.

D. En présence d'un ARNt correct et de la paromomycine, la structure du site de décodage est similaire à celle présentée en B.

Figure 1-27: Interaction des extrémités 3'-CCA des ARNt dans le centre peptidyltransférase (adapté de Schmeing *et al.*, 2002)..... 95

A. Structure de la sous-unité 50S de *H. marismortui* complexée avec des analogues des extrémité 3' des ARNt aux site A et P sur laquelle ont été modélisés les ARNt à partir de la structure du ribosome 70S (Yusupov *et al.*, 2001). La sous-unité est présentée avec le dessous vers le lecteur et elle a été coupée au milieu pour permettre de visualiser le centre PT et le tunnel par lequel passe le peptide en croissance. L'ARNr 23S est coloré en gris et les protéines en jaune. L'ARNt au site A est en vert, celui au site P est en mauve et celui au site E est en brun.

B. Agrandissement du centre PT de la 50S en complexe avec des analogues des extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P après la catalyse du lien peptidique. L'interaction de l'analogue au site P (mauve) avec des bases de l'ARNr 23S (en bleu) ainsi que celle de l'analogue au site A (vert) avec des bases de l'ARNr 23S (en brun et en rouge) est montrée. Les bases A2485 et A2486 (A2450 et A2451 chez *E. coli*) sont indiquées.

- Figure 1-28: Description du modèle des états hybrides lors de la translocation des ARNt sur le ribosome. Suite à l'acceptation de l'aa-ARNt^{aa} lors de l'étape de sélection, les ARNt se trouvent aux sites A/A et P/P (A et B). La catalyse du lien peptidique transfère la chaîne peptidique en croissance de l'ARNt au site P/P sur l'ARNt au site A/A (C), ce qui déclenche aussitôt le transfert de l'extrémité 3'-CCA de l'ARNt qui porte le peptide du site A vers le site P et celle de l'ARNt désaminoacylé du site P vers le site E. Ce mouvement s'effectue au niveau de la 50S seulement (D). Suite à l'ajout du facteur EF-G•GTP, la translocation des ARNt et de l'ARNm au niveau de la 30S est effectuée (E) (adapté de Schmeing *et al.*, 2002)..... 99
- Figure 1-29: Comparaison des sites de liaison de protéines ribosomiques sur l'ARNr et sur leur ARNm. Les hélices de l'ARNr sont identifiées par H, suivi d'un numéro..... 108
- A. Site de liaison de la protéine L1 sur l'ARNr 23S (à gauche) et sur son ARNm (à droite) (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).
- B. Site de liaison de la protéine S8 sur l'ARNr 16S (à gauche) et sur son ARNm (à droite) (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).
- C. Site de liaison de la protéine S4 sur l'ARNr 16S (à gauche) (adapté de Brodersen *et al.*, 2002) et sur son ARNm (à droite) (adapté de Schlax *et al.*, 2001).
- Figure 2-1: Structure of the 16S rRNA subdomain that binds S7..... 135
- Figure 2-2: Crosslink sites between protein S7 and 16S rRNA within the 30S subunit..... 136
- Figure 2-3: Mutations in *E. coli* protein S7..... 137
- Figure 2-4: Binding curves for the interaction of wild-type S7 and its deletion derivatives with rRNA..... 138
- Figure 2-5: Binding curves for the interaction of S7 point mutants with rRNA..... 139
- Figure 3-1: Secondary structure of mRNA and 16S rRNA fragments that binds S7..... 155

Figure 3-2: Location of the S7 mutations in the S7 structure.....	156
Figure 3-3: Binding curves for the interaction of wild-type S7 and its mutant derivatives with <i>str</i> mRNA.....	157
Figure 4-1: Interaction between ribosomal proteins S7 and S11 in the 30S subunit.....	179
Figure 4-2: Alignment of sequences of ribosomal proteins S7 and S11.....	180
Figure 4-3: Ribosome profile of bacterial cells overexpressing S7, S11 or their mutant derivatives.....	181
Figure 4-4: Incorporation of plasmid-encoded S7, S11 or their mutant derivatives into 30S, 70S or polysomes as determined by Western blot.....	182
Figure 4-5: Association assays with wild-type 30S or 30S containing mutated S7 or S11.....	183
Figure 4-6: Toeprinting analysis of the formation of the 30S initiation complex with 30S subunits containing wild-type or mutated S7 or S11.....	184
Figure 4-7: Filter-binding assays for the interaction between mRNA and 30S containing wild-type or mutated S7 or S11.....	185
Figure 4-8: Effect of disrupting the S7-S11 interaction on translation fidelity.....	186
Figure 5-1: Interaction du domaine 3'majeur de l'ARNr 16S avec la protéine ribosomique S7 (adapté de Powers et Noller, 1995).....	192
A. Positions de l'ARNr 16S protégées des attaques par des agents chimiques lors de la liaison de S7. L'intensité de la protection est proportionnelle à la taille des cercles entourant les nucléotides (adapté de Powers <i>et al.</i> , 1995). Image de droite: bases protégées par la protéine S7 contre les attaques par des agents chimiques. Image de gauche: squelette de l'ARNr protégé par S7 contre les attaques par des radicaux libres.	
B. Nucléotides de l'ARNr 16S qui interagissent avec S7 dans la structure cristalline de la sous-unité 30S. Les cercles bleus indiquent un contact entre le squelette de l'ARNr et S7, les cercles rouges	

indiquent un contact entre une base de l'ARNr et S7 et les cercles verts indiquent un contact impliquant à la fois une base et le squelette de l'ARNr 16S (adapté de Brodersen *et al.*, 2002).

Figure 5-2: Repliement de la partie inférieure du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S observé dans la structure de la sous-unité 30S (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). L'image du haut montre la structure secondaire de cette région de l'ARNr 16S avec les hélices colorées de couleurs différentes. L'image du bas montre la disposition de ces hélices dans la structure cristallographique de la 30S. Les protéines ont été enlevées pour augmenter la visibilité des hélices..... 194

Figure 5-3: Structure du complexe entre la protéine S7 (en vert) et l'ARNr 16S extraite de la structure cristallographique de la sous-unité 30S (adapté de Brodersen *et al.*, 2002). Des bases de l'ARNr et des résidus d'acides aminés de S7 qui interviennent dans la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement. Des boucles de S7 sont identifiées par un ℓ et les hélices par un H. Les lettres N et C correspondent aux extrémités N- et C-terminales de S7, respectivement. Les bases de l'ARNr et les acides aminés de S7 sont numérotés selon leur séquence chez *E. coli*. L'image du bas montre l'orientation de S7 par rapport à la sous-unité 30S..... 197

Liste des abbréviations

A	Adénine
aa-ARNt ^{aa}	ARNt-aminoacylé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARM	« Arginine rich motif »
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ASD	Anti-Shine-Dalgarno
BABE	1-(p-bromoacétamidobenzyle)-EDTA
C	Cytosine
Cryo-ME	Microscopie cryo-électronique
DMS	Sulfate de diméthyle
DNase	Désoxyribonucléase
dsRBD	Motif de liaison à l'ARN à double brin
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique
EF-G	Facteur d'élongation G

EF-Tu	Facteur d'élongation Tu
fmet-ARNt ^{fmet}	ARNt-formylméthionine initiateur
G	Guanine
GMPS	Guanosine mono-phosphorothioate
GTP	Guanosine triphosphate
IF	Facteur d'initiation
IHF	Facteur d'intégration de l'hôte
kDa	Kilodalton
kéthoxal	β -éthoxy- α -cétobutyraldéhyde
KH	« K homology »
ME	Microscopie électronique
PT	Peptidyltransférase
<i>Ram</i>	« ribosomal ambiguity mutations »
RF	Facteur de terminaison
RIC S12-S7	Région intercistronique S12-S7
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RRF	« ribosome recycling factor »
RNAse	Ribonucléase
RNP	Ribonucléoprotéine

RRM	« RNA recognition motif »
S	Svedberg
SD	Shine-Dalgarno
U	Uracile
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Chapitre I

Introduction

Plusieurs études concernant l'évolution des formes de vie suggèrent que la vie moderne est originaire d'un monde où les activités cellulaires étaient contrôlées exclusivement par l'ARN. Les premiers peptides apparus auraient eu pour rôle de faciliter le repliement des ARN agissant comme enzymes (ribozymes) et des enzymes protéiques auraient progressivement remplacé l'ARN dans la majorité des fonctions cellulaires. Deux arguments principaux appuient cette hypothèse: d'une part, les rôles actuels des molécules d'ARN sont considérés comme des reliques d'anciens organismes, et, d'autre part, les molécules d'ARN peuvent catalyser des réactions enzymatiques et transporter de l'information génétique (revues par Di Giulio, 1997; Jeffares *et al.*, 1998). Le ribosome, dont les deux sous-unités sont composées de deux tiers d'ARN et d'un tiers de protéines, constitue un excellent exemple de cette hypothèse de l'évolution à partir d'un monde à ARN. En effet, puisque le ribosome catalyse le déroulement de la synthèse protéique dans le monde vivant actuel, il est nécessairement apparu très tôt durant l'évolution lors de cette transition vers un monde de protéines. De plus, il a été montré que des ribozymes créés à partir d'une méthode de sélection *in vitro* avaient la capacité de catalyser un lien peptidique sans l'aide de protéines (Lohse et Szostak, 1996; Zhang et Cech, 1997; pour une revue concernant l'apparition du ribosome à partir de molécules d'ARN, voir Noller (1993)). Par contre, le ribosome se distingue des théories de l'évolution qui suggèrent que les protéines ont remplacé l'ARN parce que l'ARN ribosomique (ARNr) a conservé le rôle essentiel dans la synthèse protéique alors que les protéines ribosomiques ont principalement pour rôle de stabiliser la conformation de l'ARNr. En effet, le groupe de Steitz a déterminé, à partir de la structure cristallographique de la grande sous-unité ribosomique de l'archaebactérie *Haloarcula marismortui*, que le ribosome est un ribozyme (Nissen *et al.*, 2000) (voir section 1.4.2.2). Cependant, diverses observations suggèrent que la fonction des protéines ribosomiques ne se limiterait pas seulement au repliement de l'ARNr et proposent qu'elles pourraient aussi participer directement au processus de la synthèse protéique. Nous nous intéressons particulièrement à cet aspect. Dans cette Introduction, je décrirai les connaissances actuelles concernant la structure du ribosome procaryote et son rôle dans les étapes de la synthèse protéique. J'examinerai les informations obtenues

par des méthodes génétiques, biochimiques et biophysiques, d'une part, et par la cristallographie aux rayons X et la microscopie cryo-électronique (cryo-ME), d'autre part. Je décrirai aussi la variété d'interactions ARN-protéines rencontrées dans le ribosome. Je terminerai cette Introduction en indiquant brièvement comment s'exerce le contrôle post-transcriptionnel de l'expression des protéines ribosomiques qui est l'un des premiers contrôles de ce type à avoir été mis en évidence. Cette Introduction se concentre sur le ribosome de la bactérie *Escherichia coli*, qui a été le plus étudié. L'emphase sera mise sur les connaissances que nous avons de la petite sous-unité ribosomique et plus particulièrement des protéines ribosomiques S7 et S11 auxquelles je me suis intéressé dans mon travail de recherche.

1.1 Description générale des constituants du ribosome procaryote et des fonctions qui leur sont associées

Le ribosome est une particule ribonucléoprotéique complexe responsable de la synthèse des protéines chez tous les organismes. Il effectue cette tâche en joignant les acides aminés apportés par les ARN de transfert (ARNt), selon les instructions fournies par la séquence des codons des ARN messagers (ARNm). Chez les procaryotes, le ribosome est nommé 70S d'après sa constante de sédimentation. Il a une masse moléculaire de 2.5×10^6 Daltons et est constitué d'ARN à 60% et de protéines à 40%. Le ribosome est formé par l'association de deux sous-unités, la petite (30S) et la grande (50S).

Les dimensions des ARNr et le nombre de protéines contenues dans le ribosome varient selon les organismes. Chez la bactérie *E. coli*, la sous-unité 30S contient un ARNr de 1542 nucléotides (Brosius *et al.*, 1978; Carbon *et al.*, 1979), appelé 16S, et 21 protéines, nommées S1 à S21 (Kaltschmidt et Wittmann, 1970a; b). Il y a plusieurs modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr 16S, incluant dix méthylations de bases et la présence d'une pseudouridine (Cunningham *et al.*, 1990; Bakin *et al.*, 1994; Rozenski *et al.*, 1999). De son côté, la sous-unité 50S, qui est environ deux fois plus grosse que la 30S, contient deux ARNr, le 23S et le 5S, composés respectivement de

2904 et de 120 nucléotides (Brosius *et al.*, 1980; Brownlee *et al.*, 1967), ainsi qu'une trentaine de protéines (L1 à L34) (Kaltschmidt et Wittmann, 1970a; b). Notons ici que la protéine L7 est la forme acétylée de L12 (Terhost *et al.*, 1973) et que la protéine L8 est, en fait, un complexe formé de deux dimères L7/L12 et de la protéine L10 (Pettersson *et al.*, 1976). De plus, la protéine L26 correspond à la protéine S20 de la 30S dont la détection dans la 50S était probablement un artéfact de purification (Sergiev *et al.*, 2001; Brodersen *et al.*, 2002). L'ARNr 23S contient 23 modifications post-transcriptionnelles alors que l'ARNr 5S n'en possède aucune.

Lors de la traduction, trois étapes distinctes se succèdent: l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'étape d'initiation est sous le contrôle de la petite sous-unité. La 30S est responsable de lier l'ARNm, de se positionner correctement au niveau du codon initiateur de la traduction et de sélectionner l'ARNt initiateur, l'ARNt-formylméthionine initiateur (fMet-ARNt^{fMet}). Cela forme le complexe initiateur qui s'associe ensuite avec la 50S, pour former le ribosome 70S. Durant l'élongation, la 30S assure la fidélité de lecture en sélectionnant les ARNt dont les anticodons correspondent aux codons de l'ARNm et le maintien du cadre de lecture lors de la traduction. Le rôle principal de la 50S dans la synthèse protéique est d'effectuer la catalyse du lien peptidique, mais elle peut aussi influencer la fidélité de lecture. La liaison des ARNt aux trois sites de liaison du ribosome, les sites A (aminoacyle), P (peptidyle) et E (site de sortie), ainsi que celle des facteurs responsables de la catalyse des étapes d'élongation et de terminaison, implique la participation concertée des deux sous-unités ribosomiques.

1.2 Structure du ribosome bactérien

À cause des dimensions et de la complexité du ribosome, la résolution de sa structure a été un défi de taille pour la communauté scientifique. Différentes techniques génétiques, biochimiques et biophysiques se sont succédées durant les 30 dernières années, permettant graduellement l'amélioration des connaissances de la structure du ribosome et de celle de ses sous-unités. La recherche dans ce domaine a récemment atteint un point culminant lorsque la structure des sous-unités ribosomiques et du

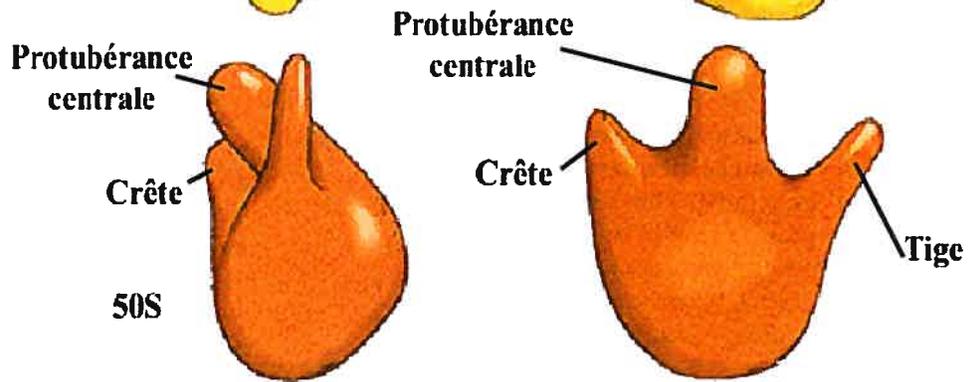
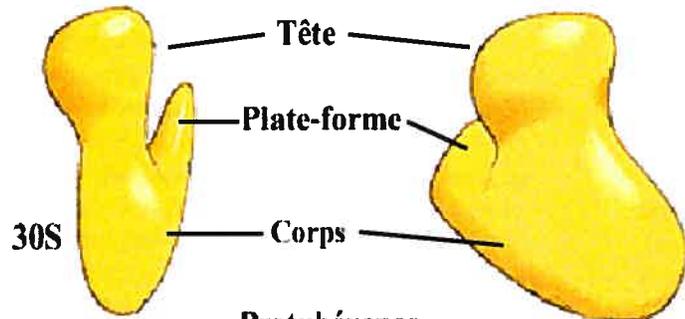
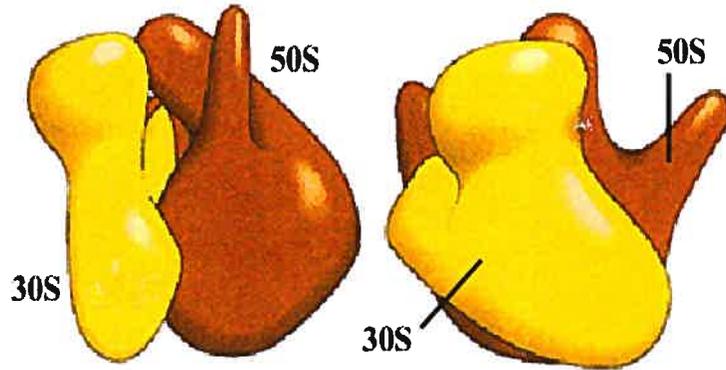
ribosome ont été déterminées à haute résolution par cristallographie aux rayons X (Ban *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000; Schlünzen *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Yusupov *et al.*, 2001).

1.2.1 Structure du ribosome à faible résolution

1.2.1.1 Morphologie du ribosome

La microscopie électronique (ME) a permis d'obtenir une première visualisation de la structure du ribosome 70S procaryote. La résolution initiale des images des particules ribosomiques produites grâce à cette technique était de l'ordre de 500 Å (Figure 1-1) (Lake, 1976; Vasiliev *et al.*, 1983; Oakes *et al.*, 1986a; Stöffler et Stöffler-Meilicke, 1986). L'utilisation subséquente de l'ordinateur pour analyser ces images a permis d'accroître leur résolution jusqu'à 300 Å (Veschoor *et al.*, 1986; Radermacher *et al.*, 1987; Frank *et al.*, 1988). Dans ces images, la petite sous-unité apparaît assez mince et on distingue trois domaines distincts: la tête, le corps et la plate-forme. La tête est liée au corps via un cou étroit. De son côté, la sous-unité 50S est beaucoup plus trapue que la 30S. Elle a la forme d'un hémisphère surmonté de trois protubérances: la crête, la protubérance centrale et la tige. La crête et la tige ont été nommées, respectivement, bras L1 et tige L7/L12, faisant allusion aux protéines qu'elles contiennent. Les résultats obtenus par la ME se sont progressivement améliorés avec l'arrivée de la cryo-ME qui consiste à examiner des images de particules ribosomiques emprisonnées dans de la glace amorphe à très basse température. Cette technique, combinée aux méthodes de reconstruction de particules uniques à partir de multiples structures et à l'utilisation d'ordinateurs très puissants a permis l'obtention d'images très détaillées. Ainsi, les images générées par la cryo-ME nous permettent désormais d'observer les ribosomes dans divers états conformationnels à une résolution d'environ 10 Å (revues par van Heel, 2000; Frank, 2001, 2002). Les détails de ces structures seront présentés à la section 1.2.2.2.

Figure 1-1: Structure du ribosome bactérien et de ses sous-unités obtenue par microscopie électronique (adapté de Oakes *et al.*, 1986a). Les différentes portions de ces structures sont dénommées d'après leur morphologie.



1.2.1.2 Structure des ARN ribosomiques et leur repliement dans les sous-unités ribosomiques

1.2.1.2.1 Structure secondaire

Tandis que des chercheurs tentaient de visualiser la structure du ribosome 70S dans son ensemble, d'autres méthodes ont été utilisées pour étudier la structure des composantes isolées du ribosome, et le repliement de l'ARNr indépendamment de la présence des protéines. Une des premières méthodes employées dans ce but a consisté à analyser les covariations des bases de l'ARNr afin de pouvoir déterminer son repliement secondaire, et si possible, tertiaire. Cette technique était basée sur la prédiction que tous les ARNr ont sensiblement la même structure secondaire et tertiaire dans les ribosomes de différents organismes, étant donné le caractère universel de la traduction, et sur l'observation que différentes séquences d'ARN peuvent adopter une structure identique (revue par Gutell *et al.*, 2002). La publication des premières séquences des ARNr 16S, 23S et 5S a permis l'élaboration des premiers modèles du repliement secondaire de l'ARNr (par exemple, Woese *et al.*, 1980; Noller *et al.*, 1981; Zwieb *et al.*, 1981). Dû aux limitations des connaissances de la structure de l'ARN, seules les covariations qui impliquaient des paires de bases A•U, G•C et G•U avaient été utilisées pour construire ces modèles. L'augmentation subséquente du nombre de séquences des ARNr, l'amélioration des algorithmes évaluant les covariations ainsi que l'accumulation de données expérimentales sur la structure de l'ARNr ont permis la publication de modèles de plus en plus détaillés. Les données expérimentales sur le repliement de l'ARNr ont été obtenues par des méthodes très diversifiées: des attaques par des agents chimiques ou enzymatiques (Noller et Woese, 1981; Ehresmann *et al.*, 1987; Stern *et al.*, 1988), la mutagenèse dirigée (revues par Triman, 1995, 1996) ou les pontages ARN-ARN (revues par Brimacombe *et al.*, 1990; Brimacombe, 1995; Sergiev *et al.*, 2001; Whirl-Carrillo *et al.*, 2002). Les attaques chimiques utilisent des agents comme le diméthylsulfate ou le kéthoxal, qui modifient spécifiquement les atomes des bases de l'ARN qui participent

aux appariements Watson-Crick. Les bases ne sont attaquées que si elles ne sont pas impliquées dans ce type d'appariement. Les attaques enzymatiques utilisent des enzymes comme les RNases T1 ou U2 qui clivent l'ARN à simple brin, ou la RNase V1 qui coupe l'ARN à double brin. La position de l'ARN modifié ou clivé peut être identifiée aisément, par exemple, par extension d'une amorce radioactive qui est arrêtée au niveau de la modification ou de la cassure de l'ARN. La mutagenèse dirigée, quant à elle, a été utilisée pour démontrer la présence d'appariements dans l'ARNr, en maintenant les appariements avec des mutations compensatoires dans les deux brins de l'hélice présumée. Enfin, les pontages ont été effectués en exposant les ribosomes ou l'ARN isolé aux rayons ultraviolets ou à des réactifs pontants de longueurs variables comme le *bis*-(2-chloroethyl)-méthylamine (moutarde à l'azote) ou le méthyl-4-mercaptobutyrimidate. La détection des bases pontées se faisait soit par l'extension d'une amorce, soit par la technique de « fingerprinting », c'est-à-dire par l'examen du patron de digestion de l'ARN étudié (Brimacombe, 1990; Mitchell *et al.*, 1992).

Les plus récents modèles de structures secondaires des ARNr incluent maintenant les covariations spéciales comme des paires U•U qui peuvent être remplacées par des C•C ou des G•G, ou des paires A•A qui peuvent être substituées par des G•G (Cannone *et al.*, 2002; Leontis *et al.*, 2002). Les derniers modèles du groupe de Gutell déterminés à partir d'environ 7000 séquences de l'ARNr 16S et de plus de 1000 séquences des ARNr 23S et 5S sont présentés à la Figure 1-2. Dans ces modèles, l'ARNr 16S se replie en quatre domaines distincts: le domaine 5' ou domaine I (positions 1-556), le domaine central ou domaine II (positions 557-919), le domaine 3' majeur ou domaine III (positions 920-1396) et le domaine 3' mineur (positions 1397-1542). L'ARNr 23S se divise en six domaines: le domaine I (positions 1-570), le domaine II (positions 571-1266), le domaine III (positions 1267-1647), le domaine IV (positions 1648-2041), le domaine V (positions 2042-2628) et le domaine VI (positions 2629-2904). Finalement, l'ARNr 5S se replie en cinq segments hélicoïdaux (I à V), avec cinq boucles (A à E).

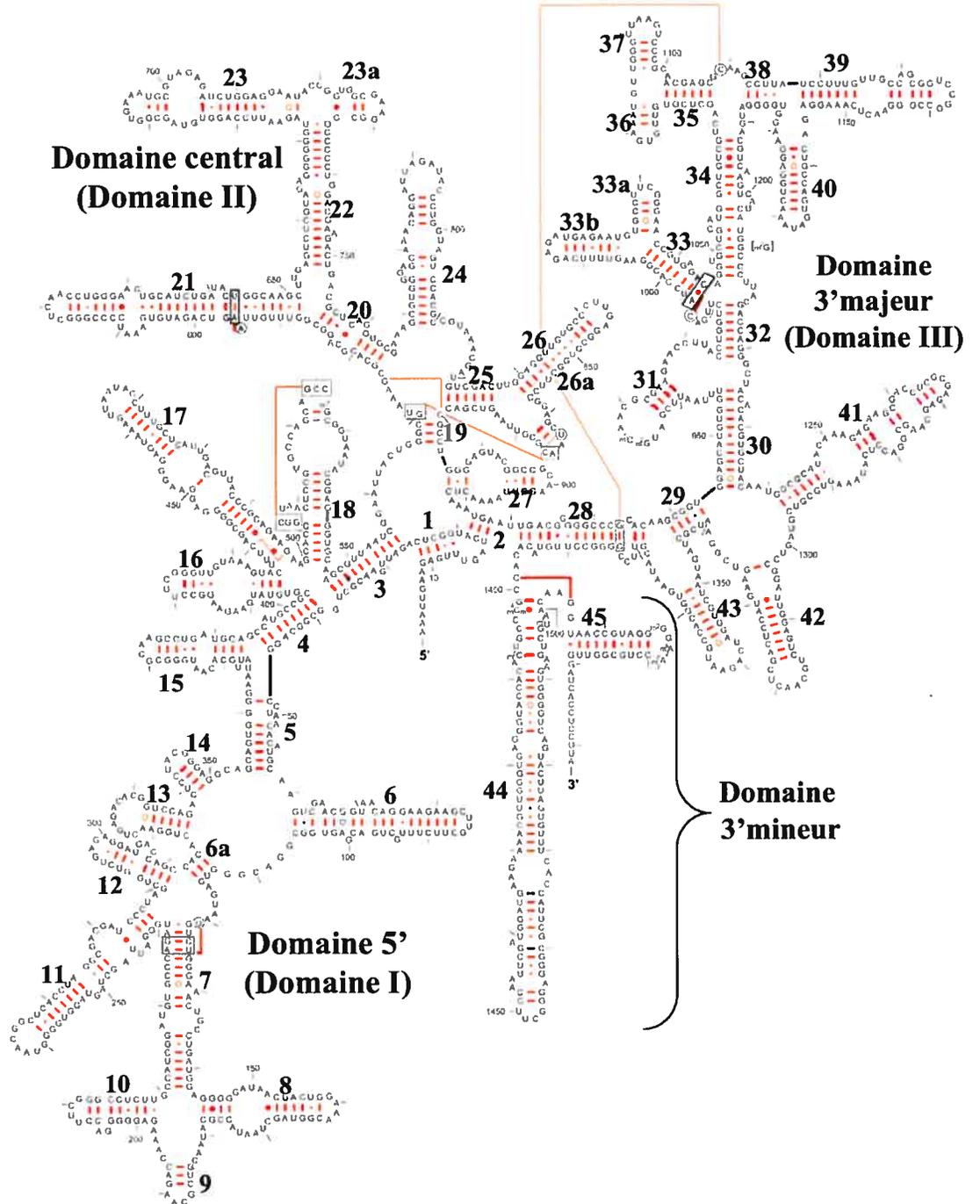
Figure 1-2: Modèles les plus récents de la structure secondaire des ARNr prédite par l'équipe de Gutell (<http://www.rna.icmb.utexas.edu/>). Les lignes rouges indiquent des interactions tertiaires prédites par l'étude des covariations des bases. Les hélices sont numérotées de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (Brimacombe, 1991).

A. ARNr 16S. Les quatre domaines de l'ARNr 16S, le domaine 5', le domaine central, le domaine 3'majeur et le domaine 3' mineur sont indiqués.

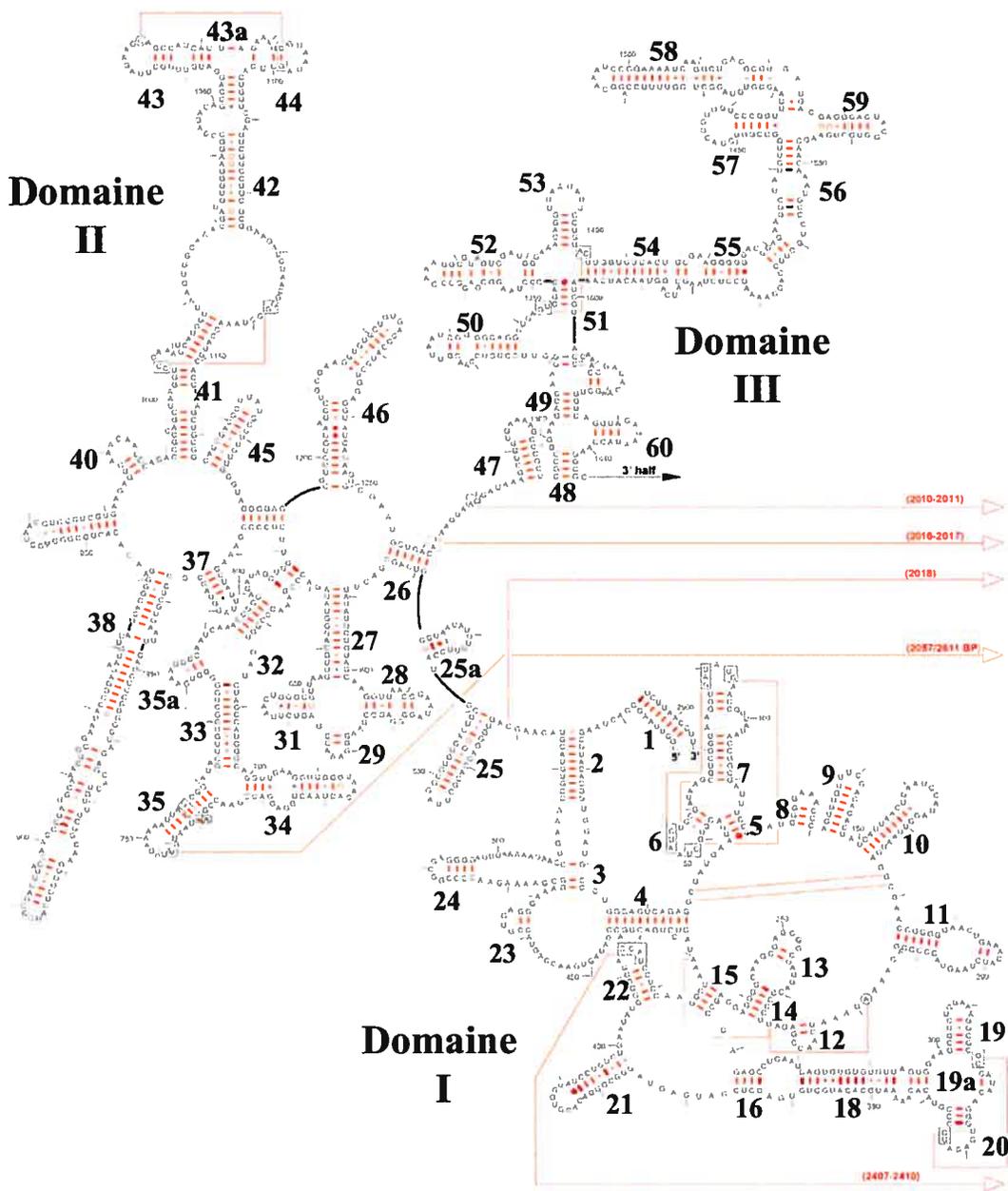
B. ARNr 23S. Les chiffres romains correspondent aux différents domaines de l'ARNr.

C. ARNr 5S. Les hélices sont numérotées de I à V et les boucles sont identifiées par une lettre (A à E).

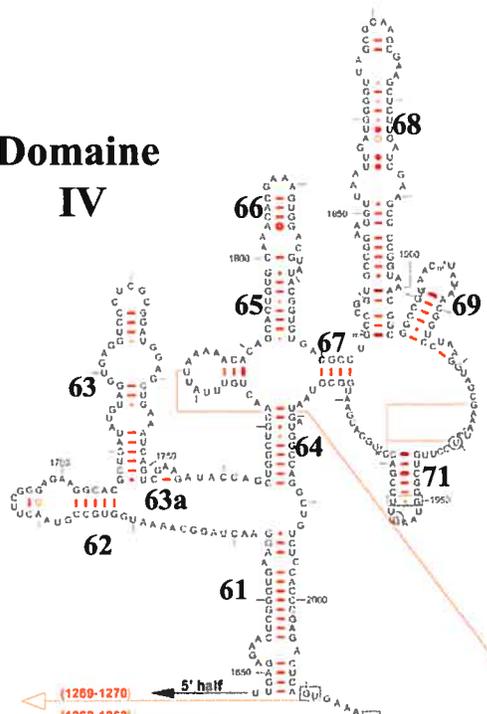
A



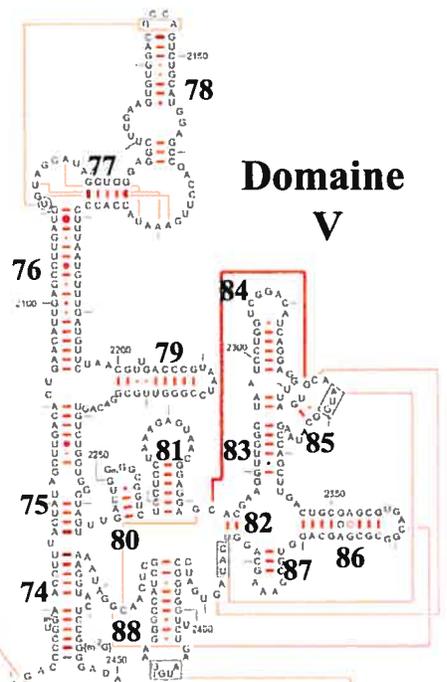
B



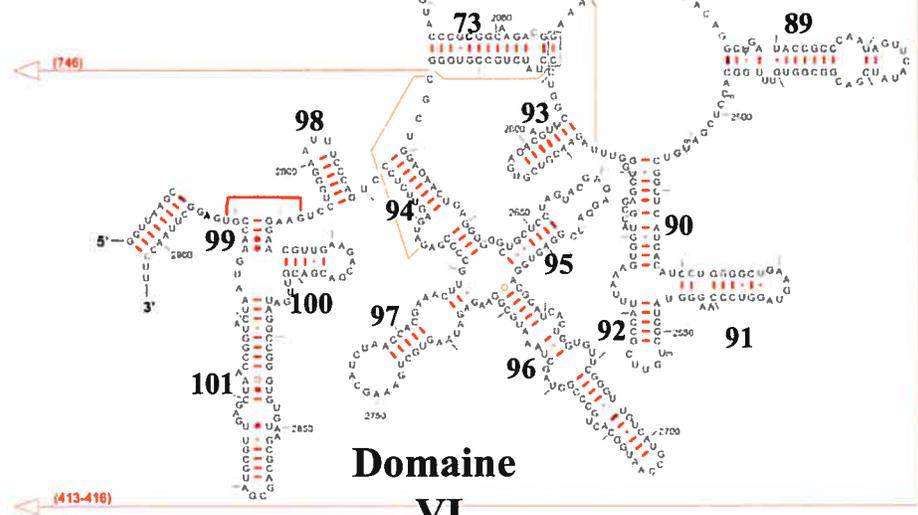
Domaine IV



Domaine V

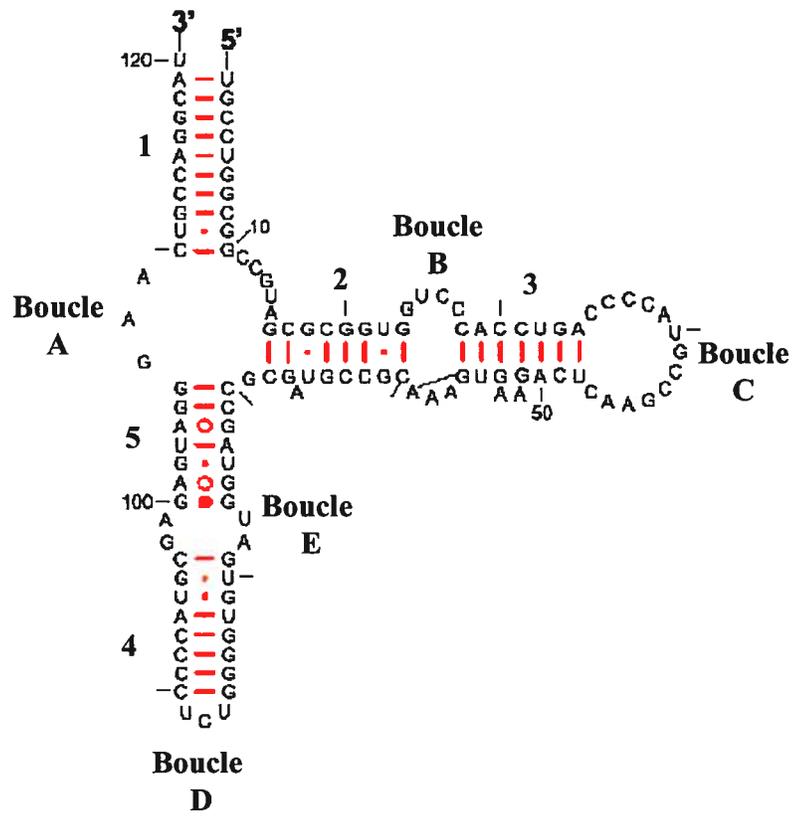


Domaine VI



(413-416)

C



1.2.1.2.2 Structure tertiaire

Aussitôt que les premiers modèles de structures secondaires des ARNr ont été publiés, les chercheurs se sont intéressés à caractériser leur repliement tertiaire. Les algorithmes utilisés pour prédire les modèles de structure secondaire avaient permis de prédire certaines interactions tertiaires, comme la formation de pseudo-nœuds, c'est-à-dire une structure d'ARN où une boucle coiffant une hélice s'apparie avec une autre région de l'ARN (Gutell et Woese; 1990; Gutell, 1996; Masquida *et al.*, 1997). Certains d'entre eux ont été confirmés par des expériences de mutagenèse dirigée, comme dans le cas des pseudo-nœuds 17-20/915-918 (Brink *et al.*, 1993), 505-507/524-526 (Powers et Noller, 1991) et 570-571/865-866 (Vila *et al.*, 1994) dans l'ARNr 16S et des pseudo-nœuds 1523-1524/1611-1612 (Kooi *et al.*, 1993) et 1262/2017 (Aagard et Douthwaite, 1994) dans l'ARNr 23S. Les techniques classiques de pontages dans les ARNr ont aussi été utilisées pour établir les relations de voisinage entre différentes régions, dans le but d'obtenir des contraintes pour la construction de modèles du repliement de ces ARNr dans le ribosome 70S. Une variation des techniques classiques de pontage a aussi été développée. Cette nouvelle technique permet de sonder le voisinage tridimensionnel de bases choisies. Elle requiert l'incorporation par transcription *in vitro* de bases modifiées portant des groupements pontants dans la séquence de l'ARN. Parmi ces agents pontants, citons la 4-thiouridine, qui a été utilisée pour sonder l'ARNr 5S (Dontsova *et al.*, 1994; Sergiev *et al.*, 1998) et le bromure de p-azidophénoacyle couplé avec la guanosine mono-phosphorothioate (GMPS), qui a été utilisé pour sonder le repliement de l'hélice 34 du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S, en utilisant le principe des permutations circulaires pour placer cet agent à des positions sélectionnées (Montpetit *et al.*, 1998). Une autre méthode employée pour étudier les relations de voisinage dans l'ARNr est l'utilisation d'agents, libres en solution ou attachés à des bases de l'ARNr, qui déclenchent la production de radicaux libres lorsqu'ils sont activés. Ces derniers induisent alors le clivage des riboses du squelette de l'ARNr localisé à proximité et la détection de ces coupures est effectuée par extension d'amorce. Un des agents les plus utilisés est le Fe(II)-EDTA, libre ou attaché à un GMPS via un « linker » approprié, le 1-(p-bromoacétamidobenzyle)-EDTA (BABE) (revue par Noller *et al.*, 2000). Le GMPS

est placé à différentes positions de l'ARN, en utilisant, en fait, un ARNr fragmenté. Cet agent a été utilisé pour sonder l'environnement de plusieurs régions de l'ARNr 16S (Newcomb et Noller, 1999a et b) ou pour étudier les régions des ARNr 16S et 23S qui deviennent protégées lors de l'association des sous-unités (Merryman *et al.*, 1999a et b). Un autre agent utilisé est le Cu(II)-iodoacétamido-1,10-orthophénanthroline libre ou lié à une uracile modifiée (4-thiouracile), ou encore, lié à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide contenant un thiophosphate, et conçu pour s'hybrider à une section non pairée de l'ARN. La phénanthroline s'intercale entre les bases voisines de l'ARN à proximité et l'addition d'une molécule réductrice déclenche la production de radicaux libres qui clivent le squelette, dans le voisinage (revue par Muth et Hill, 2001). L'ensemble de toutes les données expérimentales obtenues grâce aux pontages et aux clivages publiées depuis 30 ans représente une liste impressionnante de données. Deux équipes ont construit indépendamment une base de données à partir de ces résultats riches en informations: le groupe de Brimacombe (http://www.molgen.mpg.de/~ag_ribo/ag_brimacombe/drc/) et le groupe de Altman (<http://riboweb.stanford.edu/riboweb/login-frozen.html>). Enfin, une autre technique indépendante d'étude du repliement de l'ARNr dans le ribosome a impliqué l'hybridation à l'ARNr de sondes couplées à la biotine. Ces sondes s'hybrident à des régions non-pairées de l'ARNr et leurs sites d'hybridation sont détectés par ME suite à l'ajout d'avidine (Oakes *et al.*, 1986b; Oakes *et al.*, 1990a; 1990b).

1.2.1.3 Positionnement des protéines dans le ribosome et localisation de leur site de liaison sur l'ARN ribosomique

Les protéines ribosomiques sont relativement petites. Si l'on exclut la protéine S1 dont la taille est d'environ 61 kDa, leur taille varie entre 4 et 24 kDa et la plupart d'entre elles possèdent moins de 200 acides aminés. De plus, les protéines ribosomiques sont majoritairement basiques comme la plupart des protéines interagissant avec l'ARN ou l'ADN (revue par Liljas, 1991). Une des premières techniques utilisées pour

positionner les protéines dans les sous-unités ribosomiques a combiné l'immunologie à la ME. La grande majorité des protéines ribosomiques possèdent des épitopes à la surface des sous-unités ribosomiques. Il est donc possible de former des dimères de sous-unités en présence d'un anticorps spécifique à une protéine donnée et de visualiser la jonction de ces dimères par ME qui révèle la position de la protéine correspondante à l'anticorps utilisé. Vers la fin des années 1980, la plupart des protéines ribosomiques avaient été localisées sur la sous-unité 30S (Stöffler et Stöffler-Meilicke, 1987; 1990; Scheinman *et al.*, 1992; Schwedler *et al.*, 1993) (Figure 1-3A) et sur la sous-unité 50S (Walleczek *et al.*, 1988) (Figure 1-3B). Une technique indépendante utilisée pour localiser les protéines a consisté à étudier les patrons de diffraction aux neutrons de sous-unités ribosomiques. Cette technique utilisait des sous-unités reconstituées *in vitro*, c'est-à-dire réassemblées à partir d'ARNr 16S et de protéines ribosomiques où deux des protéines étaient soit deutérées dans un contexte de sous-unités protonées soit protonées dans un contexte de sous-unités deutérées. Il a été possible d'établir ainsi une carte des positions des centres de masse de toutes les protéines ribosomiques de la 30S (Figure 1-4A) (Capel *et al.*, 1987; Capel et Ramakrishnan, 1988). Nous avons mentionné plus haut que nous nous intéressons particulièrement aux protéines S7 et S11 de la 30S. Les techniques de microscopie immuno-électronique et de diffraction des neutrons ont positionné S7 à la base de la tête, proche de la plate-forme de la 30S et S11 dans la partie supérieure de la plate-forme, à proximité de S7. La carte des positions des protéines de la 50S a été beaucoup plus longue à obtenir par ce procédé et elle est encore incomplète à cause du nombre élevé de protéines que contient la 50S (Figure 1-4B) (May *et al.*, 1992; Svergun *et al.*, 1996; Svergun *et al.*, 2000; Willumeit *et al.*, 2001).

D'autres groupes ont cherché à identifier l'entourage des protéines en utilisant une technique de transfert d'énergie singulet-singulet en fluorescence. Cette technique consiste à incorporer par reconstitution *in vitro* dans les sous-unités ribosomiques une protéine contenant un fluorophore donneur et une autre contenant un fluorophore accepteur. La distance entre les deux protéines est ensuite estimée selon l'intensité du transfert de lumière d'un fluorophore à l'autre (Huang et Cantor, 1975, Huang *et al.*, 1975). Toutefois, l'introduction de ces fluorophores peut perturber la reconstitution des

Figure 1-3: Positionnement des protéines ribosomiques dans les sous-unités ribosomiques par microscopie électronique combinée à l'immunologie (adapté de Stöffler et Stöffler-Meilicke, 1986).

A. Les sous-unités sont présentées avec leur interface vers le lecteur.

B. C. D. Les sous-unités subissent une rotation successive de 90° vers la gauche.

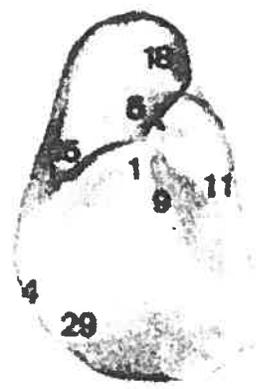
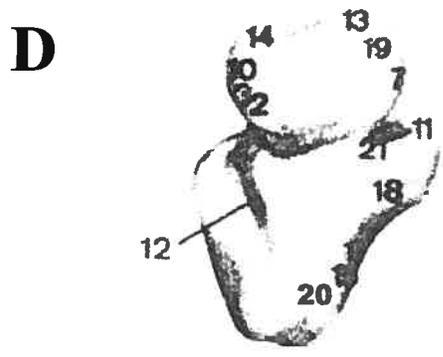
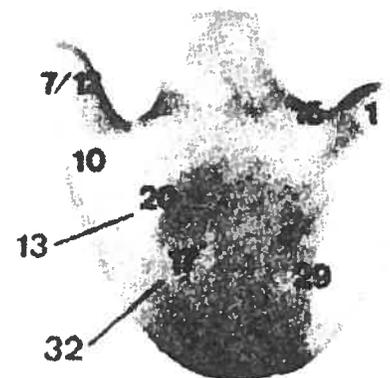
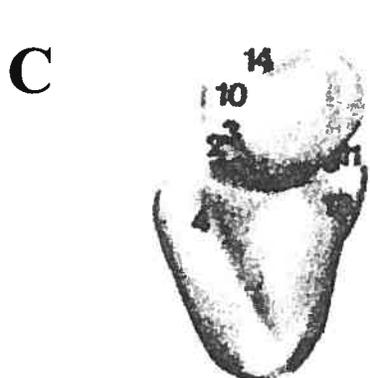
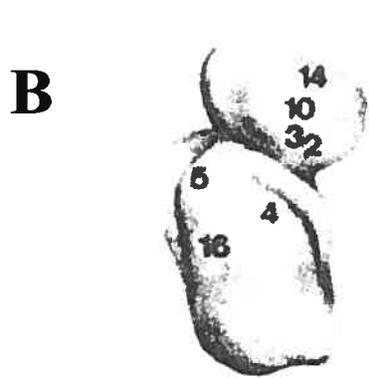
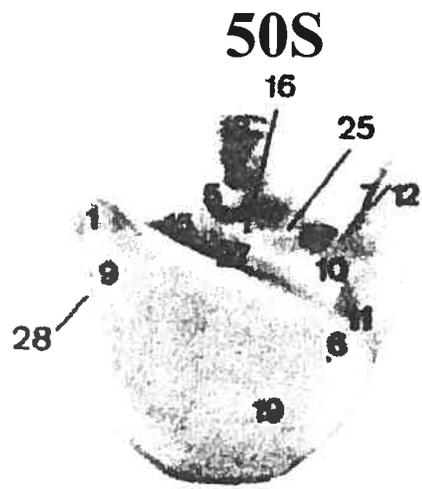
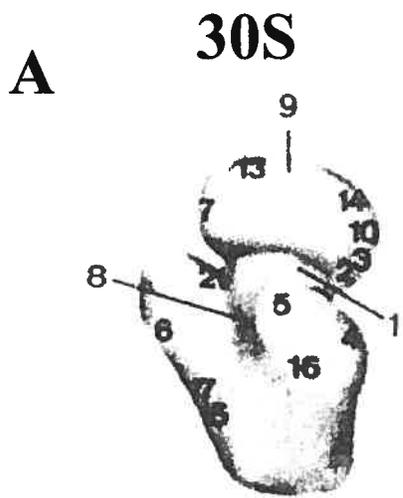
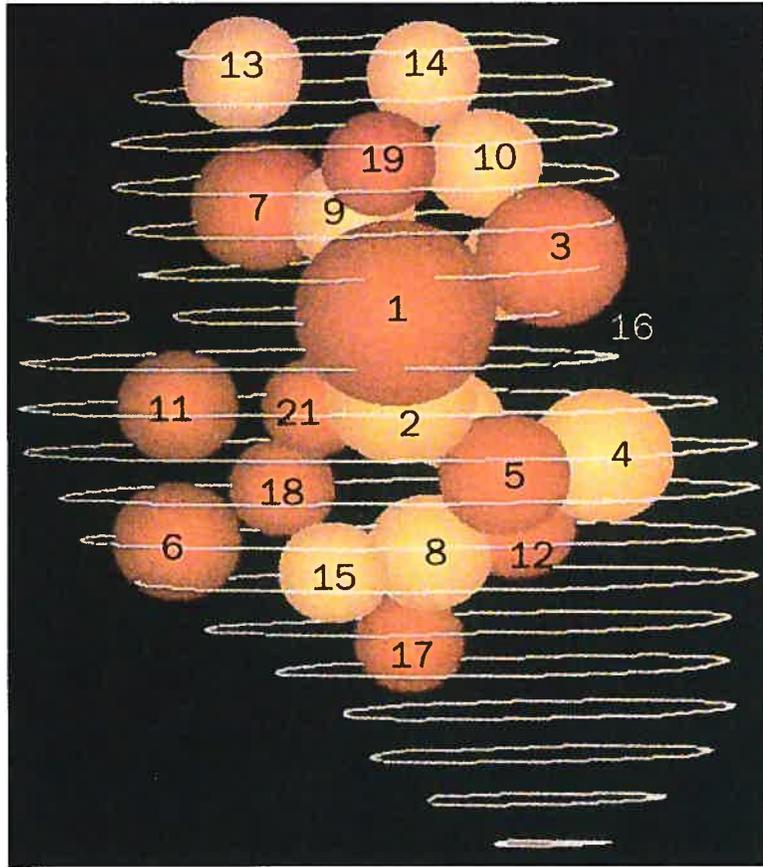


Figure 1-4: Localisation par diffraction aux neutrons de protéines ribosomiques dans les sous-unités ribosomiques déterminée. Les sous-unités sont présentées avec l'interface vers le lecteur.

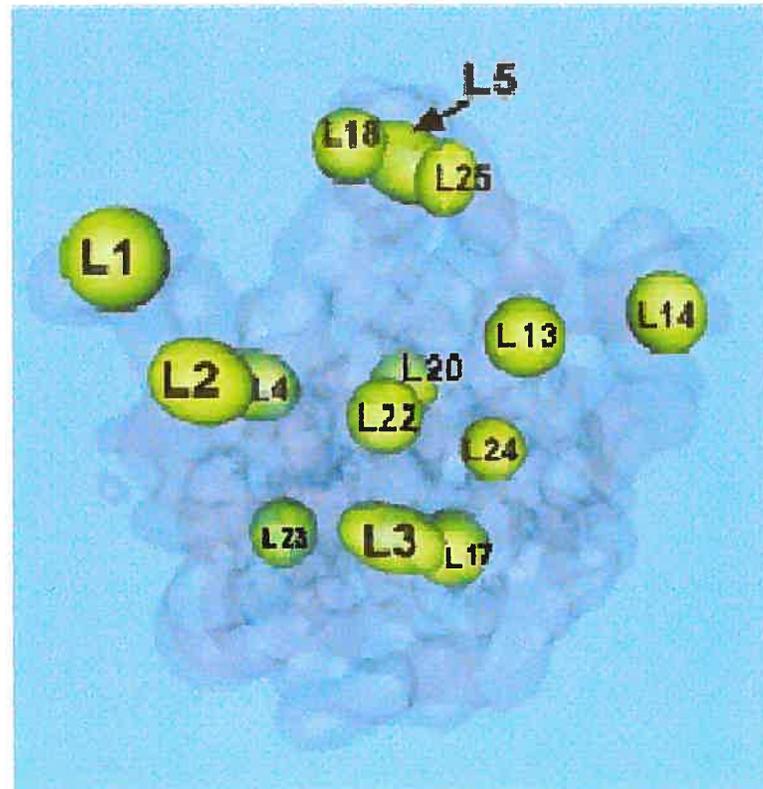
A. Position des protéines sur la 30S (adapté de Capel *et al.*, 1987).

B. Position des protéines sur la 50S (adapté de Willumeit *et al.*, 2001).

A



B



sous-unités ribosomiques, ce qui limite cette méthode. Les relations de voisinage entre les protéines ont aussi été étudiées par pontage aléatoire avec des agents pontants se liant à des résidus de lysines (Traut *et al.*, 1980; Whirl-Carrillo *et al.*, 2002 et les références citées) ou par pontage dirigé, en utilisant dans ce cas un agent pontant fixé à une cystéine sélectionnée, dans une protéine ribosomique (Traut *et al.*, 1995). Les protéines pontées sont identifiées d'après leur position de migration lors d'une électrophorèse à deux dimensions ou à l'aide d'anticorps. Certains pontages doivent cependant être considérés avec prudence, car ils peuvent résulter d'erreurs dans l'identification des protéines ribosomiques (voir section 1.2.2.3.4). Aussi, certains pontages peuvent correspondre à des conformations inactives des sous-unités ou du ribosome 70S. De plus, certaines relations de voisinage peuvent ne pas être détectées parce que les pontages requièrent un positionnement adéquat des résidus d'acides aminés réagissant avec l'agent pontant. Ces études de pontage ont montré par exemple que la protéine S7 pouvait être pontée à plusieurs protéines ribosomiques dont S9, S12 et S13 de la petite sous-unité (Sommer et Traut, 1976; Lambert *et al.*, 1983), et L7/L12 de la grande sous-unité (Traut *et al.*, 1995). S11 a aussi été pontée à plusieurs protéines dont S8, S13, S18 et S21 de la 30S (Sommer et Traut, 1976; Lambert *et al.*, 1983) et à L1 et L2 de la grande sous-unité (Lambert *et al.*, 1981).

Diverses méthodes ont été utilisées pour positionner les protéines par rapport à l'ARNr comme des pontages ARN-protéines et l'étude des protections de l'ARN par les protéines contre les attaques de l'ARN par des agents chimiques, enzymatiques ou des radicaux libres. Cette dernière méthode est nommée la méthode des empreintes. De plus, des études de mutagenèse ont permis de définir les fragments minimaux de l'ARNr pouvant lier des protéines. Comme ce fut le cas pour les pontages ARN-ARN, les pontages ARN-protéines ont été effectués par traitement des ribosomes 70S ou des sous-unités ribosomiques avec des rayons ultraviolets ou des agents pontants. Dans ce cas, les agents pontants utilisés sont asymétriques, c'est-à-dire qu'ils peuvent réagir avec l'ARNr à une extrémité et avec une protéine à l'autre extrémité. La détection des sites de pontages sur l'ARNr a été effectuée par des méthodes classiques d'extension d'amorce ou de « fingerprinting », tandis que la protéine pontée était identifiée avec un

anticorps ou, plus récemment, par spectroscopie de masse (revues par Brimacombe *et al.*, 1991; Sergiev *et al.*, 2001; Whirl-Carrillo *et al.*, 2002). Les expériences de pontage à l'ARNr 16S impliquant la protéine S7 ont montré qu'elle peut être pontée au résidu 1265 et à une région non-identifiée de l'ARNr via des résidus dans le voisinage de la glycine 54 (Ehresmann *et al.*, 1976 ; Ehresmann *et al.*, 1980), à la région 1238-1240 de l'ARNr via la méthionine 114, à la région 1377-1378 via la lysine 75 (Urlaub *et al.*, 1995; Urlaub *et al.*, 1997) et à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S (région 1531-1542) via une région non-identifiée de la protéine (Greuer *et al.*, 1987). La protéine S11 a été pontée aux régions 693-697 (Greuer *et al.*, 1987) et 702-705 de l'ARNr 16S (Osswald *et al.*, 1987). Les études de localisation des protéines ribosomiques par empreintes ont consisté à comparer les patrons d'attaques de l'ARNr en présence et en absence des protéines. Pour la sous-unité 30S, ces travaux ont été principalement effectués par le groupe de Noller qui a analysé les régions de l'ARNr protégées contre les attaques d'agents chimiques de toutes les protéines de la petite sous-unité ribosomique (Powers et Noller, 1995). Pour la sous-unité 50S, ces études ont été faites principalement par le groupe de Garrett, qui a étudié l'interaction entre L1, L2 et L23 et l'ARNr 23S (Egebjerg *et al.*, 1991). Les régions de l'ARNr protégées par S7 contre les attaques chimiques sont présentées à la Figure 1-5A et sont en accord avec les données de pontage indiquées plus haut. Ces protections se trouvent dans la partie inférieure du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S et s'étendent sur près de 200 nucléotides. S7 protège des bases dans les boucles, appelées A et B, ainsi que dans les hélices 29, 41, 42 et 43 (Figure 1-5A). En ce qui concerne S11, elle protège des bases des hélices 23, 24, 25 et 27 localisées dans le domaine central de l'ARNr 16S (Figure 1-5C). Les protections du squelette sucre-phosphate de l'ARNr contre les clivages par des radicaux hydroxyles ont également été examinées pour S7 et S11 et leur localisation concorde avec les autres types de protection. Les Figures 1-5B et 1-5D présentent, respectivement, les patrons de protection de l'ARNr 16S par S7 et S11 contre l'attaque de radicaux libres. Une variation de la technique de clivage par des radicaux libres, conçue par le groupe de Noller, consiste à attacher un atome de Fe(II) via la molécule de liaison BABE à une cystéine d'une protéine ribosomique, à assembler une sous-unité ribosomique en

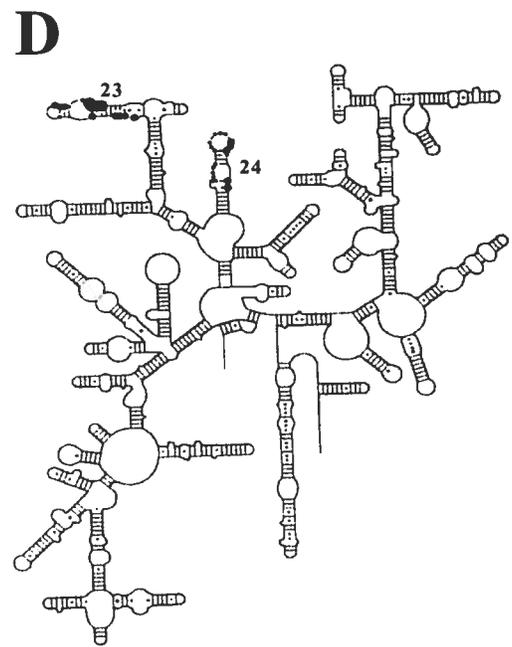
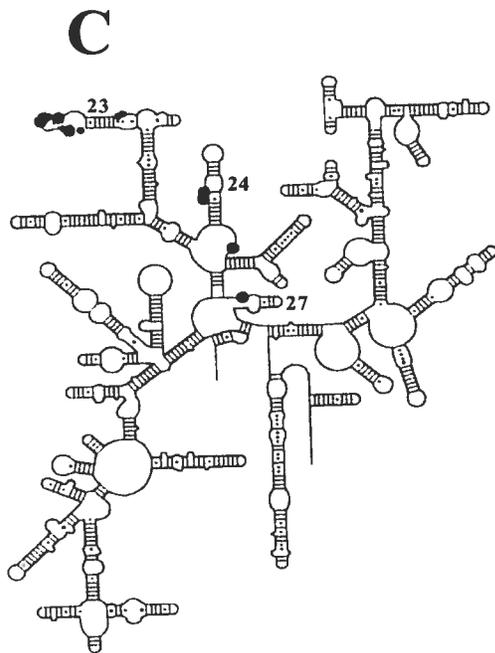
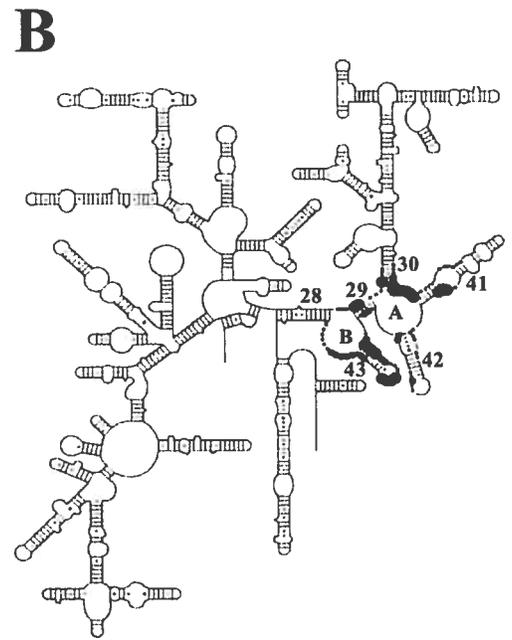
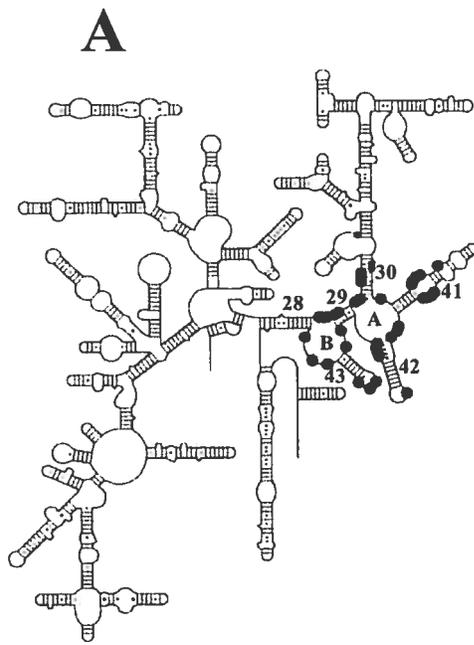
Figure 1-5: Positions de l'ARNr 16S protégées contre les attaques d'agents chimiques lors de la liaison des protéines ribosomiques S7 et S11. L'intensité de la protection est directement proportionnelle à la taille des cercles (adapté de Powers et Noller, 1995).

A. Bases de l'ARNr protégées par la protéine S7 contre les attaques d'agents chimiques.

B. Squelette de l'ARNr protégé par S7 contre les attaques de radicaux libres.

C. Bases de l'ARNr protégées par S11 contre les attaques d'agents chimiques.

D. Squelette de l'ARNr protégé par S11 contre les attaques de radicaux libres.



utilisant cette protéine modifiée et à enclencher la production de radicaux libres. Cette technique, nommée clivage dirigé, permet d'identifier l'environnement ribonucléique d'un résidu de la protéine étudiée. Les clivages dirigés ont été utilisés pour la première fois pour étudier l'emplacement de la protéine S5 dans la 30S (Heilek et Noller, 1996a), puis, ensuite pour sonder l'environnement d'autres protéines comme S13 (Heilek et Noller, 1996b), S20 (Culver et Noller, 1998), L15 (Lieberman et Noller, 1998) et L11 (Holmberg et Noller, 1999). Un autre procédé qui permet d'étudier les protections du squelette sucre-phosphate de l'ARNr par les protéines consiste à remplacer aléatoirement des phosphates dans l'ARN par des phosphorothioates. Ces analogues des phosphates réagissent ensuite à l'addition d'iode, ce qui induit le clivage de l'ARNr à ce niveau. Cette méthode a été utilisée entre autres pour sonder la liaison des protéines L5, L18 et L25 à l'ARNr 5S de la grande sous-unité (Shpanchenko *et al.*, 1996). Comme les données concernant la structure de l'ARNr, les données obtenues grâce aux attaques chimiques, enzymatiques ou par les radicaux libres représentent une quantité énorme d'informations dont la majorité concerne la petite sous-unité. Ces dernières sont résumées dans la Figure 1-6. L'ensemble des données sur les interactions ARN-protéines de la 30S montre des contacts ARN-protéines dans tout l'ARNr 16S, à l'exception de la longue hélice 44 contenue dans le domaine 3' mineur, où peu de contacts ARN-protéines sont observés. Pour la 50S, la quantité de données biochimiques ainsi obtenues est plus limitée, mais comme nous le verrons plus loin, la cristallographie aux rayons X des deux sous-unités a apporté toute l'information requise concernant les interactions ARN-protéines.

L'examen de la liaison des protéines ribosomiques à l'ARNr *in vitro* a également fourni d'importantes informations sur les interactions ARN-protéines du ribosome (voir aussi section 1.2.2.3.3). La liaison des protéines ribosomiques à l'ARNr se fait d'une manière hiérarchique, c'est-à-dire que l'interaction de certaines d'entre elles dépend de la liaison préalable d'autres protéines. Les protéines dont la liaison à l'ARNr ne dépend d'aucune autre protéine sont dites primaires (voir section 1-3). Par exemple, c'est le cas de la protéine S7, mais non de S11. Les méthodes d'analyse des sites de liaison des protéines à l'ARNr par mutagenèse ont été appliquées avec succès aux protéines

Figure 1-6: Représentation des interactions ARN-protéines entre l'ARNr 16S et les protéines ribosomiques de la 30S. Les interactions ARN-protéines observées sont identifiées par le nombre correspondant à la protéine suivi d'un A, s'il s'agit d'une protection contre l'attaque des radicaux libres, d'un B s'il s'agit de toute autre protection contre les attaques par des agents chimiques et d'un X pour un pontage (adapté de Mueller et Brimacombe, 1997a).

primaires. La constante d'association de ces protéines à l'ARNr a été évaluée par plusieurs techniques, comme la variation de la fluorescence du bromure d'éthidium lié à l'ARN, la diffraction aux rayons X à petit angle ou la filtration sur membranes de nitrocellulose (Feunteun *et al.*, 1975; Osterberg et Garrett, 1977; Spierer *et al.*, 1978; Schwarzbauer et Craven, 1981). Ces études ont montré que l'affinité des protéines ribosomiques primaires pour l'ARNr varie de 10^4 à 10^9 M⁻¹ selon les protéines et selon le procédé utilisé. S7 possède une constante d'affinité relativement faible de 1.6×10^6 M⁻¹ (Schwarzbauer et Craven, 1981; Dragon et Brakier-Gingras, 1993). La mutagenèse de régions de l'ARNr a aussi permis de délimiter les sites minimaux de l'ARNr contenant les déterminants requis pour la liaison d'une protéine, dont S7 (Dragon et Brakier-Gingras, 1993; Dragon *et al.*, 1994), S8 et L1 (revue par Zimmermann *et al.*, 2000), L3 (Spierer et Zimmermann, 1976). La Figure 1-7 montre quelques uns de ces sites minimaux de liaison des protéines ribosomiques. La détermination du site minimal de liaison de S7 est en accord avec les résultats des empreintes de la protéine sur l'ARNr, puisque ce site contient la majorité des nucléotides de l'ARNr protégés par S7. En parallèle, d'autres études de mutagenèse, en nombre plus limité, ont examiné l'effet de mutations dans les protéines ribosomiques sur leur liaison à l'ARNr comme c'est le cas pour les protéines S8, (Wu *et al.*, 1993), L18 (Newberry *et al.*, 1978), L2 (Harada *et al.*, 1998), L5 (Iwasaki *et al.*, 2002), et L9 (Adamski *et al.*, 1996).

1.2.1.4 Les modèles de la structure du ribosome

Comme mentionné plus haut, l'ensemble des connaissances sur la structure du ribosome 70S représente une quantité phénoménale d'informations. Comme aucune structure du ribosome 70S à haute résolution n'était disponible vers le milieu des années 1990, la communauté scientifique s'est tournée vers la modélisation pour tenter de comprendre les détails de la structure du ribosome 70S. Étant donné le nombre limité de données concernant la grande sous-unité, les efforts ont été concentrés sur la modélisation de la sous-unité 30S (revues par Green et Noller, 1997; Moore, 1998). Le premier modèle de la structure de la 30S, publié par le groupe de Brimacombe, a présenté uniquement le repliement de l'ARNr 16S basé sur les expériences de pontages

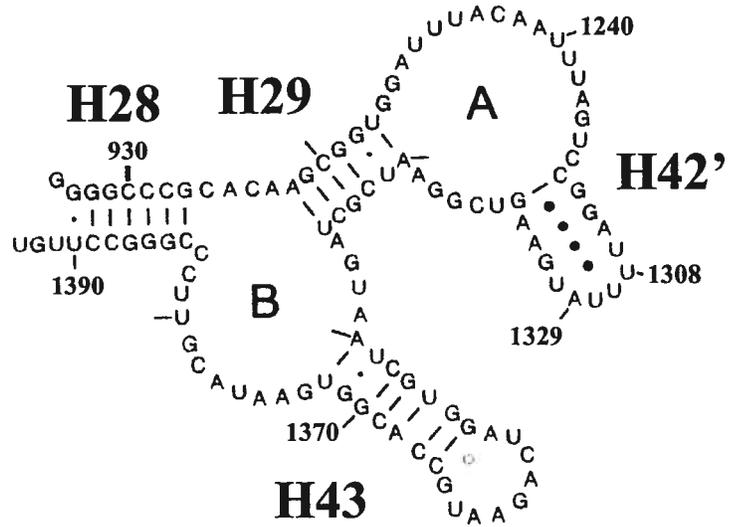
Figure 1-7: Fragments minimaux d'ARNr capables de lier des protéines ribosomiques.

A. Le fragment minimal du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S, dénommé D3M, auquel se lie la protéine S7 (adapté de Dragon *et al.*, 1994).

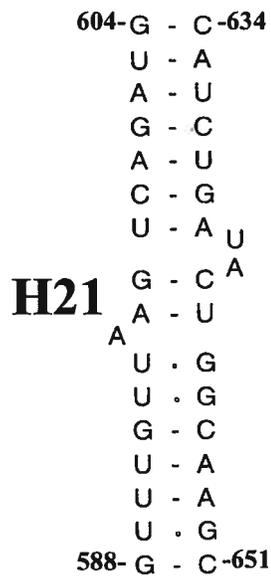
B. Le fragment minimal du domaine central de l'ARNr 16S auquel se lie la protéine S8 (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).

C. Le fragment minimal du domaine V de l'ARNr 23S auquel se lie la protéine L1 (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).

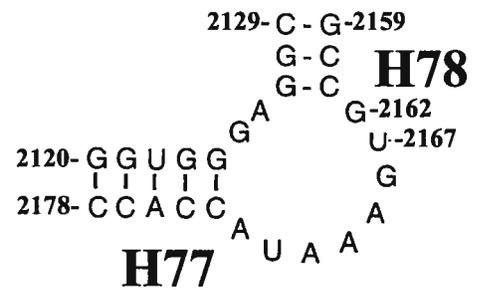
A



B



C



ARNr-ARNr (Schuler et Brimacombe, 1988; Brimacombe *et al.*, 1988; Brimacombe, 1995). Ce groupe a ensuite positionné ce modèle de l'ARNr 16S à l'intérieur de la structure de la 30S obtenue par cryo-ME, à une résolution d'environ 20 Å (voir section 1.2.2.2) (Stark *et al.*, 1995; Mueller et Brimacombe, 1997b). Finalement, l'addition des données concernant la localisation des protéines ribosomiques sur l'ARNr a permis de construire un modèle complet de la structure de la petite sous-unité ribosomique (Figure 1-8A) (Mueller et Brimacombe, 1997a; revue par Brimacombe *et al.*, 2000). Le groupe de Noller a également construit un modèle de la structure de la sous-unité 30S en utilisant les données fournies par les empreintes des protéines sur l'ARNr 16S, les sites d'interaction ARN-protéines et les localisations des protéines dans la 30S obtenues auparavant par ME et par diffraction aux neutrons (Figure 1-8B) (Noller *et al.*, 1995). Enfin, les groupes de Harvey (Figure 1-8C) (Malhotra et Harvey, 1994, Easterwood et Harvey, 1995) et de Altman (Figure 1-8D) (Fink *et al.*, 1996) ont utilisé des programmes informatiques pour bâtir des modèles compatibles avec toutes les données de structure disponibles à l'époque. En général, les différents modèles de la sous-unité 30S sont très semblables. Une différence notable entre les modèles de Brimacombe et de Noller consistait en la différence de positionnement d'une région importante dans le fonctionnement du ribosome, la boucle 530 qui coiffe l'hélice 18. Cette boucle était proche de la région 1400 selon le modèle de Brimacombe, mais à plus de 100 Å de cette région, selon le modèle de Noller. Des travaux subséquents analysant l'environnement de la protéine S5, dont la position dans la 30S était connue, ont donné raison à Brimacombe (Heilek et Noller, 1996a) et l'analyse de la structure cristallographique de la sous-unité 30S a confirmé ce point (voir plus bas). L'accumulation des données de pontage de la grande sous-unité a aussi permis une publication faisant état de la modélisation du repliement tertiaire des ARNr 23S et 5S, présentée peu de temps avant la détermination de la structure cristallographique de la sous-unité 50S (Mueller *et al.*, 2000).

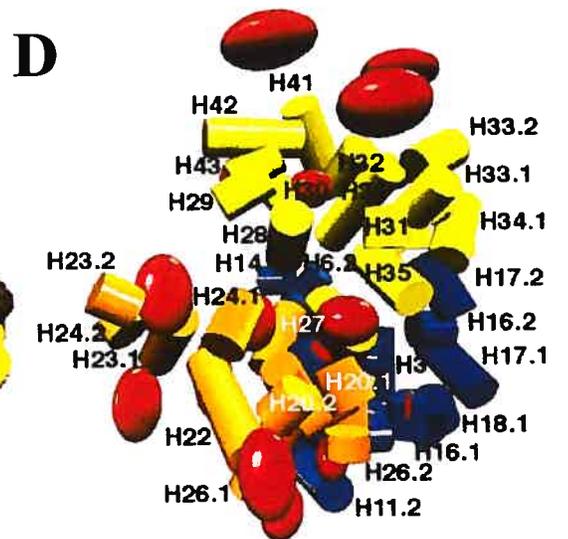
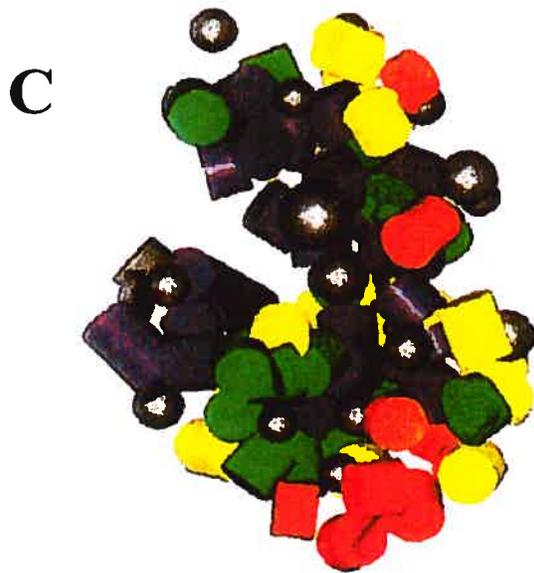
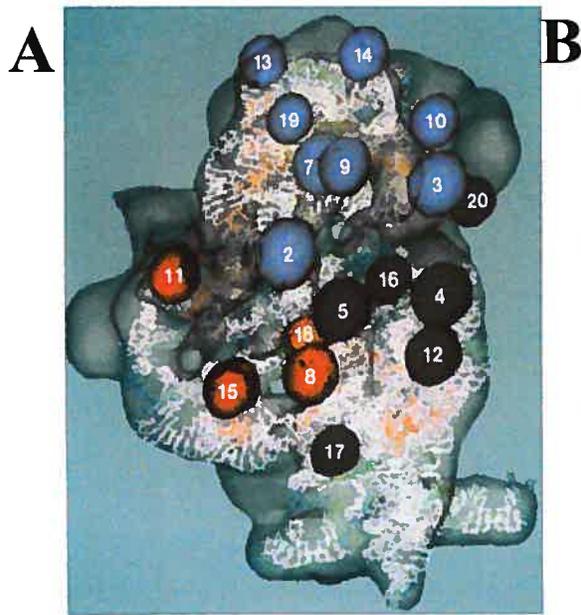
Figure 1-8: Principaux modèles de la structure de la sous-unité 30S, présentés avant la publication de la structure cristallographique de cette sous-unité.

A. Modèle du groupe de Brimacombe. L'ARNr 16S a été positionné dans la structure de la 30S déterminée par cryo-microscopie électronique (en bleu pâle). Les régions hélicoïdales de l'ARNr sont en blanc, les régions à simple brin qui connectent les hélices sont en rouge et les boucles coiffant les hélices sont en bleu. Les protéines qui interagissent avec le domaine 3' majeur de l'ARNr 16S sont représentées par des sphères en bleu pâle, celles qui interagissent avec le domaine 5' par des sphères rouges et celles qui interagissent avec le domaine central par des sphères noires (adapté de Mueller et Brimacombe, 1997a et b).

B. Modèle du groupe de Noller. L'ARNr 16S est en blanc et l'emplacement des protéines ribosomiques est représenté par des nuages de points. Ce modèle a également été utilisé pour montrer la proximité entre trois cystéines (rouge, jaune et verte) de la protéine S5 (en bleu) et différentes régions de l'ARNr 16S (adapté de Heilek et Noller, 1996).

C. Modèle du groupe de Harvey. Les cylindres représentent les hélices de l'ARNr 16S et les sphères noires, les protéines ribosomiques (adapté de Malhotra et Harvey, 1994).

D. Modèle du groupe d'Altman. Les cylindres représentent les hélices de l'ARNr 16S et les ovoïdes, les protéines ribosomiques (adapté de Fink *et al.*, 1996).



1.2.2 Structure à haute résolution du ribosome et de ses composantes

La détermination de la structure à haute résolution du ribosome 70S est le résultat de travaux qui ont débuté au cours des années 1980 pour la cristallisation et au début des années 1990 pour la cryo-ME. Cependant, en parallèle avec les études de la structure du ribosome 70S et de ses sous-unités, diverses études intéressantes ont porté sur les constituants isolés du ribosome.

1.2.2.1 Étude des composantes isolées du ribosome

À cause des difficultés rencontrées par la communauté scientifique pour déterminer la structure du ribosome 70S ou de ses sous-unités, plusieurs chercheurs se sont tournés vers la détermination de la structure à haute résolution de composantes isolées du ribosome (revues par Green et Noller, 1997; Moore, 1998; Ramakrishnan et White, 1998). Plus d'une trentaine de structures ont ainsi été obtenues par cristallographie aux rayons X ou par RMN, comprenant principalement des protéines ribosomiques, mais aussi quelques fragments d'ARNr (Figure 1-9A et B). Le Tableau 1-1 présente la totalité de ces structures dans le but de rendre hommage à tous les chercheurs qui ont travaillé dans ce domaine durant les 25 dernières années. L'analyse de la structure de ces protéines a permis d'observer que beaucoup d'entre elles contiennent des motifs trouvés dans d'autres protéines qui lient l'ARN ou l'ADN. Ceci, combiné à l'analyse de la conservation des séquences des protéines, peut fournir des indications intéressantes concernant leur mode d'interaction avec l'ARNr (voir section 1.2.2.3.3 pour les détails des interactions ARN-protéines). La structure de la protéine S7 isolée, provenant de bactéries thermophiles, a été élucidée par cristallographie aux rayons X (Wimberly *et al.*, 1997, Hosaka *et al.*, 1997). Cette protéine possède la topologie suivante: $\alpha_1\alpha_2\alpha_3\beta_1\beta_2\alpha_4\alpha_5\alpha_6$ (Figure 1-9C). Les cinq premières hélices α forment une structure compacte d'où émergent le feuillet β ainsi que les extrémités N- (17 résidus) et C- terminales (10 résidus). La disposition des hélices 1 à 5 est stabilisée par un réseau d'interactions formées par des résidus d'acides aminés aromatiques et des

Tableau 1-1: Liste des protéines ribosomiques ou des fragments d'ARNr isolés dont la structure à haute résolution a été déterminée par cristallographie aux rayons X ou par RMN.

résidus d'alanines très conservées. L'arrangement du feuillet β et des hélices 2 et 3 de S7 se superpose très bien sur le feuillet β et les hélices 1 et 2 de protéines liant l'ADN de la famille bactérienne HU (Figure 1-9D). Cette famille comprend, entre autres, les protéines dites HU (Vis *et al.*, 1995) et le facteur d'intégration de l'hôte (IHF) (Tanaka *et al.*, 1984). La structure cristallographique du facteur IHF d'*E. coli* complexé à l'ADN indique que ces protéines, sous forme de dimères, induisent une courbure (« U-turn ») dans l'ADN à double brin requise pour la réplication et la transcription (Rice *et al.*, 1996 et les références citées). La courbure de l'ADN est induite par l'insertion du feuillet β de ces protéines dans le sillon mineur de l'ADN et est stabilisée par des contacts multiples entre les hélices 1, 2 et 3 de la protéine et l'ADN. En se basant sur cette structure, sur la conservation et l'exposition au solvant des résidus de S7 et sur les pontages entre la protéine et l'ARN, il a été proposé que S7 interagisse avec l'ARNr 16S en utilisant deux régions distinctes (Wimberly *et al.*, 1997, Hosaka *et al.*, 1997). La première région serait une grande surface concave formée par le feuillet β et les hélices 1, 4 et 6 de S7 et la deuxième serait la région entourant la boucle 5 qui joint les hélices 4 et 5 de la protéine. Il a aussi été proposé que S7 se lie d'une manière analogue aux protéines de la famille HU en insérant son feuillet β dans une région à double brin de l'ARN. Nous verrons plus loin ce qu'il en est (voir Discussion).

Les protéines ribosomiques et les fragments d'ARNr dont la structure a été élucidée ont été incorporés dans les modèles informatiques des sous-unités ribosomiques ou dans les structures de cryo-ME des sous-unités ribosomiques (voir section suivante). Par exemple, le groupe de Brimacombe a publié un modèle conçu par ordinateur de l'interaction entre S7 et l'ARNr 16S (Figure 1-10; Tanaka *et al.*, 1998) en utilisant son modèle du repliement de l'ARNr 16S en trois dimensions (Mueller et Brimacombe, 1997b) comme point de départ et en tenant compte des données concernant l'interaction entre S7 et l'ARNr basées sur des pontages et aussi des empreintes de la protéine sur l'ARN.

Figure 1-9: Structure à haute résolution de diverses protéines ribosomiques.

A. Structure de protéines de la sous-unité 30S et leur localisation par diffraction aux neutrons (adapté de Ramakrishnan et White, 1998). La structure de S1 présentée correspond à un seul des sept domaines qu'elle contient (voir section 1.2.2.3.3).

B. Structure de protéines de la sous-unité 50S et leur localisation par microscopie électronique couplée à l'immunologie (adapté de Ramakrishnan et White, 1998).

C. Structure détaillée de la protéine S7 isolée (adapté de Wimberly *et al.*, 1997; Hosaka *et al.*, 1997). C et N désignent respectivement l'extrémité C-terminale et N-terminale de la protéine.

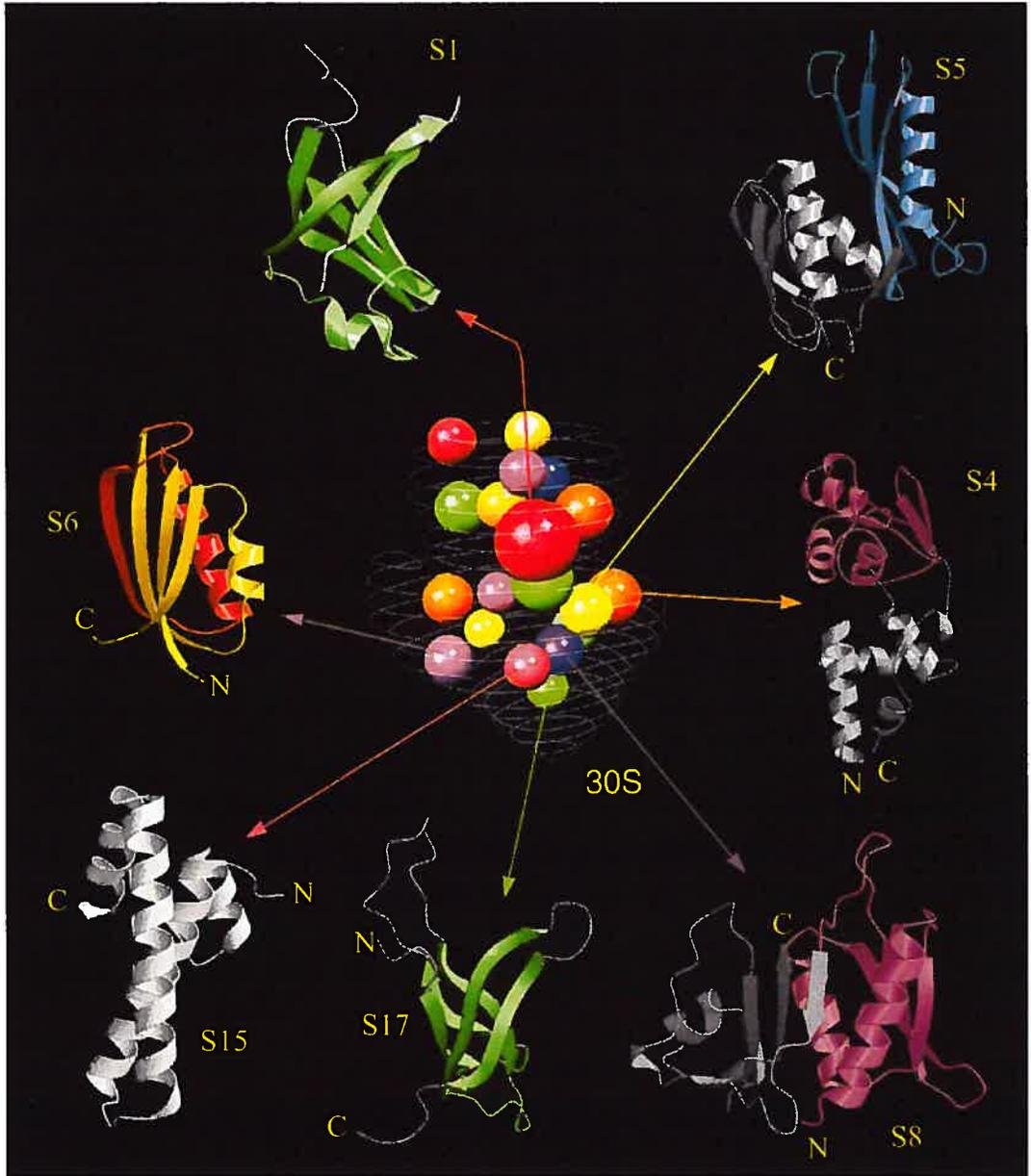
D. Comparaison de la structure cristallographique de S7 avec celle des protéines HU et IHF liant l'ADN (adapté de Wimberly *et al.*, 1997). Les hélices sont indiquées par H, suivi d'un numéro.

Molécule	Nom	Organisme	Méthode	Référence
ARN	Hélice 1 de l'ARNr 5S	<i>Thermus flavus</i>	Crys. rayons X	Betzl <i>et al.</i> , 1994.
	Hélice 1 de l'ARNr 5S	<i>E. coli</i>	RMN	White <i>et al.</i> , 1992.
	Boucle E, hélice 4 et 5 de l'ARNr 5S	<i>E. coli</i>	Crys. rayons X	Correll <i>et al.</i> , 1997.
	Boucle D et E de l'ARNr 5S	<i>E. coli</i>	RMN	Cheong <i>et al.</i> , 1990.
	Site A de l'ARNr 16S	<i>E. coli</i>	RMN	Fourmy <i>et al.</i> , 1996.
	Site de liaison de la protéine S8	<i>E. coli</i>	RMN	Kalurachi <i>et al.</i> , 1997.
	Boucle sarcine/ricine de l'ARNr 23S	Rat	RMN	Szewczak et Moore, 1995.
	Centre GTPasique de l'ARNr 23S	<i>E. coli</i>	RMN	Fountain <i>et al.</i> , 1996; Huang <i>et al.</i> ,
	Tige-boucle de l'ARNr 23S qui interagit avec l'ARNt au site P	<i>E. coli</i>	RMN	Puglisi <i>et al.</i> , 1997.
Protéine	Un des domaines de liaison à l'ARN de S1	<i>E. coli</i>	RMN	Bycroft <i>et al.</i> , 1997.
	S4	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Davies <i>et al.</i> , 1998.
	S4 moins les 41 premiers acides aminés	<i>B. stearothermophilus</i>	RMN	Markus <i>et al.</i> , 1998.
	S5	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Ramakrishnan et White, 1992.
	S6	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Lindahl <i>et al.</i> , 1994.
	S7	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Wimberly <i>et al.</i> , 1997
	S7	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Hosaka <i>et al.</i> , 1997.
	S7	<i>P. horikoshii</i>	Crys. rayons X	Hosaka <i>et al.</i> , 2001
	S8	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Davies <i>et al.</i> , 1996.
	S8	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Nevskaya <i>et al.</i> , 1998.
	S15	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Clemons <i>et al.</i> , 1998.
	S15	<i>T. thermophilus</i>	RMN	Berglund <i>et al.</i> , 1997.
	S16	<i>T. thermophilus</i>	RMN	Allard <i>et al.</i> , 2000.

Protéine	S17	<i>B. stearothermophilus</i>	RMN	Golden <i>et al.</i> , 1993b.
	S17	<i>B. stearothermophilus</i>	RMN	Jaishree <i>et al.</i> , 1996.
	S19	<i>T. thermophilus</i>	RMN	Helgstrand <i>et al.</i> , 1999.
	L1	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Nikonov <i>et al.</i> , 1996.
	L1	<i>M. jannaschii</i>	Crys. rayons X	Nevskaya <i>et al.</i> , 2000.
	L1	<i>M. thermolithotrophicus</i>	Crys. rayons X	Nevskaya <i>et al.</i> , 2002.
	Domaine de liaison à l'ARN de L2	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Nakagawa <i>et al.</i> , 1999.
	L6	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Golden <i>et al.</i> , 1993a.
	Extrémité C-terminale de L7/L12	<i>E. coli</i>	Crys. rayons X	Leijonmarck <i>et al.</i> , 1980.
	L7/L12	<i>E. coli</i>	RMN	Bocharov <i>et al.</i> , 1996.
	L7/L12	<i>T. maritima</i>	Crys. rayons X	Wahl <i>et al.</i> , 2000
	L9	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X et RMN	Hoffman <i>et al.</i> , 1994; 1996.
	Portion C-terminale de L11	<i>B. stearothermophilus</i>	RMN	Markus <i>et al.</i> , 1997.
	L14	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Davies <i>et al.</i> , 1996
	L18	<i>T. thermophilus</i>	RMN	Woestenenk <i>et al.</i> , 2002
	L20	<i>A. aeolicus</i>	RMN	Raibaud <i>et al.</i> , 2002
	L22	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Unge <i>et al.</i> , 1998.
	L25	<i>E. coli</i>	RMN	Stoldt <i>et al.</i> , 1998.
	L30	<i>B. Stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Wilson <i>et al.</i> , 1986.
	L30	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Fedorov <i>et al.</i> , 1999.
L36	<i>T. thermophilus</i>	RMN	Hard <i>et al.</i> , 2000.	
Complexe ARN-protéines	S8-Fragment de l'ARNr 16S	<i>M. jannaschii.</i>	Crys. rayons X	Tishchenko <i>et al.</i> , 2001.
	S15-Fragment de l'ARNr 16S	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Nikulín <i>et al.</i> , 2000.
	S6+S15+S18-Fragment de l'ARNr 16S	<i>T. thermophilus</i>	Crys. rayons X	Agalarov <i>et al.</i> , 2000.

L1-Fragment de l'ARNr 23S	<i>S. acidocaldarius</i> (L1) et <i>T.</i> <i>thermophilus</i> (ARNr)	Crys. rayons X	Nikulin <i>et al.</i> , 2003.
L11-Fragment de l'ARNr 23S	<i>T. maritima</i>	Crys. rayons X	Wimberly <i>et al.</i> , 1999.
L11-Fragment de l'ARNr 23S	<i>B. stearothermophilus</i>	Crys. rayons X	Conn <i>et al.</i> , 1999.
L25-Fragment de l'ARNr 5S	<i>E. coli</i>	RMN	Stoldt <i>et al.</i> , 1999; Lu et Steitz, 2000.

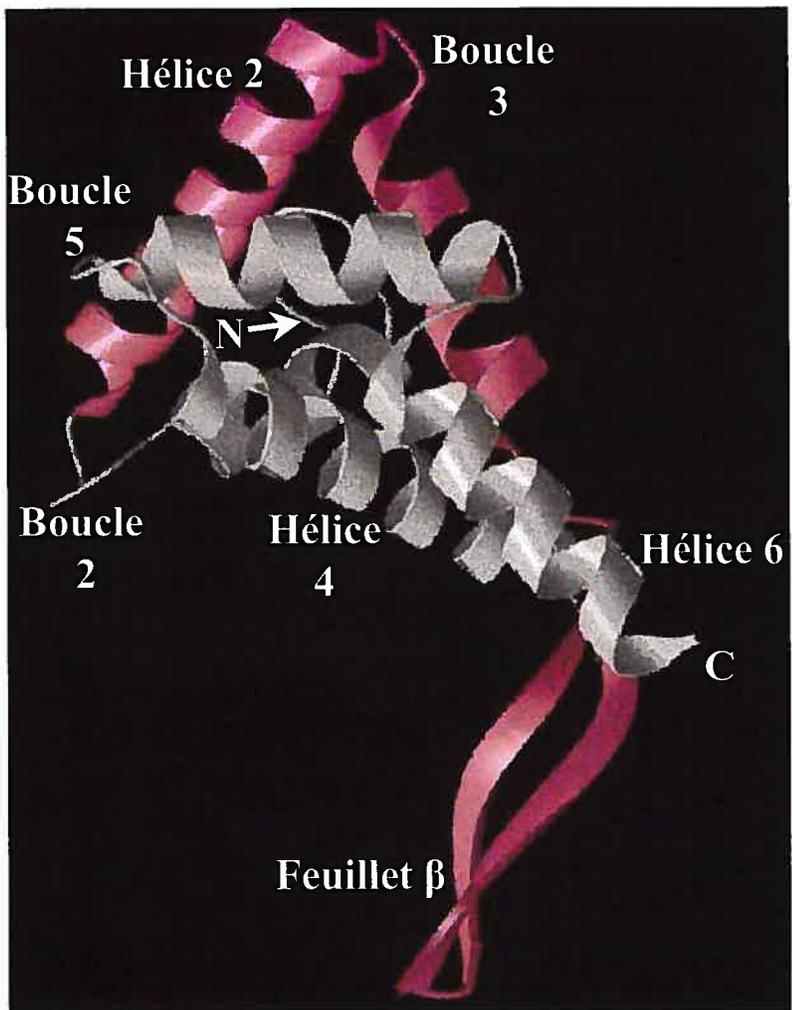
A



B



C



D

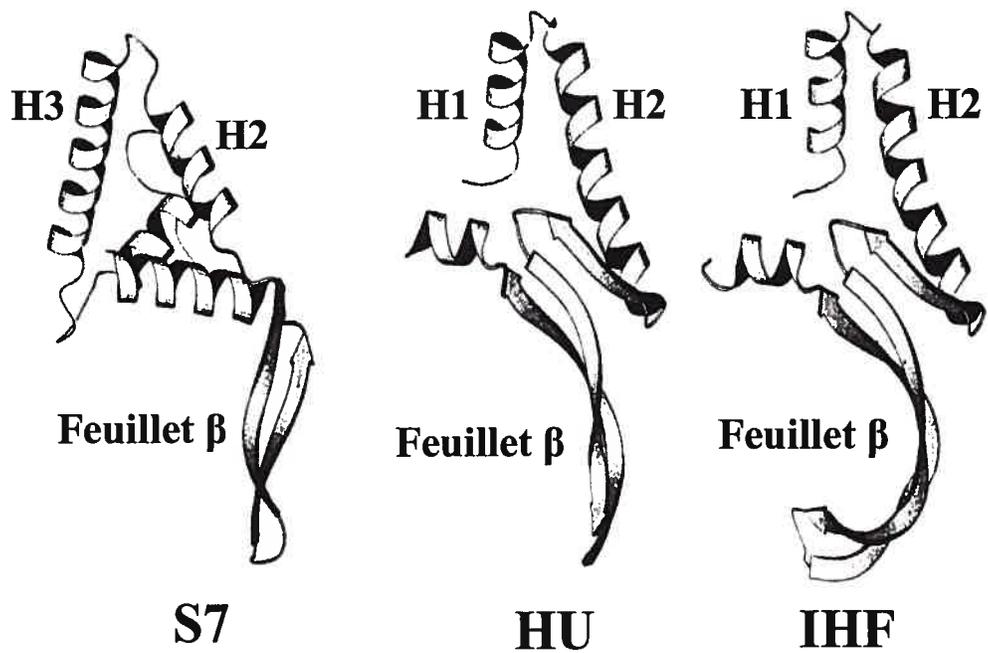
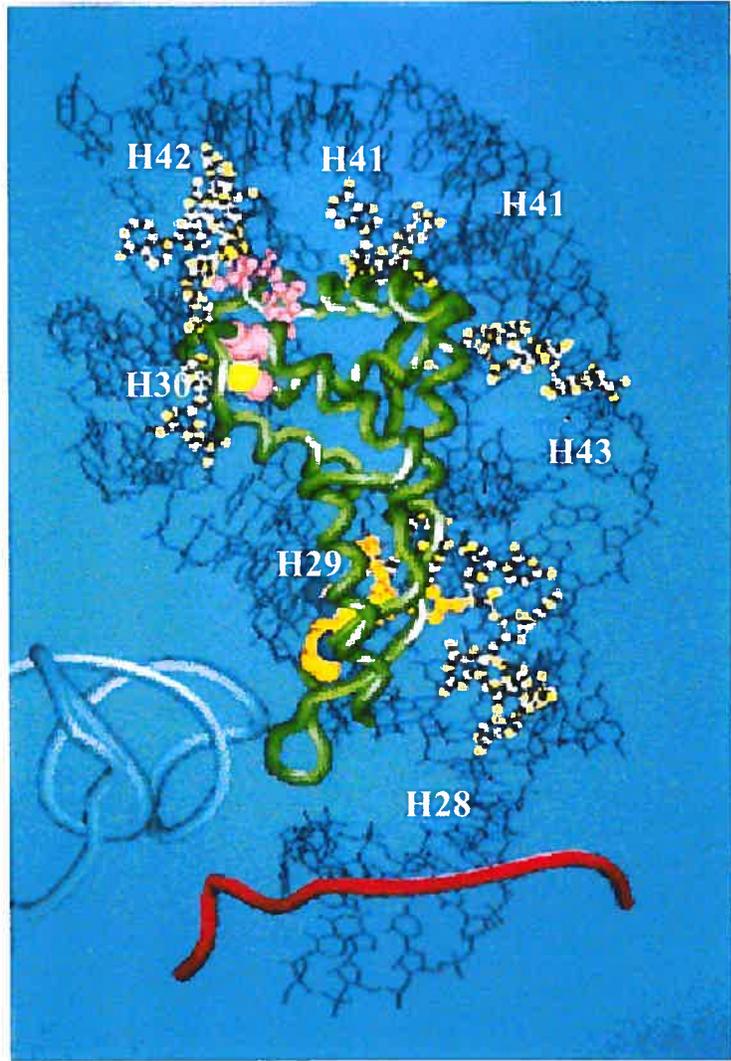


Figure 1-10: Modèle de l'interaction entre la protéine S7 et son site de liaison sur l'ARNr 16S (Tanaka *et al.*, 1998). La structure de S7 déterminée par cristallographie aux rayons X (en vert) a été positionnée par rapport au modèle du repliement de l'ARNr 16S (en bleu foncé) du groupe de Brimacombe. Les nucléotides colorés en jaune, noir et blanc sont protégés contre l'attaque des radicaux hydroxyles par la liaison de S7 et ceux en rose et en orange ont été pontés à S7. Le tube en bleu pâle en bas à gauche correspond à l'ARNt au site E et le tube rouge en bas représente l'ARNm.



1.2.2.2 Microscopie cryo-électronique

La cryo-ME est une amélioration de la technique de ME qui a été utilisée dès le début des années 1970 pour obtenir la structure du ribosome 70S (voir section 1.2.1.1). La ME traditionnelle avait le désavantage de nécessiter la préparation des échantillons dans des conditions de déshydratation qui pouvaient induire des déformations dans les particules étudiées. De plus, la résolution des images obtenues par cette technique se limitait à environ 100 Å (revues par van Heel, 2000; Frank, 2001; 2002; Stark, 2002). La cryo-ME a réussi à contourner ces limitations en analysant des images des échantillons gelés très rapidement dans la glace, c'est-à-dire sous une forme hydratée, impliquant l'absence de déformations. Combinée à la reconstruction d'images en trois dimensions par des ordinateurs de plus en plus performants, cette technique a permis l'obtention d'images dont la résolution est près de 10 fois meilleure que celles obtenues par ME. Cette technique possède aussi divers avantages vis-à-vis de la cristallographie aux rayons X. D'abord, évidemment, elle ne requiert pas la formation de cristaux, qui sont particulièrement difficiles à obtenir avec de grandes macromolécules flexibles tels les ribosomes. De plus, la cristallisation de molécules en présence d'agents comme des alcools, des ions ou des détergents qui favorisent cette cristallisation peut provoquer la formation de structures inhabituelles. En cryo-ME, la particule étudiée est dans sa conformation native, liée ou non à un ligand et non dans un état imposé par des contraintes non-physiologiques. Un autre avantage de la cryo-ME est sa rapidité puisque le processus de prise d'images ainsi que leur analyse peuvent être effectués en quelques jours. Cependant, bien qu'il soit possible en théorie d'obtenir des images à une résolution atomique avec la cryo-ME, une telle résolution n'a pas encore été atteinte en ce qui concerne le ribosome. En effet, le nombre d'images requises pour reconstruire une structure est inversement proportionnel au cube de la résolution en Å. Donc, s'il faut environ 30 000 photos pour bâtir une image à une résolution de 10 Å, l'obtention d'une image à une résolution d'environ 3 Å nécessiterait près de 1 000 000 de photos, ce qui représente un travail monumental (Frank, 2002).

La résolution des premières images du ribosome 70S d'*E. coli* ou de ses sous-unités obtenues par cryo-ME était de l'ordre de 40 Å (Frank *et al.*, 1991), et la définition des structures a constamment augmenté avec l'amélioration de la résolution des images obtenues (20 Å: Stark *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 1995a et b; Lata *et al.*, 1996; 15 Å: Malhotra *et al.*, 1998; 11.5 Å: Gabashvili *et al.*, 2000; 7.5 Å: Matadeen *et al.*, 1999). La Figure 1-11 montre des images du ribosome 70S obtenues depuis 1991 par cryo-ME. Déjà, à 40 Å de résolution (Figure 1-11A), on peut visualiser l'espace entre les sous-unités où se positionnent les ARNt ainsi que l'un des contacts entre les deux sous-unités, impliquant le bras L1 de la 50S et la plate-forme de la 30S. L'analyse des images à cette résolution a mené à l'identification de nouvelles structures morphologiques dans la sous-unité 30S: une protubérance de la tête du côté opposé à la plate-forme, nommée bec, un prolongement du corps sous le bec, nommé épaule et une excroissance au bas de la sous-unité nommée « spur ». À une résolution d'environ 25 Å, il est possible de distinguer que la surface du ribosome 70S n'est pas lisse comme dans les images précédentes, mais plutôt rugueuse et remplie d'invaginations (Figure 1-11B et C). L'analyse des structures à plus haute résolution a également permis de visualiser l'ensemble des sites de contact entre les sous-unités, comme cela sera expliqué plus loin dans cette section. À cette résolution, il est aussi possible d'observer deux tunnels dans les sous-unités ribosomiques, l'un contournant le cou de la 30S, et l'autre débutant au centre de la 50S, à l'interface entre les sous-unités, traversant entièrement la 50S, bifurquant et se terminant à deux endroits du côté du solvant. Il a été proposé que l'ARNm passe au travers du tunnel de la 30S et que celui de la 50S correspond au chemin de sortie du peptide en croissance (Figure 1-11B) (Frank *et al.*, 1995a). Les deux sorties possibles du peptide en croissance ont été nommées E1 et E2. Les positions des ARNt aux sites A, P et E du ribosome 70S ont ensuite été visualisées à une résolution d'environ 15-20 Å (Agrawal *et al.*, 1996; Stark *et al.*, 1997; Malhotra *et al.*, 1998; Agrawal *et al.*, 2000) et le positionnement de l'ARNm autour du cou de la 30S a été directement observé (Malhotra *et al.*, 1998). Dans ces structures, les tiges anticodons des ARNt sont placées au niveau du cou de la 30S à l'endroit où passe l'ARNm. Les extrémités 3'-CCA des ARNt, qui portent la chaîne polypeptidique en croissance et

l'acide aminé qui viendra allonger cette chaîne, sont positionnées à proximité du début du tunnel de la 50S, en accord avec la suggestion que ce tunnel constitue le chemin de sortie des chaînes protéiques en croissance. La résolution des structures du ribosome 70S les plus récentes obtenues par cryo-ME varie entre 7 et 12 Å (Figure 1-11D et E). En principe, la résolution de ces structures ne permet pas de distinguer avec précision les protéines et l'ARNr, mais les données sur la localisation des protéines ribosomiques et le repliement de l'ARNr ont permis la discrimination de ces deux types de molécules dans les structures obtenues par cryo-ME (Spahn *et al.*, 1999; Spahn *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2000). De plus, les composantes du ribosome dont la structure à haute résolution était connue ont pu être placées dans la structure du ribosome 70S ou de ses sous-unités (Matadeen *et al.*, 1999; Gabashvili *et al.*, 2000). Par exemple, l'équipe de Frank a identifié plus d'une dizaine de protéines et trois régions d'ARN dans le ribosome, dont la longue hélice 44 et l'hélice 28 formant le cou de la 30S, en plus de préciser le positionnement de l'ARNt initiateur au site P dans la structure du ribosome 70S à une résolution de 11.5 Å (Figure 1-11F) (Gabashvili *et al.*, 2000). Grâce aux structures cristallographiques des sous-unités ribosomiques (sections suivantes), il est maintenant possible d'identifier en détail les constituants du ribosome 70S dans les structures de cryo-ME à 10 Å. Ceci a été grandement utilisé pour étudier avec précision les sites d'interaction de divers ligands complexés au ribosome (voir sections 1.4.1 et 1.4.2).

Les plus récentes structures du ribosome 70S obtenues par cryo-ME à une résolution d'environ 12 Å ont permis de visualiser les sites de contacts entre les deux sous-unités (Figure 1-12). Ces sites de contact se répartissent en six groupes, identifiés de B1 à B6. Chaque groupe est ensuite subdivisé en sous-groupe. Les contacts B1 sont localisés entre la tête de la 30S et la protubérance centrale de la 50S, les contacts B2b à B2e et B4 s'effectuent entre plusieurs points de la plate-forme de la 30S et la région adjacente au bras L1 de la 50S. Les ponts B2a, B3, B5a et B5b connectent l'hélice 44 de la sous-unité 30S et le centre de la sous-unité 50S. Le pont B6 relie la partie inférieure des sous-unités.

Figure 1-11: Structure du ribosome 70S d'*E. coli* et de ses sous-unités obtenues par cryo-microscopie électronique.

A. Structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 40 Å obtenue par le groupe de Frank (adapté de Frank *et al.*, 1991). Le ribosome est présenté avec le dos de la 30S vers le lecteur. L1: bras L1, PC: protubérance centrale, PF: plate-forme.

B. Structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 20 Å obtenue par le groupe de Frank. À gauche, une coupe transversale du ribosome vu du haut montre le tunnel par où il a été suggéré que passe l'ARNm (présenté par un trait orange) et l'espace entre les sous-unités où se positionnent les ARNt aux sites A et P (modélisés en rose et en vert, respectivement). À droite est présentée une coupe longitudinale du côté du site A du ribosome qui montre le tunnel où passerait le peptide en croissance. Le peptide est présenté par un trait jaune ou vert selon qu'il utilise, respectivement, la sortie du tunnel E1 ou E2 pour émerger du ribosome (adapté de Frank *et al.*, 1995). h: tête, CP: protubérance centrale, L1: bras L1, Ch: tunnel, sp: « spur », p: plate-forme.

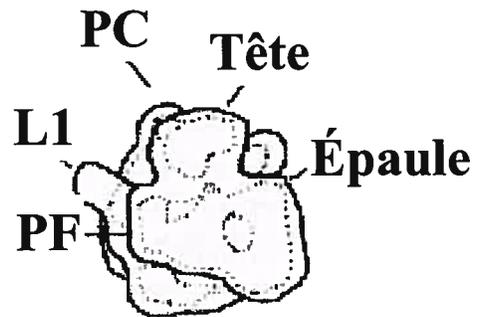
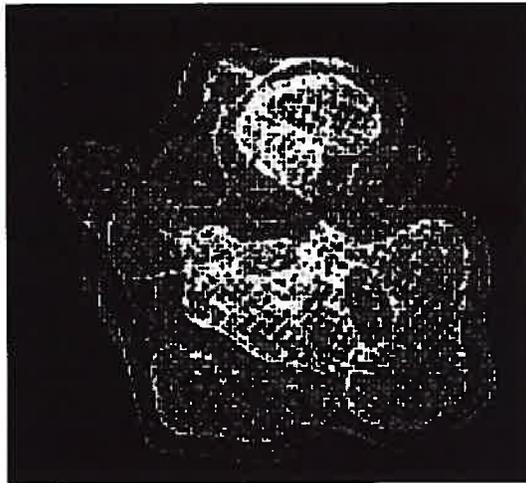
C. Structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 23 Å obtenue par le groupe de van Heel (adapté de Stark *et al.*, 1995). Le ribosome est présenté avec le site E vers le lecteur.

D. Structure du ribosome 70S complexé à l'ARNt initiateur au site P, à une résolution d'environ 11.5 Å. Cette structure a été obtenue par le groupe de Frank (adapté de Gabashvili *et al.*, 2000). La section en rouge à l'intérieur du ribosome correspond à l'hélice 44 de l'ARNr 16S, alors que celle en vert correspond au fmet-ARNt^{fmet}. La densité correspondant à cet ARNt est montrée dans la section encadrée. Le ribosome est présenté avec le site A vers le lecteur. PC: protubérance centrale, st: tige L7/L12, Sh: épaule.

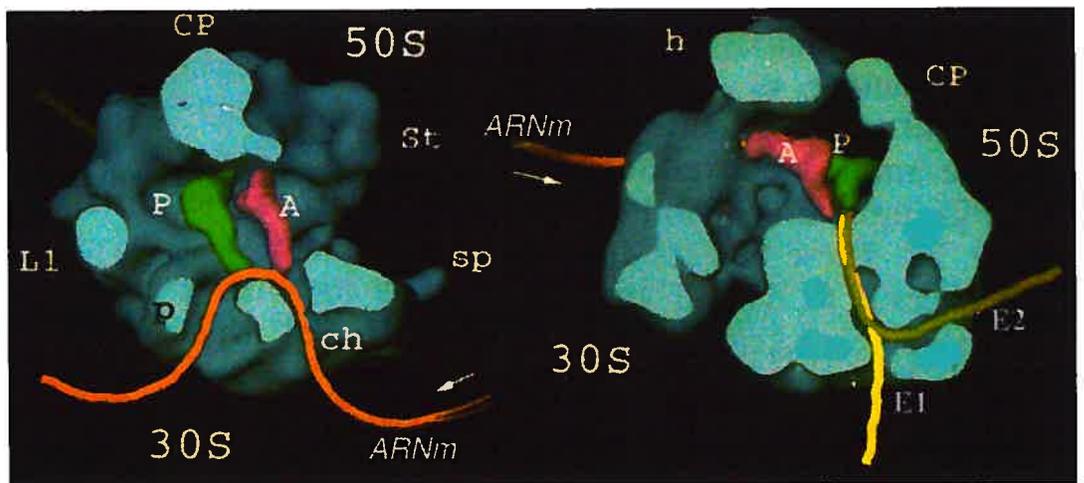
E. Structure de la sous-unité 50S à une résolution d'environ 7.5 Å obtenue par le groupe de van Heel (Matadeen *et al.*, 1999). La sous-unité est présentée avec l'interface vers le lecteur.

F. Positionnement de composantes ribosomiques dans la structure du ribosome 70S à une résolution d'environ 11.5 Å (Gabashvili *et al.*, 2000). Les sous-unités sont présentées avec l'interface vers le lecteur et la position de plusieurs protéines ribosomiques y est indiquée. La position du facteur d'élongation EF-G est également indiquée.

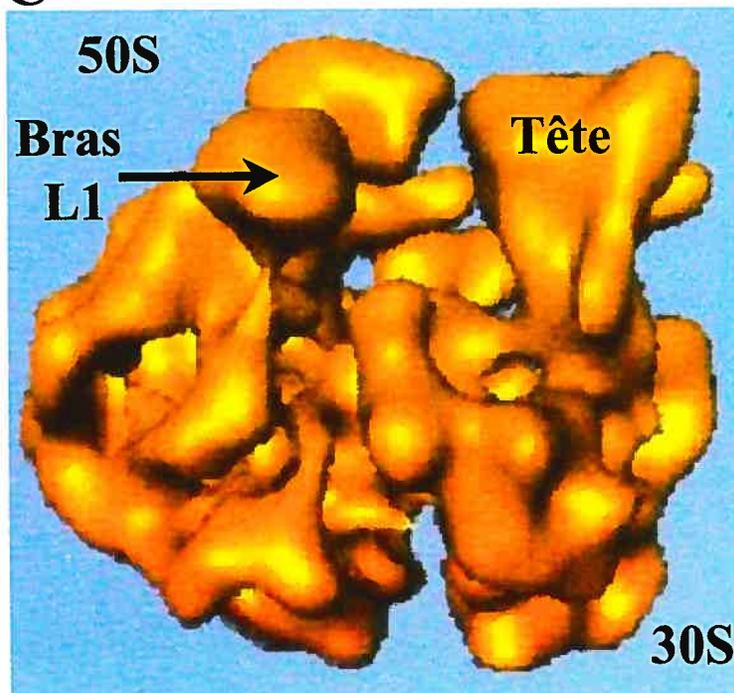
A



B



C



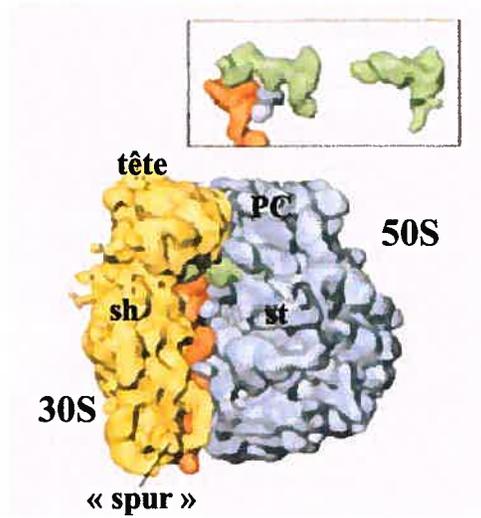
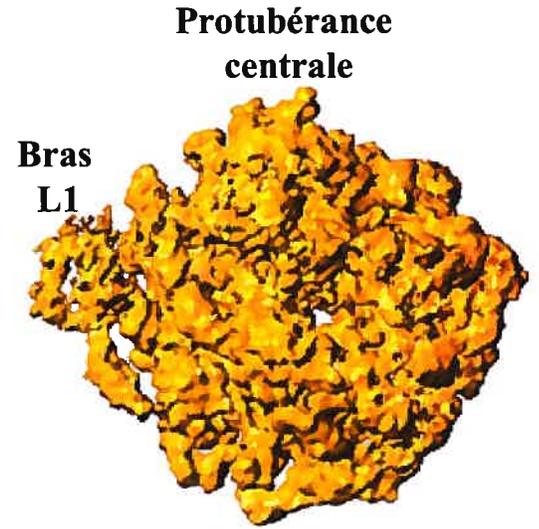
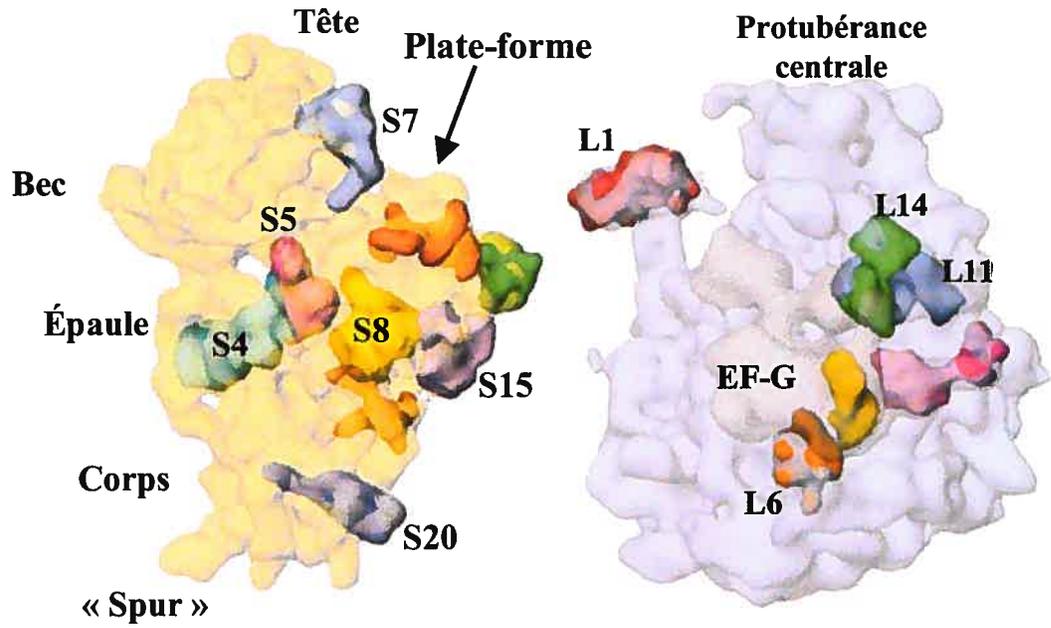
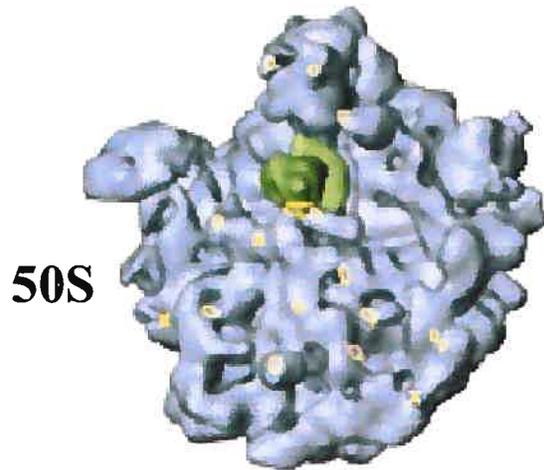
D**E****F**

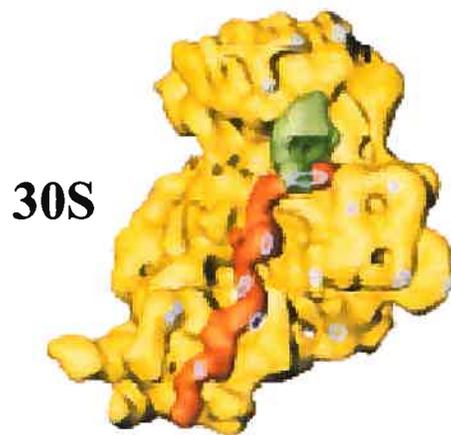
Figure 1-12: Localisation des contacts entre les sous-unités 30S et 50S dans la structure du ribosome 70S d'*E. coli* en complexe avec le fmet-ARNt^{fmet} au site P à une résolution d'environ 11.5 Å. Cette structure a été obtenue par cryo-microscopie électronique par le groupe de Frank (adapté de Frank *et al.*, 2000). Les sous-unités sont présentées avec l'interface vers le lecteur. L'hélice 44 de l'ARNr 16S dans la 30S est colorée en rouge et le fmet-ARNt^{fmet} en vert.



B1c⁺ ○ B1b
 ○ B1a

B2d⁺ ○ B2a
 ■ B2b □ B3

✕ ○ B2e ○ B2c ○ B5a
 ○ B4 ○ B5b ✕



B1b⁺ ○ B1c
 B1a⁺

✕ ✕ B2a ○ B2d
 ■ B2b

B3⁺

B5a⁺ ○ B2c B2e ✕
 B6⁺ ○ B5b ○ B4
 ✕

1.2.2.3 La cristallographie aux rayons X

Les premiers essais de cristallisation du ribosome 70S ont débuté il y a environ 25 ans. Comme les ribosomes d'*E. coli* étaient trop flexibles et trop instables pour permettre l'obtention de cristaux adéquats, les chercheurs se sont tournés vers des organismes thermophiles ou halophiles, dont les ribosomes sont plus robustes, pour obtenir des cristaux de ribosomes 70S avec une diffraction appropriée. Le degré de conservation des ribosomes dans les divers organismes vivants est d'ailleurs suffisant pour que les données structurales obtenues avec le ribosome d'un organisme puissent être appliquées aux autres ribosomes (revues par Green et Noller, 1997; Ramakrishnan et Moore, 2001; Yonath, 2002). C'est le groupe de Yonath et Wittmann qui a publié pour la première fois, en 1980, des résultats montrant des cristaux de sous-unités ribosomiques (Yonath *et al.*, 1980). Il s'agissait de sous-unités 50S provenant de la bactérie thermophile *Bacillus stearothermophilus*. L'exploit a ensuite été répété avec la grande sous-unité ribosomique de l'archaebactérie *Haloarcula marismortui* (Shevack *et al.*, 1985; von Böhlen *et al.*, 1991), ainsi qu'avec la petite sous-unité ribosomique et le ribosome 70S de la bactérie thermophile *Thermus thermophilus* (Glötz *et al.*, 1987; Trakhanov *et al.*, 1987). De 1987 à 1991, des cristaux de ribosomes 70S et de leurs sous-unités diffractaient déjà les rayons X à une résolution de 3 à 6 Å, mais étonnamment, ce n'est qu'en 2000 qu'ont été publiées les structures du ribosome 70S et de ses sous-unités à une résolution atomique. Ce délai provient du fait que la technologie initiale ne permettait pas aux chercheurs d'analyser en détail les patrons complexes de diffraction des rayons X du ribosome ou de ses sous-unités, pour générer les images à haute résolution de leur structure. Cependant, diverses innovations technologiques incluant la collection des données à des températures cryogéniques, l'amélioration de la puissance de la source des rayons X, l'accroissement de la sensibilité des détecteurs et aussi la sophistication accrue des stratégies de résolution des structures grâce à des ordinateurs extrêmement performants ont graduellement permis le raffinement des structures du ribosome 70S ou de ses sous-unités pour finalement atteindre la résolution atomique: 50S: 9 Å (Ban *et al.*, 1998), 5 Å (Ban *et al.*, 1999), 2.4 Å (Ban *et al.*, 2000), 3.1 Å (Harms *et al.*, 2001); 30S: 5.5 Å (Clemons *et al.*, 1999), 4.5

Å (Tocij *et al.*, 1999), 3.3 Å (Schlünzen *et al.*, 2000), 3.05 Å Wimberly *et al.*, 2000); 70S: 7.8 Å (Cate *et al.*, 1999), 5.5 Å (Yusupov *et al.*, 2001). Ces structures ont considérablement changé la compréhension de la traduction (revues par Dahlberg, 2001; Maguire et Zimmermann, 2001; Moore, 2001; Noller *et al.*, 2001, Ramakrishnan, 2002; Yonath, 2002). De plus, elles constituent une richesse pour ceux qui s'intéressent aux structures d'ARN et aux interactions ARN-protéines. En effet, l'élucidation de la structure du ribosome 70S et de ses sous-unités a multiplié par plus de cinq fois le nombre de structures d'ARN et de complexes ARN-protéines déterminés à une résolution atomique. Récemment, les avancées technologiques ont permis la détermination de la structure cristallographique du ribosome 70S d'*E. coli* à une résolution de 9 Å, malgré son instabilité et sa faible résistance aux bombardements par des rayons X (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2003), indiquant qu'il sera probablement possible d'élucider bientôt sa structure à haute résolution. Les sections suivantes traitent de la description des structures à résolution atomique obtenues durant les dernières années avec les ribosomes ou les sous-unités d'organismes thermophiles ou halophiles.

1.2.2.3.1 Structure cristallographique des sous-unités ribosomiques

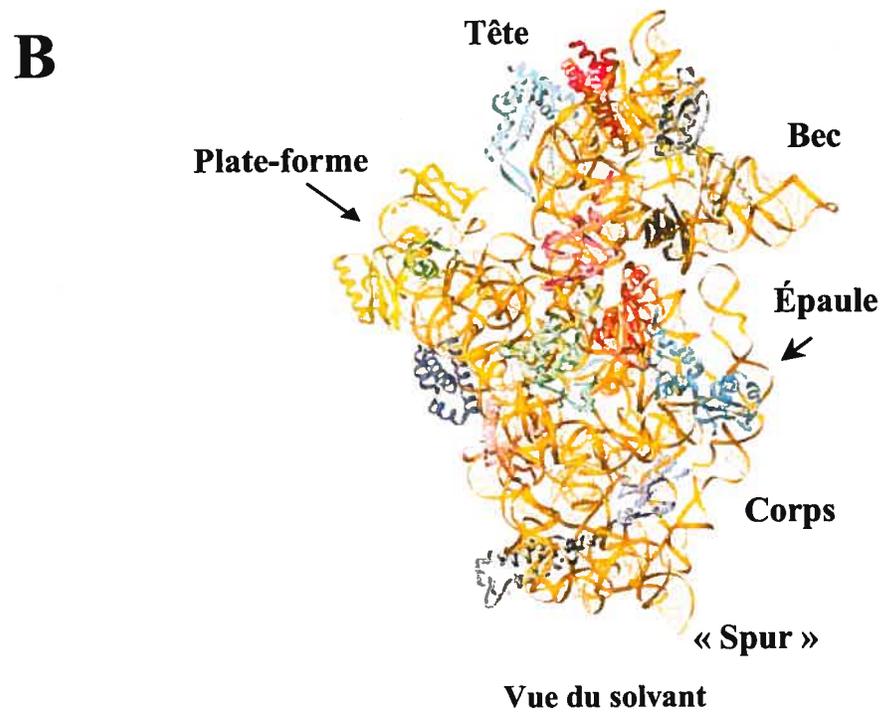
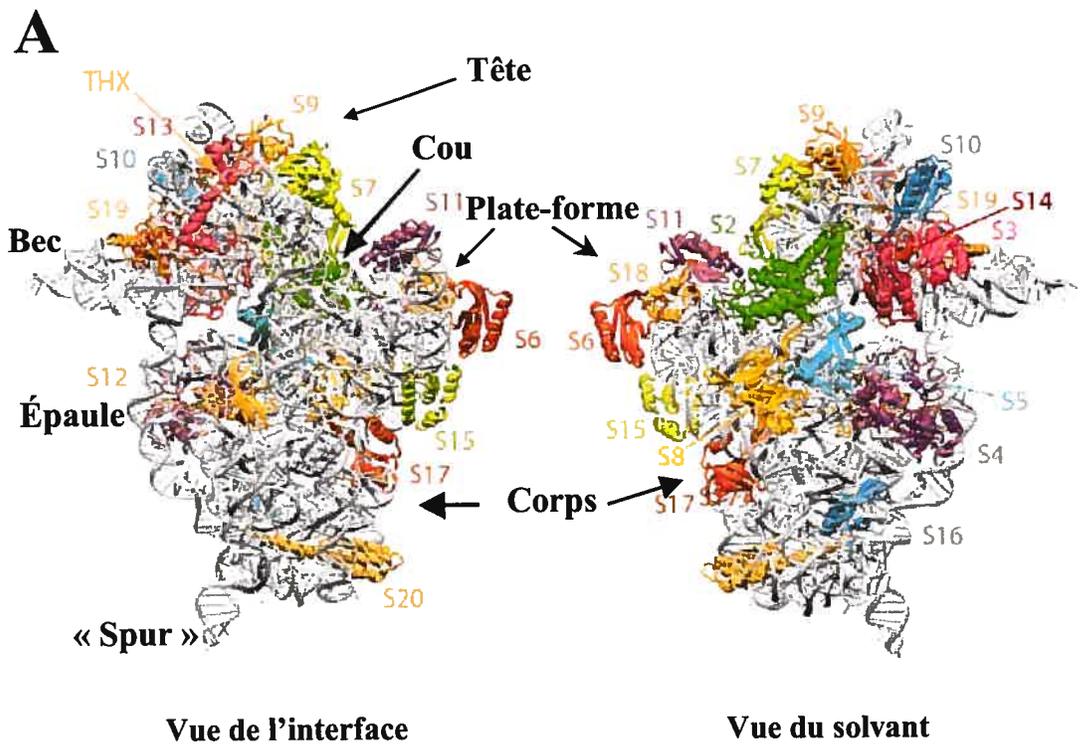
1.2.2.3.1.1 Structure de la sous-unité 30S

En 2000, le groupe de Ramakrishnan et celui de Yonath ont publié indépendamment la structure cristallographique de la sous-unité 30S provenant de la bactérie thermophile *T. thermophilus* à une résolution atomique (Figure 1-13A et B; Wimberly *et al.*, 2000, Schlünzen *et al.*, 2000). Ces structures montrent la quasi-totalité des nucléotides de l'ARNr 16S ainsi que 19 protéines (S2 à S20) et un court peptide, nommé THX qui n'existe pas chez *E. coli* (la protéine S1 a été enlevée avant la cristallisation et la sous-unité 30S de *T. thermophilus* ne contient pas de protéine S21). Les structures de cette sous-unité obtenues par les deux groupes sont très similaires et le

Figure 1-13: Structure de la sous-unité 30S de la bactérie *T. thermophilus* obtenue par cristallographie aux rayons X.

A. Structure obtenue par le groupe de Ramakrishnan à une résolution de 3.0 Å (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). L'ARNr est coloré en gris et les protéines de différentes couleurs. La sous-unité est présentée de deux côtés pour montrer la différence entre le nombre de protéines à l'interface et du côté du solvant.

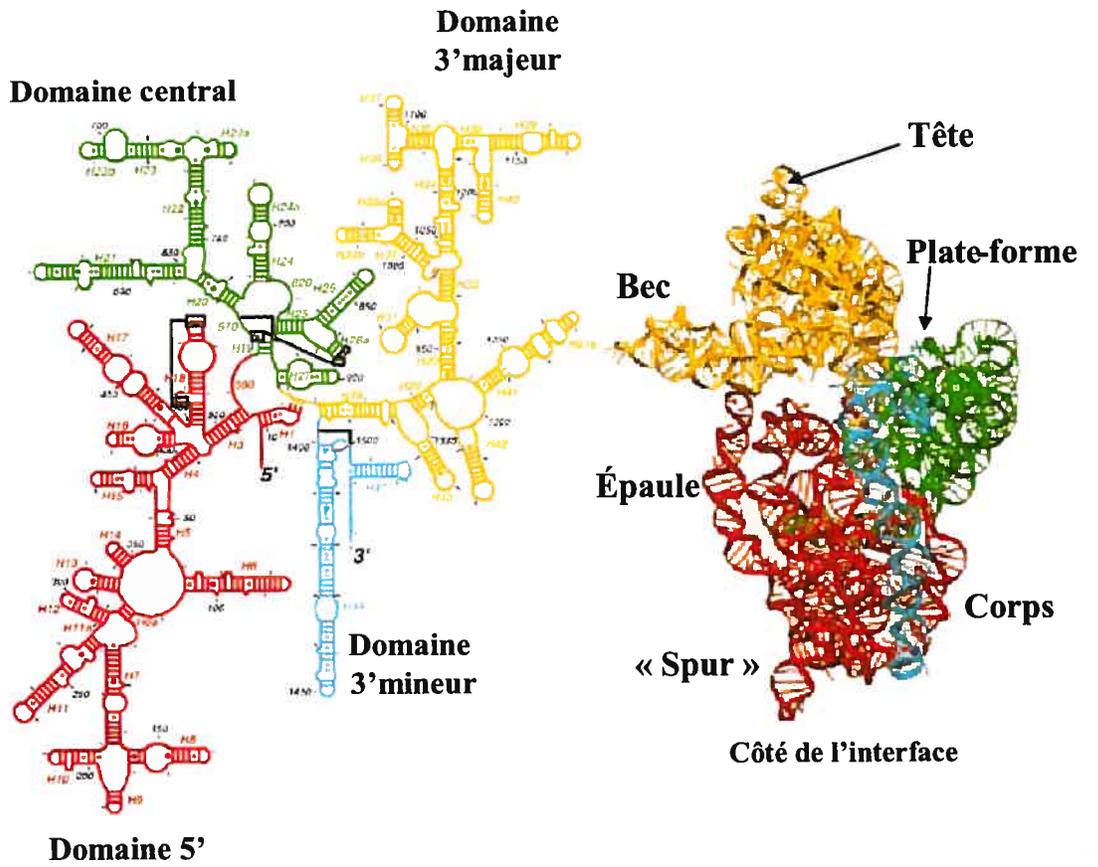
B. Structure obtenue par le groupe de Yonath à une résolution de 3.3 Å (adapté de Schlünzen *et al.*, 2000). L'ARNr est coloré en orange et les protéines de différentes couleurs.



repliement de l'ARNr d'une structure se superpose très bien sur l'autre (revues par Ramakrishnan et Moore, 2000; Puglisi *et al.*, 2000; Wimberly, 2003). Les divergences mineures entre les structures publiées par les groupes de Ramakrishnan et de Yonath sont d'ailleurs encore minimisées dans une publication subséquente du groupe de Yonath (Pioletti *et al.*, 2001). La morphologie de la sous-unité 30S est en accord avec celle établie auparavant par la cryo-ME. Il est intéressant de remarquer que la structure de la 30S est déterminée par le repliement de l'ARNr 16S où chacun des domaines de cet ARNr 16S forme une structure distincte de la 30S (Figure 1-14). En effet, la tête est composée du domaine 3' majeur, le corps, du domaine 5' avec l'hélice 6 formant le « spur », c'est-à-dire l'excroissance à la base du corps et la plate-forme est composée du domaine central. La longue hélice 44 qui fait partie du domaine 3' mineur descend le long du corps de la sous-unité 30S, comme il avait été observé par cryo-ME. La tête est liée au corps par le cou qui est composé de l'hélice 28.

La structure secondaire de l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S est formée par plus de 50 hélices régulières connectées entre elles par de courtes régions irrégulières à simple brin. Cette structure correspond au modèle de repliement secondaire de cet ARNr basé sur des analyses phylogénétiques (voir section 1.2.1.2.1). Il est intéressant de constater que la plupart des motifs de structures secondaires identifiés dans l'ARNr 16S (et aussi dans les ARNr 23S et 5S) ont été observés dans d'autres structures d'ARN, ce qui indique que le nombre de motifs structuraux secondaires possibles d'ARN est limité (Ramakrishnan et Moore, 2001). L'analyse des structures cristallographiques des sous-unités ribosomiques a néanmoins permis la découverte d'un nouveau motif de structure secondaire, le motif « K-turn » ou « kink-turn », qui est répété deux fois dans l'ARNr 16S et six fois dans l'ARNr 23S (Klein *et al.*, 2001). Il s'agit d'une hélice irrégulière qui subit un changement d'orientation de 120° au niveau d'une boucle asymétrique de trois bases. Cette boucle est entourée de deux paires canoniques C-G d'une part et de deux paires non-canoniques G-A de l'autre. Les deux portions hélicoïdales de la boucle forment une interaction de type A-mineur entre elles, c'est-à-dire une interaction entre leur sillon mineur impliquant des adénines non-appariées (voir plus bas dans cette section). Dans ce motif, le sillon majeur de l'une des portions de l'hélice contenant le

Figure 1-14: Répartition des domaines de l'ARNr 16S dans la structure de la sous-unité 30S obtenue par cristallographie aux rayons X (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). Le domaine 5' est en rouge, le domaine central est en vert, le domaine 3' majeur en jaune et le domaine 3' mineur en bleu.



« kink-turn » est élargi et le sillon mineur de l'autre portion est aplati (Klein *et al.*, 2001). L'exposition des bases et du squelette de la boucle non-appariée de ce motif permet des interactions avec des protéines (voir section 1.2.2.3.1.1).

Le repliement tridimensionnel global de l'ARNr 16S se fait principalement par des empilements coaxiaux verticaux (« stacking ») et des interactions horizontales (« packing ») entre les hélices (Wimberly *et al.*, 2000, Schlünzen *et al.*, 2000). Le motif le plus commun correspond à l'arrimage de deux hélices différentes par l'interaction de leurs sillons mineurs (Figure 1-15A). Le sillon d'une des deux hélices est souvent agrandi par la présence d'adénines appariées de manière non canonique ou simplement en « bulge » (en bleu dans la Figure) qui favorisent l'interaction avec l'autre hélice. Ce motif, déjà observé dans la structure de l'intron du groupe I (Cate *et al.*, 1996), a été nommé le motif A-mineur par le groupe de Steitz (Nissen *et al.*, 2001). Le deuxième motif d'interaction en importance est formé par l'insertion d'une série de phosphates d'une hélice dans le sillon mineur d'une autre hélice (Figure 1-15B). Cette interaction est stabilisée par des contacts entre les oxygènes des phosphates et les groupements hydroxyles et amides de guanines (en bleu dans la Figure 1-15B). Un autre mode d'interaction hélice-hélice, plus rare, rencontré trois fois dans l'ARNr 16S, utilise une purine non-appariée pour permettre l'interaction d'une hélice avec une hélice perpendiculaire (Figure 1-15C). Enfin, un motif d'interaction entre sillons mineurs d'hélices a été identifié récemment par le groupe de Steinberg (Figure 1-15D) (Gagnon et Steinberg, 2002). Ce motif, nommé motif à récepteur GU et observé quatre fois dans la 30S, consiste en une interaction entre deux hélices parallèles, impliquant un des contacts entre une paire G-U d'une hélice et une paire Watson-Crick d'une autre hélice. En plus des motifs d'interaction hélice-hélice, d'autres motifs classiques de repliement d'ARN ont été observés dans la 30S, comme des pseudo-nœuds, des bases triples, des interactions tétraboucle-récepteurs et des « zippers » de riboses qui se caractérisent par des interactions hydrogènes successives entre les positions 2'-OH de riboses d'un même brin ou de différents brins de l'ARN.

Figure 1-15: Différents motifs d'interaction entre les hélices de l'ARNr 16S (voir détails dans le texte).

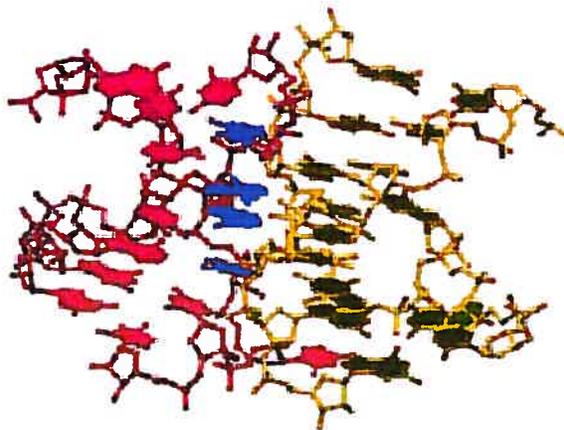
A. Motif d'interaction le plus commun, dénommé motif A-mineur. Les adénines en bleu font la majorité des ponts hydrogènes entre deux hélices (rose et jaune) (adapté de Wimberly *et al.* 2000). La figure montre l'interaction entre les hélices 6 et 8 de l'ARNr 16S.

B. Second motif d'interaction en importance qui consiste en l'insertion d'une série de phosphates d'une hélice (jaune) dans le sillon mineur d'une hélice adjacente (rose). Les guanines en bleu sont impliquées dans la formation des ponts hydrogènes avec les oxygènes des groupements phosphates de l'autre hélice (adapté de Wimberly *et al.* 2000). La figure montre l'interaction entre le squelette de l'hélice 7 avec le sillon mineur de l'hélice 21.

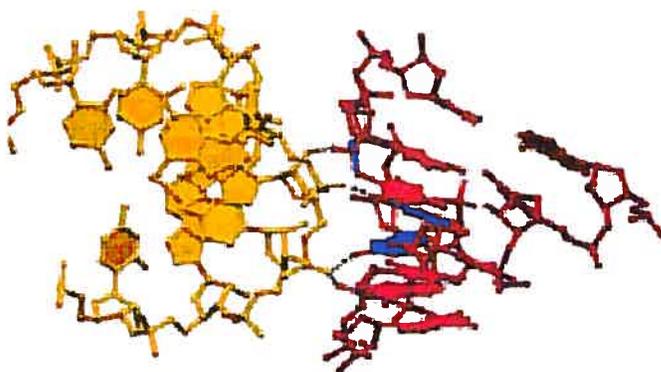
C. Motif d'interaction plus rare qui utilise une purine non-appariée (en bleu) d'une hélice (en jaune) pour permettre l'interaction entre deux autres hélices (en rose) (adapté de Wimberly *et al.* 2000). La figure montre l'interaction entre les hélices 1 et 28 qui est contrôlée par une purine non-appariée de l'hélice 27.

D. Motif d'interaction, nommé motif à récepteur GU, qui consiste en l'interaction des sillons mineurs de deux hélices. Dans ce motif, une paire G-U (en bleu) d'une hélice s'empile sur une paire Watson-Crick (en rouge) d'une autre hélice (adapté de Gagnon et Steinberg, 2002).

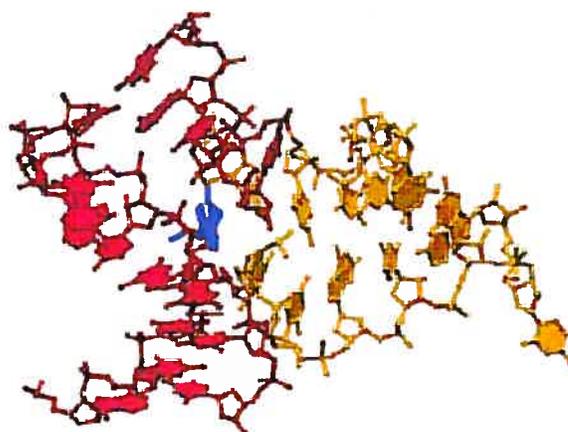
A



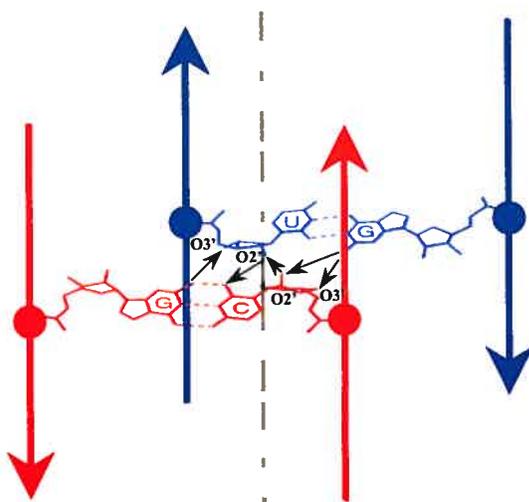
B



C

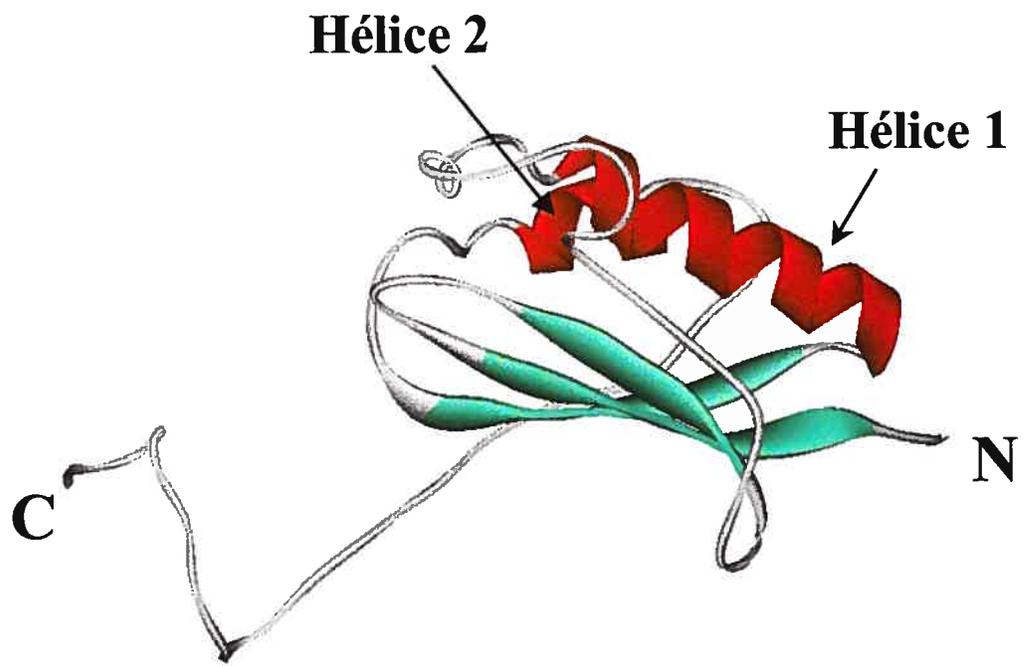


D



Dans la sous-unité 30S, les protéines sont nombreuses du côté du solvant et pratiquement absentes à l'interface (Wimberly *et al.*, 2000, Schlünzen *et al.*, 2000, revue par Brodersen *et al.*, 2002). Les seules protéines présentes à l'interface des deux sous-unités sont les protéines S12, S13 et S19. De plus, près de la moitié des protéines se trouvent dans la tête (8 sur 20). L'élucidation de la structure de la sous-unité 30S a permis de caractériser les structures des protéines ribosomiques qui n'avaient pas été obtenues par cristallographie aux rayons X ou par RMN. L'analyse de ces structures indique que la plupart d'entre elles contiennent un ou deux domaines globulaires. Les interactions des protéines ribosomiques avec l'ARNr sont présentées dans la section 1.2.2.3.3. Une particularité des protéines ribosomiques est, qu'en plus de contenir des domaines globulaires, plus de la moitié d'entre elles possèdent des extensions riches en résidus basiques qui s'insèrent à l'intérieur de l'ARNr et qui contribuent à stabiliser sa structure. Certaines de ces extensions contiennent des hélices (S13, S14) ou se présentent comme de longues extensions en feuillet β (S7, S10 et S17), ou encore sont des extensions N ou C-terminales non structurées (S4, S7, S9, S11, S12, S13 et S19). La majorité de ces extensions n'étaient pas visibles dans les structures des protéines isolées déterminées par cristallographie aux rayons X ou par RMN, car elles sont probablement trop flexibles en l'absence d'ARN. Un exemple de ces extensions concerne la protéine S12, dont le domaine globulaire se localise à l'interface entre les sous-unités, mais dont l'extension traverse complètement la sous-unité 30S pour interagir avec les protéines S8 et S17 à la surface externe de la sous-unité. La structure cristallographique de la 30S nous apprend que la protéine S11 est une protéine très compacte, qui contient un domaine composé de deux hélices α surplombant un feuillet β de cinq brins parallèles et antiparallèles. S11 possède aussi une extension C-terminale longue de 17 acides aminés (Figure 1-16). En général, les structures des protéines ribosomiques dans la sous-unité 30S sont similaires à celles qui avaient été déterminées pour ces protéines isolées. Dans le cas de la protéine S7, la seule différence entre les deux structures est l'orientation du feuillet β qui est presque perpendiculaire au domaine compact formé par les hélices dans la structure de la protéine isolée, alors qu'il est parallèle à ce domaine lorsque S7 est incorporée dans la sous-unité 30S (voir Figure 1.9 et 5.1).

Figure 1-16: Structure tridimensionnelle de la protéine ribosomique S11 obtenue à partir de la structure cristalline de la sous-unité 30S (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). La protéine contient un feuillet β (en turquoise) à brins parallèles et anti-parallèles sur lequel se superposent deux hélices α (en rouge). C et N désignent respectivement l'extrémité C-terminale et N-terminale de la protéine.



Outre les nombreuses interactions ARN-ARN et ARN-protéines, il y a dans la sous-unité 30S plusieurs interactions protéines-protéines (revue par Brodersen *et al.*, 2002). Par exemple, les protéines S3, S10 et S14 interagissent via un vaste réseau d'interactions hydrophobes dans la tête de la sous-unité, qui stabilisent ce domaine. De leur côté, les protéines S4, S5 et S8 interagissent plutôt par des ponts électrostatiques et hydrogènes. L'interaction entre S4 et S5 se produit à la jonction du corps (domaine 5' de l'ARNr 16S) et de la plate-forme (domaine central de l'ARNr 16S) et joue un rôle dans de la sélection des ARNt par le ribosome (voir section 1.4.2.1). Une longue chaîne d'interaction se produit aussi entre les protéines S9, S7, S11, S18 et S6. Le contact entre S7 et S11 se fait via la queue C-terminale flexible de S7, qui interagit avec la boucle qui précède la première hélice α de S11. Tout comme l'interaction S4-S5, l'interaction impliquant S7 et S11 relie deux domaines distincts de la sous-unité 30S, la tête (domaine 3' majeur de l'ARNr 16S) et la plate-forme (domaine central de l'ARNr 16S). Finalement, d'autres contacts ont été observés entre les protéines S13 et S19 et entre les protéines S12, S17 et S8.

1.2.2.3.1.2 Structure de la sous-unité 50S

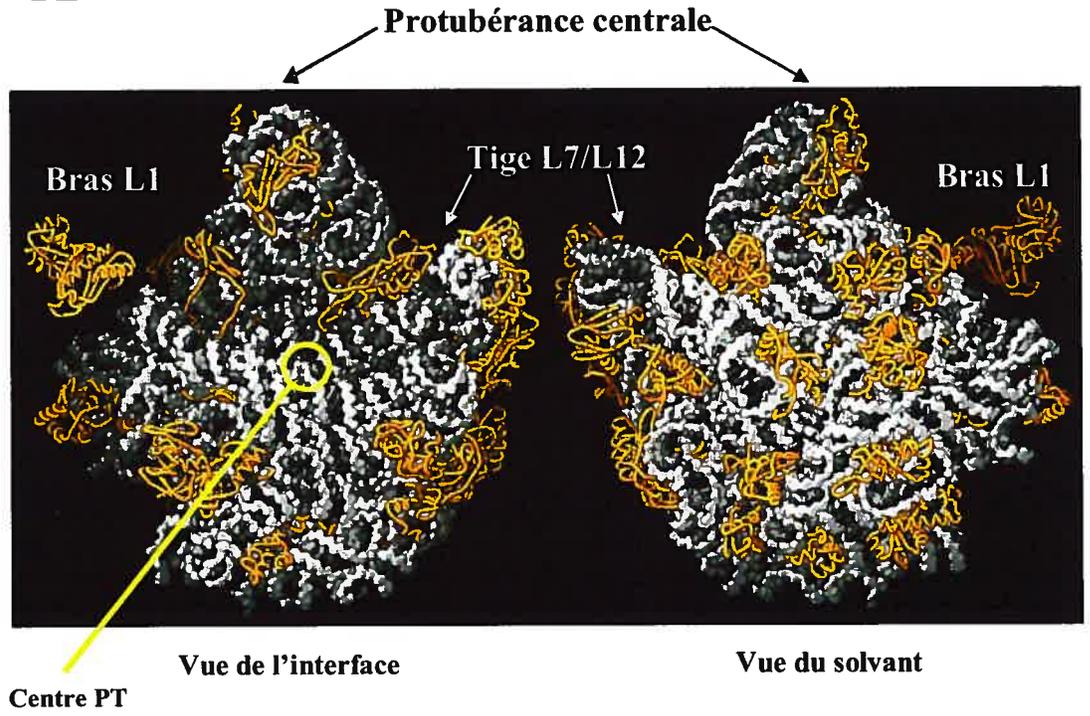
En 2000, le groupe de Steitz a déterminé la structure de la sous-unité 50S provenant de l'archaebactérie *Haloarcula marismortui* à une résolution de 2.4 Å (Figure 1-17A) (Ban *et al.*, 2000) et en 2001 le groupe de Yonath a déterminé la structure de cette sous-unité de l'eubactérie *Deinococcus radiodurans* à une résolution de 3.1 Å (Figure 1-17B) (Harms *et al.*, 2001). Comme ce fut le cas pour les deux structures cristallographiques publiées de la sous-unité 30S par les groupes de Ramakrishnan et de Yonath, les deux structures de la sous-unité 50S sont très semblables et la quasi-totalité de l'ARNr est visible dans les deux cas (plus de 93% des bases) (revues par Ramakrishnan et Moore, 2000; Puglisi *et al.*, 2000; Wimberly, 2003). La différence principale entre les deux structures réside au niveau des portions de l'ARNr impliquées dans les ponts entre les deux sous-unités. Ces régions sont désordonnées dans la structure de Ban *et al.*, mais non dans celle de Harms *et al.* Il y a aussi des différences au niveau des protéines ribosomiques dont le nombre et l'identité varient d'un organisme à

Figure 1-17: Structure de la sous-unité 50S obtenue par cristallographie aux rayons X.

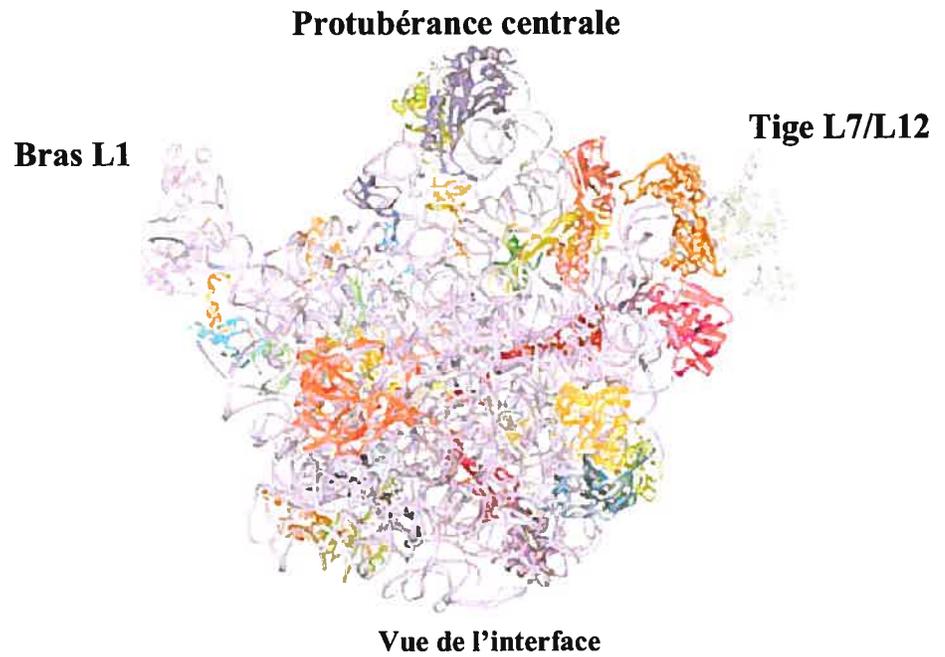
A. Structure de la sous-unité 50S de l'archaebactérie *H. marismortui* déterminée par le groupe de Steitz à une résolution de 2.4 Å (Ban *et al.*, 2000). L'ARNr est coloré en gris et les protéines en orange. La sous-unité est présentée de deux côtés pour montrer la différence entre le nombre de protéines à l'interface et du côté du solvant.

B. Structure de la sous-unité 50S de la bactérie *D. radiodurans* déterminée par le groupe de Yonath à une résolution de 3.0 Å (Harms *et al.*, 2001). L'ARNr est coloré en violet et les protéines sont de différentes couleurs.

A

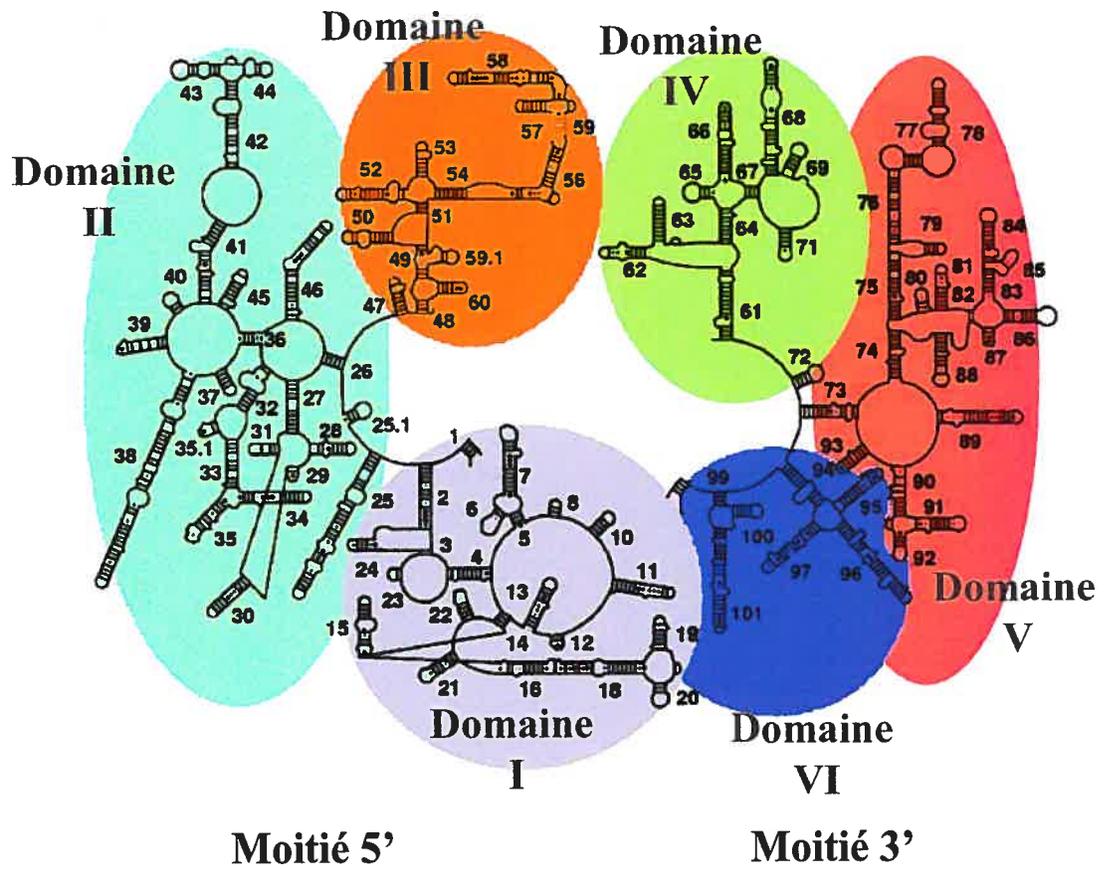
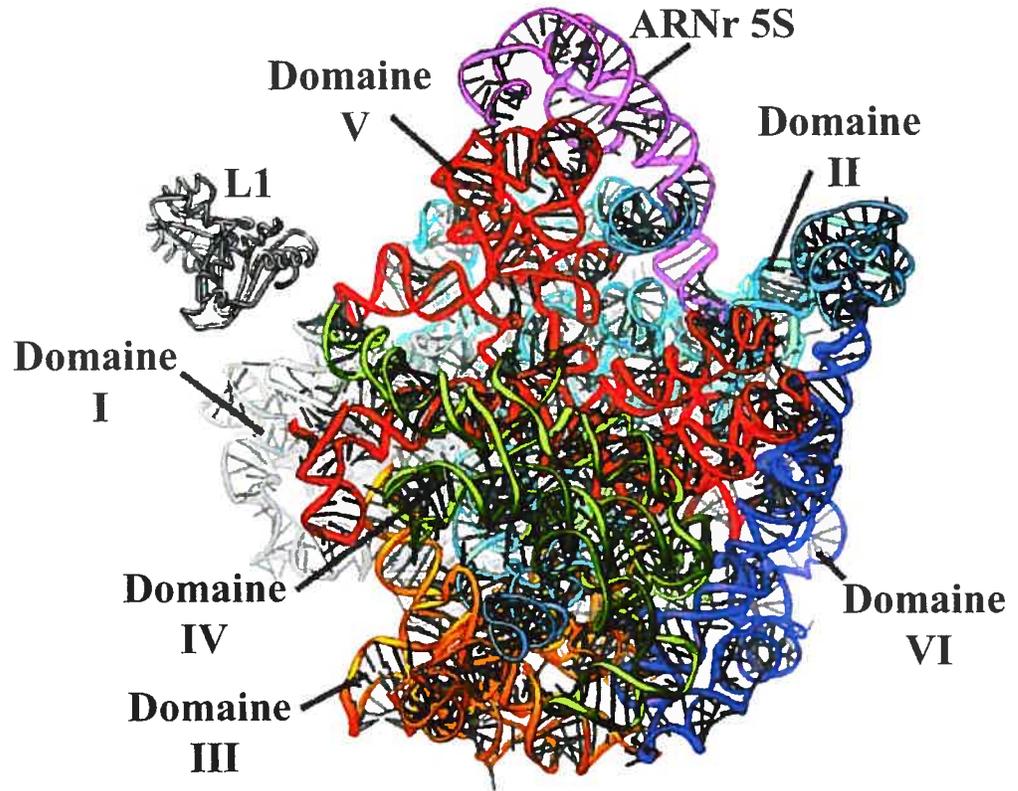


B



l'autre. La sous-unité 50S de *H. marismortui* contient 31 protéines alors que la sous-unité de *D. radiodurans* en contient 33. De plus, une dizaine de protéines de *H. marismortui* sont homologues de protéines exclusivement trouvées chez les eucaryotes, qui n'existent pas dans la sous-unité 50S de *D. radiodurans*. Par contre, la disposition et la conformation des protéines communes aux sous-unités des deux organismes sont très semblables. La comparaison de la structure de la 50S de *H. marismortui* avec la structure de la sous-unité 50S d'*E. coli* obtenue à une résolution de 7.5 Å par cryo-ME indique que les régions dont les séquences sont conservées au travers des espèces se superposent très bien dans les deux structures (Brimacombe, 2000). En détail, la structure cristalline montre que la sous-unité 50S est hémisphérique comme cela avait été observé auparavant par ME. On distingue aussi la protubérance centrale, alors que les portions de la 50S correspondant au bras L1 et à la tige L7/L12 sont trop mobiles pour être détectables à haute résolution et sont placées d'après les informations fournies par la cryo-ME. Ainsi, les protéines L1, L11, L10 et L17/L12 sont absentes de la structure de la 50S de *H. marismortui* alors que seules des portions des protéines L1, L10 et L17/L12 apparaissent dans la structure de *D. radiodurans*. L'interface avec la 30S est relativement plat, à l'exception du centre qui possède une crevasse suffisamment large pour accommoder l'extrémité 3'-CCA de l'ARNt au site A, où est attaché l'acide aminé, et l'extrémité 3'-CCA de l'ARNt au site P, qui porte le peptide en croissance. La structure confirme la présence d'un tunnel long de 100 Å et large de 15 Å qui débute à partir du centre de la crevasse et qui s'étend jusqu'au bas de la sous-unité. Ce tunnel correspond au chemin emprunté par le peptide en croissance et sa sortie est composée presque exclusivement de protéines, dont L4 et L22 qui pourraient avoir un rôle dans le repliement des peptides en croissance. Comme pour la sous-unité 30S, c'est le repliement des ARNr 23S et 5S qui détermine la conformation globale de la sous-unité. Par contre, la structure de la 50S diffère de la 30S par le fait que les six domaines de l'ARNr 23S sont entrelacés d'une manière complexe, formant un bloc monolithique, contrairement à la 30S où les domaines de l'ARNr 16S forment des structures morphologiques distinctes (Figure 1-18). Le domaine I est localisé du côté du solvant de la sous-unité, derrière et sous le bras L1. Le domaine II, le plus grand des domaines de

Figure 1-18: Localisation des domaines de l'ARNr 23S et de l'ARNr 5S dans la structure de la sous-unité 50S obtenue par cristallographie aux rayons X (image du haut) (Ban *et al.*, 2000). L'ARNr 5S est coloré en violet et les domaines de l'ARNr 23S sont colorés comme indiqué dans la structure secondaire de l'ARNr 23S (image du bas).



l'ARNr 23S, est aussi situé principalement du côté du solvant de la sous-unité, mais il contient trois régions qui traversent la sous-unité et qui rejoignent l'interface. Le domaine III est petit et globulaire et il est situé au bas de la 50S, du côté du bras L1. La surface correspondant à l'interface de la sous-unité est essentiellement constituée du domaine IV. Le domaine V est placé entre les domaines IV et II au milieu de la sous-unité. Comme il en sera question plus tard, c'est à ce domaine qu'est associée l'activité catalytique du ribosome. Le plus petit domaine de l'ARNr 23S, le domaine VI, forme la majeure partie de la surface du ribosome sous la tige L7/L12 qui est exposée au solvant. Finalement, l'ARNr 5S est situé au sommet de la protubérance centrale et s'étend jusqu'à la tige L7/L12. La différence dans la répartition de l'ARNr entre les deux sous-unités reflète probablement le besoin pour la sous-unité 30S d'une grande flexibilité durant la traduction, ce qui n'est pas le cas de la 50S. L'ARNr 23S de la grande sous-unité se replie en une centaine de sections hélicoïdales comme l'avaient prédit les études phylogénétiques (voir section 1.2.1.2.1). Le repliement tertiaire de cet ARNr se fait d'une manière similaire à celui de l'ARNr 16S dans la petite sous-unité. En effet, les mêmes motifs d'interaction entre les hélices de l'ARNr sont observés dans la 50S. Par exemple, comme pour la 30S, le motif A-mineur est celui qui est représenté le plus grand nombre de fois dans la 50S et le motif de type récepteur G-U, qui avait été trouvé quatre fois dans la 30S, a été observé huit fois dans la 50S (Gagnon et Steinberg, 2002).

Les protéines de la 50S sont dispersées à la surface externe de la sous-unité, alors que l'interface, comme pour la 30S, est pratiquement dépourvue de protéines. C'est cette région qui contient les bases de l'ARNr qui sont les plus conservées au travers des espèces. Une exception est observée dans la 50S de *D. radiodurans* où la protéine L27, qui n'existe pas chez *H. marismortui*, est située à l'interface des deux sous-unités ribosomiques. L'analyse des interactions ARN-protéines de la 50S indique, qu'en général, les protéines de cette sous-unité sont globulaires et possèdent des extensions encore plus longues que celles des protéines de la 30S, suggérant de solides associations avec l'ARN. Ceci explique la difficulté rencontrée à extraire toutes les protéines ribosomiques de la 50S, que ce soit avec des détergents ou au phénol/chloroforme (Noller *et al.*, 1992; Khaitovich *et al.*, 1999). Cinq protéines sont associées à l'ARNr 5S

dans la sous-unité de *H. marismortui* au niveau de la protubérance centrale, alors qu'il y en a six chez *D. radiodurans*.

Plusieurs interactions protéines-protéines sont aussi visibles dans la sous-unité 50S. Par exemple, il y a des interactions qui interviennent dans la tige L7/L12 et qui impliquent les protéines L7/L12 et L10. Plusieurs autres interactions impliquent un groupe de protéines contenant L3, L6, L13, L14 et L19 du côté de la tige L7/L12 chez *D. radiodurans*. Chez *H. marismortui*, la protéine L19 de cette chaîne d'interaction n'existe pas. Elle est remplacée par la protéine L24e, qui est une protéine homologue aux protéines eucaryotes.

1.2.2.3.2. Structure du ribosome 70S

La structure cristallographique du ribosome 70S de *T. thermophilus* a été déterminée à une résolution de 5.5 Å par le groupe de Noller (Figure 1-19A) (Yusupov *et al.*, 2001). Dans cette structure, le ribosome est complexé à un fragment de 36 nucléotides de l'ARNm du gène 32 du phage T4 et trois ARNt aux sites A, P et E. La structure correspond, en fait, à la combinaison de deux structures, l'une où les ribosomes contiennent les ARNt aux sites P et E et l'autre avec un ARNt au site A. À cette résolution, les auteurs ont pu identifier le squelette de l'ARN, mais pas celui des protéines. En utilisant les structures à haute résolution des sous-unités isolées, il a cependant été possible de positionner les protéines selon les densités électroniques observées (revue par Wimberly, 2003). La structure cristalline du ribosome 70S est très semblable à celle déterminée par la cryo-ME. De plus, les portions de la sous-unité 50S qui n'étaient pas ou guère visibles dans les structures des sous-unités 50S de *H. marismortui* et *D. radiodurans*, sont visibles dans celle du ribosome 70S grâce à la diminution de la flexibilité des sous-unités associées. Par exemple, dans le ribosome 70S la structure du bras L1 ainsi que celle de la tige L7/L12 sont clairement détectables.

La structure du ribosome 70S a permis de déterminer l'identité des bases de l'ARNr et des acides aminés des protéines impliqués dans la formation des ponts entre la petite et la grande sous-unité (Tableau 1-2, Figure 1-19B). L'ensemble des ponts

identifiés dans le ribosome 70S d'*E. coli* par cryo-ME ont aussi été observés dans la structure du ribosome 70S de *T. thermophilus*, mais la précision accrue de l'analyse de ces contacts a mené à une nouvelle nomenclature de ces ponts. La majorité des contacts entre les deux sous-unités se font via des ponts ARN-ARN, comme des expériences antérieures de protection contre des attaques chimiques l'avaient proposé (Merryman *et al.*, 1999a et b). Ces contacts sont composés d'une variété d'interactions impliquant, entre autres, des sillons mineurs ou majeurs d'hélices ainsi que des boucles ou le squelette de l'ARNr. Par contre, la formation des contacts entre les deux sous-unités ne dépend pas exclusivement de l'ARNr et certains ponts sont composés d'interactions ARN-protéines ou protéines-protéines, impliquant les protéines S13, S15, L2, L5, L14 et L19. Le pont auquel participe la protéine S15 avait d'ailleurs été identifié auparavant par clivage dirigé par des radicaux hydroxyles (Culver *et al.*, 1999).

Les positions des ARNt et de l'ARNm observées dans la structure du ribosome 70S correspondent à celles qui avaient été établies par la cryo-ME (voir section 1.2.2.2). Les ARNt aux sites A et P sont très proches alors que l'ARNt au site E est plus éloigné. Les boucles anticodons des ARNt sont positionnées au niveau du cou de la sous-unité 30S et interagissent avec les codons de l'ARNm (Figure 1-19C). L'endroit où s'effectue l'interaction codon-anticodon de l'ARNt au site A a d'ailleurs été nommé site de décodage. Les coudes des ARNt sont orientés vers le haut et les extrémités 3'-CCA sont positionnées au centre de la sous-unité 50S (Figure 1-19D), dans la région de l'ARNr 23S dénommé centre peptidyltransférase (PT), qui catalyse la formation du lien peptidique (voir section 1.4.2.2). Les interactions entre les ARNt et l'ARNm et le ribosome seront décrites aux sections 1.4.1.1 et 1.4.2.

1.2.2.3.3 Motifs d'interaction à l'ARNr dans les protéines ribosomiques

Les structures cristallographiques des sous-unités ribosomiques élucidées récemment nous renseignent non seulement sur la structure de l'ARN et des protéines, mais aussi sur les interactions ARN-protéines (Wimberly *et al.*, 2000; Schlünzen *et al.*,

Tableau 1-2: Liste des ponts entre les deux sous-unités ribosomiques. Les contacts sont indiqués entre parenthèses. M indique un contact impliquant le sillon majeur de l'ARN, m, un contact impliquant le sillon mineur de l'ARN, L, un contact avec une boucle de l'ARNr et B, un contact avec le squelette de l'ARN. Des combinaisons de lettres précisent la nature de l'interaction. Par exemple, L,m indique un contact avec une boucle de l'ARN, du côté du prolongement du sillon mineur de l'hélice précédant cette boucle (adapté de Yusupov *et al.*, 2001).

Pont	Type	30S		50S	
		Hélice de l'ARNr 16S ou protéine	Position	Hélice de l'ARNr 23S ou protéine	Position
B1a	Prot-ARN	S13	92-94	H38(L)	886-888
B1b	Prot-Prot	S13	NH ₂ -term	L5	134-153
B2a	ARN-ARN	H44(m)	1408-1410, 1494-1495	H69(Lm)	1913-1914, 1918
B2b	ARN-ARN	H24(m,LM)	784-785,794	H67(m), H69(M)	1836-1837, 1922
	ARN-ARN	H45(LM,Lm)	1516-1519	H71(M), H69(B)	1919-1920, 1932
B2c	ARN-ARN	H24(Bm)	770-771	H67(B)	1832-1833
	ARN-ARN	H27(Bm)	900-1	H67(B)	1832-1833
B3	ARN-ARN	H44(m)	1484-1486	H71(m)	1947-1948, 1960-1961
B4	ARN-ARN	H20(m)	763-764	H34(Lm)	717-718
	Prot-ARN	S15	40-44, COOH-term	H34(LB,LM)	713, 717
B5	ARN-ARN	H44(m)	1418-1419	H64(m)	1768-1769
	ARN-Prot	H44(B)	1420-1422	L14	44-49
	ARN-ARN	H44(B)	1474-1476	H62(Bm)	1689-1690
	ARN-ARN	H44(B)	1474-1476	H64(m)	1989
B6	ARN-ARN	H44(m)	1429-1430, 1474-1476	H62(m)	1689-1690, 1702-1705
	ARN-Prot	H44(B)	1431	L19	(Hm24e:R44)
B7a	ARN-ARN	H23(L,m)	698,702	H68(m)	1848-1849, 1896
B7b	ARN-Prot	H23(M,m)	712-713	L2	162-164, 172-174, 177-178
	ARN-Prot	H24(M,m)	773-776	L2	177-178, 198-202
B8	ARN-Prot	H14(LM)	345-347	L14	116-119

Figure 1-19: Structure du ribosome 70S complexé aux ARNt et à l'ARNm à une résolution de 5.5 Å, déterminée par cristallographie aux rayons X par le groupe de Noller (Yusupov *et al.*, 2001, adapté de Ramakrishnan, 2002). Les ARNt aux sites A, P et E sont indiqués en rouge, vert et jaune, respectivement.

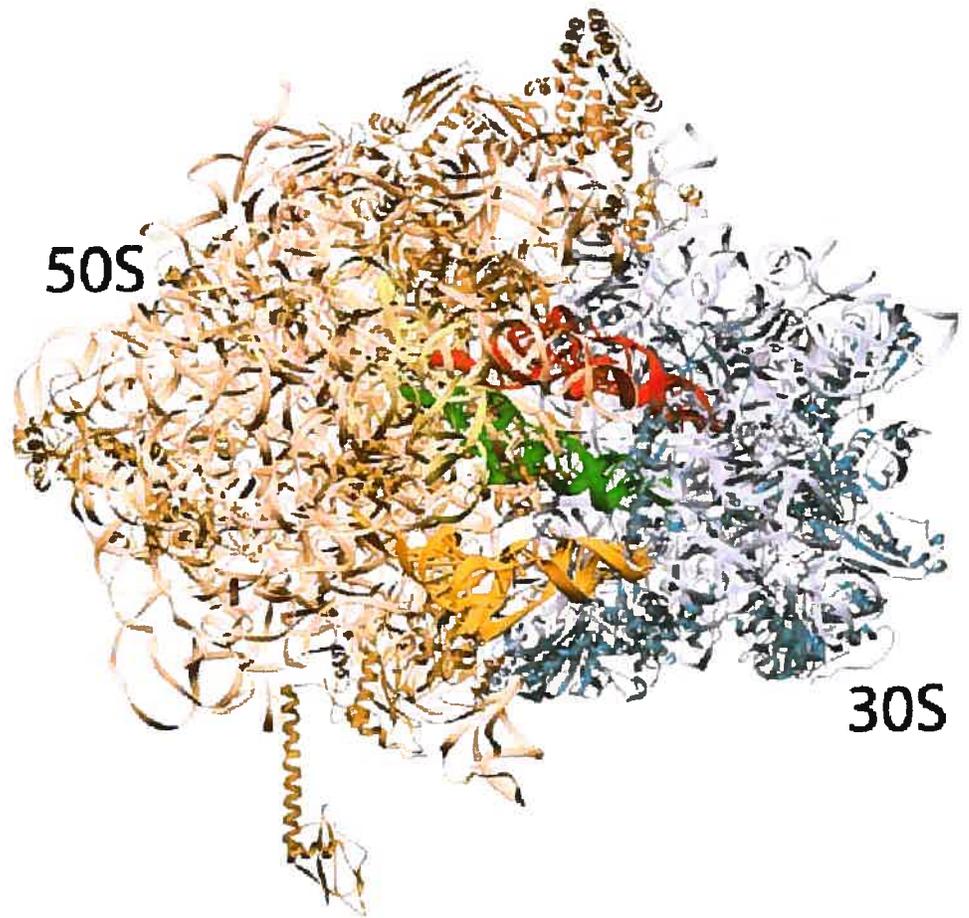
A. Structure du ribosome 70S vue du haut.

B. Localisation des ponts entre les deux sous-unités du ribosome 70S de *T. thermophilus*. Les composantes de chaque sous-unité participant à la formation des ponts sont colorées en jaune lorsqu'il s'agit de contacts ARN-protéines ou protéines-protéines et en mauve s'il s'agit de contacts ARN-ARN.

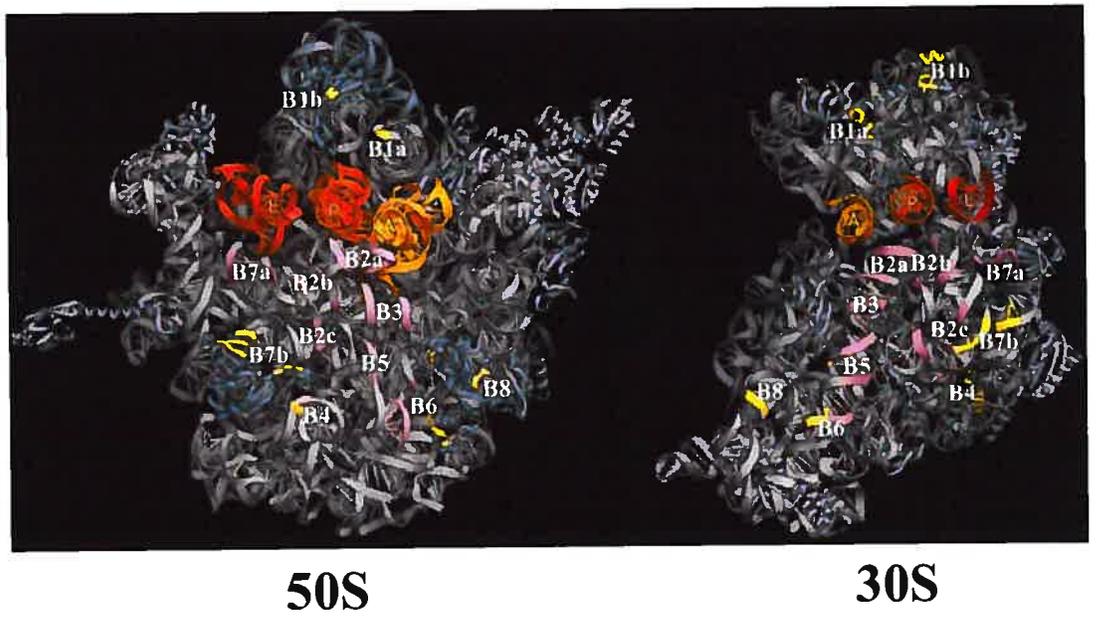
C. Positionnement des ARNt et de l'ARNm par rapport à la 30S. L'ARNm est positionné autour du cou de la 30S et est coloré en beige. Le site de décodage, où s'effectue l'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt au site A, est indiqué.

D. Positionnement des ARNt et de l'ARNm par rapport à la 50S. L'endroit dans le ribosome où se trouve l'activité peptidyltransférase est indiqué.

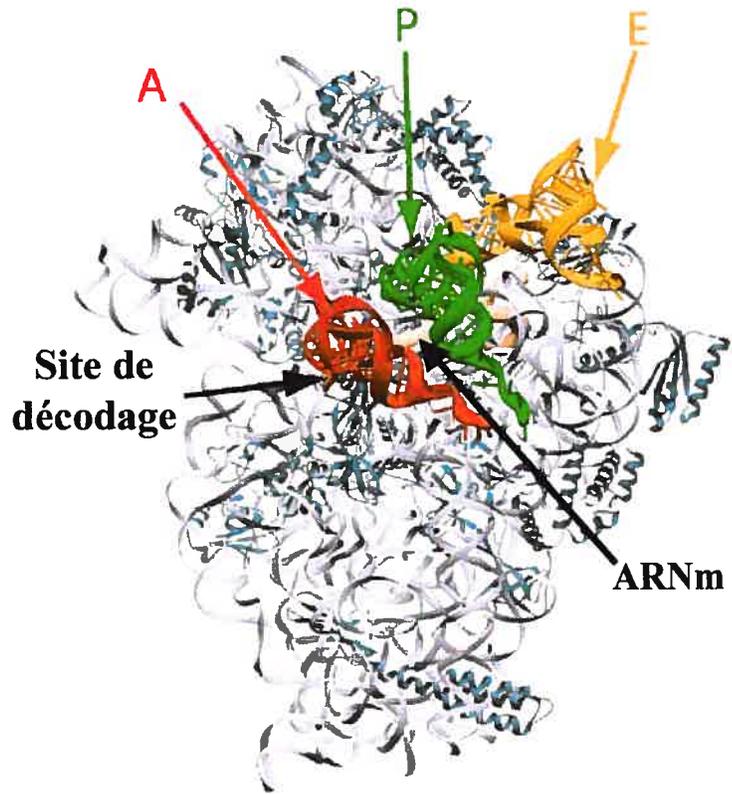
A



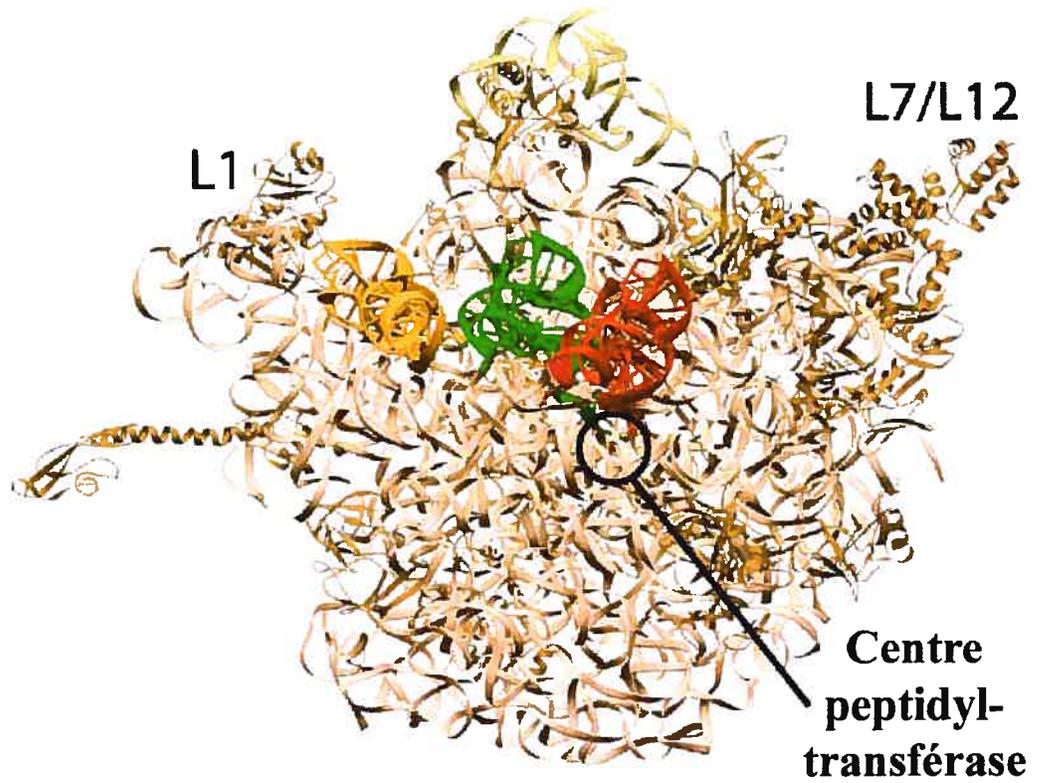
B



C



D



2000; Ban *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001). Grâce à ces publications, près de 50 structures de complexes ARN-protéines ont été déterminés à haute résolution. Comme mentionné auparavant, la plupart des protéines ribosomiques sont globulaires et ne possèdent généralement qu'un ou deux domaines compacts qui leur servent de surface d'interaction avec l'ARN, en plus d'extensions non structurées qui s'insèrent à l'intérieur des sous-unités. En général, plus la protéine est petite, plus la portion de sa surface qui est en contact avec l'ARNr est grande (Brodersen *et al.*, 2002). Ceci indique que les petites protéines sont souvent complètement entourées d'ARNr alors que les grandes reposent plutôt à la surface du ribosome. Les données des interactions ARN-protéines dans le ribosome montrent le rôle primordial des protéines ribosomiques dans le contrôle de la conformation de l'ARNr. En effet, plus du tiers des bases de l'ARNr 16S, 23S ou 5S font des contacts avec les protéines et plusieurs protéines interagissent simultanément avec plus d'une région de l'ARN. Ceci est particulièrement vrai pour les protéines qui sont essentielles pour initier l'assemblage des sous-unités (voir section 1.3). En général, les protéines ribosomiques font plus de contacts électrostatiques avec le squelette qu'avec les bases de l'ARN, ce qui s'explique par leur contenu élevé en résidus basiques. Le squelette et les bases des régions de l'ARNr qui interagissent avec les protéines ribosomiques sont, la plupart du temps, exposés par la présence de régions à simple brin ou à cause de distorsions dans les hélices. Ces distorsions sont généralement causées par des « bulges » ou des paires non-canoniques, comme il avait été observé dans d'autres complexes ARN-protéines. Par exemple, des huit motifs « kink-turn » retrouvés dans le ribosome (voir section 1.2.2.3.1.1), deux interagissent avec des protéines de la 30S (S11 et S17) et cinq avec des protéines de la 50S.

La plupart des protéines qui se lient à l'ARN sont groupées en familles selon les motifs séquentiels et structuraux communs qu'elles contiennent (revues par Mattaj, 1993; Burd et Dreyfuss, 1994; Nagai, 1996; Varani, 1997). Cette classification peut être utilisée pour les protéines ribosomiques puisque plusieurs d'entre elles possèdent des motifs connus de liaison avec les acides nucléiques, comme l'ont montré leurs structures isolées, leurs structures complexées à un fragment d'ARNr contenant leur site de liaison ou leurs structures dans les sous-unités ribosomiques (revues par Draper et Reynaldo,

1999; Al-Karadaghi *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000). Cependant, il semble que les protéines ribosomiques utilisent souvent ces motifs différemment pour interagir avec l'ARNr (pour une revue détaillée des motifs de liaison à l'ARN retrouvés dans les protéines ribosomiques, voir Ramakrishnan et White, 1998; Brodersen *et al.*, 2002).

Parmi les motifs d'interaction à l'ARN trouvés dans des protéines ribosomiques, le plus connu est sans nul doute le motif RNP (« ribonucleoparticle »), aussi appelé RRM (« RNA recognition motif »). Ce motif avait d'abord été identifié dans la protéine PABP qui se lie à la queue de poly-(A) des ARNm eucaryotes (Dreyfuss *et al.*, 1988). La cristallisation du complexe entre la protéine U1A et un petit ARN nucléaire, U1, a permis l'élucidation du motif RNP (Nagai *et al.*, 1990). Dans ce motif, quatre brins β forment un feuillet antiparallèle sur lequel s'appuient deux hélices α , d'où le nom de structure « sandwich » α - β appliqué à ce motif. Des résidus du feuillet β et des boucles joignant les brins β sont responsables de l'interaction avec l'ARN. Ce motif d'interaction est très souvent rencontré dans les protéines ribosomiques même si le nombre de brins du feuillet β et d'hélices α varie d'une protéine à l'autre. Parmi les protéines qui contiennent ce motif, on trouve entre autres les domaines C-terminaux des protéines S3 et S5, ainsi que les domaines N-terminaux des protéines L1 et L9, et les protéines S6, S9, S10, S11 L6, L7/L12, L18, L22 et L30. Cependant, les protéines n'utilisent pas ces motifs de la même manière pour interagir avec l'ARN. Par exemple, c'est la surface plane des feuillets β des protéines S9 et S11 qui interagit avec l'ARNr alors que les protéines S6 et S10 utilisent la partie latérale du feuillet β pour interagir avec l'ARNr (Figure 1-20A). Étrangement, bien que la protéine S3 possède un tel motif, il n'est guère utilisé pour interagir avec l'ARNr et sert plutôt pour interagir avec S10 et S14.

Un second motif d'interactions ARN-protéines classique est le motif ARM (« arginine rich motif »). Ses représentants les plus connus sont les protéines Rev et Tat du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ce motif se caractérise par une prépondérance d'arginines ou de lysines dans une courte séquence de 10 à 20 acides aminés (revues par Burd et Dreyfuss, 1994; Varani, 1997). Aucune structure spécifique

ne lui est associée, car le motif ARM de Tat est désordonné (Calnan *et al.*, 1991), alors que celui de Rev forme une hélice α (Tan *et al.*, 1993). Ce motif est rencontré fréquemment dans les protéines ribosomiques. En effet, presque toutes les extensions des protéines sont riches en résidus basiques (jusqu'à près de 65% des résidus chez certaines protéines). Par exemple, S9 et S13 font la majorité de leurs contacts avec l'ARNr via leur longue extension riche en résidus basiques (Figure 1-20B).

Un autre motif est le motif KH (« K homology »), d'abord identifié dans la protéine K des complexes ribonucléoprotéiques hétéronucléaires (Siomi *et al.*, 1993). Dans cette protéine, une séquence consensus I/L/VIGxxGxxI/L/V (où I, L, V, G désignent les acides aminés selon le code habituel et x correspond à n'importe lequel des acides aminés) apparaît dans un contexte de 40 acides aminés. La structure du motif KH a été élucidée par RMN, avec la vigilline humaine qui est une protéine impliquée dans le transport des ARNt. Il s'agit d'un feuillet β dans un contexte $\beta\alpha\beta\beta$, un arrangement structural qui implique aussi un « sandwich » α - β (Morelli *et al.*, 1995). L'analyse de la séquence de S3 avait prédit l'existence d'un tel motif (Siomi *et al.*, 1993), et l'examen de la structure de S3 dans la 30S a confirmé cette prédiction.

Le motif d'interaction à doigt de zinc a d'abord été identifié dans le facteur de transcription IIIA de *Xenopus Laevis* (revues par Burd et Dreyfuss, 1994; Draper, 1995). Via ses neuf motifs en doigts de zinc, cette protéine lie l'ARNr 5S ainsi que le gène correspondant. Chacun des doigts est associé à un atome de zinc en complexe de coordination avec des cystéines et forme deux courts brins β antiparallèles suivis d'une hélice α . Cette hélice forme les contacts spécifiques avec l'ARNr en s'insérant dans le sillon majeur. Huit protéines ribosomiques contiennent des motifs à doigt de zinc impliqués dans leur interaction avec l'ARNr. Ce sont les protéines S4 et S14 de la 30S (Figure 1-20C), les protéines L32 et L36 de la sous-unité 50S de *D. radiodurans* et les protéines L24e, L37e, L37ae et L44e de la 50S de *H. marismortui*, des protéines homologues à des protéines eucaryotes, sans correspondance chez les protéines bactériennes.

Un motif de liaison spécifique à l'ARN à double brin (dsRBD) est aussi trouvé chez certaines protéines ribosomiques. Constitué d'environ 70 acides aminés, principalement basiques et hydrophobes, ce motif ne lie spécifiquement l'ARN que lorsqu'il est présent en plus d'une copie dans une protéine. C'est le cas de la protéine Staufen qui contient cinq de ces motifs et qui est impliquée dans le transport des ARNm chez les eucaryotes (Ferradon *et al.*, 1994). La topologie structurale du domaine est un feuillet β à trois brins antiparallèles sur lequel s'appuient deux hélices α . Il s'agit donc d'une topologie en « sandwich » α - β , mais ici, une longue boucle relie les brins 1 et 2 du feuillet β . Une seule protéine ribosomique contient un tel domaine de liaison à l'ARN. Il s'agit du domaine N-terminal de la protéine S5. Bien que ce domaine se superpose très bien sur celui de la protéine Staufen (Bycroft *et al.*, 1995) ou sur celui d'une autre protéine, la protéine A liant l'ARN à double brin (Ryter *et al.*, 1998), S5 utilise ce motif d'une manière différente pour interagir avec l'ARNr. En effet, ce sont les hélices α du troisième motif de Staufen qui font la plupart des contacts avec l'ARN (Ramos *et al.*, 2000), alors que c'est le feuillet β de S5 qui interagit principalement avec l'ARNr (Figure 1-20D).

Enfin, un dernier motif connu de liaison à l'ARN, typique des ARNt synthétases, est aussi présent dans la protéine ribosomique L25. Ce motif comprend deux feuillets β (baril β) entourés d'hélices α (Rould *et al.*, 1991). Encore une fois, même si la conformation de la protéine se superpose sur celle de la glutamyl-ARNt synthétase, le mode d'interaction est très différent puisque L25 n'utilise pas le même côté du baril β que celui de la synthétase pour interagir avec l'ARNr (Stoldt, 1999; Lu et Steitz, 2000). L'analyse de la structure à haute résolution des protéines ribosomiques isolées ou bien complexées à un fragment d'ARNr contenant leur site de liaison ou encore incorporées dans les sous-unités ribosomiques, a aussi indiqué que certaines de ces protéines possèdent des motifs de liaison rencontrés dans les interactions protéines-ADN à simple brin (Figure 1-21) (revues Al-Karadaghi *et al.*, 2000). C'est le cas des protéines S1, S12, S17 et du domaine N-terminal de L2, qui possèdent un motif de liaison trouvé dans la

nucléase staphylococcale, ainsi que dans deux toxines bactériennes, la sous-unité B de l'entérotoxine et la vérotoxine-1 (Figure 1-21A) (Murzin, 1993).

Figure 1-20: Exemple d'interactions entre l'ARNr 16S et des protéines ribosomiques contenant des motifs connus d'interactions avec l'ARN. Les bases de l'ARNr sont numérotées selon la séquence de *E. coli* et les résidus d'acides aminés des protéines sont numérotés selon la séquence de *T. thermophilus* (adapté de Brodersen *et al.*, 2002).

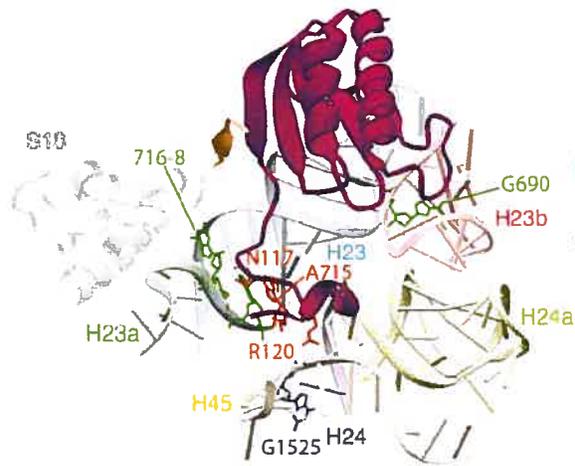
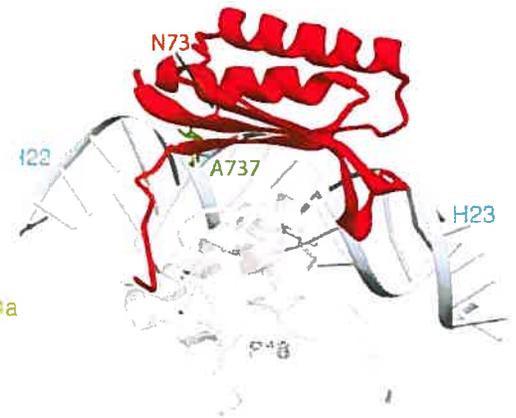
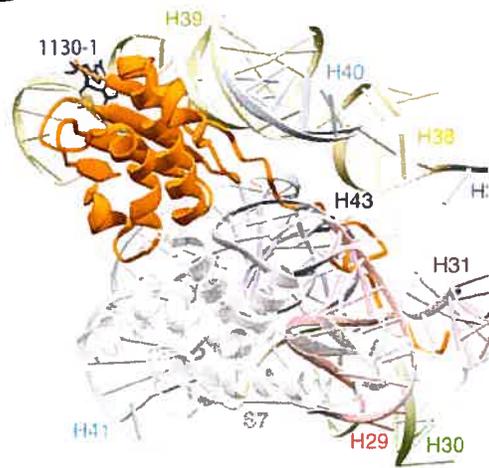
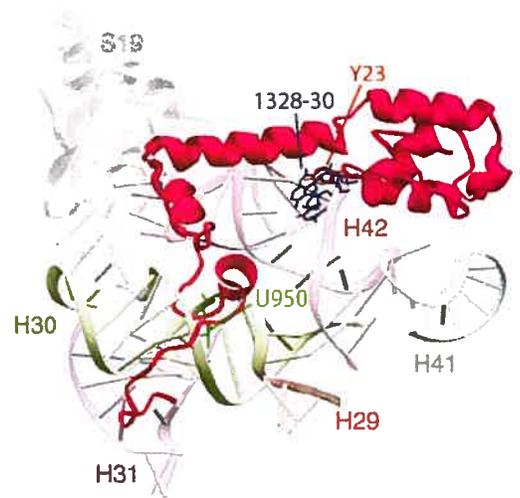
A. Structure du complexe entre l'ARNr et les protéines S11 et S6 qui contiennent le motif RNP. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui interviennent dans la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement. La protéine S18, avec laquelle S11 et S6 interagissent, est aussi représentée en blanc.

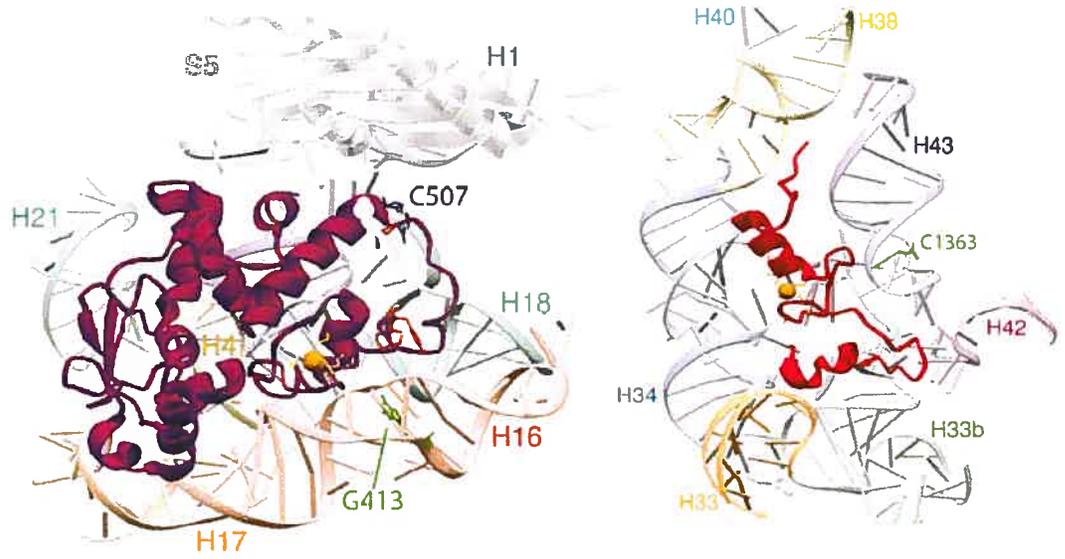
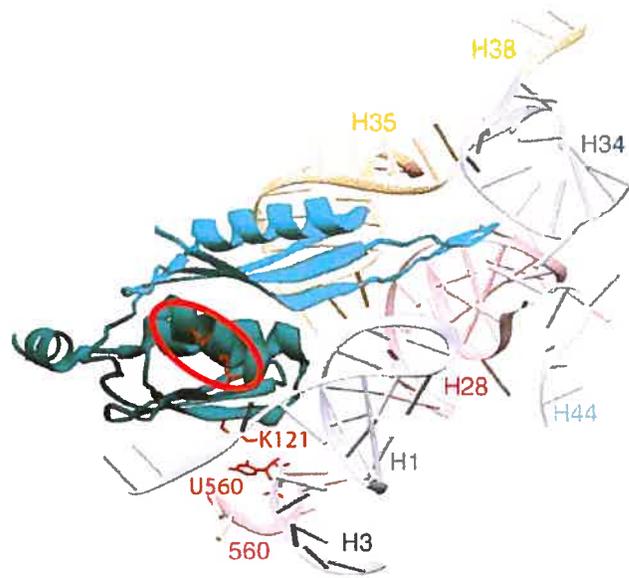
B. Structure du complexe entre l'ARNr et les protéines S9 et S13 qui contiennent le motif ARM. Une grande partie des contacts que font ces protéines avec l'ARNr implique des résidus d'arginine et de lysine dans leur longue extrémité C-terminale. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui participent à l'interaction sont colorés en bleu foncé et en rouge, respectivement. La protéine S7, avec qui S9 interagit, et la protéine S19, qui interagit avec S13, sont aussi représentées en blanc.

C. Structure du complexe entre l'ARNr et les protéines S4 et S14 qui contiennent un motif à doigt de zinc. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui sont importants pour la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement. L'atome de zinc et les résidus avec lesquels il interagit sont colorés en jaune. La protéine S5, avec laquelle S4 interagit, est indiquée en blanc.

D. Structure du complexe entre l'ARNr et la protéine S5 avec l'ARNr 16S dont le domaine N-terminal contient le motif dsRBD (bleu foncé). Le contact principal ARN-S5 est indiqué par des résidus identifiés en rouge.

Les acides aminés entourés d'un cercle rouge dans l'une des hélices α de S5 sont impliqués dans l'interaction avec la protéine S4.

A**S11****S6****B****S9****S13**

C**S4****S14****D****S5**

l'entérotoxine et la vérotoxine-1 (Figure 1-21A) (Murzin, 1993). Ce motif, nommé OB, permet aux protéines d'interagir avec des oligonucléotides ou des oligosaccharides. Il est composé d'un feuillet β de cinq brins, formant un baril β , et une hélice α est positionnée entre les troisièmes et quatrièmes brins β . Les brins du feuillet β sont joints par des boucles de longueurs différentes avec lesquelles les protéines interagissent avec l'ADN. Dans les sous-unités ribosomiques, ce motif est utilisé d'une manière similaire par les protéines ribosomiques S12, S17 et le domaine N-terminal de L2 pour interagir avec l'ARNr (La protéine S12 ne possède cependant pas d'hélice α) (Nakagawa *et al.*, 1999). Dans le cas de S1, la protéine contient six de ces motifs alignés les uns après les autres. Toutefois, cette protéine n'est pas présente dans les cristaux des sous-unités ribosomiques qui ont été analysés et l'on ignore comment elle interagit avec l'ARNr.

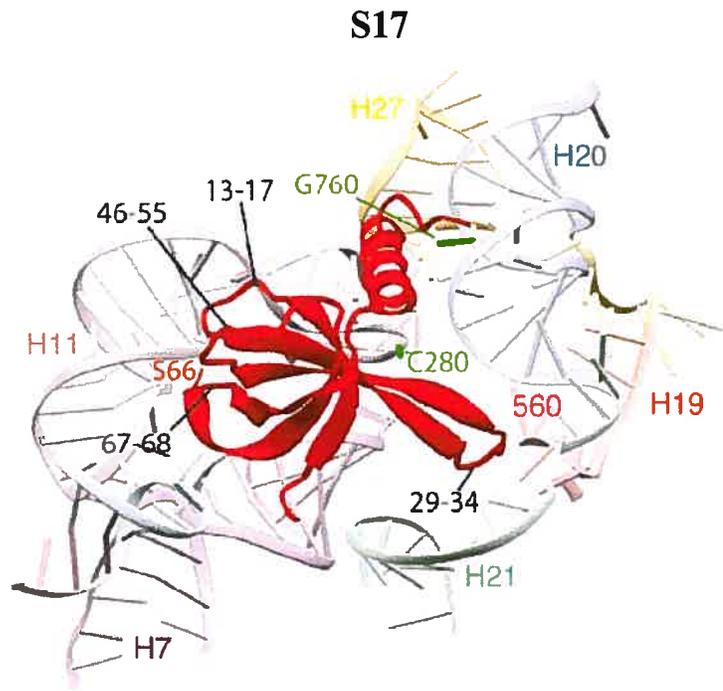
Finalement, d'autres protéines ribosomiques utilisent des motifs pour lier l'ARNr qui ont été observés dans des protéines qui interagissent avec l'ADN à double brin (revues par Al-Karadaghi *et al.*, 2000). C'est le cas du domaine central de la protéine S4 (Figure 1-20C), qui se replie comme le domaine ETS des facteurs de transcription ETS eucaryotes (Donaldson *et al.*, 1996). Cependant, on ignore si les modes d'interaction avec les acides nucléiques de S4 et des facteurs ETS sont similaires, car aucune structure à haute résolution d'un facteur de la famille ETS complexé à l'ADN n'est disponible. La même situation est rencontrée pour le domaine C-terminal de L2 qui contient un baril SH3 formé de deux feuillets β à trois brins (Nakagawa *et al.*, 1999). Ce motif est trouvé chez plusieurs protéines qui lient l'ADN, comme l'intégrase du VIH (Lodi *et al.*, 1995), mais on ne connaît pas les détails de sa structure en complexe avec l'ADN. Le domaine C-terminal de la protéine L11 interagit avec l'ARNr 23S en utilisant un motif caractéristique des homéodomains (Conn *et al.*, 1999; Wimberly *et al.*, 1999; Nikulin *et al.*, 2003) comme le facteur de transcription HNF-3/forkhead (Clark *et al.*, 1993). L'arrangement des hélices α et du feuillet β du domaine N-terminal de S8 est semblable à celui retrouvé dans diverses protéines liant l'ADN (Davies *et al.*, 1996; Nevskaya *et al.*, 1998) (Figure 1-21B), comme la DNase I (Weston *et al.*, 1992) et l'ADN méthyltransférase HaeIII (Reinisch *et al.*, 1995). Cet arrangement permet à S8 de reconnaître une section à double brin de l'ARNr 16S.

Figure 1-21: Exemple d'interactions entre l'ARNr 16S et des protéines ribosomiques qui contiennent des motifs connus de liaison à l'ADN. Les bases de l'ARNr sont numérotées selon la séquence de *E. coli* et les acides aminés des protéines sont numérotés selon la séquence de *T. thermophilus* (adapté de Brodersen *et al.*, 2002).

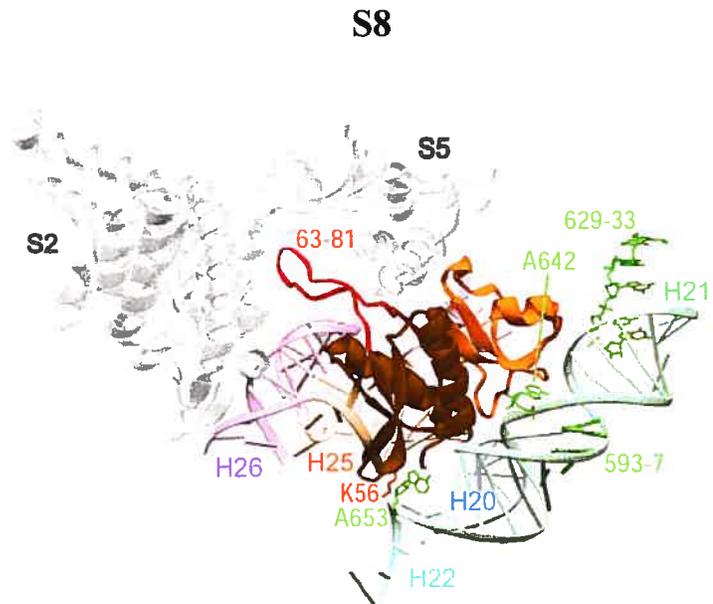
A. Structure du complexe entre l'ARNr et la protéine S17, qui contient un motif OB. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui interviennent dans la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement.

B. Structure du complexe entre l'ARNr et la protéine S8 dont le domaine N-terminal se replie comme le domaine d'interaction de la DNase I avec l'ADN. Les bases de l'ARNr et les résidus d'acides aminés des protéines qui interviennent dans la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement.

A



B



Les interactions ARN-protéines contrôlent le repliement de l'ARNr et, comme nous l'avons vu, le ribosome constitue une riche source d'informations pour l'étude de ces interactions. Nous nous intéressons particulièrement à la protéine S7 qui organise le repliement du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S (voir section 1.3). En permettant ce repliement, S7 induit la liaison d'autres protéines et permet la formation de la tête de la sous-unité 30S. Des études de pontage et de protections ont suggéré que S7 interagit avec plusieurs sites du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S (voir section 1.2.1.3). De plus, la structure cristallographique de S7 de bactéries thermophiles a révélé que la protéine se replie de la même manière que des protéines de la famille HU qui se lient à l'ADN à double brin. Ceci a notamment permis de suggérer que S7 peut interagir avec une portion à double brin de l'ARNr 16S (voir section 1.2.2.1). Nous avons décidé de caractériser le mode d'interaction de S7 avec l'ARNr 16S en introduisant des délétions et des mutations en des sites choisis de la protéine susceptibles de participer à son interaction avec l'ARNr 16S. Quand nous avons entamé cette étude, seule la structure cristalline de la protéine isolée était disponible. Nous avons pu ensuite analyser nos résultats à la lumière de la structure cristallographique de la sous-unité 30S (voir section 5.1 dans la Discussion).

1.2.2.3.4 Analyse des données génétiques, biophysiques et biochimiques face à la structure cristallographique du ribosome et de ses sous-unités.

Les récentes structures cristallographiques du ribosome 70S bactérien et de ses sous-unités permettent d'analyser la validité de l'ensemble des données biochimiques, biophysiques et génétiques de la structure du ribosome établies au cours des trente dernières années. Tout d'abord, il a été possible de vérifier les modèles de la structure secondaire des ARNr (Gutell *et al.*, 2002). L'analyse indique que le premier modèle du groupe de Gutell, qui a été conçu à partir de quelques séquences seulement, a prédit correctement 60% des paires de base de l'ARNr 16S et 78% de celles de l'ARNr 23S. Les modèles les plus récents du même groupe qui sont basés sur environ 7000 séquences

de l'ARNr 16S et 1050 séquences de l'ARNr 23S prédisent environ 98% des paires de bases observées dans les cristaux des sous-unités ribosomiques.

Les structures cristallographiques des sous-unités ribosomiques permettent aussi de vérifier la validité des résultats obtenus avec les techniques de sondage du repliement tertiaire de l'ARNr et du positionnement des protéines dans le ribosome 70S (Sergiev *et al.*, 2001; Whirl-Carrillo *et al.*, 2002). Par exemple, Altman et ses collaborateurs ont recueilli plus de 2500 données concernant des relations de proximité ARN-ARN, ARN-protéines ou protéines-protéines dans le ribosome, dont 411 sont basées sur des pontages, 811 sur des empreintes et 1307 sur des clivages dirigés. Les résultats de ces analyses indiquent qu'aucune méthode d'étude des relations de voisinage n'est parfaite, mais certaines d'entre elles sont plus précises que d'autres. Concernant les données de pontages (voir sections 1.2.1.2.1, 1.2.1.2.2 et 1.2.1.3), l'analyse indique que les méthodes plus anciennes et moins complexes sont plus fiables que les méthodes sophistiquées utilisées de nos jours (Sergiev *et al.*, 2001; Whirl-Carrillo *et al.*, 2002). De plus, malgré l'énorme quantité d'agents pontants disponibles sur le marché, les rayons ultraviolets et la moutarde à l'azote ont donné les informations les plus précises sur les relations de voisinage dans le ribosome. Contrairement à ce qui était généralement admis, il n'y a pas de corrélation entre la longueur de l'agent pontant et la distance entre les sites pontés, indiquant que l'agent pontant est rarement en pleine extension lorsqu'il agit. La comparaison des résultats de pontage protéine-protéine avec les positions réelles de ces protéines dans les structures cristallographiques des sous-unités ribosomiques indique que 85% des pontages effectués dans la 30S étaient valables et que 50% de ceux effectués dans la grande sous-unité étaient corrects. Par contre, 70% des pontages entre des protéines situées à l'interface des sous-unités sont incompatibles avec la localisation de ces protéines dans le ribosome (Whirl-Carrillo *et al.*, 2002). Comme indiqué plus haut, ces erreurs sont probablement dues à une identification erronée des protéines pontées ou à l'utilisation de ribosomes ou de sous-unités dans des conformations inactives. Pour les pontages impliquant l'ARN, la détection des bases pontées est plus précise avec la technique de « fingerprinting » qu'avec la méthode d'extension d'amorce, où des arrêts non spécifiques de l'extension de l'amorce conduisent à des

erreurs. L'analyse révèle que l'identification de la protéine ribosomique impliquée dans un pontage par des anticorps polyclonaux ou encore selon la taille peut mener à des erreurs alors que la spectrométrie de masse est très précise. En ce qui concerne l'étude des interactions ARN-protéines par la méthode des empreintes sur l'ARNr (voir section 1.2.1.3), ce sont les clivages par radicaux qui ont fourni les meilleurs résultats. En général, les données des interactions ARN-protéines impliquant S7 et S11 sont en accord avec les données observées dans la structure cristallographique de la 30S. En effet, les bases pontées ou protégées par la liaison de S7 ou S11 sont proches de ces protéines dans la structure cristallographique de la 30S (voir section 5.1 de la Discussion pour une analyse détaillée de l'interaction entre S7 et l'ARNr 16S). Par contre, les pontages protéines-protéines impliquant S7 et S11 contenaient plusieurs erreurs. En effet, parmi les protéines pontées à S7, on trouve S12 de la petite sous-unité et L7/L12 de la grande sous-unité qui sont situées du côté opposé à S7 dans le ribosome. D'autre part, parmi les protéines pontées à S11, on trouve S8 et S13, deux protéines qui ne sont pas dans l'entourage immédiat de S11 dans la 30S (voir Figure 1-13 et 1-17).

En comparant la localisation des protéines d'*E. coli* dans les sous-unités par microscopie immuno-électronique et diffraction aux neutrons (voir section 1.2.1.3) à celle obtenue par la cristallographie aux rayons X pour les bactéries *T. thermophilus*, *H. marismortui* et *D. radiodurans*, quelques erreurs ont été détectées (Brodersen *et al.*, 2002). Par exemple, la protéine S20 avait été localisée en haut du corps par diffraction des neutrons, mais au bas de la sous-unité par ME et par cristallographie aux rayons X. Le positionnement de S20 au haut du corps serait d'un artefact lors de l'assemblage de la 30S à partir d'ARNr et de protéines, qui est requis pour la diffraction des neutrons.

Malgré tout, un examen des modèles de la 30S basés sur les données biochimiques et génétiques montre que ces modèles étaient relativement corrects et proches de la réalité, comme l'a ensuite révélé la structure cristalline, avec des déviations de seulement 26 à 46 Å selon les régions de la 30S (Whirl-Carrillo *et al.*, 2002).

1.3 Assemblage du ribosome

La corrélation directe entre le taux de croissance cellulaire et la biosynthèse des ribosomes souligne l'importance de l'assemblage rapide et correct des sous-unités à partir d'un transcrit d'ARNr et de protéines pour qu'il y ait une synthèse protéique efficace. Les études de l'assemblage du ribosome à partir de ses constituants ont débuté il y a plus de trente ans et, encore de nos jours, plusieurs questions concernant son mécanisme restent sans réponse. Les travaux du groupe de Nomura ont permis de découvrir que des sous-unités 30S pouvaient être assemblées spontanément à partir d'ARNr 16S et d'un mélange contenant toutes les protéines ribosomiques de la sous-unité 30S indiquant que l'assemblage peut se faire sans facteurs externes (Traub et Nomura, 1968; Held *et al.*, 1973; revues par Culver, 2003; Williamson, 2003). Ces sous-unités étaient fonctionnelles dans la synthèse protéique. Il a ensuite été montré qu'un ARNr 16S obtenu par transcription *in vitro* et où les modifications post-transcriptionnelles des bases n'ont donc pas eu lieu, peut être utilisé pour cet assemblage. Ceci indique que la 30S est capable de s'assembler sans que les bases de l'ARNr soient modifiées. Toutefois, dans ces conditions, les sous-unités sont légèrement moins efficaces dans la synthèse protéique par comparaison avec les 30S reconstituées avec un ARN 16S naturel (Melançon *et al.*, 1987; Krzyzosiak *et al.*, 1987).

Les études de reconstitution *in vitro* ont été mises à profit pour déterminer la hiérarchie suivant laquelle les protéines ribosomiques se lient à l'ARNr 16S (Held *et al.*, 1974). Ceci a conduit au classement des protéines ribosomiques de la 30S en trois groupes, selon l'ordre dans lequel elles s'assemblent dans la sous-unité. Le premier groupe contient les protéines primaires, S4, S7, S8, S15, S17 et S20, qui interagissent directement et individuellement avec l'ARNr 16S, sans l'aide d'aucune autre protéine. Le second groupe contient les protéines secondaires, S5, S6, S9, S11, S12, S13, S16, S18 et S19, dont la liaison nécessite préalablement celle d'au moins une protéine primaire. Finalement, la liaison des protéines du groupe tertiaire, S2, S3, S10, S14 et S21, dépend de celle d'au moins une des protéines de chacun des groupes précédents. La protéine S1 se lie probablement en dernier à la 30S. La détermination des relations de

dépendance et d'interdépendance dans la liaison des protéines à l'ARNr 16S a mené à la construction de la carte de l'assemblage de la sous-unité 30S. La Figure 1-22 montre une version modifiée de la carte publiée initialement par le groupe de Nomura (Culver, 2003). La modification concerne la protéine S13, dont la liaison dépend de celle des protéines S7, S9 et S19, et non de celle de S20, comme il avait été suggéré initialement. D'autres études de reconstitution de particules ribosomiques ont souligné l'importance du rôle des protéines S4 et S7 dans l'assemblage de la 30S, la première initiant le repliement du corps et l'autre de la tête de la sous-unité (Nowotny *et al.*, 1988). Le rôle prépondérant que jouent ces protéines dans l'assemblage n'est pas surprenant, compte tenu de la complexité des régions de l'ARNr 16S avec lesquelles elles interagissent, qui contiennent des jonctions de plusieurs hélices. Il a aussi été démontré que des fragments d'ARNr transcrits *in vitro* et correspondant aux différents domaines de l'ARNr 16S (5', central et 3' majeur) peuvent s'assembler indépendamment les uns des autres avec les protéines ribosomiques et former des particules ribonucléoprotéiques stables. Une fois que les particules ribonucléoprotéiques correspondant avec différents domaines sont assemblées, elles interagissent ensemble via de nouveaux contacts ARN-protéines et protéines-protéines. La protéine S4 initie le repliement du domaine 5' qui forme le corps de la sous-unité (Mandiyan *et al.*, 1991; Agalarov *et al.*, 1999), S15 est responsable de du repliement précoce du domaine central qui forme la plate-forme (Mandiyan *et al.*, 1991; Agalarov *et al.*, 1998; Agalarov et Williamson, 2000), alors que le domaine 3', qui constitue la tête de la 30S, est sous le contrôle de S7 (Samaha *et al.*, 1994; Agalarov *et al.*, 1999).

La méthode des empreintes, qui a été utilisée pour sonder les sites de liaison des protéines ribosomiques (voir section 1.2.1.3), a aussi été utilisée pour étudier la dynamique de l'assemblage de la sous-unité 30S. En effet, cette technique a permis de suivre les étapes du repliement de l'ARNr 16S, en identifiant les bases qui deviennent protégées, lors de l'addition successive des protéines (Powers *et al.*, 1993). Ces expériences ont montré que la liaison des protéines primaires induit les changements conformationnels qui permettent l'organisation des sites de liaison des protéines secondaires, puis tertiaires. Lors de l'assemblage, le repliement de l'ARNr 16S débute

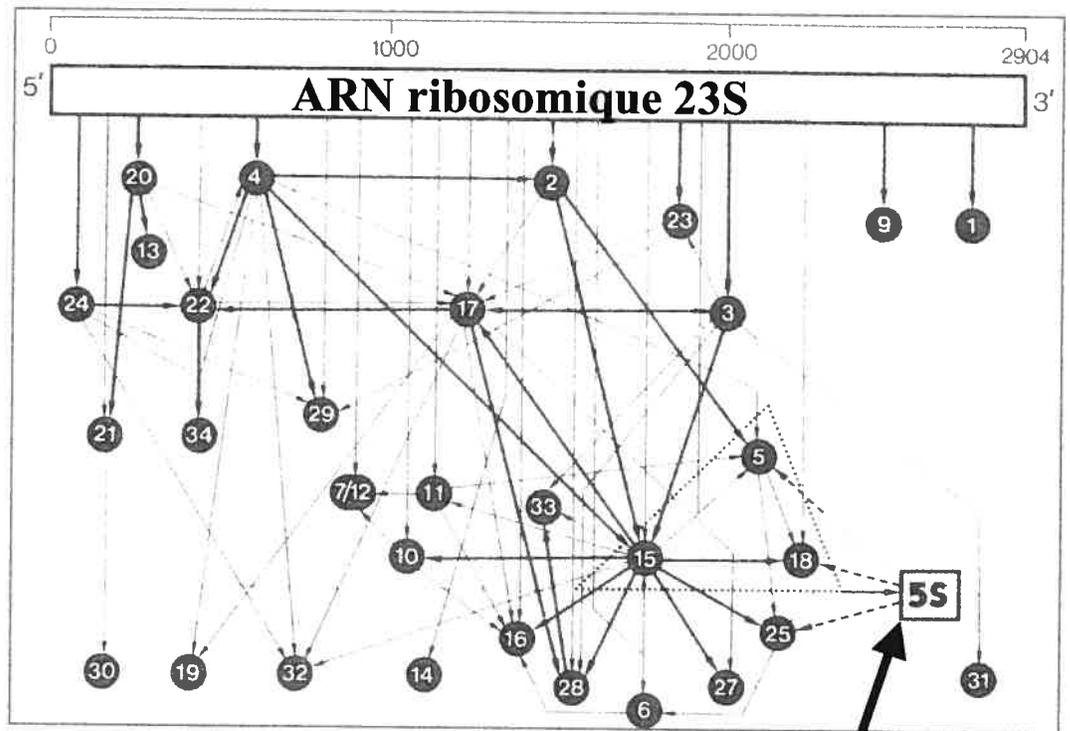
Figure 1-22: Carte d'assemblage de la sous-unité 30S déterminée par les études de reconstruction *in vitro*. Les protéines primaires sont en noir, les secondaires en rouge et les tertiaires en vert.

au niveau du domaine 5', se poursuit dans le domaine central et se termine par celui du domaine 3'. Ceci est en accord avec l'idée que les intermédiaires de l'assemblage de la 30S commencent à se former lors de la transcription de l'ARNr 16S et avant qu'elle soit complète (revue par Culver, 2003).

L'analyse des structures cristallographiques récentes de la 30S, combinée à une simulation de l'assemblage de la sous-unité par ordinateur, a permis de pousser encore plus loin les modèles de la formation de la 30S, en explorant la contribution de chaque protéine ribosomique sur le repliement de l'ARNr 16S (Stagg *et al.*, 2003). Plusieurs conclusions peuvent être déduites des résultats de cette étude. D'une part, elle propose que les sites de liaison des protéines primaires sont remarquablement moins flexibles que ceux des protéines secondaires ou tertiaires, ce qui facilite leur liaison par les protéines initiatrices de l'assemblage. Ensuite, la liaison des premières protéines ribosomiques à l'ARNr 16S induit la formation des sites de liaison des protéines, qui se lient ultérieurement dans l'assemblage de la 30S, comme l'avaient proposé précédemment les études d'empreintes des protéines sur l'ARNr 16S. En l'absence des protéines initiatrices, ces sites seraient trop flexibles pour être reconnus par les protéines qui se lient plus tardivement. Finalement, les protéines impliquées dans des interactions protéines-protéines dans la sous-unité, ont généralement une relation d'interdépendance lors de l'assemblage. Cette étude montre que l'étape initiale de l'assemblage de la sous-unité 30S est sous le contrôle du repliement précoce de l'ARNr, mais que les étapes suivantes, qui mènent au repliement tertiaire de l'ARNr 16S, sont contrôlées par la liaison des protéines ribosomiques.

Les études qui concernent l'assemblage de la sous-unité 50S sont plus limitées que celles de la 30S, mais les grandes lignes de la carte de son assemblage ont été établies (Figure 1-23) (Herold et Nierhaus, 1987; revues par Nierhaus, 1990a; Khaitovitch et Mankin, 2000) et continuent de se préciser (Liiv *et al.*, 1996; Østergaard *et al.*, 1998). Il ressort de ces études que l'assemblage de la grande sous-unité est plus complexe que celui de la 30S à cause du plus grand nombre de protéines impliquées, et aussi parce que les domaines de l'ARNr 23S sont intimement liés dans la structure de la

Figure 1-23: Carte de l'assemblage de la 50S déterminée par les études de reconstruction *in vitro*. Les lignes en pointillé correspondent aux protéines impliquées dans l'assemblage à l'ARNr 5S (adapté de Nierhaus, 1990).



ARN ribosomique 5S

sous-unité. Tout comme pour la 30S, l'assemblage de la 50S s'effectue d'une manière hiérarchique impliquant des protéines primaires, secondaires et tertiaires, dont plus de 17 d'entre elles interagissent directement avec l'ARNr 23S indépendamment des autres protéines. Contrairement à la 30S, l'assemblage de la 50S utilisant un ARNr 23S d'*E. coli* transcrit *in vitro*, est extrêmement inefficace (Weitzmann *et al.*, 1990). Des études de reconstitution de la 50S en utilisant des combinaisons de fragments d'ARNr 23S transcrits *in vitro* et de fragments d'ARNr 23S naturels ont permis l'identification d'une région du domaine V de cet ARNr (nucléotides 2445 à 2523), qui contient les modifications post-transcriptionnelles indispensables pour que l'assemblage de la 50S soit efficace (Green et Noller, 1996). Par contre, l'ARNr 23S de la bactérie *T. thermophilus* (Green et Noller, 1999) ou de la bactérie *T. aquaticus* (Khaitovich et Mankin, 2000) transcrit *in vitro* peuvent former des sous-unités 50S actives, bien que l'activité de ces sous-unités est moins élevée que celle de sous-unités reconstituées avec l'ARNr naturel.

Même s'il a été montré que les sous-unités ribosomiques 30S et 50S peuvent s'assembler spontanément à partir d'un mélange contenant exclusivement l'ARNr et les protéines ribosomiques, plusieurs indices suggèrent que des facteurs extraribosomiques pourraient participer à la formation des ribosomes *in vivo*. L'incubation de l'ARNr 16S et des protéines ribosomiques à 42°C est requise pour que la reconstitution de la 30S soit complète et la présence de dénaturants chimiques et d'osmolytes facilite cet assemblage (revue par Williamson, 2003). De telles conditions sont très peu physiologiques. En accord avec l'idée que des chaperonnes cellulaires pourraient participer à l'assemblage des sous-unités, il a été montré que l'hélicase DbpA interagit avec des séquences spécifiques de l'ARNr 23S (Diges et Uhlenbeck, 2001) et que l'ajout de la protéine chaperonne DnaK au mélange d'ARNr et de protéines *in vitro* permet l'assemblage de la sous-unité 30S à une température de 15°C (Maki *et al.*, 2002). Toutefois, la délétion du gène de la protéine DnaK chez *E. coli* n'a pas empêché pas les ribosomes de s'assembler correctement dans les cellules (Alix et Nierhaus, 2003). Une explication à cette

observation est que *in vivo* plusieurs chaperonnes cellulaires participeraient de manière redondante à l'assemblage des sous-unités ribosomiques.

1.4 Les étapes de la traduction: une relation structure-fonction

La synthèse protéique est effectuée en trois étapes distinctes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chaque étape requiert la collaboration de facteurs cellulaires spécifiques. L'initiation de la traduction débute avec la liaison de la sous-unité 30S à l'ARNm et à l'ARNt initiateur, chargé de méthionine formylée, qui se place au site P. Cette liaison est suivie de l'association de la sous-unité 50S. Trois facteurs cellulaires facilitent cette étape, les facteurs d'initiation IF1, IF2 et IF3. L'élongation consiste en la répétition successive d'un cycle où l'acide aminé correspondant au codon de l'ARNm est ajouté à la chaîne polypeptidique en croissance. Cette étape est séparée en trois sous-étapes qui sont la sélection et le placement de l'ARNt portant un acide aminé au site A, la catalyse du lien peptidique où la chaîne peptidique est transférée sur le résidu d'acide aminé de l'ARNt arrimé au site A, et la translocation qui déplace l'ARNt désaminoacylé au site E, et celui qui porte le peptide en croissance, au site P. L'étape d'élongation est catalysée par deux facteurs, EF-Tu et EF-G. Finalement, la terminaison implique la reconnaissance d'un codon stop indiquant la fin de la lecture du message, et la libération de la chaîne protéique par un des facteurs de terminaison (RF-1 ou RF-2, en collaboration avec RF-3), la dissociation des sous-unités par le facteur RRF en collaboration avec EF-G et finalement, l'expulsion de l'ARNt désaminoacylé du ribosome provoquée par IF3 (revue par Ramakrishnan, 2002).

Comme les études de la structure du ribosome, les études qui visaient à comprendre les étapes de la traduction se sont d'abord basées sur une multitude d'expériences biochimiques et génétiques. La position des différents ligands du ribosome, c'est-à-dire l'ARNm, les ARNt et les facteurs de la traduction, a été déterminée avec les techniques classiques de pontages et d'empreintes. La mutagenèse du ribosome a aussi été utilisée et a fourni beaucoup d'informations sur le mécanisme de

la synthèse protéique (revue par Green et Noller, 1997; O'Connor *et al.*, 2000; Brakier-Gingras *et al.*, 2003). Les études de mutagenèse du ribosome ont débuté par la recherche de mutations spontanées ou induites par des agents mutagènes dans les gènes des protéines ribosomiques, qui confèrent la résistance à divers antibiotiques se liant au ribosome. Il a été découvert, par exemple, que des mutations dans la protéine S12 peuvent soit rendre les ribosomes résistants, soit dépendants vis-à-vis de la streptomycine, un antibiotique qui induit des erreurs dans la sélection des ARNt. Ces mutations, dites restrictives, rendent la traduction plus précise. Des mutations qui annulent cette dépendance à la streptomycine, en rendant les ribosomes moins précis, ont ensuite été identifiées dans les protéines S4 et S5 (mutations *ram* ou « ribosomal ambiguity mutations ») (revue par Kurland *et al.*, 1996). La mutagenèse dirigée a ensuite été utilisée abondamment pour étudier comment des mutations spécifiques dans l'ARNr affectent la synthèse protéique. Afin de répertorier l'ensemble des effets des mutations dans l'ARNr 16S et l'ARNr 23S sur la synthèse protéique, une base de données a été créée par le Dr K. Triman (<http://ribosome.fandm.edu>; Triman, 1998). Les techniques utilisées pour muter l'ARNr dans les ribosomes ont été très variées. Tout d'abord, il y a des méthodes *in vivo* qui impliquent l'expression d'un opéron à ARNr à partir d'un plasmide approprié, où l'opéron est sous contrôle d'un promoteur naturel ou d'origine phagique (revues par O'Connor *et al.*, 2000; Brakier-Gingras *et al.*, 2003). La bactérie *E. coli* contient sept opérons des ARNr dans son génome et l'incorporation de l'ARNr plasmidique dans les ribosomes est donc en compétition avec celle des ARNr chromosomiques. Il en résulte une population hétérogène de ribosomes où la proportion d'ARNr plasmidique dépend de la puissance du promoteur permettant l'expression de cet ARNr (voir par exemple: Tapprich et Dahlberg, 1990; Pinard *et al.*, 1994). Pour contourner ce problème d'hétérogénéité, des mutations conférant la résistance à certains antibiotiques ont été introduites dans les ARNr plasmidiques de manière à ce que seuls les ribosomes qui contiennent ces ARNr soient utilisés par la cellule en présence de l'antibiotique (voir par exemple: Powers et Noller, 1991; Pörse et Garrett, 1995; Saarma *et al.*, 1998). Cependant, le danger de cette méthode est que ces mutations sélectives peuvent aussi influencer le fonctionnement du ribosome. Une autre méthode,

développée initialement par le groupe de de Boer et perfectionnée par l'équipe de Cunningham, permet de contrer astucieusement le problème de l'hétérogénéité (Hui et de Boer, 1987; Brink *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996). Avec cette méthode, dite méthode de ribosomes spécialisés, la séquence anti-Shine-Dalgarno d'un ARNr 16S (qui intervient dans la sélection des sites d'initiation de la traduction sur les ARNm, voir plus bas) dans un plasmide contenant un opéron à ARNr est mutée de manière à ce que seuls les ribosomes qui contiennent cet ARNr 16S mutant soient aptes à traduire des ARNm rapporteurs choisis. Le gène de ces ARNm rapporteurs est porté par le même plasmide et contient une séquence Shine-Dalgarno complémentaire à celle de l'ARNr 16S plasmidique muté. Plus récemment, une souche d'*E. coli*, nommée $\Delta 7$ prn, a été construite où les sept opérons des ARNr sont supprimés du génome de la bactérie, de sorte que l'opéron des ARNr utilisé par la cellule est exclusivement transcrit à partir d'un plasmide introduit dans la bactérie (Asai *et al.*, 1999). Cette souche d'*E. coli* permet l'étude de mutations dans les ARNr contenant une population d'ARNr homogène (voir par exemple: O'Connor *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2001). Les études de mutagenèse ont aussi bénéficié de la reconstitution des sous-unités ribosomiques *in vitro* pour incorporer des mutations dans les ribosomes. Dans cette technique, les sous-unités sont reconstituées en utilisant un ARNr mutant, transcrit *in vitro* à partir d'un plasmide contenant le gène de l'ARNr 16S ou celui de l'ARNr 23S, sous contrôle d'un promoteur T7, et d'un mélange de protéines ribosomiques (voir section 1.3). Les techniques de mutagenèse dirigée ont aussi été appliquées plus récemment pour étudier les fonctions des protéines ribosomiques dans la synthèse protéique. Par exemple, la reconstitution *in vitro*, en utilisant une protéine mutée qui a été exprimée dans la bactérie, puis purifiée, a permis l'étude de l'implication de la protéine L2 dans la synthèse protéique (Coopermann *et al.*, 1995; Diedrich *et al.*, 2000). La délétion de gènes, quant à elle, a été utilisée pour examiner le rôle de la protéine L27 dans la traduction (Wower *et al.*, 1998). Les ribosomes mutants, produits grâce à ces méthodes, ont été testés *in vivo* et *in vitro* avec une batterie d'essais qui permettent de disséquer les étapes de la traduction. Ces méthodes ont permis notamment d'étudier la liaison de ligands comme l'ARNm, les ARNt ou les facteurs de traduction, l'association des sous-

unités, la fidélité de traduction, la catalyse du lien peptidique et la translocation. Les études concernant le mécanisme de la traduction ont aussi profité de la grande variété des antibiotiques qui ciblent le ribosome (revues par Auerbach *et al.*, 2002; Harms *et al.*, 2003). En étudiant les étapes de la synthèse protéique affectées par ces antibiotiques et en identifiant leurs sites de liaison sur le ribosome par cristallographie aux rayons X, il a été possible d'analyser l'implication de ces sites dans le fonctionnement du ribosome (voir par exemple: Brodersen *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2000; Pioletti *et al.*, 2001; Schlünzen *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2002b). De plus, les structures cristallographiques du ribosome et de ses sous-unités en complexe avec les ARNt, l'ARNm et des facteurs de traduction ont puissamment contribué à expliquer les effets de mutations dans le ribosome. La combinaison des données biochimiques et génétiques avec l'analyse de ces structures permet maintenant de proposer des mécanismes détaillés pour les étapes de la synthèse protéique.

1.4.1 L'initiation

La première étape de la synthèse protéique chez les bactéries consiste en la liaison de l'ARNm par la sous-unité 30S et au positionnement de cette dernière au niveau du codon d'initiation (revues par Sprengart et Porter, 1997; Fuchs, 1999; Gualerzi *et al.*, 2000). L'initiation de la traduction débute le plus souvent par le codon AUG, même si d'autres codons comme GUG, UUG, AUU et CUG peuvent aussi être utilisés. Pour la très grande majorité des ARNm, la reconnaissance du site d'initiation de la traduction par les ribosomes est assurée par la complémentarité d'une séquence de trois à neuf résidus riche en purines sur l'ARNm, en amont du codon initiateur, dite séquence Shine-Dalgarno (SD), avec une autre séquence localisée à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S, la séquence anti-Shine-Dalgarno (ASD) (Shine et Dalgarno, 1974, 1975; Steitz et Jakes, 1975). La distance optimale entre la séquence SD et le codon initiateur est de 7 à 9 bases. L'existence de cette interaction a été démontrée par mutagenèse de la séquence de l'ARNr 16S et de la séquence SD du message (Jacob *et al.*, 1987; Hui et de Boer, 1987). Cependant, la séquence de certains ARNm cellulaires débute directement au codon d'initiation, et ils ne possèdent donc pas de séquence SD. Cette observation a

mené à la recherche d'autres séquences dans les ARNm qui favoriseraient l'initiation de la traduction. L'examen de la séquence d'un grand nombre d'ARNm a conduit notamment à suggérer l'implication de deux séquences des ARNm dans l'initiation: la « downstream box », dont la séquence est partiellement complémentaire aux bases 1469-1463 dans l'hélice 44 de l'ARNr 16S, et le facteur epsilon, qui possède une séquence riche en pyrimidines, complémentaire à la région entourant la base 460 de l'ARN 16S. Ces séquences, localisées en aval du codon d'initiation de plusieurs ARNm, agissent comme séquences stimulatrices (« enhancers ») de l'initiation de la traduction. Il a été proposé que ces séquences pouvaient, tout comme la séquence SD, s'apparier avec une séquence complémentaire de l'ARNr 16S (revues par McCarthy et Brimacombe, 1994; Gualerzi *et al.*, 2000). Cependant, des expériences de mutagenèse dirigée de l'ARNr 16S et dans l'ARNm ont éliminé cette proposition (O'Connor *et al.*, 1999; La Teana *et al.*, 2000; O'Connor et Dahlberg, 2001). L'implication de la protéine ribosomique S1 dans la liaison des ARNm aux sous-unités 30S a été démontrée. Cette protéine contient une répétition de sept domaines OB de liaison à l'ARN et il a été proposé qu'elle permettrait aux ribosomes d'agripper les ARNm (Tzareva *et al.*, 1994; Ringquist *et al.*, 1995; Voorma, 1996). Il faut rappeler ici que les sites d'interaction des ARNm avec la 30S correspondent à des régions à simple brin. Si ces régions sont structurées et que la séquence SD est impliquée dans une interaction secondaire, la reconnaissance de ce site d'interaction sera difficile (de Smit et van Duin, 1990). Le groupe de Frank a confirmé directement l'hypothèse de l'implication de S1 dans la liaison des ARNm par les 30S par cryo-ME, en comparant des images à une résolution de 11.5 Å de la petite sous-unité contenant S1 complexée à un ARNt initiateur et à un ARNm avec les structures cristallographiques de la 30S où S1 est absente (Sengupta *et al.*, 2001). Cette analyse indique que la protéine est placée au dos de la 30S, proche du cou, et possède des extensions qui enveloppent le cou de la sous-unité et interagissent avec l'ARNm. Il a récemment été proposé que S1 pourrait reconnaître préférentiellement des séquences comme la séquence epsilon ou la « downstream box », ce qui expliquerait leur action stimulatrice sur la traduction (Komarova *et al.*, 2002).

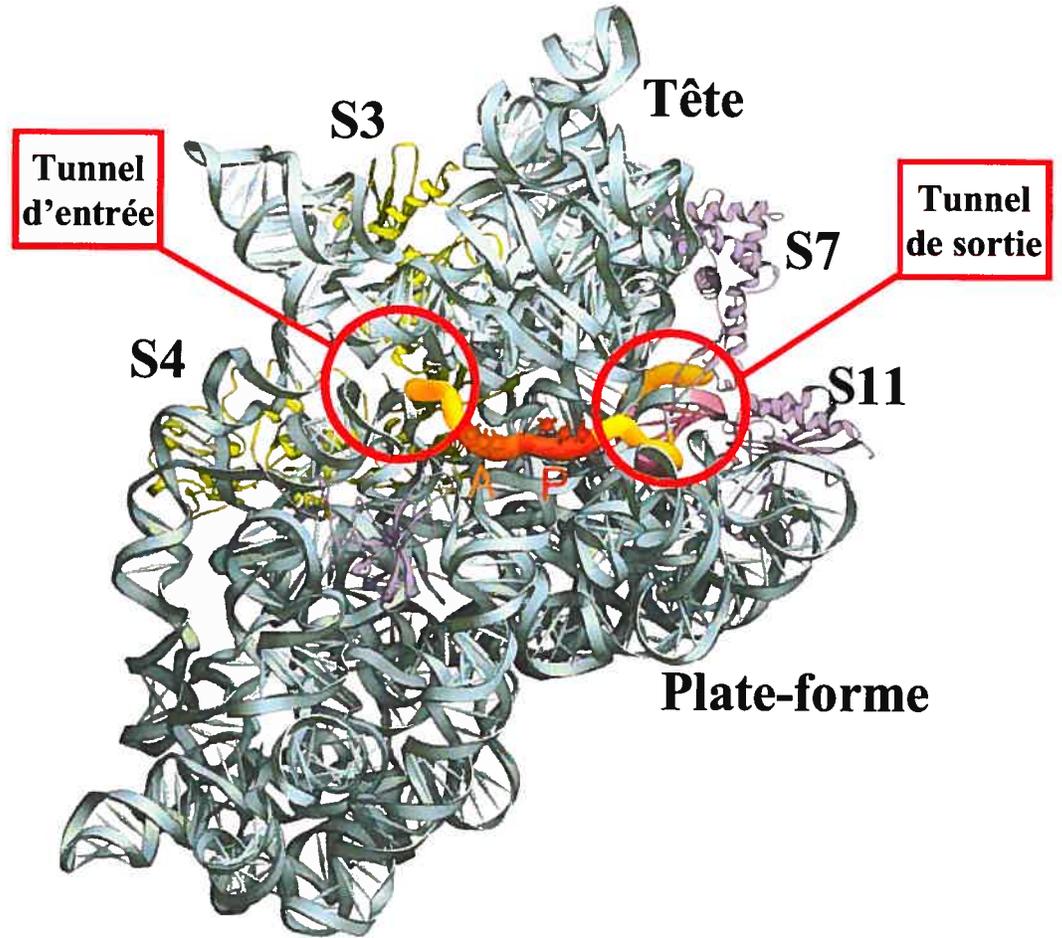
Lorsque l'ARNm se lie à la 30S, il se positionne autour du cou de la sous-unité, comme il a été suggéré par des études de pontage (revue par Green et Noller, 1997; Mueller *et al.*, 1997) et des images de ME (Shatsky *et al.*, 1991). Le trajet suivi par l'ARNm a été ensuite observé directement par cryo-ME (Frank *et al.*, 1995; Malhotra *et al.*, 1998) et, finalement, par cristallographie aux rayons X (Figure 1-24) (Carter *et al.*, 2000; Yusupova *et al.*, 2001; revue par Culver, 2002). Une trentaine de nucléotides de l'ARNm interagissent avec la 30S et sont répartis également de chaque côté du codon au site P (de -15 à +15, la première base du codon au site P correspondant à +1). L'ARNm qui a été complexé à la 30S dans la structure cristalline de Yusupova *et al.* possède une séquence SD. La structure qui en résulte permet donc de visualiser l'interaction entre cette séquence et l'extrémité 3' de l'ARNr 16S, qui se localise sur la plate-forme, à proximité des protéines S7 et S11 (voir section en rose dans la Figure 1-24). À son entrée (côté 3' ou aval) et à sa sortie (côté 5' ou amont), l'ARNm traverse un tunnel étroit. La partie en aval est le tunnel d'entrée et en amont, le tunnel de sortie. Les tunnels d'entrée et de sortie sont formés par des liens non-covalents, entre la tête et l'épaule ou entre la tête et la plate-forme, respectivement. Ceci est en accord avec le fait qu'ils doivent s'ouvrir lors de l'initiation pour permettre la liaison de l'ARNm à la 30S, et aussi le mouvement de l'ARNm relativement à la 30S lors de la translocation (revue par Frank, 2003). Le tunnel en amont contient le feuillet β et l'extrémité C-terminale de la protéine S7 dans la tête de la sous-unité 30S, et la boucle précédant la première hélice de S11 et l'extrémité N-terminale de S18 dans la plate-forme. Ce tunnel contient aussi diverses régions de l'ARNr 16S, notamment les boucles 690 et 790 coiffant les hélices 23 et 24, respectivement, et le début de l'hélice 45, sur la plate-forme. Notons ici que l'interaction entre l'extrémité C-terminale de S7 et la boucle précédant la première hélice de S11 permet la fermeture du tunnel de sortie. La portion de l'ARNm qui traverse ce tunnel contient le codon au site E dont l'accès pour un ARNt est rendu difficile, à moins que des changements conformationnels ne le rendent plus accessible. À la sortie de ce tunnel, on rencontre les codons aux sites P et A de l'ARNm, dont l'exposition permet leur interaction avec les anticodons des ARNt. La sous-unité 30S fait plusieurs contacts avec chacun de ces codons. Le phosphate de la position +1 du

Figure 1-24: Enroulement de l'ARNm autour la sous-unité 30S (adapté de Culver *et al.*, 2002).

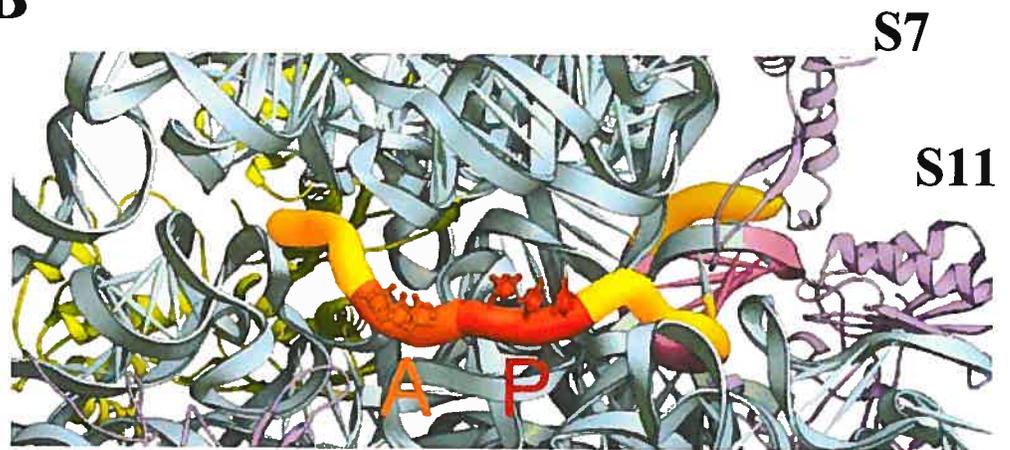
A. Chemin suivi par l'ARNm autour du cou de la sous-unité 30S tel qu'établi par cristallographie aux rayons X du ribosome 70S (Ysusupova *et al.*, 2001). Les codons aux sites A et P de l'ARNm sont colorés en orange et rouge, respectivement. Les portions de l'ARNm et de l'ARNr 16S colorées en rose correspondent à l'interaction Shine-Dalgarno. Les protéines impliquées dans la formation des tunnels par lesquels passe l'ARNm sont aussi indiquées.

B. Portion agrandie de l'interaction de l'ARNm avec la sous-unité 30S.

A



B



codon au site P interagit avec la position N1 de la base G926, alors que son ribose ainsi que celui de la position +2 interagissent avec le nucléotide 1498. Un contact supplémentaire a été observé entre le ribose de la position 1400 et la position +3 dans la structure cristalline de la sous-unité 30S, où l'extrémité 3' de l'ARNr 16S remplace l'ARNm (Carter *et al.*, 2000). Les positions +4 et +5 du codon au site A interagissent avec la base G530 qui coiffe l'hélice 18 et les bases A1492 et A1493 dans l'hélice 44, en présence d'un ARNt au site A. L'établissement de ces interactions est d'ailleurs une étape très importante dans la sélection des ARNt lors de l'élongation (voir section 1.4.2.1). Aussi, les résidus 48-51 de la protéine S12, contenus dans une boucle reliant deux brins d'un baril β , interagissent avec les riboses des positions +5 et +6 du codon au site A. À la jonction des codons A et P, se trouve le phosphate du nucléotide 1401 qui change l'orientation de l'ARNm (« kink ») d'environ 45° et favorise l'exposition des codons A et P de l'ARNm pour leur interaction avec les ARNt. La portion de l'ARNr 16S interagissant avec le codon au site A de l'ARNm a été nommée centre de décodage et l'analyse de la structure cristallographique du ribosome a permis une description détaillée de ce centre. La composition de centre de décodage avait été initialement suggérée par des études de protection de l'ARNr 16S contre les attaques d'agents chimiques par les ARNt et par des pontages entre l'ARNr 16S et l'ARNm (revue par Green et Noller, 1997; Mueller *et al.*, 1997). Après le centre de décodage, l'ARNm passe par le tunnel d'entrée qui est composé de deux couches distinctes. La première comprend l'hélices 1 et la boucle 530 de l'épaule, l'hélice 28 du cou et l'hélice 34 de la tête de l'ARNr 16S. La seconde couche est formée par la protéine S3 de la tête et les protéines S4 et S5 du corps (Yusupova *et al.*, 2001). Comme l'ARNm doit être à simple brin pour être décodé par le ribosome, il a été proposé que ces protéines, qui constituent le point de rencontre entre le ribosome et des structures secondaires présentes dans l'ARNm, joueraient le rôle d'hélicases en déroulant l'ARNm qui pénètre dans le tunnel.

La formation du complexe d'initiation requiert la liaison du fmet-ARNt^{fmet} à la sous-unité 30S. Il s'agit d'un ARNt portant une méthionine modifiée par formylation de son α -NH₂. La liaison de cet ARNt à la 30S peut se faire avant ou après la liaison de l'ARNm à la sous-unité et elle est favorisée par IF2, un facteur qui lie le GTP et dont

l'interaction à la 30S est grandement favorisée par IF1 (Stringer *et al.*, 1974; revue par Gualerzi *et al.*, 2001). Lorsque l'ARNt initiateur se lie à la 30S, il se positionne au site P, probablement à cause du blocage des sites A et E par les facteurs d'initiation IF1 et IF3, respectivement (revue par Ramakrishnan *et al.*, 2002). D'une part, des études de protection des bases de l'ARNr 16S par IF1 (Dahlquist et Puglisi, 2000), ainsi que des études cristallographiques de sous-unités 30S en complexe avec IF1 (Carter *et al.*, 2001), indiquent que ce facteur se lie sur le site A de la 30S. D'autre part, le site E est bloqué par le facteur IF3 sur la plate-forme, comme l'ont indiqué des études de pontage, de protection contre les attaques chimiques, de clivages dirigés (Dallas et Noller, 2001 et les références citées) et des images de cryo-ME (McCutcheon *et al.*, 1999). Cette localisation a toutefois été contestée par des études de cristallographie aux rayons X qui plaçaient IF3 sur la plate-forme, mais du côté du solvant (Pioletti *et al.*, 2001). Cependant, ce facteur n'a pas été co-cristallisé avec les sous-unités, mais ajouté à des cristaux de 30S déjà formés, ce qui a pu interférer avec la liaison correcte de la protéine sur la sous-unité. Des études de protection, de pontage (Wakao *et al.*, 1991) et de clivage dirigé, avec des nucléases chimiques liées à des cystéines de IF2 (Marzi *et al.*, 2003), ont montré que ce facteur se localise dans la partie supérieure du site A au niveau de la tête de la 30S. Ces résultats indiquent qu'il participe aussi au blocage du site A. Outre le fait qu'il bloque le site E, le facteur IF3, probablement aidé par les autres facteurs d'initiation, accélère la cinétique de formation du complexe d'initiation (Calogero *et al.*, 1988) et vérifie l'identité de l'ARNt initiateur (Sussman *et al.*, 1996; Haggerty et Lovett, 1997). Une fois lié à la 30S, la tige-boucle anticodon du fmet-ARNt^{fmet} établit plusieurs contacts avec la 30S, qui impliquent les bases G926, G966, A1229, G1338, A1339, et C1400 de l'ARNr 16S (Figure 1-19B). Ces contacts sont renforcés par des interactions avec la queue C-terminale riche en lysine de S13 et par l'arginine terminale extrêmement conservée de S9 (Carter *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001). Des études de pontage de la sous-unité 30S à l'ARNm ont montré que l'addition des facteurs d'initiation, et plus particulièrement d'IF3, aux 30S complexées à un ARNm, modifie les patrons de pontage de cet ARNm à l'ARNr 16S et aux protéines ribosomiques. L'interprétation de ces résultats est que les facteurs d'initiation induisent

un repositionnement de l'ARNm sur la 30S de manière à ce que le codon d'initiation se place au site P. Ceci implique donc que le codon d'initiation ne se positionne pas directement au site P de la 30S lorsque l'ARNm se lie à la sous-unité et que l'interaction codon-anticodon au site P est grandement accélérée par les facteurs d'initiation (La Teana *et al.*, 1995; revue par Gualerzi *et al.*, 2001).

Une fois le complexe ternaire formé, c'est-à-dire lorsque la sous-unité 30S est complexée avec le fmet-ARNt^{fmet} et l'ARNm, la sous-unité 50S s'y associe. Les deux sous-unités interagissent via divers ponts intermoléculaires (Yusupov *et al.*, 2001) (voir section 1.2.2.2 et 1.2.2.3.2). Des études de mutagenèse suggèrent que l'interaction entre les ponts se fait de manière coordonnée, car si la formation de seulement quelques uns d'entre eux est empêchée, cela peut inhiber presque complètement l'association des sous-unités (voir par exemple: Diedrich *et al.*, 2000; Bélanger *et al.*, 2002). Alternativement, ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la force d'interaction des différents ponts est inégale. La comparaison des structures des sous-unités isolées obtenues par cristallographie aux rayons X et par cryo-ME et à celle du ribosome 70S montre que certaines régions de la 30S et de la 50S occupent une position différente, suivant que les sous-unités sont associées ou libres. La plupart des ces régions contiennent des ponts unissant les sous-unités (revues par Noller et Baucom, 2002; Frank, 2003). Parmi les changements observés, le bec de la tête de la 30S se rapproche de l'épaule et provoque la fermeture du tunnel d'entrée de la 30S. Le côté de la tête où se trouve S7, ainsi que la plate-forme se déplacent vers la 50S, tandis que le bras L1, la protubérance centrale et la tige L7/L12 de la 50S se déplacent vers la 30S. La région qui subit les changements les plus visibles est l'hélice 44 de l'ARNr 16S. Il a été proposé que cette hélice jouerait le rôle de senseur en détectant la présence de la 50S et en préparant le centre de décodage pour les cycles d'élongation qui vont suivre (Gabashvili *et al.*, 2000). L'association de la 50S à la 30S est très rapide et elle induit l'éjection des facteurs IF1 et IF3. Elle déclenche aussi l'hydrolyse du GTP par IF2 probablement via son interaction avec l'hélice 89 et la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S (La Teana *et al.*, 2001; revue par Gualerzi *et al.*, 2001). Cette boucle, qui coiffe l'hélice 95 (positions A2654 à A2665), a été nommée d'après sa sensibilité à l'attaque de deux nucléases, la

sarcine et la ricine, et elle est impliquée dans le déclenchement de l'hydrolyse du GTP non seulement par IF2, mais aussi par les facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G (voir plus bas). IF2 quitte ensuite le ribosome. Le rôle exact de l'hydrolyse du GTP par IF2 est cependant encore inconnu. Contrairement aux facteurs d'élongation, l'hydrolyse du GTP par IF2 ne sert pas à expulser le facteur du ribosome (Tomsic *et al.*, 2000). Il a été suggéré que le site de liaison du GTP de IF2 pourrait agir comme régulateur de la synthèse protéique puisque, en situation de stress, la bactérie synthétise du ppGpp, une molécule qui inactive IF2 en se liant au site de liaison du GTP (Gualerzi *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré que des mutations dans IF2 qui réduisent son activité GTPasique affectent fortement la croissance cellulaire, ce qui confirme l'importance de l'hydrolyse du GTP bactérienne (Laursen *et al.*, 2003). Le départ des facteurs d'initiation rend le site A disponible, ce qui permet l'arrivée d'un ARNt-aminoacylé (aa-ARNt^{aa}) et amorce l'étape de l'élongation. En s'associant à la sous-unité 30S, la sous-unité 50S fait aussi plusieurs contacts avec l'ARNt au site P. En tout, sept contacts sont effectués. Six d'entre eux impliquent l'ARNr 23S et le dernier implique un feuillet β de la protéine L5 (positions 54 à 66). Suite à l'association de la 50S, l'extrémité 3'-CCA de l'ARNt qui porte la méthionine formylée se positionne à l'endroit de la 50S où débute le long tunnel par lequel cheminera le peptide en croissance.

1.4.2 L'élongation

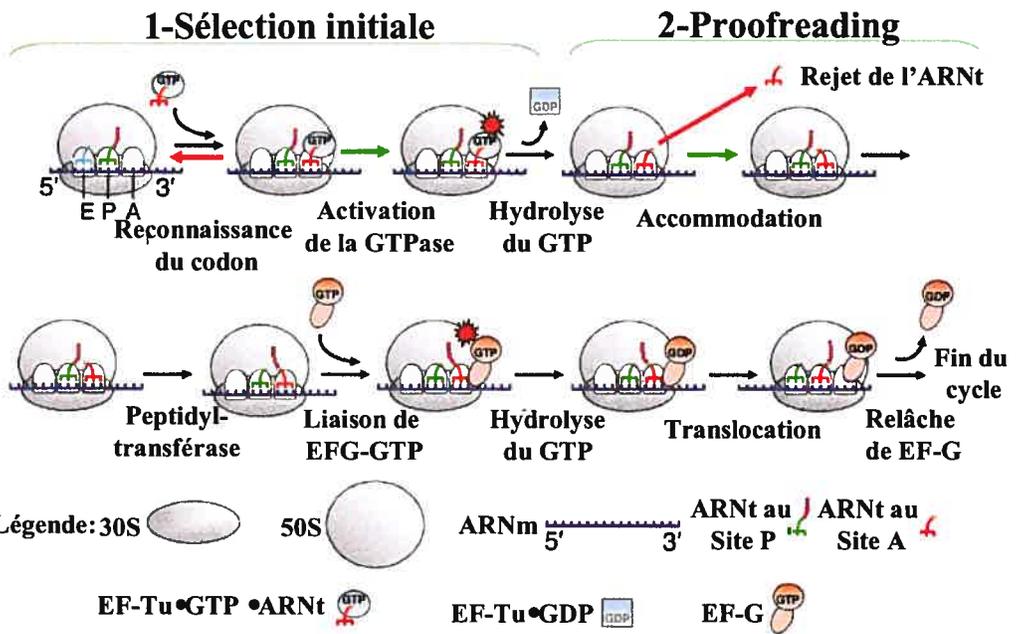
L'étape d'initiation conduit à un ribosome contenant le fmet-ARNt^{fmet} au site P, tandis que le site A, vide, est prêt à recevoir l'aa-ARNt^{aa} dont le résidu aminoacylé va allonger la chaîne en croissance. La Figure 1-25 montre les étapes successives se produisant lors de l'élongation. En bref, l'aa-ARNt^{aa} complexé à EF-Tu•GTP se lie au ribosome. Initialement, il interagit avec le site A au niveau de la 30S et sur un site transitoire (site T) au niveau de la 50S. Cet ARNt est donc positionné au site dit A/T. Une interaction codon-anticodon correcte déclenche une adaptation induite (« induced-fit ») de diverses régions de la 30S qui stabilisent l'interaction de l'aa-ARNt^{aa} au ribosome et provoquent l'hydrolyse du GTP par EF-Tu. Cette hydrolyse induit l'éjection d'EF-Tu et le déplacement de l'extrémité 3'-CCA de l'aa-ARNt^{aa} au site A, dans le

centre PT de la sous-unité 50S. À ce moment, l'ARNt est donc positionné au site A/A, c'est l'accommodation. Le transfert du peptide en croissance de l'ARNt au site P sur le résidu d'acide aminé porté par l'ARNt au site A, c'est-à-dire la formation du lien peptidique, s'effectue très rapidement. Elle est suivie de la translocation, favorisée par le facteur EF-G, qui déplace l'ARNm d'un codon relativement au ribosome et, en même temps, les ARNt des sites A et P aux sites P et E, respectivement. Le ribosome est alors prêt à débiter un second cycle d'élongation (revues par Ramakrishnan, 2002; Frank, 2003).

1.4.2.1 Sélection de l'ARN de transfert

Comme mentionné plus haut, l'aa-ARNt^{aa} complexé à EF-Tu•GTP interagit avec le ribosome en se liant au site A de la 30S et à un site transitoire (T) sur la 50S. Des images de cryo-ME ont permis d'analyser les détails de cette interaction (Valle *et al.*, 2002; Stark *et al.*, 2002 et les références citées). Suite à l'hydrolyse du GTP et au départ de EF-Tu•GDP, l'aa-ARNt^{aa} peut être accommodé au site A/A. La capacité des ribosomes à discriminer entre un ARNt correct (un appariement parfait des trois bases de l'anticodon de l'ARNt avec les trois bases du codon de l'ARNm) et un ARNt dont l'appariement est incorrect (aucune ou seulement une paire de bases correcte) ou presque correct (deux paires de bases correctes) est extraordinaire (revues par Rodnina *et al.* 2001; 2002). Le processus de discrimination permet au ribosome d'incorporer un acide aminé incorrect seulement à tous les 10000 codons, à une vitesse d'incorporation de 10 à 20 acides aminés par seconde. Des études cinétiques et thermodynamiques ont montré que la différence énergétique entre l'appariement d'un ARNt correct avec un codon d'un ARNm ne permet pas une discrimination siffusante (Hopfield, 1974; Ninio, 1975; revue par Zimmermann, 1996). Il a alors été suggéré que la sélection des ARNt se fait en deux étapes qui permettent au ribosome d'amplifier la différence énergétique entre un ARNt correct et un ARNt presque correct (Figure 1-25). La première étape, appelée sélection initiale, se produit avant l'hydrolyse du GTP par EF-Tu et rejette les ARNt incorrects et une partie des ARNt presque corrects. Ensuite vient le « proofreading » qui se produit après l'hydrolyse du GTP par EF-Tu et qui permet

Figure 1-25: Schéma représentant l'étape d'élongation de la synthèse protéique (adapté de Ramakrishnan, 2002).



l'éjection des ARNt presque corrects qui ont réussi à passer le premier contrôle avant l'accommodation. Plus récemment, des études sophistiquées de cinétique à l'état préstationnaire (« pre-steady-state kinetics ») ont permis de disséquer chacune de ces étapes et de calculer précisément l'énergie associée à la liaison d'un ARNt correct, d'un ARNt presque correct ou d'un ARNt incorrect (Rodnina *et al.*, 1996; Pape *et al.*, 1998; Pape *et al.*, 1999; revues par Ramakrishnan, 2002; Rodnina *et al.*, 2002). Ces études ont montré que la liaison d'un ARNt correct au ribosome est environ 20 fois plus stable, qu'il déclenche l'hydrolyse du GTP 10 fois plus rapidement et se place au site A/A près de 70 fois plus rapidement qu'un ARNt presque correct. Les différences de cinétique observées entre les deux ARNt indiquent donc que le ribosome a plus de temps pour rejeter un ARNt presque correct (et évidemment un ARNt incorrect) avant qu'il puisse atteindre le site A/A et suggèrent que la sélection des ARNt est un processus dynamique, où la liaison d'un ARNt correct provoque une adaptation induite (« induced fit ») du ribosome, c'est-à-dire un changement de conformation approprié. Ce changement de conformation, analysé dans le paragraphe suivant, accélère l'hydrolyse du GTP et l'accommodation de l'ARNt au site A/A.

Le mécanisme détaillé par lequel le ribosome décode les ARNm a pu être élucidé récemment grâce à diverses structures cristallographiques de la sous-unité 30S et du ribosomes 70S. Il y a eu la structure de la 30S complexée avec la tige-boucle anticodon d'un ARNt correct (Ogle *et al.*, 2001) ou d'un ARNt presque correct au site A (Ogle *et al.*, 2002), avec comme messenger un hexanucléotide, U6 et celle du ribosome 70S complexé avec des ARNt complets aux site A, P et E, avec comme messenger, un fragment de 36 nucléotides de l'ARNm du gène 32 du phage T4 (Yusupov *et al.*, 2001). L'analyse de ces structures et leur comparaison avec celle de la 30S seule montrent que la liaison d'un ARNt au site A induit des changements dans la conformation de la 30S qui permettent de vérifier la géométrie de l'hélice formée entre le codon de l'ARNm au site A et l'anticodon de l'ARNt (revues par Ramakrishnan, 2002; Ogle *et al.* 2003). La liaison d'un ARNt correct stabilise une conformation où les bases A1492 et A1493 sont déplacées à l'extérieur de l'hélice 44, et où la base G530 de la boucle coiffant l'hélice 18 passe de la conformation *syn* à *anti* (comparer les Figure 1-26A et B). Ces trois bases

interagissent avec le sillon mineur de l'hélice codon-anticodon dont elles sondent la géométrie. La liaison de la paromomycine, un agent qui diminue la fidélité de traduction, à l'hélice 44 de l'ARNr 16S induit des changements conformationnels similaires au niveau des bases A1492 et A1493 (Figure 1-26 B et D) (Fourmy *et al.*, 1996, 1998; Vicens et Westhof, 2001; Carter *et al.*, 2001). L'importance des bases A1492 et A1493 dans la sélection des ARNt avait été suggérée précédemment par le fait que la mutation de l'une ou l'autre de ces adénines est létale chez *E. coli* (Yoshizawa *et al.*, 1999). Quant à la base G530, son rôle dans la liaison de l'ARNt au ribosome avait également été démontré par des études de mutagenèse (Powers et Noller, 1990). Les bases de l'ARNr 16S impliquées dans la reconnaissance de l'interaction codon-anticodon vérifient avec précision l'appariement des deux premières paires de bases, mais sont plus tolérantes pour la troisième paire. Ceci explique la dégénérescence du code génétique, où les codons des ARNm codant pour un même acide aminé forment des familles où la troisième base est variable. Toutefois, si la troisième base de l'anticodon forme un appariement induisant une déformation trop prononcée de l'hélice codon-anticodon, l'ARNt sera rejeté (Ogle *et al.*, 2003). On peut noter que l'hélice 34 dans la tête de la 30S contacte le ribose de la base « wobble » de l'anticodon (troisième base), via la position 1054, suggérant que cette base participe aussi à la sélection des ARNt au site A. La structure cristalline de la sous-unité 30S, complexée à une tige-boucle de l'anticodon d'un ARNt presque correct (Ogle *et al.*, 2002), avec un appariement G-U de type « wobble » à la première ou à la seconde position de l'hélice codon-anticodon, a aussi été examinée. Le messenger était l'hexanucléotide U6. Les structures révèlent que les changements conformationnels du centre de décodage de l'ARNr 16S observés avec un ARNt correct ne sont observés qu'en présence de paromomycine, qui stabiliserait ces changements. En effet, la géométrie des paires « wobble » déplace le U du codon dans le sillon mineur de l'hélice codon-anticodon, ce qui l'empêche de former un lien hydrogène avec la base A1493 ou A1492, selon qu'elle soit en position +4 ou +5, respectivement. De plus, ce déplacement du U bloque l'accès à une molécule d'eau dont le rôle est de solvater les groupements polaires de cet U. Les

Figure 1-26: Changements de conformation induits par la liaison d'un ARNt correct ou de la paromomycine sur la 30S (adapté de Ogle *et al.*, 2001). La tige-boucle anticodon (ASL) de l'ARNt au site A est en doré, celle au site P, en vert, l'ARNm, en mauve, la protéine S12, en brun, les bases A1492, A1493 et G530, en rouge, et la paromomycine, en jaune.

A. Structure du centre de décodage en absence d'ARNt. Les bases A1492 et A1493 sont positionnées à l'intérieur de l'hélice 44, alors que le G530 est en conformation *syn*.

B. En présence d'un ARNt correct au site A, les bases A1492 et A1493 se déplacent à l'extérieur de l'hélice 44 et le G530 a maintenant une conformation *anti*.

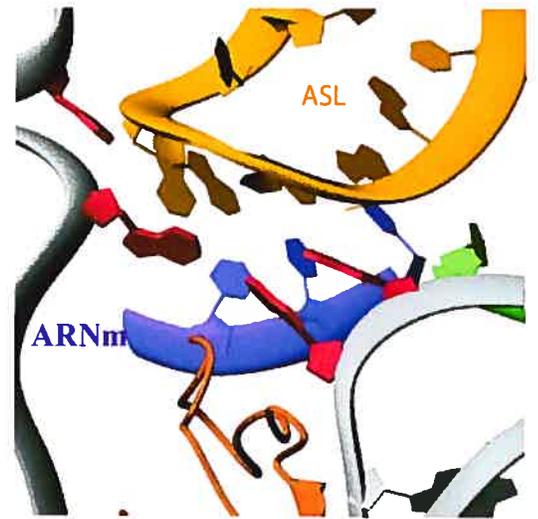
C. En présence de paromomycine, les bases A1492 et A1493 se déplacent hors de l'hélice 44 alors que la base G530 reste immobile.

D. En présence d'un ARNt correct et de la paromomycine, la structure du site de décodage est similaire à celle présentée en B.

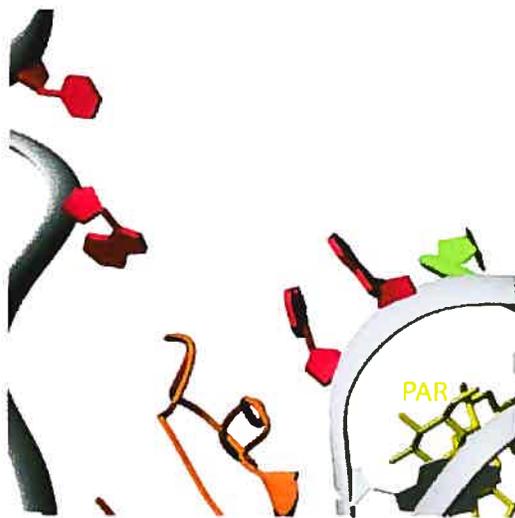
A



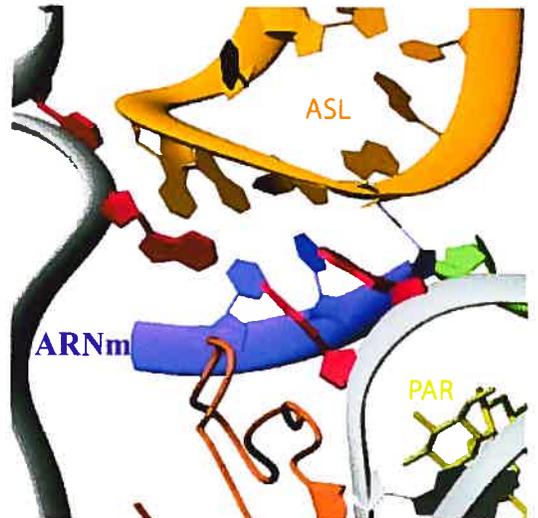
B



C



D



pertes d'énergie dues à l'absence de cette molécule diminuent l'affinité de l'ARNt presque correct pour la 30S par comparaison avec l'ARNt correct.

La stabilisation des conformations des bases 530, 1492 et 1493 de l'ARNr 16S observées en présence d'un ARNt correct induit à son tour une série de changements dans la sous-unité 30S. Ceux-ci se caractérisent par un rapprochement de la tête vers l'épaule et une rotation de la tête et de l'épaule vers l'interface des sous-unités. Cette adaptation induite par la présence d'un ARNt correct est probablement favorisée par les multiples contacts entre l'aa-ARNt^{aa} au site A et l'ARNr 16S et les protéines S12 et S13, deux protéines à l'interface des sous-unités ribosomiques. Le mouvement qu'effectue l'épaule lors de l'adaptation induite implique par ailleurs la destruction de l'interaction entre les protéines S4 et S5, ainsi que la formation de nouveaux contacts entre la protéine S12 et les hélices 44 et 27 de l'ARNr 16S. L'adaptation induite du ribosome a été qualifiée de passage d'une forme « ouverte », qui correspond à un état d'interaction des ARNt avec le ribosome, à une forme « fermée », qui représente l'état productif où la 30S accepte l'ARNt (Ogle *et al.*, 2002; revues par Rodnina *et al.*, 2002; Ogle *et al.*, 2003). La participation de diverses composantes de la 30S à la sélection des ARNt avait été précédemment montrée par mutagenèse (revues par Zimmermann, 1996; Noller *et al.*, 1996). Aussi, l'analyse des structures cristallographiques de la 30S complexée avec un fragment d'ARNt correct ou presque correct permet d'expliquer les effets de ces mutations. Par exemple, des mutations dans l'hélice 34 de l'ARNr 16S diminuent la fidélité de traduction (Moine et Dahlberg, 1994; O'Connor *et al.*, 1997). Cette hélice interagit avec la boucle de l'anticodon d'un ARNt au site A via la base 1054, comme indiqué plus haut. Il a été proposé que les mutations étudiées dans l'hélice 34 favorisent son interaction avec l'ARNt, stabilisant alors la liaison d'un ARNt presque correct avec le ribosome (revue par Brakier-Gingras *et al.*, 2003). De plus, il avait aussi été proposé qu'un « switch » conformationnel se produit dans l'hélice 27 de l'ARNr 16S, proche du site de décodage, lors de la sélection de l'ARNt. L'hélice passerait d'un appariement 912/885 à un appariement 912/888 lors de l'acceptation de l'ARNt (Lodmell et Dahlberg, 1997). Des mutations de l'hélice favorisant soit la conformation 912/885, soit 912/888, rendaient, respectivement, la traduction moins et plus précise. Toutefois, les

structures cristallines récentes de la 30S complexée à un ARNt presque correct n'appuient pas l'existence de ce « switch », car il a été observé que l'hélice 27 demeure dans la conformation 912/885 durant la sélection de l'ARNt (Ogle *et al.*, 2002). Cela a aussi été observé dans la structure cristallographique à une résolution de 9 Å de ribosomes d'*E. coli* mutants dépendants de la streptomycine, qui ont un phénotype de traduction plus précis (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2003). Il semblerait plutôt que les mutations dans l'hélice 27 influencent subtilement les changements conformationnels qui se produisent au niveau de l'épaule et de l'hélice 44 lors de l'acceptation d'un ARNt (Ogle *et al.*, 2003). Aussi, comme cela a été mentionné plus haut, il existe des mutations *ram* dans les protéines S4 et S5 qui rendent les ribosomes moins précis (revue par Kurland *et al.*, 1996). L'analyse de la structure cristallographique de la sous-unité 30S indique que toutes ces mutations de S4 et S5, sauf une, résultent d'un changement parmi les acides aminés responsables de l'interaction entre les deux protéines (Carter *et al.*, 2000). En perturbant cette interaction, les mutations *ram* de S4 et S5 favorisent la conformation fermée de la 30S associée à l'acceptation des ARNt par le ribosome (Ogle *et al.*, 2003). À l'inverse, des mutations dans la protéine S12 qui rendent le ribosome plus précis ont été obtenues lors de la sélection de mutants résistants à la streptomycine (Kurland *et al.*, 1996). Ces mutations se localisent dans les résidus de la protéine qui interagissent avec les hélices 27 et 44 de l'ARNr 16S, mais seulement dans la conformation fermée de la sous-unité 30S. En mutant ces résidus dans S12, la conformation fermée de la 30S est défavorisée et les ribosomes sont alors plus précis, car ils ont plus de temps pour rejeter les ARNt avant l'accommodation (Ogle *et al.*, 2003).

Une fois que la 30S a accepté l'ARNt, elle doit transmettre l'information à la 50S pour que s'effectue l'hydrolyse du GTP par EF-Tu et l'accommodation de l'ARNt au site A. On ignore encore comment le signal est transmis d'une sous-unité à l'autre, mais il a été proposé qu'il se fasse via les ponts entre les deux sous-unités (revue par Brakier-Gingras *et al.*, 2003). Diverses régions du domaine IV de l'ARNr 23S, en particulier les hélices 67 et 69, interagissent avec le centre de décodage de l'ARNr 16S, incluant l'hélice 44 et la boucle coiffant l'hélice 27 (Yusupov *et al.*, 2001). Une interaction codon-anticodon correcte pourrait alors influencer la conformation de ces

ponts et induire des changements conformationnels au niveau du domaine IV de l'ARNr 23S, qui se répercuteraient dans les régions de la 50S impliquées dans l'hydrolyse du GTP par EF-Tu et/ou dans les régions impliquées dans l'accommodation de l'ARNt au site A. Cette hypothèse est appuyée par des études de mutagenèse qui ont montré que des mutations dans la boucle 900 de l'hélice 27 de l'ARNr 16S (Bélangier *et al.*, 2002), ainsi que celles dans la boucle 1916 coiffant l'hélice 69 de l'ARNr 23S (O'Connor et Dahlberg, 1995), affectent la fidélité de traduction. Par surcroît, des mutations dans le centre peptidyltransférase (domaine V de l'ARNr 23S) (Sarma et Remme, 1992; Gregory *et al.*, 1994) ou dans la boucle sarcine-ricine coiffant l'hélice 95 de l'ARNr 23S, impliquée dans l'interaction avec EF-Tu (voir plus bas) (Melançon *et al.*, 1992; Bilgin et Ehrenberg, 1994; O'Connor et Dahlberg, 1996), influencent aussi la sélection des ARNt. Une autre hypothèse propose que la transmission du signal de la 30S vers la 50S se ferait directement via l'ARNt du complexe EF-Tu•GTP-aa-ARNt^{aa}. En effet, il a été montré que l'ARNt change de conformation lorsqu'il interagit avec le codon de l'ARNm (Rodnina *et al.*, 1995) et que des mutations dans les boucles T et D d'un ARNt diminuent la précision de sélection de cet ARNt (revue par Yarus et Smith, 1995). De plus, un ARNt fragmenté complexé à EF-Tu•GTP est incapable d'activer l'hydrolyse du GTP (Piepenburg *et al.*, 2000). Récemment, cette hypothèse concernant le rôle de l'ARNt dans la communication entre les deux sous-unités a été appuyée par l'analyse de la structure du ribosome complexé avec EF-Tu•GTP-aa-ARNt^{aa} obtenue par cryo-ME par les groupes de Frank et de van Heel indépendamment (Valle *et al.*, 2002; Stark *et al.*, 2002; revues par Ramakrishnan, 2002; Rodnina *et al.*, 2002). Les détails des structures diffèrent quelque peu d'un groupe à l'autre, mais il est possible d'observer directement les contacts que fait le complexe EF-Tu•GTP-aa-ARNt^{aa} lorsqu'il se lie au site A/T du ribosome. EF-Tu interagit avec la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S et l'hélice 5 de l'ARNr 16S, dans la partie supérieure du corps de la 30S, alors que l'ARNt interagit avec la région entourant la protéine L11 et l'hélice 69 de la 50S, ainsi qu'avec la protéine S12 de la 30S. La comparaison de la structure du complexe EF-Tu•GTP-aa-ARNt^{aa} lié au ribosome à celle du même complexe isolé (Nissen *et al.*, 1995) indique des déformations dans l'ARNt qui provoquent une tension dans la tige-boucle anticodon

de l'ARNt du complexe lié au ribosome lorsqu'il interagit avec le codon de l'ARNm sur la 30S. En plus d'induire les changements conformationnels de la 30S dont nous avons parlé plus haut, l'interaction codon-anticodon correcte pourrait stabiliser cette conformation déformée de l'ARNt. Parmi les déplacements observés de plusieurs régions de la 30S lorsque le centre de décodage du ribosome a reconnu un ARNt correct, la rotation de l'épaule vers le centre de la 30S devrait influencer directement la structure et la position du complexe EF-Tu•GTP-aa-ARNt^{aa} via les contacts de l'ARNt avec S12 et de EF-Tu avec l'hélice 5 de l'ARNr 16S. Ces mouvements favoriseraient une conformation du facteur qui activerait l'hydrolyse du GTP (Ogle *et al.*, 2003). L'hydrolyse du GTP permet la libération de l'ARNt de son interaction avec EF-Tu et l'éjection de ce dernier lié au GDP. Pour que EF-Tu puisse interagir à nouveau avec un aa-ARNt^{aa} et être utilisé dans un cycle d'élongation subséquent, le facteur d'échange EF-Ts doit catalyser le remplacement du GDP par du GTP. La tension structurale à laquelle est soumise l'ARNt lors de l'interaction codon-anticodon pourrait favoriser son déplacement du site A/T au site A/A du ribosome suite au départ de EF-Tu, et, dès qu'il occupe le site A/A, cet ARNt participe à la réaction de catalyse du lien peptidique. L'accommodation de l'ARNt au site A, implique une multitude de nouveaux contacts entre le ribosome et l'ARNt (Yusupov *et al.*, 2001). En effet, en plus de huit contacts entre cet ARNt et la sous-unité 30S décrit plus haut, onze interactions sont détectées avec la sous-unité 50S, dont dix impliquent des bases de l'ARNr 23S et une, la protéine L16.

Le site E est libre lors du premier cycle d'élongation, mais lors de la sélection d'un ARNt dans les cycles d'élongation subséquents, le site E sera occupé par l'ARNt désaminoacylé (voir plus bas, section 1.4.2.3). Il a été observé que la présence d'un ARNt désaminoacylé au site E diminue l'affinité d'un aa-ARNt^{aa} au site A et augmente la fidélité de sélection des ARNt, en accroissant la discrimination entre les ARNt corrects et incorrects (revue par Nierhaus, 1990b; Márquez *et al.*, 2002). Ceci a conduit le groupe de Nierhaus à proposer un modèle selon lequel la présence d'un ARNt au site E influence la conformation du site A et fait en sorte que seuls les ARNt corrects ont une affinité assez forte pour se lier au ribosome, pour être acceptés, et induire des

changements conformationnels nécessaires à l'éjection de l'ARNt au site E. La structure du ribosome 70S complexé avec les ARNt et un ARNm a indiqué que l'ARNt au site E interagit simultanément avec la 30S et la 50S (Yusupov *et al.*, 2001) (voir section 1.4.2.3) et il est possible que sa présence rend la transition de la 30S de la conformation ouverte à la conformation fermée lors de la sélection des ARNt plus difficile (Ogle *et al.*, 2003). Le mécanisme d'éjection de l'ARNt au site E causé par l'acceptation d'un aa-ARNt^{aa} au site A est peu connu, mais des études de pontage ont proposé que l'ARNt est transféré transitoirement du site E à un site voisin, le site F, avant d'être éjecté (Wower *et al.*, 2000; Kirrilov *et al.*, 2002).

1.4.2.2 La formation du lien peptidique

Lorsque l'ARNt est accommodé au site A, la formation du lien peptidique a lieu immédiatement, avec une vitesse de réaction d'environ 70 s^{-1} (Katunin *et al.*, 2002b). On sait depuis longtemps que cette vitesse varie en fonction du pH, indiquant qu'il s'agit probablement d'une catalyse de type acide-base (Maden et Monro, 1968; Petska, 1972). Une telle réaction implique la déprotonation du groupement α -amino de l'acide aminé de l'aa-ARNt^{aa} au site A ($\alpha\text{-NH}_3^+ \rightarrow \alpha\text{-NH}_2$), qui devient un nucléophile. La seconde étape consiste en l'attaque par ce groupement nucléophile du carbone électrophile du groupement ester qui lie la chaîne peptidique à l'ARNt au site P. Il y a alors formation d'un intermédiaire tétraédrique sous forme d'un zwitterion. Le groupement α -amino qui a servi pour l'attaque initiale, est ensuite déprotoné, et l'intermédiaire tétraédrique devient chargé négativement. Par la suite, l'extrémité 3' de l'ARNt au site P se protone et brise son lien avec le peptide, ce qui permet le transfert de la chaîne peptidique de l'ARNt au site P au résidu d'acide aminé porté par l'aa-ARNt^{aa} au site A (revues par Ramakrishnan, 2002; Rodnina et Wintermeyer, 2003; Moore et Steitz, 2003).

La composante du ribosome responsable de la catalyse du lien peptidique a fait l'objet de débats durant plusieurs années (revues par Green et Noller, 1997; Khaitovich et Mankin, 2000; Dorner *et al.*, 2002). D'un côté, certains affirmaient que c'est l'ARNr

23S qui est responsable de cette activité alors que d'autre suggéraient que ce rôle est exercé par une protéine de la sous-unité 50S. Les résultats favorisant l'implication de l'ARNr 23S dans l'activité peptidyltransférase (PT) sont nombreux. Tout d'abord, diverses études de pontages et de protections de l'ARNr ont montré que l'ARNr 23S joue un rôle primordial dans la liaison des ARNt aux sites A et P ou dans l'interaction d'antibiotiques qui ciblent l'activité PT. La mutagenèse dirigée a aussi été utilisée pour confirmer l'implication de l'ARNr 23S dans l'activité PT en montrant que la mutation de plusieurs nucléotides de cet ARNr affecte sévèrement cette activité ou confère la résistance à certains inhibiteurs de l'activité PT (voir la base de données du groupe de Triman: <http://ribosome.fandm.edu>; Triman *et al.*, 1998). Par exemple, il a été montré que la mutation des résidus U2493, A2497, A2530, G2557 où A2589 diminue fortement l'activité PT (Pörse et Garrett, 1995). L'ensemble des nucléotides importants pour cette activité se localise dans la boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S, qui a été dénommée centre peptidyltransférase du ribosome. Il a aussi été démontré que les ribosomes de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* conservent une activité PT après avoir subi une digestion poussée à la protéinase K, ou un traitement au dodécyl sulfate de sodium ou au phénol, qui détruisent ou dénaturent les protéines (Noller *et al.*, 1992). Toutefois, malgré la rigueur de ces traitements, la 50S conservait près du quart de ses protéines intactes. Des extractions encore plus poussées au phénol ont éliminé complètement les protéines de la sous-unité 50S, mais ce traitement a provoqué la dénaturation de l'ARNr et, conséquemment, l'inhibition de l'activité PT (Khaitovich *et al.*, 1999). Cependant, d'autres résultats ont suggéré que les protéines ribosomiques peuvent aussi participer à l'activité PT. Il a été montré que certaines protéines ribosomiques peuvent être pontées à des antibiotiques qui ciblent l'activité PT, à plusieurs bases de l'ARNr 23S dans le centre PT ainsi qu'aux ARNt aux sites A et P de la 50S. Parmi ces protéines, il faut citer principalement L2, L15, L18 et L27 (revue par Khaitovich et Mankin, 2000). Il a aussi été montré que l'introduction de mutations dans certaines protéines ribosomiques peut conférer la résistance à des antibiotiques agissant sur l'activité PT. Par exemple, des mutations dans la protéine L15 rendent les ribosomes résistants à la lincomycine (Hummel *et al.*, 1979) et des mutations dans les protéines L3

et L4 confèrent la résistance à la tiamuline (Böck *et al.*, 1982). Plus récemment, il a été montré que la mutation de l'histidine 229 de la protéine L2 réduit significativement l'activité PT (Coopermann *et al.*, 1995, Uhlein *et al.*, 1998; Diedrich *et al.*, 2000) et que cette activité est aussi grandement diminuée par la délétion du gène codant pour la protéine L27 d'*E. coli* (Wower *et al.*, 1998). L'ensemble de ces résultats laisse la question ouverte concernant le constituant du ribosome responsable de la catalyse du lien peptidique.

Récemment, la cristallographie aux rayons X a apporté des informations importantes concernant l'implication des constituants du ribosome dans la synthèse protéique. Le groupe de Steitz et Moore (Nissen *et al.*, 2000) a déterminé la structure de la sous-unité 50S de *H. marismortui* en complexe avec l'inhibiteur dit de Yarus, un analogue de l'intermédiaire tétraédrique sous forme de zwitterion formé durant le transfert du lien peptidique (Welch *et al.*, 1995). L'emplacement de cet inhibiteur dans la structure de la sous-unité 50S a permis de localiser avec précision le centre PT et montre qu'il n'y a aucune protéine ribosomique à moins de 18 Å de ce centre (Figures 1-17A et 1-19D). Ceci exclurait donc la participation des protéines dans la réaction PT et impliquerait que le ribosome est un ribozyme (revues par Cech, 2000; Steitz, 2000; Lilley, 2001). Le groupe de Steitz et Moore a aussi démontré que les sous-unités 50S cristallisées avaient une activité PT, indiquant que la structure observée représente un état physiologique du ribosome (Schmeing *et al.*, 2002). Il faut cependant mentionner que la sous-unité 50S de *H. marismortui* ne possède pas d'homologue de la protéine L27 d'*E. coli*, qui, comme indiqué plus haut, a été pontée aux ARNt et est importante pour l'activité PT chez cette bactérie. Ceci suggère qu'il pourrait y avoir des différences dans les mécanismes de l'activité PT de ces deux organismes.

Le mécanisme par lequel le ribosome catalyse la réaction PT n'est pas encore défini rigoureusement. Tout d'abord, il a été proposé que le rôle du ribosome se limitait à positionner correctement les deux extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P et que la réaction PT s'effectue spontanément, sans la participation du ribosome (Nierhaus *et al.*, 1980). En accord avec ce modèle, le groupe de Steitz et Moore a obtenu récemment

des structures cristallographiques de la sous-unité 50S de *H. marismortui* complexée avec des analogues des extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P, soit précédant la catalyse du lien peptidique (Hansen *et al.*, 2002a), soit après la réaction PT (Schmeing *et al.*, 2002). L'analyse de ces cristaux montre que des appariements entre l'ARNr 23S et les extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P contribuent à l'alignement adéquat de ces extrémités des ARNt, ce qui permet la formation du lien peptidique (revue par Moore et Steitz, 2003). La Figure 1-27 montre ces appariements. La base 2588 (2553 chez *E. coli*) est pairée avec le C75 de l'ARNt au site A de la 50S et les bases 2284 et 2285 (2251 et 2252 chez *E. coli*) s'apparient avec les positions 74 et 75 de l'ARNt au site P. De plus, la base A76 à l'extrémité des ARNt aux sites A et P interagit avec l'ARNr 23S via une interaction de type A-mineur. Il a été montré que la destruction des appariements entre la base 2553 et l'ARNt au site A ainsi que celle entre la base 2252 et l'ARNt au site P par mutagenèse affecte grandement l'activité PT (Samaha *et al.*, 1995; Kim et Green, 1999).

Le groupe de Steitz et Moore a proposé un mécanisme d'action pour l'activité PT en analysant la proximité entre certaines bases de l'ARNr 23S et l'inhibiteur de Yarus dans la structure cristalline de la 50S. Ce modèle propose, qu'en plus de positionner correctement les extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P, le ribosome aurait un rôle actif dans la catalyse du lien peptidique en stabilisant l'intermédiaire formé lors de la réaction PT (Nissen *et al.*, 2000; revues par Dorner *et al.*, 2002; Moore et Steitz, 2003; Rodnina et Wintermeyer, 2003). Grâce à un système de relais de transfert de charges qui implique, entre autres, la base G2482 (G2447 chez *E. coli*), la base très conservée A2486 (A2451 chez *E. coli*) jouerait le rôle du catalyseur de la réaction. Selon le modèle, le groupement N3 de la base A2486 soustrairait un proton du groupe α -NH₂ de l'aa-ARNt^{aa} au site A, ce qui constituerait la première étape de la PT. La déprotonation du groupe α -NH₂ de l'ARNt par la base A2486 suppose que cette dernière a un pKa neutre, ce qui est inhabituel pour les adénines, mais qui est en accord avec le fait que la réaction PT soit sensible aux variations du pH. Le modèle proposé initialement par le groupe de Steitz et Moore nécessite cependant des corrections et des améliorations. Tout d'abord, il a été montré que la mutation de la base 2482 n'affecte

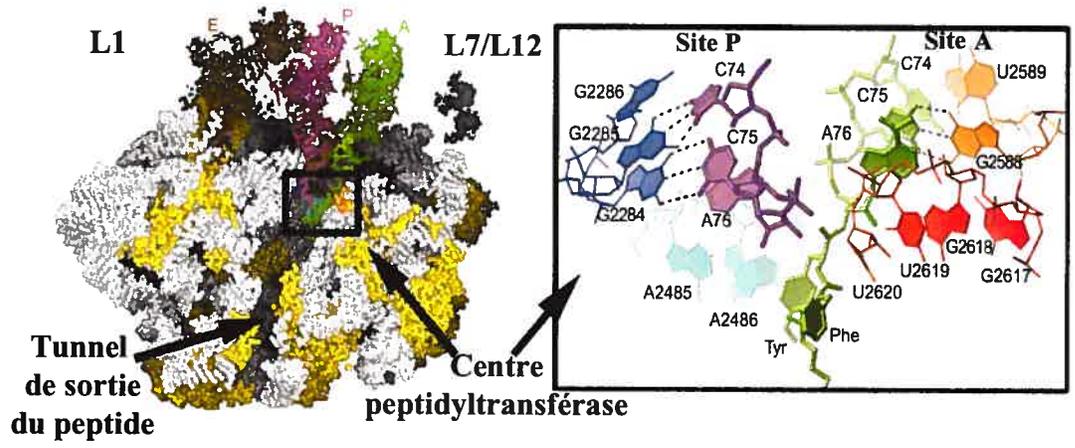
Figure 1-27: Interaction des extrémités 3'-CCA des ARNt dans le centre peptidyltransférase (adapté de Schmeing *et al.*, 2002).

A. Structure de la sous-unité 50S de *H. marismortui* complexée avec des analogues des extrémité 3' des ARNt aux site A et P sur laquelle ont été modélisés les ARNt à partir de la structure du ribosome 70S (Yusupov *et al.*, 2001). La sous-unité est présentée avec le dessous vers le lecteur et elle a été coupée au milieu pour permettre de visualiser le centre PT et le tunnel par lequel passe le peptide en croissance. L'ARNr 23S est coloré en gris et les protéines en jaune. L'ARNt au site A est en vert, celui au site P est en mauve et celui au site E est en brun.

B. Agrandissement du centre PT de la 50S en complexe avec des analogues des extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P après la catalyse du lien peptidique. L'interaction de l'analogue au site P (mauve) avec des bases de l'ARNr 23S (en bleu) ainsi que celle de l'analogue au site A (vert) avec des bases de l'ARNr 23S (en brun et en rouge) est montrée. Les bases A2485 et A2486 (A2450 et A2451 chez *E. coli*) sont indiquées.

A

B



pas le potentiel d'ionisation de la base A2486, ce qui est donc incompatible avec l'hypothèse qu'il y ait un transfert de charge entre les deux bases (Beringer *et al.*, 2003). De plus, la position de la base A2486 dans la structure de la sous-unité 50S complexée avec les analogues des extrémités des ARNt dans l'état précédant la catalyse du lien peptidique, n'appuie pas l'hypothèse que cette base contribue à stabiliser l'intermédiaire tétraédrique (Hansen *et al.*, 2002a). L'importance de A2486 est cependant appuyée par des études de mutagénèse (Thompson *et al.*, 2001) et des études de la cinétique de formation du lien peptidique, dans des conditions où la réaction PT est limitante (Katunin *et al.*, 2002b; revue par Rodnina et Wintermeyer; 2003). Ce qui émerge à l'heure actuelle concernant le mécanisme de la réaction PT c'est que le ribosome joue un rôle primordial dans le positionnement des extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P et que la base A2486 (ou une autre base de l'ARNr 23S) joue soit un rôle dans la réaction catalytique ou dans le contrôle d'un changement de conformation du centre PT permettant la catalyse. Par contre, le mécanisme précis de cette catalyse et la nature des changements de conformation du centre PT lors de la catalyse du lien peptidique demeurent mystérieux.

Récemment, le groupe de Yonath a cristallisé la sous-unité 50S de la bactérie *D. radiodurans*, complexée à un analogue de l'extrémité 3'-CCA d'un ARNt au site A, avec une mini-hélice imitant la tige aminoacceptrice des ARNt (Bashan *et al.*, 2003). La structure du centre PT observée est semblable à celle observée par le groupe de Steitz et Moore, sauf que l'arrangement du substrat dans le centre PT présente quelques différences. Ces études, avec des analogues plus grands que ceux de Steitz et Moore, révèlent l'importance de régions du ribosome en dehors du centre PT, comme la protéine L16 et l'hélice 69 de l'ARNr 23S, pour le positionnement des extrémités 3'-CCA des ARNt au centre PT. Ce travail appuie donc l'hypothèse que le positionnement des ARNt est crucial pour la catalyse du lien peptidique. L'ensemble des travaux présentés dans cette section indique que d'autres études sont nécessaires pour que le mécanisme de la catalyse du lien peptidique soit complètement dévoilé. Par exemple, il serait intéressant d'obtenir la structure cristalline du ribosome 70S complexé à des ARNt aux sites A et P à une résolution atomique, ce qui nous permettrait d'observer en

détail la structure du centre PT. Il est possible que la structure de ce centre soit différente lorsque la 30S est associée à la 50S, ce qui pourrait expliquer le fait que la catalyse du lien peptidique est environ 1000 à 10000 fois plus lente si elle est effectuée par des sous-unités 50S isolées plutôt que par des ribosomes 70S complets (revue par Moore et Steitz, 2003). En effet, la structure du ribosome complexé aux ARNt et à un ARNm suggère, malgré le fait que cette structure soit à une résolution non-atomique, que certaines bases impliquées dans l'interaction de l'ARNt au site P n'adoptent pas la même position que dans la structure de la 50S complexée à des analogues des extrémités 3'-CCA des ARNt (Yusupov *et al.*, 2001).

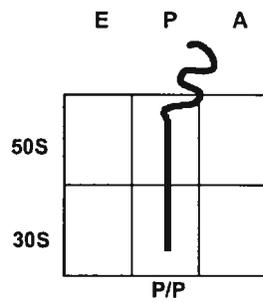
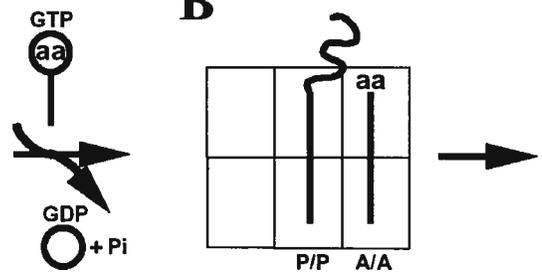
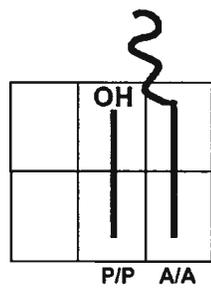
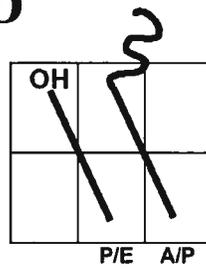
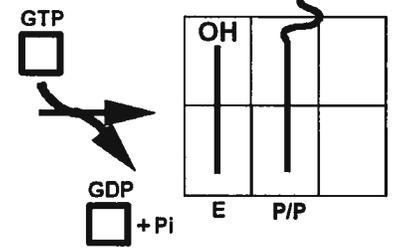
1.4.2.3 La translocation

Suite à la catalyse du lien peptidique, le peptide en croissance se trouve lié à l'ARNt au site A et l'ARNt nouvellement désaminoacylé est au site P de la 50S. L'étape suivante est la translocation qui consiste en un déplacement relatif de l'ARNm d'une distance de trois bases et des ARNt qui lui sont liés par rapport au ribosome (revues par Noller *et al.*, 2002; Ramakrishnan, 2002; Joseph, 2003; Frank, 2003). Les deux ARNt se déplacent des sites A et P aux sites P et E, respectivement, comme l'ont indiqué des études de protection et de pontages (revues par Green et Noller, 1997; Wower *et al.*, 2000; Kirrilov *et al.*, 2002). L'ARNt au site E interagit avec le ribosome via 14 contacts avec les ARNr 16S et 23S et six avec les protéines ribosomiques S7, L1 et L33. En ce qui concerne S7, elle insère son feuillet β et son hélice C-terminale dans la boucle de l'anticodon de l'ARNt. L'ARNt au site E est solidement ancré dans le ribosome grâce à S7 et L1 qui bloquent sa sortie (Figure 1-21-B et C). Ceci indique que l'ARNt n'est pas éjecté de manière passive du ribosome à partir du site E (Yusupov *et al.*, 2001). Malgré la proximité entre l'anticodon de l'ARNt au site E et du codon correspondant de l'ARNm dans la structure du ribosome 70S de Yusupov *et al.*, il ne semble pas y avoir d'interaction codon-anticodon régulière de type Watson-Crick entre les deux ARN, bien que la résolution de la structure ne permet pas de distinguer ce fait avec précision. La translocation est catalysée par le facteur EF-G, une GTPase qui se lie transitoirement au ribosome et dont l'interaction ressemble à celle du complexe EF-Tu•GTP-aa-ARNt^{aa}.

avec le ribosome (Aevarsson *et al.*, 1994; Czworkowski *et al.*, 1994). La réaction de translocation est lente en présence d'EF-G et sans GTP (Katunin *et al.*, 2002a) et elle est très lente, quoique non abolie, en l'absence d'EF-G (Garvilova *et al.*, 1976). Ces résultats couplés avec l'observation qu'un inhibiteur de l'activité PT, la sparsomycine, et que des réactifs spécifiques pour les groupements thiols des protéines sont capables d'induire la translocation des ARNt en l'absence d'EF-G, suggèrent que la translocation constitue une fonction inhérente au ribosome (Southworth *et al.*, 2002; Fredrick et Noller, 2003).

Les mouvements des ARNt dans le ribosome durant la translocation sont décrits par le modèle des états hybrides qui se fonde sur les changements des patrons de protection des bases de l'ARNr par les ARNt, lors d'attaques d'agents chimiques durant la translocation (Moazed et Noller, 1989). Selon ce modèle, le mouvement des ARNt se ferait en deux étapes (Figure 1-28). Dans un premier temps, suite à la catalyse du lien peptidique, les extrémités 3'-CCA des ARNt se déplacent spontanément par rapport à la sous-unité 50S, passant des sites A et P aux sites P et E, respectivement, alors que leur tige-boucle anticodon demeure aux sites A et P sur la 30S (A/A→A/P et P/P→P/E). Il a été proposé que ce mouvement pourrait être favorisé par l'affinité des extrémités 3'-CCA des ARNt pour les sites P et E, respectivement, puisque le site P de la 50S a une plus forte affinité pour la chaîne peptidique en croissance que le site A, alors que le site E a une plus grande affinité pour l'extrémité 3' désaminoacylée de l'ARNt que le site P (revue par Noller *et al.*, 2002). Dans un deuxième temps, la tige de l'anticodon des ARNt se déplace par rapport à la sous-unité 30S pour compléter le déplacement des ARNt dans un mouvement qui est catalysé par le facteur EF-G et l'hydrolyse du GTP qui lui est lié. Le facteur EF-G, complexé au GDP, quitte alors le ribosome laissant le site A libre pour l'arrivée du prochain aa-ARNt^{aa}. Dans ce modèle, les contacts que font les ARNt avec le ribosome se brisent et se reforment. Il faut noter que l'occupation du site E/E par l'ARNt désaminoacylé requiert probablement une réorganisation du tunnel étroit de sortie de la 30S. Dans la structure du ribosome 70S complexé avec les ARNt et l'ARNm (Yusupov *et al.*, 2001), la tige-boucle anticodon de l'ARNt au site P et la tige acceptrice de l'ARNt au site E sont en contact, respectivement, avec les hélices 69 et 68

Figure 1-28: Description du modèle des états hybrides lors de la translocation des ARNt sur le ribosome. Suite à l'acceptation de l'aa-ARNt^{aa} lors de l'étape de sélection, les ARNt se trouvent aux sites A/A et P/P (A et B). La catalyse du lien peptidique transfère la chaîne peptidique en croissance de l'ARNt au site P/P sur l'ARNt au site A/A (C), ce qui déclenche aussitôt le transfert de l'extrémité 3'-CCA de l'ARNt qui porte le peptide du site A vers le site P et celle de l'ARNt désaminoacylé du site P vers le site E. Ce mouvement s'effectue au niveau de la 50S seulement (D). Suite à l'ajout du facteur EF-G•GTP, la translocation des ARNt et de l'ARNm au niveau de la 30S est effectuée (E) (adapté de Schmeing *et al.*, 2002).

A**B****C****D****E**

de l'ARNr 23S via une interaction de type récepteur G-U (voir section 1.2.2.3.1.1) (Gagnon et Steinberg, 2002). En modélisant les mouvements des ARNt vers les états hybrides ($A/A \rightarrow A/P$ et $P/P \rightarrow P/E$), ces auteurs ont proposé que, grâce à la flexibilité de l'hélice 69 qui interagit avec la tige-boucle anticodon de l'ARNt au site P, le mouvement de l'autre extrémité de l'ARNt (tige acceptrice) vers l'hélice 68 au site E se produit sans que l'interaction impliquant la tige-boucle anticodon soit perturbée.

Très peu de détails sont connus concernant le mouvement de l'ARNm sur la sous-unité 30S, à part le fait qu'il s'effectue en même temps que celui des ARNt (Studer *et al.*, 2003; Savelsbergh *et al.*, 2003). La translocation des ARNt peut se faire en l'absence d'ARNm (Belitsina *et al.*, 1981), ce qui semble cependant indiquer que l'ARNm n'est pas indispensable pour cette étape et suggère qu'il pourrait tout simplement être entraîné par le mouvement des ARNt (Ramakrishnan, 2002).

La compréhension du mécanisme de la translocation a progressé grandement suite à la publication récente de plusieurs études cinétiques et de cryo-ME (revues par Ramakrishnan, 2002; Joseph, 2003; Frank 2003). Les études cinétiques ont permis, de déterminer à quels moments de la translocation s'effectuent les déplacements des ARNt et de l'ARNm en étudiant les variations de l'intensité de la fluorescence de molécules attachées aux ARNt et à l'ARNm (Rodnina *et al.*, 1997; Katunin *et al.*, 2002a; Studer *et al.*, 2003; Savelsbergh *et al.*, 2003). Les études cinétiques ont aussi déterminé l'affinité d'EF-G pour le ribosome avant ou après la catalyse du lien peptidique (Zavialov et Ehrenberg, 2003). Les études de cryo-ME ont permis de visualiser les changements conformationnels que subissent le ribosome et les ARNt durant les étapes de la translocation à une résolution d'environ 10-13Å (Agrawal *et al.*, 1998, 1999; Frank et Agrawal, 2000, Stark *et al.*, 2000; Valle *et al.*, 2003). Certaines de ces études ont été effectuées en présence de ligands qui bloquent le ribosome dans divers états conformationnels correspondant à différentes étapes de la translocation. Parmi ces ligands, il y a le GDPNP, un analogue non-hydrolysable du GTP qui se lie à EF-G et l'acide fusidique qui empêche EF-G•GDP de quitter le ribosome suite à l'hydrolyse du GTP. La comparaison des résultats obtenus avec le GDPNP avec ceux obtenus avec

l'acide fusidique permet de définir le rôle de l'hydrolyse du GTP dans la translocation. L'analyse individuelle de chacune de ces études serait trop exhaustive pour cette Introduction, mais il est possible de résumer leurs conclusions sous forme d'un modèle de la translocation qui diffère légèrement du mécanisme classique expliqué plus haut dans la Figure 1-28. La cryo-ME a révélé la structure du ribosome immédiatement après la formation du lien peptidique, en absence d'EF-G. Étonnamment, il a été observé que l'ARNt désaminoacylé au site P ne se déplace pas spontanément au site E de la 50S, contrairement à ce que prédisait le modèle de états hybrides. Cette observation est appuyée par des études de pontage des ARNt sur le ribosome avant et après la réaction PT (Wower *et al.*, 2000) et par le fait que, dans la structure cristalline du ribosome complexé avec des analogues des extrémités 3'-CCA des ARNt aux sites A et P après la catalyse du lien peptidique, aucun déplacement de l'analogue portant le peptide au site A vers le site P n'est observé (Figure 1-27) (Schmeing *et al.*, 2002). Le nouveau modèle de la translocation propose aussi que la présence d'un ARNt désaminoacylé au site P déverrouille (« unlock ») le ribosome, ce qui permet la liaison du facteur EF-G•GTP au site A du ribosome. C'est la liaison d'EF-G•GTP qui induit la translocation des ARNt par rapport à la 50S (A/A→A/P et P/P→P/E) et qui provoque des changements conformationnels majeurs dans le ribosome comme cela a été montré par cryo-ME. La sous-unité 30S subit une rotation de 4° (la tête ayant un mouvement plus accentué de 10°) similaire à une roue à rochet (« ratchet ») dans le sens horaire par rapport à la sous-unité 50S lorsqu'on regarde le ribosome du côté de la 30S. La tête se tourne vers la protéine L1, la plate-forme acquiert une forme plutôt allongée et l'épaule, qui interagit avec EF-G, bouge en direction de l'ARNt au site A. De plus, la liaison d'EF-G•GTP agrandit l'ouverture des deux tunnels dans lesquels passe l'ARNm. Ceci est en accord avec le fait que le ribosome doit relâcher son emprise sur cet ARNm qui doit se déplacer durant la translocation et aussi avec le fait que le codon au site E à l'intérieur du tunnel doit probablement être accessible pour l'anticodon de l'ARNt désaminoacylé. La rotation de la 30S par rapport à la 50S s'accompagne aussi d'un mouvement de près de 20 Å de la tige L1 de la 50S qui lui permet d'interagir avec l'ARNt nouvellement arrivé au site E de la grande sous-unité. Cette structure permet l'observation, pour la première

fois, des états hybrides et constitue donc la confirmation de leur existence durant la translocation. Le mouvement de rochet de la 30S par rapport à la 50S, provoque la destruction de certains ponts entre les sous-unités, dont ceux de la tête de la 30S (ponts B1a, B1b et B1c) impliquant les protéines S13 et L5. Ces deux protéines interagissent avec les ARNt, et la mise en évidence du mouvement de rochet souligne le rôle de ces protéines dans le contrôle de la dynamique du ribosome durant la translocation (Valle *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003). Suite au mouvement de rochet du ribosome, EF-G hydrolyse le GTP, ce qui permet le déplacement de la 30S, qui reprend sa position initiale. C'est probablement à ce moment que les ARNt et l'ARNm sont déplacés par rapport à la 30S (Valle *et al.*, 2003; Savelsberg *et al.*, 2003). L'hydrolyse du GTP par EF-G résulte aussi en un changement de conformation de ce facteur qui se caractérise par un mouvement de l'un de ses domaines, le domaine IV, à l'intérieur du site A du ribosome. Il est proposé que ce déplacement empêche un mouvement de recul des ARNt et de l'ARNm pendant que le ribosome est en conformation déverrouillée. Après l'hydrolyse du GTP, EF-G est rapidement éjecté du ribosome, déclenchant le verrouillage du ribosome et libérant le site A pour le prochain aa-ARNt^{aa}.

Un autre modèle du déplacement des ARNt lors de la translocation, nommé le modèle α - ϵ , avait été proposé par le groupe de Nierhaus (Dabrowski *et al.*, 1998; revue par Nierhaus *et al.*, 2000). Ce modèle se basait sur l'examen des patrons de protection des ARNt par le ribosome. Les phosphates de ces ARNt étaient substitués avec des phosphorothioates. Le groupe de Nierhaus n'avait pas observé de changements dans ces patrons de protection des ARNt aux sites A et P avant et après la translocation. Ce groupe a donc conclu que les contacts entre le ribosome et les ARNt aux sites A et P sont maintenus durant la translocation, impliquant que les domaines ribosomiques qui interagissent avec les ARNt bougent en même temps que ceux-ci pour les transporter d'un site à l'autre et qu'il n'y aurait pas d'états hybrides. La structure récente de cryo-ME du ribosome où sont observés les états hybrides des ARNt sur le ribosome n'appuie pas ce modèle (Valle *et al.*, 2003).

1.4.2 La terminaison

La traduction se termine lorsque le ribosome rencontre l'un des trois codons stop (UGA, UAA ou UAG) au site A (revues par Ehrenberg *et al.*, 2000; Buckingham et Ehrenberg, 2003; Kisselev *et al.*, 2003). Plusieurs facteurs ribosomiques sont impliqués dans ce processus complexe. Des études biochimiques et génétiques ont montré que l'efficacité de la terminaison ne dépend pas seulement de la présence du codon de terminaison, mais aussi de son environnement (revue par Tate et Mannering, 1996). Par exemple, la présence d'un U directement en 3' d'un codon de terminaison accroît l'efficacité de la terminaison. La première étape de la terminaison est la reconnaissance des codons de terminaison des ARNm par des facteurs de terminaison spécifiques. Le facteur RF1 reconnaît les codons UAG ou UAA et le facteur RF2 reconnaît les codons UGA ou UAA. La création de chimères entre RF1 et RF2, par échanges de segments entre ces deux protéines, a permis de spécifier quelles sont les régions qui contrôlent la spécificité de la reconnaissance des codons stop (Ito *et al.*, 2000). Une séquence de trois acides aminés a ainsi été identifiée, la séquence proline, X, thréonine (ou X représente n'importe lequel des acides aminés) (motif PXT) pour RF1 et la séquence sérine, proline, phénylalanine (motif SPF) pour RF2. Ce tripeptide est localisé dans une boucle exposée de RF2, comme l'a montré la structure cristallographique de la protéine (Vestergaard *et al.*, 2001), et il a été proposé qu'il agit comme un « anticodon protéique ». Suite à la reconnaissance du codon stop, les facteurs RF1 et RF2 provoquent l'hydrolyse du lien entre la chaîne protéique et l'ARNt au site P, et le relâchement de cette chaîne. Le mécanisme exact de cette hydrolyse n'a pas encore été élucidé, mais il est proposé qu'une glutamine, présente dans un contexte très conservé glycine-glycine-glutamine (GGQ), est placée au centre PT, où elle positionne une molécule d'eau qui hydrolyse le lien peptidique (Song *et al.*, 2000). Dans la structure cristallographique de RF2, le motif GGQ est à 23 Å de distance du motif SPF. Cette observation contredit l'hypothèse voulant que le facteur interagisse simultanément avec le centre PT et le codon stop de l'ARNm au centre de décodage puisque ces deux régions du ribosome sont à plus de 75 Å de distance l'une de l'autre. Les structures récentes du ribosome complexé au facteur RF2, analysées par cryo-ME, ont permis de

régler le litige (Rawat *et al.*, 2003; Klaholz *et al.*, 2003; revue par Brodersen et Ramakrishnan, 2003). Ces structures montrent que lorsque le facteur se lie au ribosome, les domaines qui contiennent les motifs GGQ et SPF s'éloignent suffisamment pour placer le motif GGQ au centre PT et le motif SPF à proximité du codon stop de l'ARNm. Ces structures indiquent aussi qu'il n'y a pas d'analogie entre la conformation du facteur sur le ribosome et celle d'un ARNt, contrairement à une proposition antérieure (Vestergaard *et al.*, 2001).

Le rôle de l'ARNr dans la terminaison a été étudié par mutagenèse dirigée. Il ressort de ces études que les mutations de l'ARNr n'affectent pas RF1 et RF2 de façon égale, indiquant que les deux facteurs n'agissent probablement pas de manière identique sur le ribosome. En effet, les mutations des bases 1054 et 1200 de l'hélice 34 de l'ARNr 16S affectent la fonction de RF2 uniquement, alors que celle de la base 1192 de la même hélice perturbe la fonction de RF2 beaucoup plus que celle de RF1.

L'hydrolyse du lien peptidique par RF1 ou RF2 et le relâchement de la chaîne peptidique permet la liaison du facteur RF3 complexé au GDP au ribosome. Suite à cette liaison, le GDP se dissocie rapidement du complexe, et est remplacé par du GTP. Ceci est suivi de l'éjection du facteur RF1 ou RF2. L'hydrolyse subséquente du GTP associé à RF3 induit l'éjection de ce facteur (Zavialov *et al.*, 2001; 2002; Zavialov et Ehrenberg, 2003). Le ribosome est alors toujours lié à l'ARNm et contient un ARNt désaminoacylé au site P. Le facteur RRF (« ribosome recycling factor »), en collaboration avec EF-G•GTP, se lie alors au ribosome et dissocie les sous-unités 50S des 30S (revue par Kisselev *et al.*, 2003). L'énergie nécessaire à cette dissociation est fournie par l'hydrolyse du GTP par le facteur EF-G (Karimi *et al.*, 1999a). Malgré les fortes ressemblances entre la structure du facteur RRF et l'ARNt, ils ne se lient pas de la même manière sur le ribosome, comme l'ont démontré des expériences de clivages dirigés (Lancaster *et al.*, 2002). Suite à la dissociation de la 50S, la 30S se retrouve liée à l'ARNm avec un ARNt désaminoacylé au site P. La liaison du facteur IF3 à la 30S permet le relâchement de cet ARNt, une fonction similaire à celle qu'il exerce durant l'initiation en déstabilisant l'association des ARNt non-initiateurs à la 30S. La sous-

unité 30S peut demeurer sur l'ARNm, où elle se déplace et peut réinitier la traduction à un autre cistron en aval. Il a été proposé que ce déplacement (« scanning ») n'est possible que si la 30S est associée à IF3 (Karimi *et al.*, 1999b). IF3 antagonise aussi l'association de la 50S à la 30S, empêchant ainsi l'association prématurée des 50S (Hershey, 1987).

1.5 L'autorégulation de l'expression des protéines ribosomiques

Chez *E. coli*, les gènes codant pour les quelques 50 protéines ribosomiques sont répartis dans une vingtaine d'opérons contenant de un à onze gènes. Les opérons ne sont pas spécialisés pour la 30S ou la 50S car plusieurs d'entre eux codent à la fois pour des protéines de la 30S et de la 50S. D'autres cistrons codant pour des facteurs de la traduction ou des protéines dont les fonctions ne sont pas reliées à la traduction peuvent faire partie de ces opérons. Des expériences de traduction *in vivo* et *in vitro* ont permis de déterminer que la traduction des ARNm correspondant aux opérons des protéines ribosomiques est réprimée par la liaison de l'une des protéine codées par ces ARNm, qui agit comme répresseur traductionnel (revues par Zengel et Lindhal, 1994; Draper, 1995; Keener et Nomura, 1996; Hof et Gourse, 2003). Ces protéines se lient à l'ARNm quand elles sont en excès par rapport à l'ARNr. La protéine répresseur se lie en un site souvent localisé au début de l'ARNm et cette liaison est suffisante pour bloquer la traduction de tous les cistrons de cet ARNm. En effet, la traduction des différents cistrons est couplée, c'est-à-dire que la traduction d'un cistron expose le cistron suivant qui est alors disponible pour la traduction par les ribosomes. Cependant, dans certains cas, le site de liaison de la protéine répresseur ne se trouve pas au début du premier cistron, mais entre deux cistrons. La liaison de la protéine répresseur bloque la traduction des cistrons en aval et, il a été suggéré que lors de cette liaison, il y a clivage de l'ARNm en amont du site de liaison, et dégradation rapide de cette portion clivée. C'est le phénomène de rétrorégulation. Par exemple, chez *E. coli*, la protéine L1 contrôle l'expression de l'opéron L1, qui code pour L1 et pour L11, en se liant en amont du cistron de L1 (Yates

et al., 1980). La protéine S8 contrôle la traduction de l'opéron *spc* qui code dans l'ordre pour les protéines L14, L24, L5, S14, S8, L6, L18, S5, L30, L15, X et Y (X et Y sont des protéines ayant d'autres fonctions cellulaires) en se liant entre les cistrons codant pour les protéines L24 et L5 (Dean *et al.*, 1981a). L'expression de l'opéron α qui code dans l'ordre pour les protéines S13, S11, S4, la sous-unité α de l'ARN polymérase et L17, est contrôlée par la liaison de S4 à l'extrémité 5' non-traduite de l'ARNm précédant le cistron de S13 (Yates *et al.*, 1980). Notons toutefois que l'expression de la sous-unité α de l'ARN polymérase n'est pas contrôlée par la liaison de S4 au messager. La protéine S15 régule l'expression de son ARNm. Cet ARNm, dépendant de la transcription, peut soit coder uniquement pour S15, soit être dicistronique, le second cistron codant pour la polynucléotide phosphorylase. Le contrôle de S15 s'exerce exclusivement sur son propre cistron et si l'ARNm est dicistronique, il n'y a pas de couplage traductionnel entre les deux cistrons (Benard *et al.*, 1996). Finalement, S7 contrôle l'expression de l'opéron *str* qui code dans l'ordre pour les protéines S12, S7, EF-G et EF-Tu. La régulation est effectuée suite à la liaison de la protéine entre le cistron codant pour S12 et son propre cistron. La régulation de l'expression de S12 est vraisemblablement effectuée par rétrorégulation (Saito *et al.*, 1994).

Le contrôle traductionnel exercé par les protéines ribosomiques implique qu'elles ont une meilleure affinité pour l'ARNr que pour leur ARNm puisqu'elles doivent être préférentiellement incorporées dans le ribosome. C'est le cas des protéines S8 (Gregory *et al.*, 1988) et S15 (Serganov *et al.*, 2002 et les références citées) dont l'affinité pour l'ARNr est, respectivement, cinq et 150 fois supérieure à celle pour leur ARNm. Cependant, des études concernant la protéine S4 ont montré que cette protéine lie l'ARNr 16S et son ARNm avec la même affinité. Pour expliquer cette observation, il a été proposé que la liaison de la protéine à l'ARNr 16S est favorisée par la coopérativité de l'assemblage du ribosome, ce qui donne un caractère irréversible à la liaison de la protéine à l'ARNr et lui permet de lier préférentiellement cet ARNr tant qu'il est disponible (Deckman et Draper, 1985).

La plupart des protéines répresseurs sont des protéines primaires qui interagissent directement avec l'ARNr durant l'assemblage des sous-unités. Cette observation a conduit à la suggestion que les protéines répresseurs reconnaissent des structures similaires sur l'ARNr et sur les ARNm (Nomura *et al.*, 1980). Des études structurales subséquentes ont montré des ressemblances frappantes dans les structures secondaires des sites de liaison sur l'ARNr et l'ARNm des protéines L1 (Said *et al.*, 1988) et S8 (Gregory *et al.*, 1988; Cerretti *et al.*, 1988) (Figure 1-29 A et B). Cependant, l'examen des structures secondaires du site de liaison de la protéine S4 sur l'ARNr 16S et son ARNm montre que ce n'est pas le cas pour cette protéine. Son site de liaison à l'ARNr est une jonction de plusieurs hélices alors que son site de liaison sur son ARNm englobe un pseudo-nœud (Figure 1-29C) (Deckman et Draper, 1987; Tang et Draper, 1989). Cependant, plus récemment, il a été découvert que des délétions dans la protéine S4 affectent de la même manière la liaison de la protéine à l'ARNr 16S et à son ARNm. Ceci indique que S4 utilise les mêmes déterminants pour interagir avec les deux cibles, ce qui suggère que les conformations tridimensionnelles de ces cibles doivent présenter des similitudes (Baker et Draper, 1995). Un examen des structures secondaires des sites de liaison de S15 sur l'ARNr et sur son propre ARNm avait aussi révélé l'absence de similitude entre les cibles chez *E. coli* (Ehresmann *et al.*, 1995). La structure cristallographique de la sous-unité 30S de *T. thermophilus* a révélé que la protéine reconnaît, trois déterminants de liaison sur l'ARNr 16S: une jonction de trois hélices, les hélices 20, 21 et 22, un motif G-U/G-C et une tétraboucle GAAG. La liaison de la protéine S15 à son ARNm a été étudiée par mutagenèse dirigée chez trois organismes différents, *E. coli* (Serganov *et al.*, 2002), *T. thermophilus* (Serganov *et al.*, 2003) et *B. stearothermophilus* (Scott et Williamson, 2001). Les résultats de ces études révèlent que pour chacun des organismes étudié, S15 a trouvé un moyen qui lui est propre, mais apparenté à sa liaison à l'ARNr 16S, pour interagir avec son ARNm. En effet, dans chaque cas, les sites de liaison de S15 sur son ARNm contiennent l'un des deux premiers déterminant de liaison à l'ARNr 16S de la protéine, c'est-à-dire soit le motif G-U/G-C pour l'ARNm de S15 d'*E. coli* et de *B. stearothermophilus*, ou une jonction à trois hélices similaire à celle reconnue dans l'ARNr 16S pour l'ARNm de S15 de *T.*

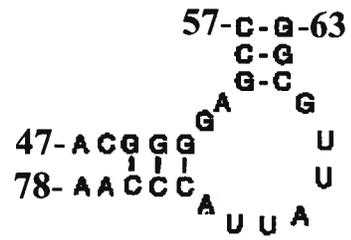
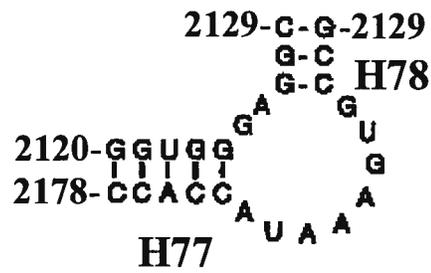
Figure 1-29: Comparaison des sites de liaison de protéines ribosomiques sur l'ARNr et sur leur ARNm. Les hélices de l'ARNr sont identifiées par H, suivi d'un numéro.

A. Site de liaison de la protéine L1 sur l'ARNr 23S (à gauche) et sur son ARNm (à droite) (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).

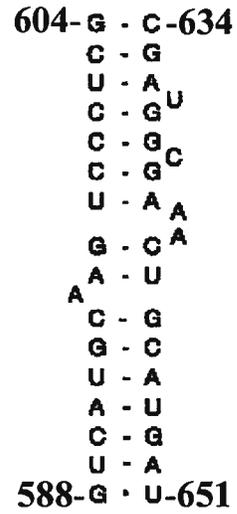
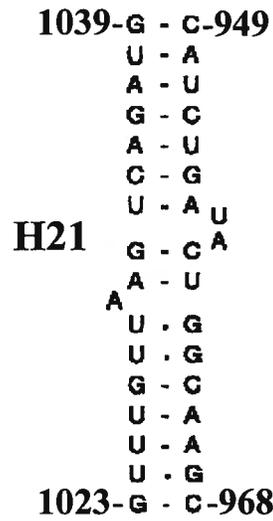
B. Site de liaison de la protéine S8 sur l'ARNr 16S (à gauche) et sur son ARNm (à droite) (adapté de Zimmermann *et al.*, 2000).

C. Site de liaison de la protéine S4 sur l'ARNr 16S (à gauche) (adapté de Brodersen *et al.*, 2002) et sur son ARNm (à droite) (adapté de Schlax *et al.*, 2001).

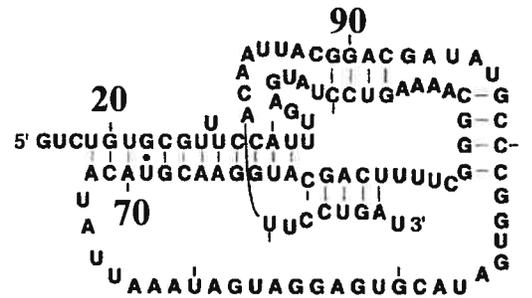
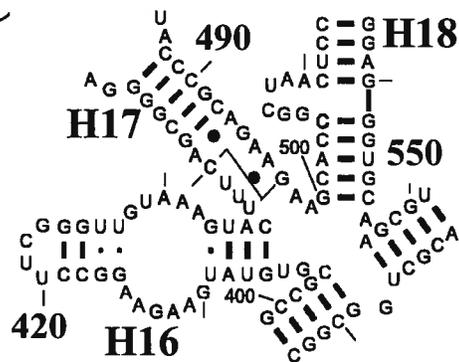
A



B



C



thermophilus (revue par Springer et Portier, 2003). Concernant la liaison de S7 à son ARNm, des attaques chimiques et enzymatiques ont proposé que ce site peut se replier en une longue tige-boucle irrégulière (Saito et Nomura, 1994), ou en un pseudo-nœud (Spiridinova *et al.*, 1999) alors que S7 reconnaît une jonction de plusieurs hélices sur l'ARN 16S.

La comparaison des structures secondaires proposées pour le site de liaison sur l'ARNm avec le site de liaison de S7 sur l'ARNr 16S montre qu'il y a très peu d'homologies entre les structures et suggère que la protéine pourrait les reconnaître en utilisant des déterminants différents (voir section 1.6 et Discussion). Il y a deux modèles qui expliquent le mécanisme par lequel les protéines ribosomiques interfèrent avec la traduction couplée de leur ARNm. Le premier consiste en une compétition entre ces protéines et les sous-unités 30S pour la liaison à l'ARNm (Jinks-Robertson et Nomura, 1987). Les protéines, en bloquant la séquence SD, empêcheraient la liaison par la sous-unité 30S. Ce modèle a été démontré dans certains cas, dont, récemment, S15 de la bactérie *T. thermophilus* (Serganov *et al.*, 2003). Un mécanisme différent de répression a été observé pour d'autres protéines. En effet, les protéines S4 et S15 d'*E. coli*, en se liant à leur ARNm, stabilisent la formation d'un pseudo-nœud qui piègerait la 30S et l'empêcherait ainsi de poursuivre la traduction de l'ARNm (Philippe *et al.*, 1993; Schlax *et al.*, 2001).

1.6 Description du projet de recherche

Comme nous l'avons expliqué précédemment (sections 1.2.1.3 et 1.3), la protéine ribosomique S7 se lie à une région complexe du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S, à la jonction de plusieurs hélices, et sa liaison induit celle des autres protéines de la tête de la sous-unité. Les résultats de diverses études de pontages et de protections suggèrent qu'il existe plusieurs points de contacts entre l'ARNr et la protéine S7, en accord avec le fait que la protéine doit stabiliser une conformation de l'ARNr qui permet la liaison d'autres protéines. La première partie de mon projet de recherche a eu pour objectif d'étudier l'interaction entre S7 et l'ARNr 16S en mutant la protéine en des sites

choisis et en identifiant les régions ou les résidus importants pour sa liaison à l'ARNr 16S. Nous avons cloné le gène de S7 à partir du génome d'*Escherichia coli* dans un vecteur d'expression procaryote et avons ajouté une étiquette (« tag ») histidine, pour permettre une purification rapide de la protéine. Ensuite, nous avons muté plusieurs sites de la protéine, choisis d'après leur exposition au solvant dans la structure cristalline de la protéine isolée et leur conservation au travers des espèces. Nous avons ainsi créé quatre mutants de délétion et douze mutants de substitution. Les protéines mutantes ont été exprimées et purifiées, et leur liaison à un fragment de l'ARNr 16S transcrit *in vitro*, qui contient le site de liaison de S7, a été étudiée par filtration sur membranes de nitrocellulose. Nos résultats indiquent que la liaison de S7 à l'ARNr 16S est affectée par la mutation de plusieurs régions dispersées dans la séquence de la protéine, en accord avec la suggestion qu'il y aurait plusieurs sites de contacts entre les deux molécules. Ces travaux ont conduit à notre première publication. Nous avons ensuite confronté nos résultats à la structure cristallographique de la sous-unité 30S, qui a été publiée lorsque nous avons terminé cette étude. Cette analyse est présentée dans la première partie de la Discussion (section 5.1).

Un rôle important de S7 est aussi de contrôler l'expression de son ARNm polycistronique en se liant à ce messager et en empêchant sa traduction lorsqu'elle est produite en excès par rapport à l'ARNr. S7 exerce son rôle en liant une région située entre le cistron codant pour S12 et son propre cistron. Cet effet répresseur se manifeste par le fait que la surexpression de S7 cause un ralentissement de la croissance des bactéries. Le second volet de ma recherche a visé à comprendre comment S7 interagit avec cette seconde cible, son ARNm. Nous avons utilisé les mutants créés lors de notre étude de l'interaction de S7 et l'ARNr 16S pour tester leur capacité à lier l'ARNm de S7. Nous avons effectué les tests de liaison par filtration sur membrane de nitrocellulose en utilisant un fragment de l'ARNm de S7 transcrit *in vitro* à partir d'un vecteur qui contient la région de liaison de S7. Nos résultats ont indiqué que les mutations qui perturbent la liaison de la protéine à l'ARNr 16S perturbent aussi sa liaison à son ARNm. Ceci implique que la protéine utilise les mêmes déterminants pour interagir avec l'ARNr 16S et son ARNm. De plus, l'examen approfondi (les) résultats suggèrent

que les structures des deux sites de liaison de la protéine montre qu'ils présentent des similitudes malgré le fait que, à première vue, leur structure secondaire suggère que ces sites sont différents. Ces résultats ont constitué notre deuxième publication.

Le troisième volet de ma recherche a eu pour objectif de déterminer l'importance fonctionnelle de l'interaction entre la protéine S7 et une autre protéine ribosomique: S11. Cette interaction implique l'extrémité C-terminale de S7 et la boucle précédant la première hélice de S11. Elle a été révélée par l'analyse de la structure cristallographique de la sous-unité ribosomique 30S. Cette interaction constitue un contact entre la tête et la plate-forme de la petite sous-unité ribosomique et participe à la formation du tunnel de sortie par lequel passe l'ARNm. Diverses études structurales effectuées sur le ribosome et ses sous-unités ont indiqué que la tête de la 30S se déplace par rapport à la plate-forme durant la synthèse protéique. Ce déplacement requiert probablement la destruction puis la reformation de l'interaction entre S7 et S11. Nous nous sommes donc intéressés à étudier quels sont les effets sur le ribosome de la rupture permanente de cette interaction. Pour étudier l'interaction S7-S11, nous avons décidé de la rompre en mutant soit S7, soit S11. Nous avons donc cloné le gène de la protéine S11 à partir du génome d'*E. coli* en utilisant un vecteur d'expression identique à celui utilisé pour cloner S7. Les plasmides contenant les gènes mutants de S7 et de S11 ont été utilisés pour exprimer les protéines chez *E. coli*. Nous avons d'abord vérifié que les protéines mutantes étaient incorporées dans la sous-unité 30S. Nous avons ensuite examiné les effets des mutations de S7 et S11 sur différentes étapes de la synthèse protéique. Nos résultats montrent que lorsque l'interaction entre les deux protéines est brisée, les ribosomes sont moins précis, mais les sous-unités 30S mutantes lient l'ARNm plus aisément. De plus, les sous-unités 30S qui contiennent S7 mutée s'associent moins bien avec les sous-unités 50S, alors que les mutations dans S11 n'affectent pas la capacité d'association entre les 30S et les 50S. L'ensemble de nos résultats nous permettent de conclure que l'interaction entre S7 et S11 n'est pas une simple relation de voisinage, mais participe directement au fonctionnement du ribosome. Ces travaux constituent notre troisième article.

Chapitre II

Mapping of the RNA recognition site of *Escherichia coli* ribosomal protein S7

Francis Robert, Matthieu Gagnon, Dimitri Sans, Stephen Michnick
and Léa Brakier-gingras.

Département de Biochimie
Université de Montréal
Montréal, H3C 3J7
Québec, Canada

RNA, 6: 1649–1659, 2000.

ABSTRACT

Bacterial ribosomal protein S7 initiates the folding of the 3' major domain of 16S ribosomal RNA by binding to its lower half. The X-ray structure of protein S7 from thermophilic bacteria was recently solved and found to be a modular structure, consisting of an α -helical domain with a β -ribbon extension. To gain further insights into its interaction with rRNA, we cloned the S7 gene from *E. coli* K12 into a pET expression vector and introduced four deletions and twelve amino acid substitutions in the protein sequence. The binding of each mutant to the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA was assessed by filtration on nitrocellulose membranes. Deletion of the N-terminal 17 residues or deletion of the β -sheet (residues 72 to 89) severely decreased S7 affinity for the rRNA. Truncation of the C-terminal portion (residues 138 to 178), that includes part of the terminal α -helix, significantly affected S7 binding whereas a shorter truncation (residues 148 to 178) only marginally influenced its binding. Severe effects were also observed with several strategic point mutations located throughout the protein, including Q8A and F17G in the N-terminal region, and K35Q, G54S, K113Q, M115G in loops connecting the α -helices. Our results are consistent with the occurrence of several sites of contact between S7 and the 16S rRNA, in line with its role in the folding of the 3' major domain.

Key-words: ribosomal protein S7; 16S rRNA; RNA-protein interactions.

INTRODUCTION

Bacterial ribosomal protein S7 is one of the primary proteins which, along with S4, initiates the higher-order folding of 16S ribosomal RNA and therefore the assembly of the 30S ribosomal subunit (Novotny & Nierhaus, 1988). Besides its role in the ribosome, S7 also acts as a translational repressor for its own mRNA, the *str* operon mRNA, which codes for ribosomal proteins S7 and S12 and elongation factors EF-Tu and EF-G (Saito & Nomura, 1994; Saito *et al.*, 1994). S7 binds to the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA (Fig. 1A), as demonstrated by crosslinking studies (Mueller and Brimacombe, 1997; Urlaub *et al.*, 1995, 1997) as well as by protection against attack with base-specific chemical reagents or hydroxyl radicals (Powers *et al.*, 1988; Powers & Noller, 1995). We previously showed that the S7 binding site on 16S rRNA could be delimited to a fragment of about 100 nucleotides in the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA (Fig. 1B), containing helix 29, a portion of helix 42, helix 43, and two large internal loops, A and B, connecting helix 29 to helix 42 and to helix 43, respectively. This study also suggested that helix 29, the beginning of helix 43 and both loops A and B interacted with protein S7 (Dragon & Brakier-Gingras, 1993; Dragon *et al.*, 1994).

The structure of protein S7 from two thermophilic bacteria, *Bacillus stearothermophilus* and *Thermus thermophilus*, has been solved independently by Hosaka *et al.* (1997) and Wimberly *et al.* (1997), respectively. The two structures are identical, suggesting that *E. coli* S7 could also adopt the same structure, that consists of a six α -helix bundle with a β -sheet between helices 3 and 4 (Fig. 2). The N- and C-terminal portions are disordered and exposed. RNA-binding regions could be predicted from the analysis of S7 structure: first, a large concave surface, rich in basic and hydrophobic residues, involving the β -sheet and portions of helices 4 and 6 plus the flexible N and C termini that can extend this surface; second, loop 2, bridging helices 1 and 2, and the proximal loop 5, which connects helices 4 and 5. These predictions are supported by crosslinking studies (Fig. 2) of the bacterial protein S7 to 16S rRNA within the 30S subunit, showing that both K8 and K75, located in the concave domain

of the protein, can be crosslinked to nucleotide 1378 in 16S rRNA, whereas M115, in loop 5, can be crosslinked to nucleotide 1240 (Urlaub *et al.*, 1995, 1997).

S7 is located in the head of the 30S subunit at the subunit interface (Capel *et al.*, 1988; Cate *et al.*, 1999; Clemons *et al.*, 1999; Mueller & Brimacombe, 1997; Tocilj *et al.*, 1999), close to the decoding region (Muralikrishna & Cooperman, 1994) and the 530 loop of 16S rRNA (Alexander *et al.*, 1994). S7 was also crosslinked to the anticodon loop of tRNA at the A, P and E sites (Sylvers *et al.*, 1992; Döring *et al.*, 1994; Rosen & Zimmermann, 1997), and to the mRNA upstream from the decoding site (Dontsova *et al.*, 1992; Greuer *et al.*, 1999). It is involved in the binding of tetracycline, an antibiotic that binds to the A site (Buck & Cooperman, 1990) and has been shown to crosslink to puromycin, another protein synthesis inhibitor that interacts with the A site (Bischof *et al.*, 1994).

In this study, we have introduced various deletion and substitution mutations in several portions of *E. coli* S7, in order to gain further insights into its interaction with 16S rRNA.

RESULTS

Binding of *Escherichia coli* S7 protein to 16S ribosomal RNA

The S7 gene from *E. coli* K12A19 chromosomal DNA was first cloned by PCR into plasmid pET-21a(+) under control of a T7 promoter (Studier *et al.*, 1990) and its expression was induced with IPTG in *E. coli* BL21(DE3). A histidine tag was added to the N-terminal portion of the protein, which allows its purification by chromatography on a Ni-NTA column. The purity of the protein and that of its mutant derivatives described below was superior to 98 %, as assessed by SDS-PAGE (data not shown). The affinity of the protein for its RNA binding domain, in the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA, was measured by filtration on nitrocellulose membranes. For these assays, we used an RNA fragment generated by *in vitro* transcription that corresponds to the lower half of the 3' major domain. With the nitrocellulose filtration

binding assay, 100 % of the RNA transcript is never retained on the filter (see Gregory *et al.*, 1988). In the present study, saturation with wild-type S7 was observed when about 30 % of the RNA transcript was bound to the filter (Fig. 4). The apparent association constant (K'_a) between S7 and the rRNA fragment was determined from the amount of protein required to half-saturate the RNA. It was found to be $5.3 \mu\text{M}^{-1}$ when binding assays were performed in a high-ionic strength buffer (20 mM MgCl_2 , 300 mM KCl), which is classically used for 30S *in vitro* assembly (Table 1). This value is about three-fold higher than the value we observed previously (Dragon & Brakier-Gingras, 1993). This probably results from the fact that S7 was purified under native conditions in the present study whereas denaturing conditions were previously used (see also Spiridonova *et al.*, 1998). The histidine tag that was added to S7 does not appear to increase its affinity for rRNA since, as shown below, some mutant derivatives of S7 bind very poorly to the rRNA although they have this histidine tag. When binding assays were performed in a moderate-ionic strength buffer (2 mM MgCl_2 , 175 mM KCl), under conditions that are closer to physiological salt conditions (Kao-Huang *et al.*, 1977), the association constant was increased about 6-fold compared to its value in the high-ionic strength buffer (Table 1). This likely reflects the involvement of electrostatic interactions between S7 and the rRNA, which are less efficient in a high-ionic strength buffer (Draper, 1999).

Identification of the regions of S7 involved in its binding to 16S rRNA using deletion mutations

Various deletion mutants were first investigated in order to dissect out the regions of S7 involved in rRNA binding (Fig. 3). The unstructured N-terminal portion (residues 1 to 17)¹ preceding helix 1, and the C-terminal portion (residues 138 to 178), including the unstructured C-terminal region plus a part of helix 6, were deleted independently. A shorter C-terminal truncation ($\Delta 148-178$), where only the unstructured C-terminal region was eliminated, was investigated as well. The β -sheet (residues 72-89), located between helices 3 and 4, was also deleted and replaced with a short flexible

loop, RRGGGGS, recreating the charge environment normally found in this region of the protein. The CD spectra of the four deletion mutants did not differ significantly from that of wild-type S7 (data not shown), indicating that the truncated proteins did not suffer major structural perturbations except for the deletion. Affinities for the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA were measured in the high-ionic strength and the moderate-ionic strength buffers (Fig. 4 and Table 1).

Our results show that each deletion interfered with S7 binding to the 16S rRNA fragment, the effect being greatest for the deletion in the N-terminal portion. Indeed, with this mutant, there was no detectable binding in the high-ionic strength buffer whereas a very low level of binding could be detected in the moderate-ionic strength buffer, with an association constant that was reduced more than ten-fold relative to wild-type S7. Deletion of the β -sheet also interfered strongly with the binding, the association constant being reduced about three- and five-fold in the high- and moderate-ionic strength buffer, respectively. The large C-terminal deletion (Δ 138-178) reduced the affinity two- and three-fold in the high- and moderate-ionic strength buffer, respectively. The short C-terminal deletion (Δ 148-178) had no effect in the high-ionic strength buffer and caused only a weak effect in the moderate-ionic strength buffer. Altogether, these results suggest that the N-terminal portion of the protein as well as the β -sheet play a major role in S7 binding to the 16S rRNA. Helix 6 is also involved in S7 binding although to a lesser extent. The effects of the deletion of the β -sheet and of the C-terminal region were increased in the moderate-ionic strength buffer, probably reflecting the loss of electrostatic interactions between S7 and the 16S rRNA. The N-terminal portion of S7 contains several charged residues that likely interact with 16S rRNA, but the low binding capacity of the N-terminal deletion mutant makes it difficult to assess the importance of electrostatic interactions in the N-terminal region.

Identification of amino acid residues of S7 involved in its binding to 16S rRNA using point mutations

In order to define which amino acid residues of S7 are involved in binding to rRNA, we mutated the protein at 12 different positions, not only in the regions that we

previously deleted but also in other parts of the protein likely to be involved in the protein-RNA interaction (Fig. 3). The residues mutated were chosen according to their conservation and exposure to solvent determined from the S7 crystal structure (Hosaka *et al.*, 1997; Wimberly *et al.*, 1997). Each mutant was expressed in *E. coli* and purified as described above. Point mutations were introduced in the N-terminal portion (R3Q, Q8A, F17G), in the β -sheet (Y84A) and in helix 6, preceding the C-terminal unstructured portion (K136Q, R142Q and M143A). Mutations were also introduced in loop 2 (K34Q, K35Q), in loop 3 (G54S) and in loop 5 (K113Q, M115G). The mutations of K or R to Q conserve the capacity of the residues to interact with rRNA through a hydrogen bond but not through a salt bridge. Again, the CD spectra of all the point mutants were very similar to that of wild-type S7, reflecting the absence of major structural perturbations (data not shown). Comparison of the relative affinities in the high-ionic strength and in the moderate-ionic strength buffer emphasizes the importance of electrostatic interactions in the formation of the protein-RNA complex. Indeed, when the substitution of a charged residue influenced the binding of the protein, the effect was larger in the moderate-ionic strength buffer (Fig. 5 and Table 2). Among the different mutations, the largest effects (a decrease of five-fold and more in the moderate-ionic strength buffer) were obtained with Q8A and F17G in the N-terminal portion, with K35Q in loop 2, G54S in loop 3 and K113Q and M115G in loop 5. K34Q in loop 2 did not affect the binding in contrast to its neighbor K35Q. It could be observed that the effect of mutation G54S was increased in the moderate-ionic strength buffer although this substitution does not directly involve a charged residue. Mutations in helix 6 (K136Q, R142Q, M143A) also decreased the affinity but modestly. Y84A in the β -sheet only decreased the affinity by about two-fold, indicating that it does not play a major role in the interaction with the rRNA. The same observation holds for R3Q in the N-terminal region.

DISCUSSION

Involvement of a large surface of S7 in rRNA binding

Our results are in good agreement with the predictions made from the crystallographic structure of S7 (Hosaka *et al.*, 1997; Wimberly *et al.*, 1997). These predictions suggested that a large concave surface encompassing the β -sheet and helices 4 and 6 plays an important role in the interaction between the protein and the rRNA. Our deletion mutation eliminating the β -sheet severely reduces the affinity of S7 for the rRNA and supports the involvement of this region in rRNA binding. The effect of deleting helix 4 was not investigated since such a deletion would have perturbed the structure of the protein, but while our work was in progress, Miyamoto *et al.* (1999) recently published a report showing that point mutations in helix 4 as well as in the β -sheet also decreased the interaction between *Bacillus stearothermophilus* S7 and rRNA. Our results combined with those of Miyamoto *et al.* show that single point mutations in the β -sheet and in helix 4 of S7 do not severely affect binding, suggesting that several weak contacts contribute to the interaction between the concave surface of protein S7 and the rRNA. This is shown for instance with mutation Y84A in our work, and mutation R101Q in their work. Deleting a portion of helix 6 had a more modest effect than eliminating the β -sheet. A modeling study by Tanaka *et al.* (1998) recently positioned the S7 crystallographic structure into a three-dimensional model of 16S rRNA. In their placement of the concave surface of S7, in agreement with the crosslink observed between K75 and nucleotide 1378 of 16S rRNA (Urlaub *et al.*, 1995, 1997) and with footprint sites for S7 (Powers *et al.*, 1988; Powers & Noller, 1995), the β -sheet interacts with the beginning of helix 29 and with loop B of 16S rRNA, and helix 4 of S7 runs along helix 29 and also contacts helix 43 of the rRNA. Helix 6 of S7, which is proximal to the β -sheet, could interact with the tip of helix 43 or, alternatively, it could contribute indirectly to S7 binding to the rRNA by interacting with the β -sheet and influencing its orientation, so as to optimize its contact with the rRNA.

Role of S7 loops in rRNA binding

Our results also stress the importance for rRNA binding of loops 2, 3 and 5, three loops that are well-conserved and exposed to the solvent. Mutations in each of these loops strongly decreased the affinity of S7 for 16S rRNA. Loop 2 that connects helices 1 and 2 contains two positively charged K residues: whereas K34 substitution had no effect, K35 substitution severely impaired S7 binding, which can suggest a direct contact between this residue and rRNA, probably with the backbone. Loop 5 connects helices 4 and 5, and two substitutions within this loop, K113Q and M115G, severely impaired the binding of S7. A decreased binding when mutating loop 5 could be expected since M115 was found to be crosslinked to U1240, at the junction between helices 30 and 41 of 16S rRNA (Urlaub *et al.*, 1995, 1997). Loops 2 and 5 are neighbours in the crystal structure of S7, and the modeling of Tanaka *et al.* (1998) places them at the junction between helices 30 and 41 and near the beginning of helix 42, in agreement with the crosslinking data and the presence of several sites of protection of the RNA bases and backbone by S7 (Powers *et al.*, 1988; Powers & Noller, 1995).

Loop 3, which connects helices 2 and 3, is located on the face of S7 which is opposite to the concave surface and to loops 2 and 5. Mutation G54S in loop 3 severely decreased S7 binding. A previous report by Ehresmann *et al.* (1976) had shown that loop 3 could be UV-crosslinked to the 16S rRNA within the 30S subunit, suggesting that this loop directly interacts with the rRNA. The modeling of Tanaka *et al.* places it near an internal loop at the beginning of helix 41 of 16S rRNA, where protection occurs upon S7 binding. Neither the amino acid residue involved in loop 3 crosslink nor the site of crosslink on the rRNA were identified. An alternative suggestion is that loop 3 does not contact the rRNA and that this crosslink, which was not reported in subsequent studies, results from a transient interaction between the protein and the rRNA. The G54S mutation could indirectly affect S7 binding to the rRNA by introducing subtle rearrangements in the protein structure, which alter the orientation of helices and thus perturb some crucial contacts between the protein and the rRNA. These contacts

probably involve electrostatic interactions, which could account for the greater effect of the G54S mutation in the moderate-ionic strength buffer.

Involvement of the S7 N-terminal region in rRNA binding

The N-terminal portion of S7 is rich in positively charged residues, a characteristic commonly found in the so-called arginine-rich motif that occurs in several RNA-binding proteins (Tan & Frankel, 1995). Deletion of the N-terminal 17 residues of S7 dramatically affected its affinity for rRNA since it caused a complete to near-complete loss of binding, depending upon the ionic strength of the binding buffer. A similar observation was made by Miyamoto *et al.* (1999) with the truncation of the N-terminal ten residues of *B. stearothermophilus* S7. Point mutations within the N-terminal region also significantly affected S7 binding to rRNA, with a five-fold decrease of the affinity for mutants Q8A and F17G. The S7 terminal portion is an unstructured and flexible region, which has been crosslinked to C1378, the same base that was crosslinked to K75 in the β -sheet (Urlaub *et al.*, 1995, 1997) and is part of the P site (Green & Noller, 1997). It was also crosslinked to puromycin, an antibiotic that binds to the A site (Bischof *et al.*, 1994). Moreover, directed hydroxyl radical probing showed that it is proximal to the loop capping helix 43 (Miyamoto *et al.*, 1999). The results obtained with the mutations in the N-terminal portion indicate that this region of S7 plays a crucial role in the binding of the protein to rRNA, whereas the crosslinking studies and hydroxyl radical probing suggest that this region remains flexible when S7 is bound to rRNA. To account for the loss of binding in the absence of the N-terminal region, we propose that it makes an initial interaction with the rRNA that is required for the other contacts to occur. Once S7 is bound to the rRNA, the N-terminal region could disengage and then interact either with the A site or with the P site. The N-terminal portion of S7 is not conserved in its eukaryotic homolog (Kuwano *et al.*, 1992; Vladimirov *et al.*, 1996; Wimberly *et al.*, 1997), making this region an interesting potential target for the development of novel antibiotics that interfere with bacterial ribosome assembly. In various other RNA-binding ribosomal and non-ribosomal proteins such as L1 (Eliseikina *et al.*, 1996), the antitermination protein NusB of *E. coli*

(Huenges *et al.*, 1998) and the bacteriophage λ N protein (Legault *et al.*, 1998), the flexible and positively charged N-terminal portion has also been shown to play a crucial role in the interaction with the RNA.

When this work was completed, Fredrick *et al.* (2000) published a study that examined the effects of various mutations in *E. coli* S7 on 30S assembly *in vivo*. The N-terminal deletion of S7 and mutations at positions 34 and 35 were also investigated by these researchers. Interestingly, the mutant with the N-terminal deletion or a substitution of K35, which bind weakly to the 16S rRNA in our experiments, incorporate poorly in the 30S subunit in their assays whereas the mutant at position K34, which binds well to the rRNA, incorporates efficiently into the 30S subunit. However, the good correlation between our results and those of Fredrick *et al.* does not hold for the mutant harboring a deletion of the β -sheet, which is well-incorporated in their *in vivo* assays whereas its affinity for rRNA is weak in our *in vitro* assays. This suggests that the capacity of S7 to assemble into 30S subunits does not solely rely on its rRNA binding activity.

The role of S7 in organizing the 3' major domain of 16S rRNA warrants a detailed characterization of its interaction with 16S rRNA. X-ray crystallographic studies of the 30S subunit and the 70S ribosome are progressing at a very rapid pace and their structure will soon be available at an atomic resolution. It will therefore be important to investigate how these crystal structures explain the molecular basis of our mutagenesis results. It is however also possible that not all of the contacts used by S7 to bind to the naked rRNA and to initiate the assembly of the 30S subunit are maintained in the complete 30S particle.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and enzymes

All restriction endonucleases, alkaline phosphatase and T4 DNA ligase were purchased from Amersham Pharmacia Biotech. SequenaseTM version 2.0 was from Amersham Life Sciences and Deep Vent DNA polymerase was purchased from New

England Biolabs. T7 RNA polymerase was purified from the overproducing strain BL21/pAR1219 as described (Zawadzki & Gross, 1991). [α - 32 P]UTP (3000 Ci/mmol) was from ICN. IPTG, PMSF, benzamidine and lysozyme were purchased from Bioshop Canada Inc. All the oligonucleotides used were from GIBCO BRL.

Plasmids and bacterial strains

Plasmid pET-21a(+), from Novagen, was used for the expression of S7 protein and its various mutants under control of a T7 promoter. Competent *E. coli* XL1-blue cells (Sambrook *et al.*, 1989) were used for the transformation and storage of the various plasmids. *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, which carries the T7 RNA polymerase gene under control of the *lacUV5* promoter, was used with pET-21a(+) and its derivatives for expression of the S7 protein and its mutants (Studier *et al.*, 1990).

Cloning of the S7 gene and construction of S7 mutants

Genomic DNA from *Escherichia coli* K12A19 was prepared by standard procedures (Marmur, 1961) and used for amplification of the S7 gene by PCR. The forward primer (#1) that contained a sequence coding for a histidine tag (*italic letters*) was: 5'-CGCGCCATAT GCACCACCACC ACCACCACCCACGTCGTCGCGTCAT TGGTC-3' and the reverse primer (#2) was: 5'-GGCGCCATATGGGCGTTCAATTT AAGTAGCCC-3'. The underlined letters correspond to the initiation codon of S7 in primer #1 and the triplet complementary to the stop codon of S7 in primer #2. The bold letters in the primer sequences correspond to *NdeI* restriction site which is used for the cloning of the PCR fragments containing the S7 gene or its mutants into pET-21a(+). PCR amplification of the S7 gene was carried out with the Deep vent DNA polymerase in a RobocyclerTM 40 from Stratagene under the following conditions: 5 min of denaturation at 94°C, 25 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at the annealing temperature and 1 min at 72°C followed by a final extension step of 5 min at 72°C. The amplified fragment was digested with *NdeI*, purified with the GFXTM PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Pharmacia Biotech) and ligated into the appropriately

digested plasmid pET-21a(+), generating pET-21a(+)-S7, that was subsequently used for the construction of the S7 mutants. The N-terminal deletion (Δ 1-17) was created by PCR using a forward primer (#3) containing the *NdeI* site (bold letters) followed by the sequence for a histidine tag (italic letters), and designed such that the amplification of the S7 gene started at the codon corresponding to amino acid 18 (underlined letters): (5'-CGCGCC**ATATG***CACCACCACCAC CACCACGGAT*CAGAACT GCTGGCTAAA-3'). Primer #2 was the reverse primer. The C-terminal deletions (Δ 138-178 or Δ 148-178) were also produced by PCR using the forward primer #1 and a reverse primer that introduced a stop codon (underlined letters) after residue 137 or 147 of S7 (5'-GGCGCC**ATATG**ACGGTGAACGTCT**CAACGTTTCTTAACTGC**-3' (#4) and 5'-GGCGCC**ATATG**GTGTGCGAACGATT**AGTTGGCTTCG**-3' (#5), respectively. The deletion of the β -sheet (Δ 72-89) was done by PCR in two steps. The first portion of the S7 gene (residues 1 to 71) was amplified with primer #1, as the forward primer, and the following primer: 5'-GGCCCG**G**ACCCACCACCACCGCGGCGAGTCGGGCGCACGTTTTCGAG-3' (#6), as the reverse primer. The second portion of the gene (residues 90-178) was amplified with the following forward primer: 5'-GGCCCG**GGTCCGTC**CGTCCGGTTCGTCGTAATGCT-3' (#7), and primer #2, as the reverse primer. The two PCR fragments were digested with *AvaII* (in bold letters for #6 and #7) and ligated together. Primers #6 and 7 were designed such that a sequence coding for RRGGGGS was added at the junction of the two PCR fragments, replacing the β -sheet sequence (residues 72-89) with a short loop of 7 residues. This avoids a drastic structural perturbation by recreating the charged environment of this region of the protein. PCR conditions for the deletion mutants were as described above.

The plasmids coding for the substitution mutants of S7 were derived from pET-21a(+)-S7 by a two-step PCR, using the overlap extension procedure described by Ho *et al.* (1989). The flanking primers: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGG-3' (#8) and 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGGC-3' (#9) annealed to the T7 promoter region and to the T7 terminator region, respectively, on the pET plasmid. The internal mutagenic primers used to introduce the mutations were entirely overlapping and, for each

mutation, only one of the complementary primers with the same orientation as primer #8 is indicated here: R3Q: 5'-CCACCCACGTCCAGCGCGTCATTG-3' (#10); Q8A: 5'-CGTCATTGGTGCGCGTAAAATTC-3' (#11); F17G: 5'-GGATCCGAAG GGCG GATCAGAAC-3' (#12); K34Q: 5'-GGTAGATGGTCCAGAAATCTACTG-3' (#13); K35Q: 5'-AGATGGTAAACCAGTCTACTGCTG-3' (#14); G54S: 5'-TCAGCGCTCTA GCAAATCTGAAC-3' (#15); Y84A: 5'-TGGTTCTACTGCGCAGGTACCAG-3' (#16); K113Q: 5'-ACGCGGTGATCAGTCCATGGCTC-3' (#17); M115G: 5'-TGATAAATCCGCGCTCTGCGC C-3' (#18); K136Q: 5'-TGCAGTTAAGCAGCGTGAAGACG-3' (#19); K142Q: 5'-AG ACGTTCACCCAGATGGCCGAAG-3' (#20); M143A: 5'-CGTTCACCGTGCGGCCGA AGCCA-3' (#21). The underlined letters correspond to the mutated codon. The coding sequence of S7 and all its mutant derivatives was verified by the dideoxynucleotide sequencing method (Sanger *et al.*, 1977).

Expression and purification of S7 and its derivatives

S7 and its derivatives were expressed in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS as described by Studier *et al.* (1990). Expression was induced for 3 hours with 1 mM IPTG at 37°C when the culture reached an OD₆₀₀ of about 0.6. Cells were harvested and sonicated and the proteins were purified by chromatography on a Ni-NTA resin (Novagen) as described by the manufacturer. The purity of the proteins was assessed by SDS/polyacrylamide gel electrophoresis and their concentration was determined by a Bradford assay (BioRad). The fractions containing the proteins were pooled and dialyzed against a high-ionic strength buffer, HMK (50 mM Hepes-KOH, pH 7.8, 20 mM MgCl₂, 300 mM KCl and 5 mM β-mercaptoethanol), containing 0.01% Triton X-100. Aliquots of the protein solutions were conserved at -80°C.

Synthesis of the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA

Synthesis of the [³²P]-labeled 16S rRNA fragment that binds S7 was carried out by *in vitro* transcription with T7 polymerase of plasmid pFD3LH (Dragon & Brakier-

Gingras, 1993). This plasmid contains the rDNA sequence corresponding to the lower half of the 3' major domain plus the 3' minor domain of 16S rRNA (nucleotides 926-986/1219-1542). It was linearized with *RsaI* and transcribed as described by Dragon & Brakier-Gingras (1993), generating the lower half of the 3' major domain (nucleotides 926-986/1219-1393).

Filter-binding assays

The interaction between the various S7 mutants and the 16S rRNA fragment was assessed by the nitrocellulose filter binding assay, as described by Dragon & Brakier-Gingras (1993), with minor modifications. The RNA fragment was incubated at 43°C for 30 min in the binding buffer, the protein was then added at various concentrations, and the mixture was left for 30 min at 30°C, and kept on ice for at least 10 min prior to filtration. The binding buffer was either the high-ionic strength (HMK) buffer or a moderate-ionic strength buffer, where MgCl₂ was 2 mM and KCl was 175 mM. The apparent association constant (K'_a) was calculated using GraphPad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were recorded at 4°C on a Jasco J-710 spectropolarimeter, using a cylindrical cuvette with a 0.1-cm path length. Spectra were taken between 190 and 260 nm in HMK buffer at protein concentrations ranging from 0.2 to 0.4 mg/ml. Because of the high chloride concentration in the buffer, the spectra were not reliable below 210 nm.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs M. Aubry, G. Boileau, F. Dragon and R. Zimmermann for helpful discussions and comments. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada to L. B.-G.

REFERENCES

- Alexander RW, Muralikrishna P, Cooperman BS. 1994. Ribosomal components neighboring the conserved 518-533 loop of 16S rRNA in 30S subunits. *Biochemistry* 33: 12109-12118.
- Bischof O, Kruft V, Wittmann-Liebold B. 1994. Analysis of the puromycin binding site in the 70S ribosome of *Escherichia coli* at the peptide level. *J Biol Chem* 269: 18315-18319.
- Brimacombe R. 1991. RNA-protein interactions in the *Escherichia coli* ribosome. *Biochimie* 73: 927-936.
- Buck MA, Cooperman BS. 1990. Single protein omission reconstitution studies of tetracycline binding to the 30S subunit of *Escherichia coli* ribosomes. *Biochemistry* 29: 5374-5379.
- Capel MS, Engelman DM, Freeborn BR, Kjeldgaard M, Langer JA, Ramakrishnan V, Schindler DG, Schneider DK, Schoenborn, BP, Sillers IY, Yabuki S, Moore PB. 1987. A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Science* 238: 1403-1406.
- Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZ, Earnest TN, Noller HF. 1999. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285: 2095-2104.
- Clemons WMJr, May JL, Wimberly BT, McCutcheon JP, Capel MS, Ramakrishnan V. 1999. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400: 833-840.
- Dontsova O, Dokudovskaya S, Kopylov A, Bogdanov A, Rinke-Appel J, Jünke N, Brimacombe R. 1992. Three widely separated positions in the 16S RNA lie in or close to the ribosomal decoding region: A site-directed cross-linking study with mRNA analogues. *EMBO J* 11: 3105-3116.
- Döring T, Mitchell P, Osswald M, Bochkariov D, Brimacombe R. 1994. The decoding region of 16S RNA: a cross-linking study of the ribosomal A, P and E sites using tRNA derivatized at position 32 in the anticodon loop. *EMBO J* 13: 2677-2685.

- Dragon F, Brakier-Gingras L. 1993. Interaction of *Escherichia coli* ribosomal protein S7 with 16S rRNA. *Nucl Acids Res* 21: 1199-1203.
- Dragon F, Payant C, Brakier-Gingras L. 1994. Mutational and structural analysis of the RNA binding site for *Escherichia coli* ribosomal protein S7. *J Mol Biol* 244: 74-85.
- Draper DE. 1999. Themes in RNA-protein recognition. *J Mol Biol* 293: 255-270.
- Ehresmann B, Reinbolt J, Backendorf C, Tritsch D, Ebel JP. 1976. Studies of the binding sites of *Escherichia coli* ribosomal protein S7 with 16S RNA by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 67: 316-319.
- Eliseikina IA, Avliyakov NK, Grishkovskaya IB, Muranova TA, Sedelnikova SE, Garber MB. 1996. RNA binding properties of ribosomal protein L1 from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry (Moscow)* 61: 1461-1464.
- Fredrick K, Dunny GM, Noller HF. 2000. Tagging ribosomal protein S7 allows rapid identification of mutants defective in assembly and function of 30S subunits. *J Mol Biol* 298: 379-394.
- Green R, Noller HF. 1997. Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* 66: 679-716.
- Gregory RJ, Cahill PBF, Thurlow DL, Zimmermann RA. 1988. Interaction of *Escherichia coli* ribosomal protein S8 with its binding sites in ribosomal RNA and messenger RNA. *J Mol Biol* 204: 295-307.
- Greuer B, Thiede B, Brimacombe R. 1999. The cross-link from the upstream region of mRNA to ribosomal protein S7 is located in the C-terminal peptide: Experimental verification of a prediction from modeling studies. *RNA* 5: 1521-1525.
- Gutell RR, Larsen N, Woese CR 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* 58: 10-26.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.
- Hosaka H, Nakagawa A, Tanaka I, Harada N, Sano K, Kimura M, Yao M, Wakatsuki S. 1997. Ribosomal protein S7: A new RNA-binding motif with structural similarities to a DNA architectural factor. *Structure* 5: 1199-1208.

- Huenges M, Rölz C, Gschwind R, Peteranderl R, Berglechner F, Richter G, Bacher A, Kessler H, Gemmecker G. 1998. Solution structure of the antitermination protein NusB of *Escherichia coli*: a novel all-helical fold for an RNA-binding protein. *EMBO J* 17: 4092-4100.
- Johanson U, Hughes D. 1992. Comparison of the complete sequence of *str* operon in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Gene* 120: 93-98.
- Kao-Huang Y, Revzin A, Butler AP, O'Conner P, Noble DW, von Hippel PH. 1977. Nonspecific DNA binding of genome-regulating proteins as a biological control mechanism: measurement of DNA-bound *Escherichia coli lac* repressor *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4228-4232.
- Kuwano Y, Olvera J, Wool IG. 1992. The primary structure of rat ribosomal protein S5, a ribosomal protein present in the rat genome in a single copy. *J Biol Chem* 267: 25304-25308.
- Legault P, Li J, Mogridge J, Kay LE, Greenblatt J. 1998. NMR structure of the bacteriophage lambda N peptide/*boxB* RNA complex: recognition of a GNRA fold by an arginine-rich motif. *Cell* 93: 289-299.
- Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208-218.
- Mueller F, Brimacombe R. 1997. A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. II. The RNA-protein interaction data. *J Mol Biol* 271: 545-565.
- Muralikrishna P, Cooperman BS. 1994. A photolabile oligodeoxyribonucleotide probe of the decoding site in the small subunit of the *Escherichia coli* ribosome: identification of neighboring ribosomal components. *Biochemistry* 33: 1392-1398.
- Miyamoto A, Usui M, Yamasaki N, Yamada N, Kuwano E, Tanaka I, Kimura, M. 1999. Role of the N-terminal region of ribosomal protein S7 in its interaction with 16S rRNA which binds to the concavity formed by the beta-ribbon arm and the alpha-helix. *Eur J Biochem* 266: 591-598.

- Nowotny V, Nierhaus KH. 1988. Assembly of the 30S subunit from *Escherichia coli* ribosomes occurs via two assembly domains which are initiated by S4 and S7. *Biochemistry* 27: 7051-7055.
- Powers T, Noller HF. 1995. Hydroxyl radical footprinting of ribosomal proteins on 16S rRNA. *RNA* 1: 194-209.
- Powers T, Changchien LM, Craven GR, Noller HF. 1988. Probing the assembly of the 3' major domain of 16S ribosomal RNA. Quaternary interactions involving ribosomal proteins S7, S9 and S19. *J Mol Biol* 200: 309-319.
- Reinbolt J, Tritsch D, Wittmann-Liebold B. 1978. The primary structure of ribosomal protein S7 from *E. coli* strains K and B. *FEBS Lett* 91: 297-301.
- Rosen KV, Zimmermann RA. 1997. Photoaffinity labelling of 30S-subunit proteins S7 and S11 by 4-thiouridine-substituted tRNA^{Phe} situated at the P site of *Escherichia coli* ribosomes. *RNA* 3: 1028-1036.
- Saito K, Nomura M. 1994. Post-transcriptional regulation of the *str* operon in *Escherichia coli*. Structural and mutational analysis of the target site for translational repressor S7. *J Mol Biol* 235: 125-139.
- Saito K, Mattheakis LC, Nomura M. 1994. Post-transcriptional regulation of the *str* operon in *Escherichia coli*. Ribosomal protein S7 inhibits coupled translation of S7 but not its independent translation. *J Mol Biol* 235: 111-124.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. In *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, section 2, p. 59.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Spiridonova VA, Golovin AV, Drygin DY, Kopylov AM. 1998. An extremely high conservation of RNA-protein S7 interactions during prokaryotic ribosomal biogenesis. *Biochem Mol Biol Int* 44: 1141-1146.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60-89.

- Sylvers LA, Kopylov AM, Wower J, Hixon SS, Zimmermann RA. 1992. Photochemical cross-linking of the anticodon loop of yeast tRNA^{Phe} to 30S-subunit protein S7 at the ribosomal A and P sites. *Biochimie* 74: 381-389.
- Tan R, Frankel AD. 1995. Structural variety of arginine-rich RNA-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5282-5286.
- Tanaka I, Nakagawa A, Hosaka H, Wakatsuki S, Mueller F, Brimacombe R. 1998. Matching the crystallographic structure of ribosomal protein S7 to a three-dimensional model of the 16S ribosomal RNA. *RNA* 4: 542-550.
- Tocilj A, Schlünzen F, Janell D, Glühmann M, Hansen HAS, Harms J, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A. 1999. The small ribosomal subunit from *Thermus thermophilus* at 4.5 Å resolution: Pattern fittings and the identification of a functional site. *Proc Natl Acad Sc. USA* 96: 14252-14257.
- Urlaub H, Thiebe B, Müller EC, Wittmann-Liebold B. 1995. Protein-rRNA binding features and their structural and functional implications in ribosomes determined by cross-linking studies. *EMBO J* 14: 4578-4588.
- Urlaub H, Kruff V, Bischof O, Müller EC, Brimacombe R, Wittmann-Liebold B. 1997. Identification and sequence analysis of contact sites between ribosomal proteins and rRNA in *Escherichia coli* 30S subunits by a new approach using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectroscopy combined with N-terminal microsequencing. *J Biol Chem* 272: 14547-14555.
- Vladimirov SN, Ivanov AV, Karpova GG, Musolyamov AK, Egorov TA, Thiebe B, Wittman-Liebold B, Otto A. 1996. Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry. *Eur J Biochem* 239: 144-149.
- Wimberly BT, White SW, Ramakrishnan V. 1997. The structure of ribosomal protein S7 at 1.9 Å resolution reveals a β-hairpin motif that binds double-stranded nucleic acids. *Structure* 5: 1187-1198.
- Zawadzki V, Gross HJ. 1991. Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase. *Nucl Acids Res* 19: 1948.

Footnote

¹Numbering is that of Reinbolt *et al.* (1978) for *E. coli* S7, except that it was corrected for the omission of amino acid R91 in the original report, as later shown by sequencing of the gene (Johanson & Hughes, 1992).

Abbreviations:

A₆₀₀, absorbance at 600 nm; CD, circular dichroism; IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactoside; Ni-NTA, nickel-nitriloacetic acid; PCR, polymerase chain reaction; PMSF, phenyl methane sulfonyl fluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Abbreviations for the amino acid residues are as follows: A for alanine, F for phenylalanine, G for glycine, K for lysine, M for methionine, Q for glutamine, R for arginine, S for serine, Y for tyrosine.

Tableau 2-1: Affinity for 16S rRNA of wild-type S7 and deletion mutants.

Mutant	High-ionic strength		Moderate-ionic strength	
	K' _a (μM^{-1})	Relative affinity	K' _a (μM^{-1})	Relative affinity
Wild-type S7	5.3 ± 0.5	1.00	30.5 ± 3.8	1.00
Δ1-17	n.d.	—	2.0 ± 0.4	0.07
Δ72-89	1.8 ± 0.3	0.34	6.1 ± 1.0	0.20
Δ138-178	3.1 ± 0.5	0.58	9.8 ± 1.8	0.32
Δ148-178	5.6 ± 0.7	1.06	16.9 ± 2.3	0.55

K'_a values are means plus standard deviation of at least four independent experiments. n.d.: not detectable. Experiments were performed either in a high-ionic strength buffer (20 mM MgCl₂, 300 mM KCl) or in a moderate-ionic strength buffer (2 mM MgCl₂, 175 mM KCl).

Tableau 2-2: Affinity for 16S rRNA of various point mutants of S7.

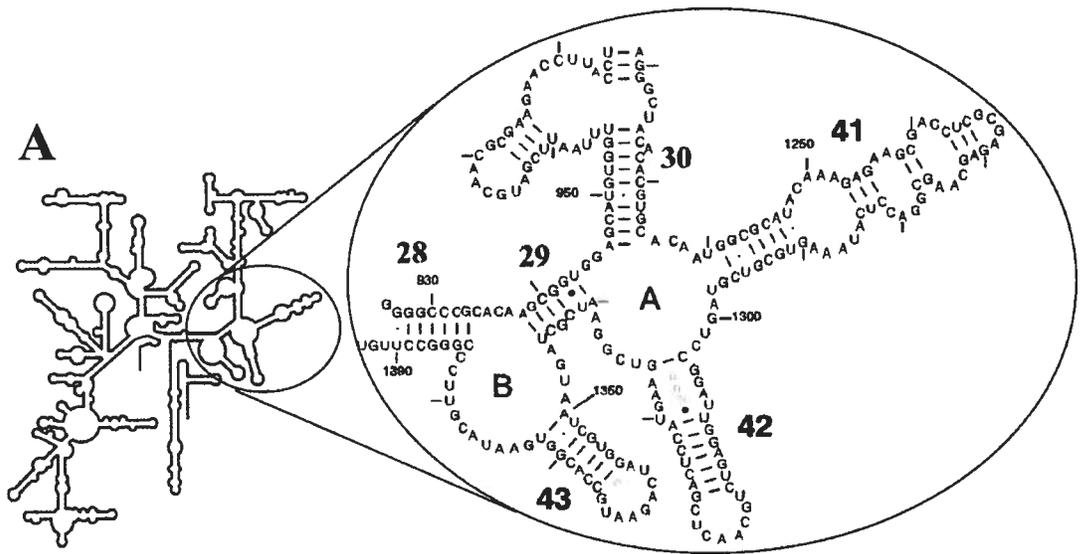
Mutant	High-ionic strength		Moderate-ionic strength	
	K' _a (μM^{-1})	Relative affinity	K' _a (μM^{-1})	Relative affinity
Wild-type S7	5.3 ± 0.5	1.00	30.5 ± 3.8	1.00
R3Q	3.0 ± 0.4	0.57	11.5 ± 1.6	0.38
Q8A	1.1 ± 0.2	0.21	7.9 ± 1.5	0.26
F17G	0.9 ± 0.2	0.17	6.4 ± 0.8	0.21
K34Q	5.5 ± 0.6	1.04	33.0 ± 5.3	1.08
K35Q	2.4 ± 0.5	0.45	4.2 ± 0.9	0.14
G54S	2.1 ± 0.4	0.40	4.9 ± 0.8	0.16
Y84A	3.4 ± 0.6	0.64	17.2 ± 2.8	0.56
K113Q	2.2 ± 0.3	0.42	7.3 ± 1.3	0.24
M115G	1.4 ± 0.3	0.26	7.8 ± 1.6	0.26
K136Q	5.2 ± 0.9	0.98	24.1 ± 3.5	0.79
R142Q	4.4 ± 0.9	0.83	20.1 ± 3.2	0.66
M143A	3.6 ± 0.7	0.68	11.8 ± 2.9	0.39

K'_a values are means plus standard deviation of at least four independent experiments. Experiments were performed either in a high-ionic strength buffer (20 mM MgCl₂ 300 mM KCl) or in a moderate-ionic strength buffer (2 mM MgCl₂, 175 mM KCl).

Figure 2-1: Structure of the 16S rRNA subdomain that binds S7.

A. Skeleton of the 16S rRNA secondary structure (adapted from Gutell *et al.*, 1994). The magnified portion of the RNA is the lower half of the 3' major domain that contains the binding site of S7. Helices are numbered according to Brimacombe (1991).

B. Minimal 16S rRNA fragment that binds S7, as determined by Dragon & Brakier-Gingras (1993).



B

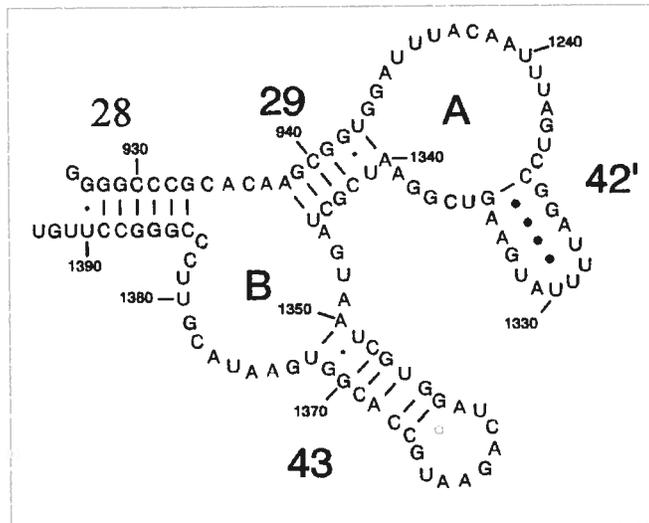


Figure 2-2: Crosslink sites between protein S7 and 16S rRNA within the 30S subunit. Left: secondary structure of the RNA binding site of S7 showing bases U1240 and C1378 (circled) that have been crosslinked to the protein. Right: crystallographic structure of *B. stearothermophilus* S7 adapted from Hosaka *et al.* (1997) showing residues crosslinked to the rRNA at positions 8, 75, and 115. The crosslink at position 8 was found with *B. stearothermophilus* S7 (where it is K whereas it is Q in *E. coli* S7), the crosslink of K75 was found with *E. coli* S7, and that of M115 with both *E. coli* and *B. stearothermophilus* S7. The concave surface encompassing the β -sheet and parts of helices 4 and 6 to which we refer in the text faces the reader. The S7 image was produced using Weblab ViewerPro software (Molecular Simulation Inc.).

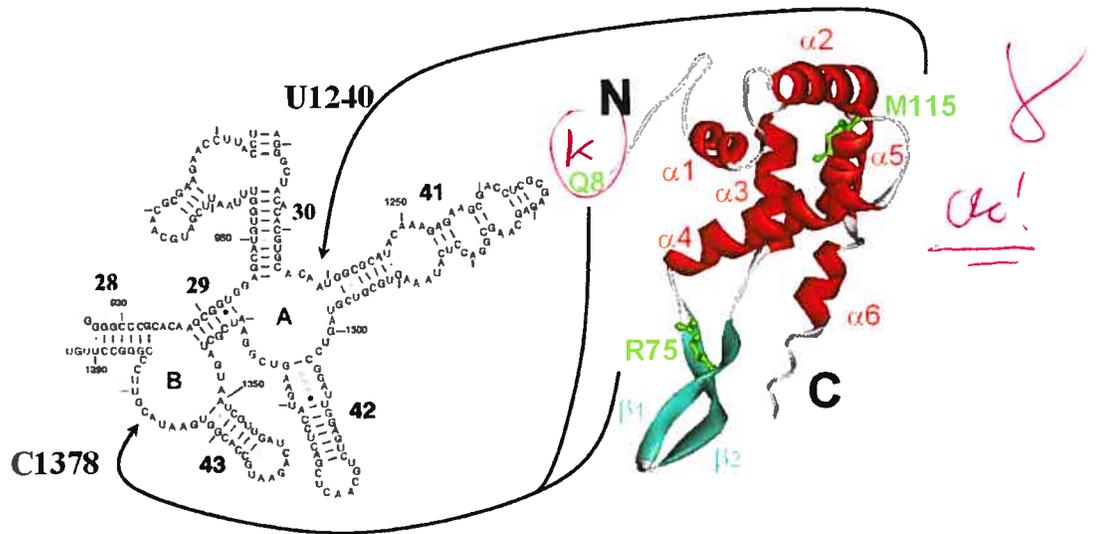


Figure 2-3: Mutations in *E. coli* protein S7.

A. Schematic representation of the different S7 mutations that were investigated in this study. $\ell 1$ to $\ell 7$ correspond to loop1 to loop 7. With mutant $\Delta 72-89$, the black box represents the RRGGGGS sequence that replaced the β -sheet (see the text).

B. Localization of the point mutations in the crystallographic structure of S7 adapted from Hosaka *et al.* (1997).

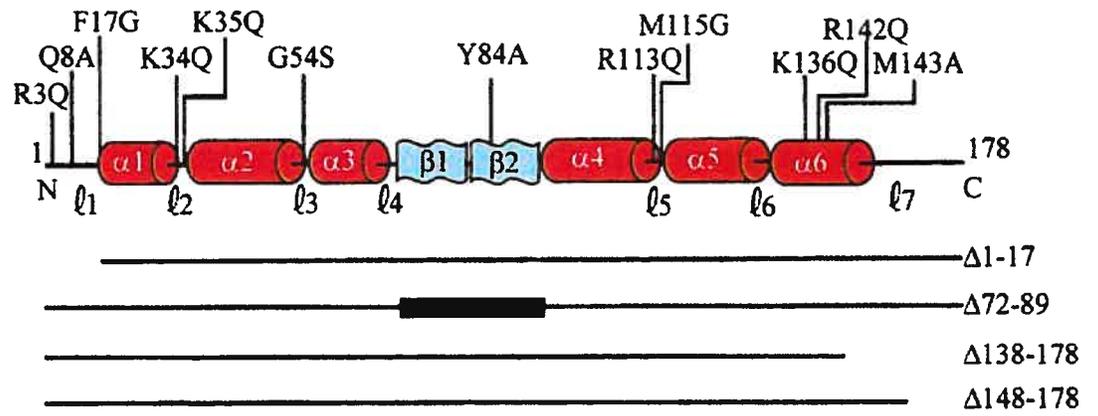
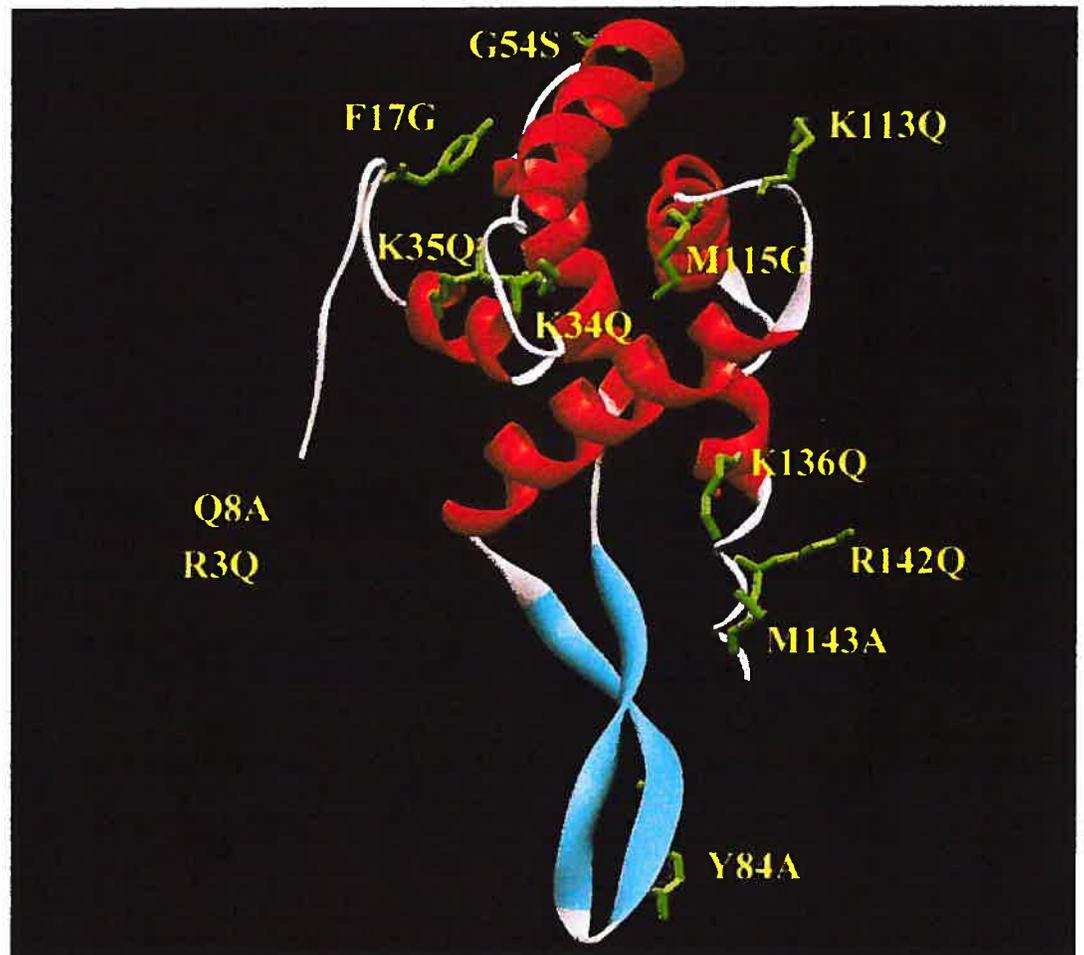
A**B**

Figure 2-4: Binding curves for the interaction of wild-type S7 and its deletion derivatives with rRNA. The curves correspond to representative binding isotherms measured by a nitrocellulose filter assay. The lower half of the 3' major domain of 16S rRNA was synthesized *in vitro* and incubated with increasing amounts of protein. Background retention of RNA on the filter (2 to 3 % of the total rRNA) was subtracted before plotting. Binding constants are given in Table 1.

A. Binding in a high-ionic strength buffer.

B. Binding in a moderate-ionic strength buffer.

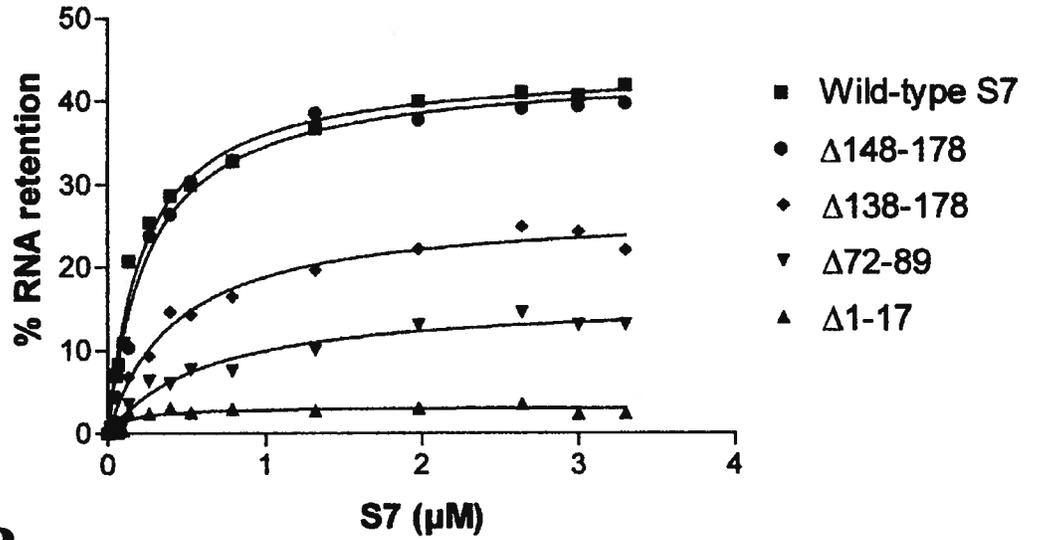
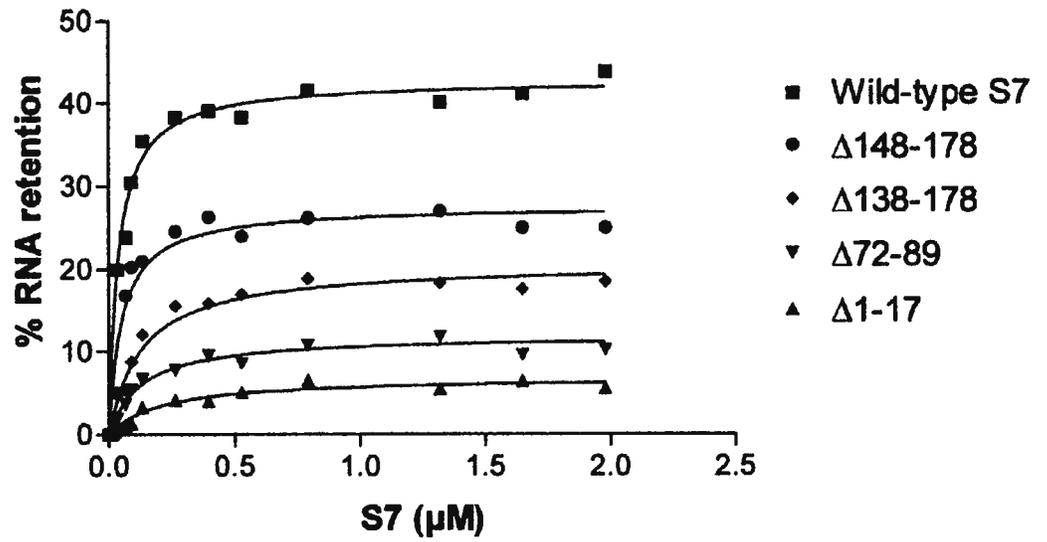
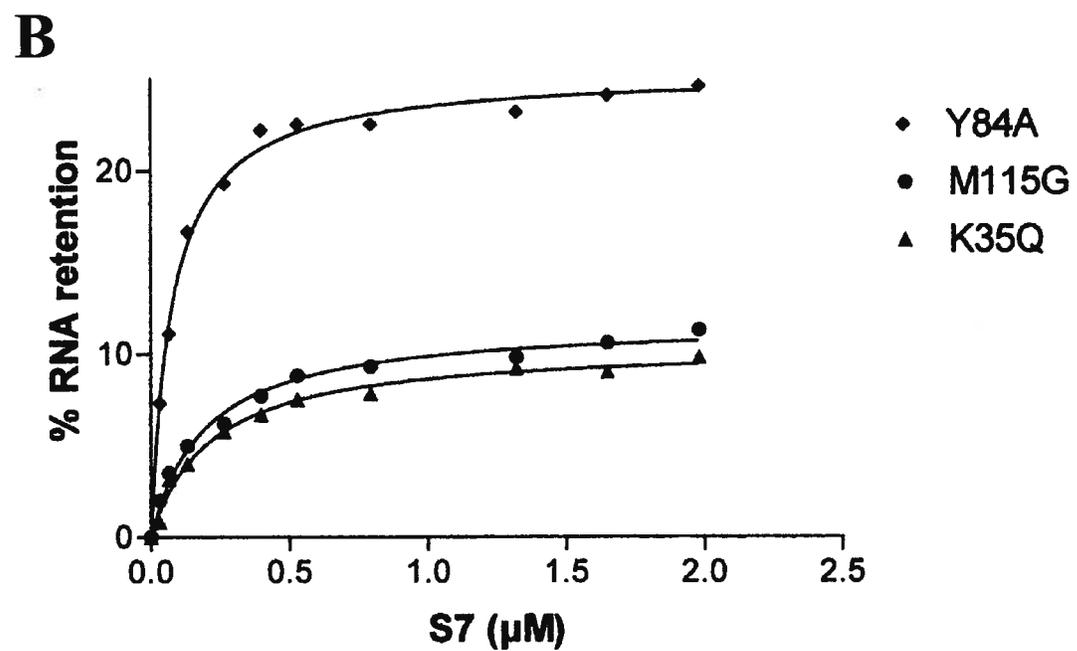
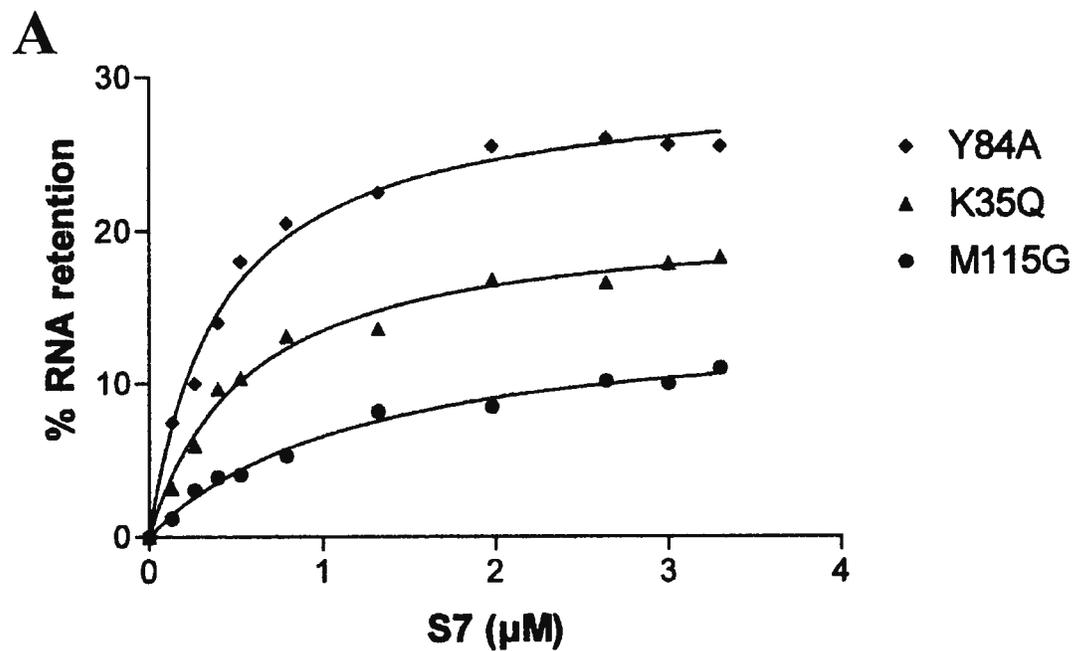
A**B**

Figure 2-5: Binding curves for the interaction of S7 point mutants with rRNA. Typical binding curves are shown for a transcript corresponding to the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA. Conditions were as in Figure 4. Binding constants are given in Table 2.

A. Binding in a high-ionic strength buffer.

B. Binding in a moderate-ionic strength buffer.



Chapitre III

Ribosomal protein from *Escherichia coli* uses the same determinants to bind to 16S ribosomal RNA and to its messenger RNA

Francis Robert and Léa Brakier-Gingras

Département de Biochimie
Université de Montréal
Montréal, H3C 3J7
Québec, Canada

Nucleic Acids Research, 29: 677-682, 2001.

ABSTRACT

Ribosomal protein S7 from *E. coli* binds to the lower half of the 3' major domain of 16S ribosomal RNA and initiates its folding. It also binds to its own mRNA, the *str* mRNA, and represses its translation. Using filter-binding assays, we showed in this study that the same mutations that interfere with S7 binding to 16S rRNA also weaken its affinity for its mRNA. This suggests that the same protein regions are responsible for mRNA and rRNA binding affinities, and that S7 could recognize identical sequence elements within the two RNA targets, although they have dissimilar secondary structures. Overexpression of S7 is known to inhibit bacterial growth. This phenotypic growth defect was relieved in cells overexpressing S7 mutants that bind poorly the *str* mRNA, confirming that growth impairment is controlled by the binding of S7 to its mRNA. Interestingly, a mutant with a short deletion at the C-terminus of S7 was more detrimental to cell growth than wild-type S7. This suggests that the C-terminal portion of S7 plays an important role in ribosome function, which is perturbed by the deletion.

INTRODUCTION

Ribosomal protein S7 from *E. coli* is a primary binding protein that organizes the folding of the 3' major domain of 16S rRNA and enables the subsequent binding of other ribosomal proteins, so as to form the head of the 30S subunit. It is located at the subunit interface, in proximity to the decoding center and its structure, which has been solved by X-ray crystallography for thermophilic bacteria, consists of a six- α helix bundle with a β -hairpin between helices 3 and 4 (1, 2, reviewed in 3). Mutagenesis studies have been used to define which amino acid residues in S7 are involved in its interaction with rRNA (4, 5) and it was found that several regions play an important role in S7 binding, including its N-terminal region, the β -hairpin, and loops 2 and 5, connecting α -helices 1 and 2, and 4 and 5, respectively. In *E. coli*, the expression levels of most ribosomal proteins are regulated autogenously by primary binding proteins, which exert a feedback control at the translational level by binding to a specific site of their operon mRNA (reviewed in 6, 7). S7 is one of these translational repressors (8). It is encoded by the *str* operon, which also codes for ribosomal protein S12, and elongation factors G and Tu. Overexpression of S7 interferes with bacterial growth (9), an effect which is assumed to result from repression of translation of the *str* operon mRNA upon S7 binding, causing an imbalance between rRNA transcription and ribosomal protein and elongation factor translation. The binding site of S7 in the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA was delineated to a short fragment comprising two multibranch loops (10), whereas its binding site on its mRNA is contained in an irregular hairpin structure located in the intercistronic region between S12 and S7 coding sequences (11). Although these binding sites appear to have a very different secondary structure, they contain two identical sequence elements (see Fig. 1). These two elements likely correspond to recognition elements for S7 on 16S rRNA, as suggested by protection by S7 against hydroxyl radical attack, crosslinking studies and mutational and chemical probing of the S7 binding site (13, 14, 15, reviewed in 16). The recent crystal structures of the bacterial 30S subunit at 3.0 and 3.3 Å resolution (17, 18) fully support this suggestion, in showing contacts between these two elements and protein S7. The binding of S7 to its mRNA is much less characterized than its binding to

16S rRNA, but it could be hypothesized that the two elements that are common to 16S rRNA and the *str* mRNA also constitute the recognition signals for S7 on its mRNA.

In this study, we have compared the effect of various deletion and point mutations in *E. coli* S7 on its binding to its own mRNA and to 16S rRNA. We also investigated the effect of mutations in S7 on its capacity to interfere with cell growth, allowing a direct comparison between the binding affinity of the repressor for its mRNA and its *in vivo* effectiveness. Our results suggest that S7 uses the same features to recognize its binding site on its mRNA and on 16S rRNA, and demonstrate a direct relationship between the capacity of the protein to bind its mRNA and its ability to interfere with cell growth.

MATERIAL AND METHODS

Construction of plasmids and expression of S7 and its mutant derivatives

Plasmid pET-21a(+)-S7, which codes for *E. coli* K12 S7 under control of a T7 promoter, and its derivatives coding for various S7 deletion and point mutants were previously described (5). These plasmids were used to transform *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Novagen) and the recombinant proteins were expressed after induction with isopropyl-D-galactopyranoside (IPTG) and purified by affinity chromatography, as described (5). Plasmid pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen), which allows *in vitro* transcription of a cloned DNA sequence with the T7 RNA polymerase, was used for the cloning of the intercistronic S12-S7 region of the *str* operon, extending on the S12 and S7 coding sequences. Genomic DNA was obtained from *Escherichia coli* K12A19 following a standard procedure (19), and we amplified by PCR the sequence corresponding to bases -160 to +71 (the first base of S7 initiation codon on the *str* mRNA corresponds to position 1). The forward primer (#1) was: 5'-GCGCGGCTAGCCTCCGGCGTTAAA GACCGTAAGC-3' and the reverse primer (#2) was: 5'-GCGCGTTCTGAACCAGCAG TTCTGATCCGAACTTCG-3'. The bold letters in the sequence of primers #1 and #2 correspond to *Nhe*I and *Hind*III restriction sites, respectively. These sites were used for the cloning of the PCR fragment containing the S12-S7 intercistronic region into

pcDNA3.1/Hygro(+), generating pcDNA3.1/Hygro(+)-S12ICRS7. PCR was carried out using the Vent DNA polymerase (New England BioLabs) in a RobocyclerTM 40 from Stratagene under the following conditions: 4 min of denaturation at 94°C, 28 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C, followed by a final extension step of 5 min at 72°C.

RNA preparation and nitrocellulose filter binding assays

The ³²P-labeled fragment of the *str* operon used for binding studies was obtained by run-off transcription in the presence of [³²P]UTP of plasmid pcDNA3.1/Hygro(+)-S12ICRS7 linearized with *Hind*III. The RNA fragment of the *str* mRNA contained 252 nucleotides, of which 230 nucleotides encompass the end of S12 sequence, the intercistronic region and the beginning of S7 sequence, and 22 nucleotides originate from the vector. A ³²P-labeled fragment of 218 nucleotides corresponding to the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA and containing the S7 binding site was generated as described (5). Binding assays were done as described previously (5), in 50 µl of binding buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 20 mM Mg(OAc)₂, 350 mM KOAc and 5 mM β-mercaptoethanol) with increasing concentrations of protein.

Growth assays

Twenty ml of LB medium were inoculated with a single colony of *E. coli* BL21(DE3)/pLysS or a *recA* derivative, BLR(DE3)/pLysS, transformed with either pET-21a(+)-S7 or its various derivative plasmids coding for the S7 mutants. When the optical density at 600 nm was 0.05, IPTG was added to the cell culture to a final concentration of 0.75 mM and cell growth was monitored at 37°C by measuring the optical density at 600 nm every 20 minutes. Cell doubling time was calculated using GraphPad Prism version 3.00 for Windows.

RESULTS

To identify amino acid residues critical for the binding of S7 to 16S rRNA, a set of deletion and single amino acid substitution mutants had been previously generated (5, see Fig. 2), and CD spectra had indicated that the mutant proteins did not suffer major

structural perturbations. The same mutants were investigated for their capacity to interact with the *str* mRNA fragment encompassing the S7 binding site in a high-ionic strength buffer (20 mM Mg(OAc)₂, 350 mM KOAc). With this buffer, the maximal retention efficiency was about 35 % for the complex between the *str* mRNA fragment and wild-type S7, but was below 20 % in a buffer containing chloride instead of acetate anions. We therefore selected the acetate buffer for studying the interaction between S7 mutants and the *str* mRNA fragment. The apparent association constant (K'_a) of wild-type S7 for its mRNA was determined from the amount of protein required to half-saturate the RNA. Its value ($6.8 \pm 0.7 \mu\text{M}^{-1}$) was identical to that measured for the association constant between S7 and the 16S rRNA fragment ($7.1 \pm 1.4 \mu\text{M}^{-1}$), a value comparable to that of $5.3 \pm 0.5 \mu\text{M}^{-1}$ found previously in a slightly different high-ionic strength buffer containing chloride and not acetate anions (5).

Representative binding curves for different mutants are shown in Figure 3. The apparent association constants of the mutants derivatives of S7 for the *str* mRNA fragment is presented in Table 1 and the effect of the mutations on S7 binding to the *str* mRNA is compared to their effect on S7 binding to 16S rRNA. Several deletion and point mutations located throughout the protein sequence significantly decreased the affinity of S7 for its mRNA. They include a N-terminal deletion (Δ 1-17), deletion of the β -hairpin (Δ 72-89), point mutations in the N-terminal region (Q8A, F17G), mutation K35Q in loop 2 and mutation M115G in loop 5. Interestingly, the same mutations had been found to significantly interfere with S7 binding to the rRNA (5). The other mutations modestly or hardly affected S7 binding to the mRNA, comparable to their effect on rRNA binding. The fact that the effect of mutations are similar for 16S rRNA and mRNA binding strongly suggests that S7 uses the same features to bind the two RNA targets.

The effect of overexpression of the S7 mutants on cell growth was assessed by measuring the cell doubling time, under conditions where wild-type chromosome-encoded S7 was also expressed. A direct correlation could be readily observed between the capacity of the mutants to bind the *str* mRNA and their ability to interfere with cell growth (Table 2). Mutants that bind poorly the *str* mRNA had only a weak effect on cell growth. This was the case for mutants Δ 1-17, Δ 72-89, Q8A, F17G, K35Q and M115G.

On the other hand, mutants that bind efficiently to the mRNA such as K34Q, K136Q and R142Q strongly interfered with bacterial growth as does wild-type S7. One of the mutants, Δ 148-178, with a short C-terminal deletion, was even more detrimental than wild-type S7.

DISCUSSION

Our results show that *E. coli* S7 binds its mRNA and the 16S rRNA with the same affinity. S8, a regulatory ribosomal protein binds its mRNA with an affinity which is about five-fold less than its affinity for the rRNA (20), whereas S4, another regulatory ribosomal protein has the same affinity for its mRNA and for the rRNA (21). One would have expected regulatory ribosomal proteins to bind preferentially the rRNA, so that they repress translation of their mRNA only when there is a shortage of rRNA transcript. Deckman and Draper (21) concluded from studies with S4 that the fact that regulatory ribosomal proteins are incorporated into ribosomes preferentially to binding their mRNA results from the high cooperativity of ribosome assembly. Our observation that S7 binds its mRNA and the 16S rRNA with the same affinity fully supports this conclusion.

As indicated in the Introduction, the binding sites of S7 on 16S rRNA and on its mRNA, although apparently dissimilar at the secondary structure level, present two identical sequence elements, which were identified as recognition elements for S7 binding in rRNA. Our results with a variety of S7 mutants clearly suggest that S7 uses the same determinants to bind the *str* mRNA and 16S rRNA since the same mutations which decreased S7 binding to rRNA decreased its affinity for the mRNA. It is thus very likely that S7 recognizes two identical elements on the mRNA and on the 16S rRNA. Among ribosomal proteins acting as translational repressors, the binding sites for S8 and L1 on their mRNA are strikingly similar to their binding sites on the rRNA, from which it can readily be inferred that they recognize identical elements on the two targets (reviewed in 22). In contrast, like for S7, the mRNA binding sites of the translational repressors S4 and S15 seem very different from their binding sites on the rRNA

(reviewed in 23). However, S4 appears to use the same determinants to bind rRNA and its mRNA since S4 deletions that decreased rRNA recognition had parallel effects on mRNA binding (24). As to S15, its interaction with 16S rRNA has been characterized in detail from the crystallographic structure of a complex between S15 from a thermophilic bacterium and a 16S rRNA fragment encompassing its binding site (25), as well as from footprinting and interference studies (14, 26, 27). Footprinting and mutagenesis studies with its mRNA binding site (28, 29) strongly suggest that S15 recognizes similar elements on both rRNA and its mRNA. Therefore, it appears to be a common characteristic of ribosomal proteins acting as translational repressors that they recognize the same elements in their mRNA and in their rRNA binding site, whether these sites appear similar or dissimilar.

We observed that overexpression of wild-type S7 interferes with cell growth, which, as mentioned above, can be related to its binding its own polycistronic mRNA, the *str* mRNA, and repressing its translation (8, 9). Our results show that there is a direct correlation between the capacity of each S7 mutant to bind the *str* mRNA *in vitro* and the effect of its overexpression on bacterial growth. Indeed, mutants that bind well the *str* RNA efficiently interfered with cell growth whereas overexpression of the mutants that bind poorly the *str* mRNA only weakly affected cell growth. Alternatively, these mutants that weakly interfere with cell growth could be rapidly degraded *in vivo*, thus accounting for their lack of effect. However, examination of the amount of the overexpressed S7 proteins at different times of bacterial growth does not support this possibility (data not shown). Interestingly, Fredrick *et al.*, (9), who also investigated the effect of various mutations in S7 on cell growth, found a close correlation between the capacity of different S7 mutants to interfere with cell growth and their proficiency in 30S subunit assembly and suggested that S7 residues involved in mRNA binding are also involved in rRNA binding. This suggestion is directly confirmed by the results of the present study.

In our *in vivo* assays, the chromosome-encoded wild-type S7 is coexpressed with the plasmid-encoded S7 mutants. As suggested by the results from Fredrick *et al.*, (9), it is likely that the 30S subunits contain almost exclusively wild-type S7 when the S7 mutants which are overexpressed bind poorly the 16S rRNA, whereas S7 mutants that

bind efficiently 16S rRNA can outcompete wild-type S7 for the formation of 30S subunits. Therefore, with these mutants, that conserve a high affinity for 16S rRNA as well as for the *str* mRNA, effects on growth could result not only from S7 binding to the *str* mRNA but also from a decreased activity of the ribosomes having incorporated the mutated protein. Mutant $\Delta 148-178$ with a deletion of 31 amino acids at the C-terminal end binds well to 16S rRNA and to its mRNA, but its overexpression is much more detrimental than that of wild-type S7, suggesting that the effect of the mutation results not only from the repression of translation of the *str* mRNA but also from a functional defect in the 30S subunits having incorporated the mutated S7 protein. One could argue here that mutant $\Delta 138-178$, with a larger deletion at the C-terminus is not as detrimental as $\Delta 148-178$, although it also lacks the sequence deleted in $\Delta 148-178$. However, it is likely that mutant $\Delta 138-178$ is less efficiently incorporated into the 30S subunit than mutant $\Delta 148-178$, due to its weaker binding affinity for the rRNA. Greuer *et al.* (30) recently showed that a region in the C-terminus of *E. coli* S7 (positions 149 to 155) could be crosslinked to a mRNA analog, in the spacer between the Shine-Dalgarno sequence and the initiator codon. An attractive hypothesis is that the C-terminal region of S7 participates in the formation of a functional 30S initiation complex and that 30S subunits having incorporated mutant $\Delta 148-178$ would be impaired in translation initiation. Experiments are in progress in our laboratory to investigate this hypothesis. Interestingly, the portion of the C-terminal region of S7 that is crosslinked to mRNAs is extremely well-conserved in bacteria (1, 2), but not in the eukaryotic homolog of S7 (31, 32). This could be related to the known difference in the way prokaryotic and eukaryotic ribosomes initiate protein synthesis (33).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs François Dragon and Stephen Michnick for stimulating discussions and for comments on this manuscript. This study was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Hosaka,H., Nakagawa,A., Tanaka,I., Harada,N., Sano,K., Kimura,M., Yao,M. and Wakatsuki,S. (1997) Ribosomal protein S7: a new RNA-binding motif with structural similarities to a DNA architectural factor. *Structure*, **5**, 1199-1208.
2. Wimberly,B.T., White,S.W. and Ramakrishnan,V. (1997) The structure of ribosomal protein S7 at 1.9 Å resolution reveals a beta-hairpin motif that binds double-stranded nucleic acids. *Structure*, **5**, 1187-1198.
3. White,S.W., Clemons Jr.,W.M., Davies,C., Ramakrishnan,V. and Wimberly,B.T. (2000) In Garrett,R.A., Douthwaite,S.R., Liljas,A., Matheson,A.T., Moore,P.B. and Noller,H.F. (eds), *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions*. ASM Press, Washington, DC, pp.73-83.
4. Miyamoto,A., Usui,M., Yamasaki,N., Yamada,N., Kuwano,E., Tanaka,I. and Kimura,M. (1999) Role of the N-terminal region of ribosomal protein S7 in its interaction with 16S rRNA which binds to the concavity formed by the beta-ribbon arm and the alpha-helix. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 591-598.
5. Robert,F., Gagnon,M., Sans,D., Michnick,S. and Brakier-Gingras,L. (2000) Mapping of the RNA recognition site of *Escherichia coli* ribosomal protein S7. *RNA*, in press.
6. Keener,J. and Nomura,M. (1996) Regulation of ribosome synthesis. In Neidhardt,F.C., Ingraham,J.L., Low, K.B., Magasanik,B., Schaecher,M. and Umberger,H.E. (eds), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, 2nd edit., vol. 1, ASM Press, Washington, DC, pp. 1417-1431.
7. Zengel,J.M. and Lindahl,L. (1994) Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **47**, 331-370.
8. Saito,K., Mattheakis,L.C. and Nomura,M. (1994) Post-transcriptional regulation of the str operon in *Escherichia coli*. Ribosomal protein S7 inhibits coupled translation of S7 but not its independent translation. *J. Mol. Biol.*, **235**, 111-124.
9. Fredrick,K., Dunny,G.M. and Noller,H.F. (2000) Tagging ribosomal protein S7 allows rapid identification of mutants defective in assembly and function of 30 S subunits. *J. Mol. Biol.*, **298**, 379-394.

10. Dragon,F. and Brakier-Gingras,L. (1993) Interaction of Escherichia coli ribosomal protein S7 with 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1199-1203.
11. Saito,K. and Nomura,M. (1994) Post-transcriptional regulation of the str operon in Escherichia coli. Structural and mutational analysis of the target site for translational repressor S7. *J. Mol. Biol.*, **235**, 125-139.
12. Brimacombe,R. (1991) RNA-protein interactions in the Escherichia coli ribosome. *Biochimie*, **73**, 927-936.
13. Dragon,F., Payant,C. and Brakier-Gingras,L. (1994) Mutational and structural analysis of the RNA binding site for Escherichia coli ribosomal protein S7. *J. Mol. Biol.*, **244**, 74-85.
14. Powers,T. and Noller,H.F. (1995) Hydroxyl radical footprinting of ribosomal proteins on 16S rRNA. *RNA*, **1**, 194-209.
15. Urlaub,H., Thiede,B., Müller,E.C., Brimacombe,R. and Wittmann-Liebold,B. (1997) Identification and sequence analysis of contact sites between ribosomal proteins and rRNA in Escherichia coli 30 S subunits by a new approach using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry combined with N-terminal microsequencing. *J. Biol. Chem.* **272**, 14547-14555.
16. Mueller,F. and Brimacombe,R. (1997) A new model for the three-dimensional folding of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA. II. The RNA-protein interaction data. *J. Mol. Biol.*, **271**, 545-565.
17. Schlüzen,F., Tocilj,A., Zarivach,R., Harms,J., Gluehmann,M., Janell,D., Bashan,A., Bartels,H., Agmon,I., Franceschi,F. and Yonath,A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*, **102**, 615-623.
18. Wimberly,B.T., Brodersen,D.E., Clemons,W.M., Morgan-Warren,R.J., Carter,A.P., Vornrhein,C, Hartsch,T. and Ramakrishnan,V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**, 327-339.
19. Marmur,J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.

20. Gregory,R.J., Cahill,P.B.F., Thurlow,D.L. and Zimmermann,R.A. (1998) Interaction of *Escherichia coli* ribosomal protein S8 with its binding sites in ribosomal RNA and messenger RNA. *J. Mol. Biol.*, **204**, 295-307.
21. Deckman,I.C. and Draper,D.E. (1985) Specific interaction between ribosomal protein S4 and the alpha operon messenger RNA. *Biochemistry*, **24**, 7860-7865.
22. Zimmermann,R.A., Alimov,A., Uma,K., Wu,H., Wower,I., Nikonowicz,E.P., Drygin,D., Dong,P. and Jiang,L. (2000) How ribosomal proteins and rRNA recognize one another. In Garrett,R.A., Douthwaite,S.R., Liljas,A., Matheson,A.T., Moore,P.B. and Noller,H.F. (eds), *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions.*, ASM Press, Washington, DC, pp. 93-104.
23. Draper,D.E. (1996) Ribosomal protein-RNA interactions. In Zimmermann,R.A. and Dahlberg,A.E. (eds), *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Synthesis.* CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 171-197.
24. Baker,A.-M. and Draper,D.E. (1995) Messenger RNA recognition by fragments of ribosomal protein S4. *J. Biol. Chem.*, **270**, 22939-22945.
25. Nikulin,A., Serganov,A., Ennifar,E., Tishchenko,S., Nevskaya,N., Shepard,W., Portier,C., Garber,M., Ehresmann,B., Ehresmann,C., Nikonov,S. and Dumas,P. (2000) Crystal structure of the S15-rRNA complex. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 273-277.
26. Batey,R.T. and Williamson,J.R. (1996) Interaction of the *Bacillus stearothermophilus* ribosomal protein S15 with 16 S rRNA: II. Specificity determinants of RNA-protein recognition. *J. Mol. Biol.*, **261**, 550-567.
27. Serganov,A., Masquida,B., Westhof,E., Chachia,C., Portier,C., Garber,M., Ehresmann,B. and Ehresmann,C. (1996) The 16S rRNA binding site of *Thermus thermophilus* ribosomal protein S15: comparison with *Escherichia coli* S15, minimum site and structure. *RNA*, **2**, 1124-1138.
28. Bénard,L., Mathy,N., Grunberg-Manago,M., Ehresmann,B., Ehresmann,C. and Portier,C. (1998) Identification in a pseudoknot of a U.G motif essential for the regulation of the expression of ribosomal protein S15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2564-2567.

29. Phillippe,C., Bénard,L., Portier,C., Westhof,E., Ehresmann,B. and Ehresmann,C. (1995) Molecular dissection of the pseudoknot governing the translational regulation of Escherichia coli ribosomal protein S15. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 18-28.
30. Greuer,B, Thiede,B. and Brimacombe,R. (1999) The cross-link from the upstream region of mRNA to ribosomal protein S7 is located in the C-terminal peptide: experimental verification of a prediction from modeling studies. *RNA*, **5**, 1521-1525.
31. Kuwano,Y., Olvera,J. and Wool,I.G. (1992) The primary structure of rat ribosomal protein S5. A ribosomal protein present in the rat genome in a single copy. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25304-25308.
32. Vladimirov,S.N., Ivanov,A.V., Karpova,G.G., Musolyamov,A.K., Egorov,T.A., Thiede,B., Wittmann-Liebold,B. and Otto,A. (1996) Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 144-149.
33. Jackson,R.J. (1996) A comparative view of initiation site selection mechanisms. In Hershey,J.W.B., Mathews,M.B. and Sonenberg,N. (eds), *Translational control*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, pp.71-112.

Tableau 3-1: Affinity for wild-type and mutated S7 for its mRNA.

Mutation	K'_a (μM^{-1})	Relative affinity for <i>str</i> mRNA	Relative affinity for 16S rRNA ^a
None	6.8 ± 0.9	1.00	1.00
Δ1-17	0.6 ± 0.1	0.09	n.d.
Δ72-89	1.9 ± 0.3	0.28	0.34
Δ138-178	3.7 ± 0.4	0.54	0.58
Δ148-178	6.6 ± 1.2	0.97	1.06
R3Q	2.9 ± 1.1	0.43	0.57
Q8A	1.8 ± 0.3	0.26	0.21
F17G	1.3 ± 0.2	0.19	0.17
K34Q	6.7 ± 0.9	0.99	1.04
K35Q	1.9 ± 0.3	0.28	0.45
G54S	3.3 ± 0.8	0.49	0.40
Y84A	4.7 ± 0.6	0.69	0.64
K113Q	4.0 ± 0.7	0.59	0.42
M115G	0.7 ± 0.1	0.10	0.26
K136Q	6.0 ± 0.8	0.88	0.98
R142Q	5.6 ± 0.9	0.82	0.83
M143A	4.4 ± 0.8	0.65	0.68

A fragment of the *str* operon mRNA encompassing the intercistronic region between S12 and S7 coding sequences was synthesized *in vitro* and incubated with increasing amounts of protein. The binding affinity of wild-type and mutated S7 for the *str* mRNA fragment was measured by a nitrocellulose filter-binding assay. Binding assays were performed in a high-ionic strength buffer (20 mM Mg(OAc)₂, 350 mM KOAc). K'_a values are means ± standard deviation of at least three independent experiments. n.d.: not detectable. ^a The relative affinity of the S7 mutants for a fragment corresponding to the lower half of the 3' major domain of 16S rRNA was determined by Robert *et al.* (5) in a high-ionic strength buffer comparable to that used in this study (20 mM MgCl₂, 300 mM KCl).

Tableau 3-2: Effect of overexpression of S7 and its mutant derivatives on bacterial growth.

Plasmid	Doubling time (min)
pET-21a (+)	62 ± 9
pET-21a (+)-S7	174 ± 18
pET-21a (+)-S7Δ1-17	92 ± 13
pET-21a (+)-S7Δ72-89	87 ± 9
pET-21a (+)-S7Δ138-178	144 ± 11
pET-21a (+)-S7Δ148-178	No growth
pET-21a (+)-S7R3Q	145 ± 8
pET-21a (+)-S7Q8A	95 ± 9
pET-21a (+)-S7F17G	97 ± 13
pET-21a (+)-S7K34Q	172 ± 10
pET-21a (+)-S7K35Q	96 ± 9
pET-21a (+)-S7G54S	122 ± 15
pET-21a (+)-S7Y84A	123 ± 7
pET-21a (+)-S7K113Q	117 ± 8
pET-21a (+)-S7M115G	97 ± 8
pET-21a (+)-S7K136Q	161 ± 13
pET-21a (+)-S7R142Q	167 ± 16
pET-21a (+)-S7M143A	131 ± 12

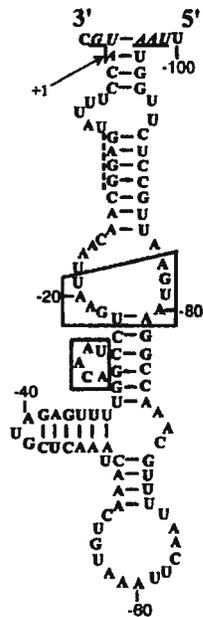
BL21(DE3)/pLysS cells were transformed with plasmid pET-21a(+) containing the gene coding for wild-type S7 under control of a T7 promoter or with the derivatives of this plasmid coding for S7 mutants, and the growth rate of the bacterial cultures was monitored in the LB medium at 37°C. Doubling time values are means ± standard deviation of at least three independent experiments. Identical results were obtained with BLR(DE3)/pLysS cells (data not shown).

Figure 3-1: Secondary structure of mRNA and 16S rRNA fragments that binds S7.

A. Secondary structure of the *str* mRNA fragment that binds S7. The stop codon for S12 and the initiation codon for S7 are italicized. The Shine-Dalgarno sequence is indicated with a bar.

B. Lower half of the 3' major domain of 16S rRNA, with the circled sequence containing the minimal binding site for S7 (10). Helices are numbered according to Brimacombe (12). The sequences that are boxed are identical in the mRNA and the rRNA. The arrows point to bases in 16S rRNA that were crosslinked to S7 (15).

A



B

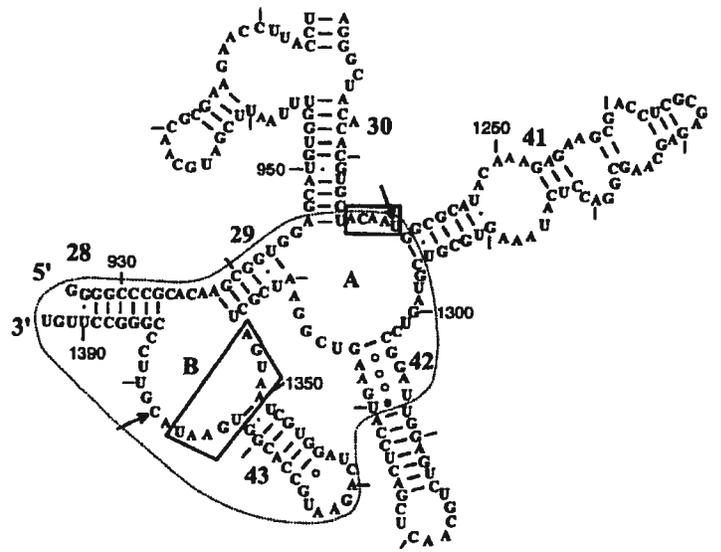


Figure 3-2: Location of the S7 mutations in the S7 structure. Secondary structural elements of protein S7 are indicated: α , α -helix; β , β -hairpin; L, loop. The arrows show the mutated amino acid residues in point mutants and the bars depict the deletion mutants. The black box in mutant $\Delta 72-89$ corresponds to the deletion of the β -hairpin that was replaced with RRGGGGS.

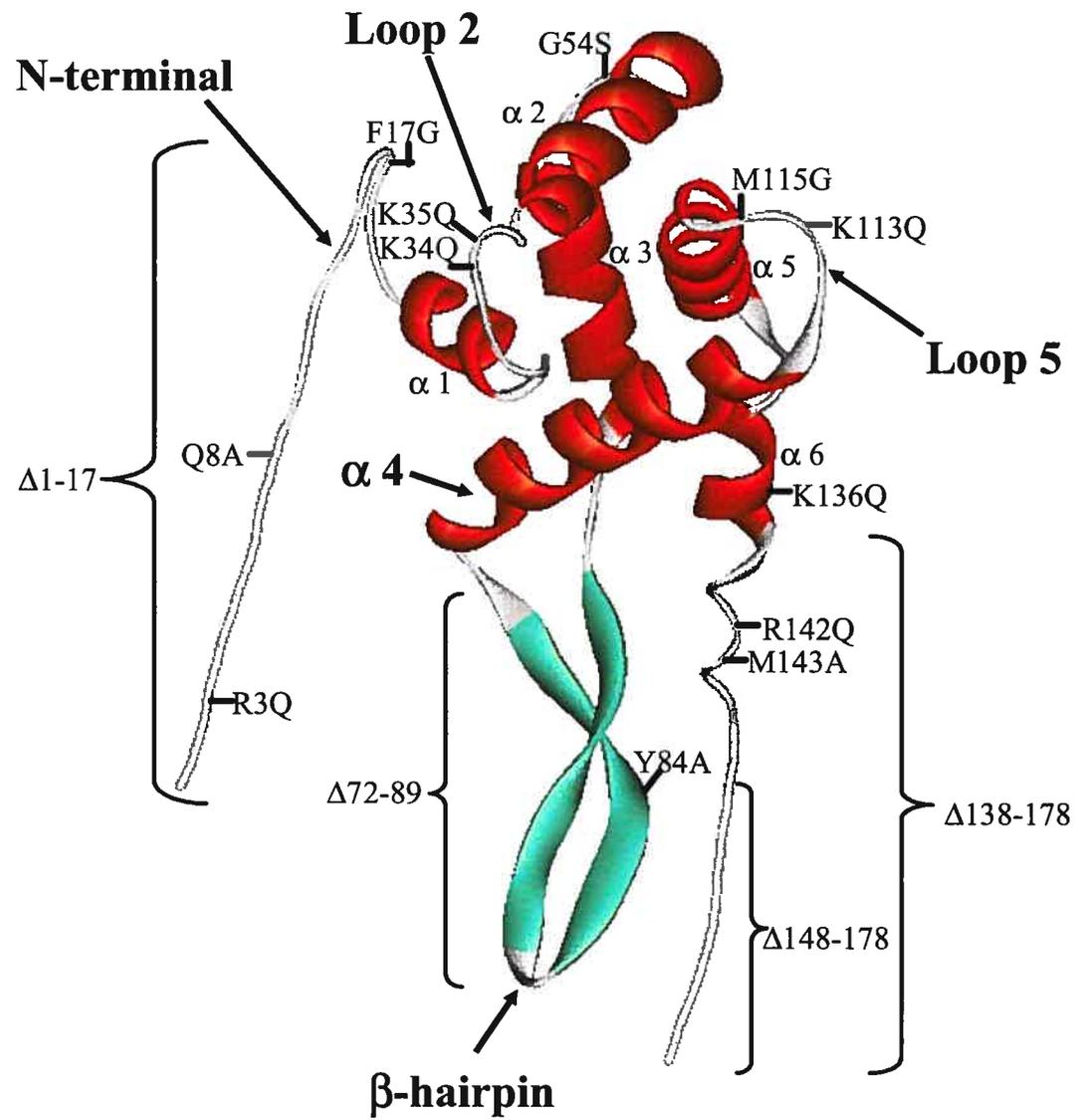
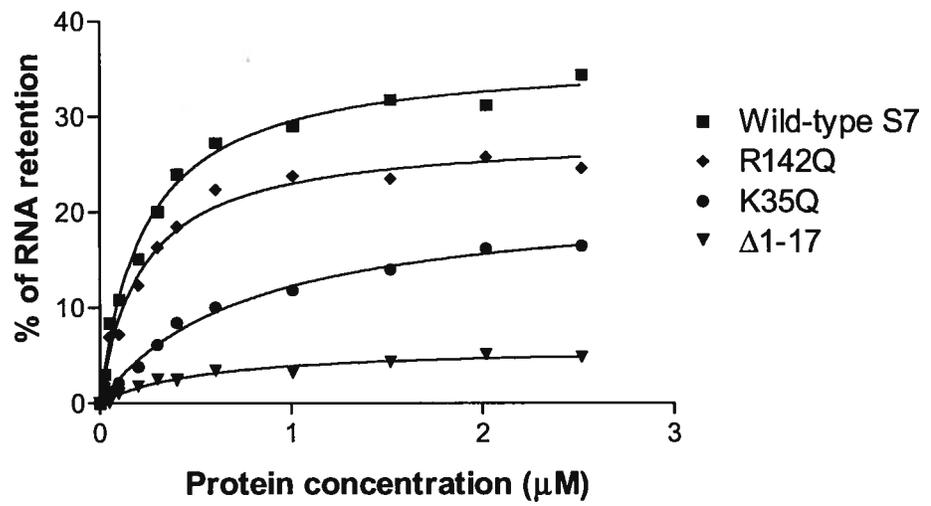


Figure 3-3: Binding curves for the interaction of wild-type S7 and its mutant derivatives with *str* mRNA. The curves show binding isotherms measured by a nitrocellulose filter binding assay. They correspond to the wild-type protein and to representative examples of mutations that affect binding modestly, strongly, or dramatically. The portion of the *str* mRNA containing the S7 binding site was synthesized *in vitro* and incubated with increasing amounts of protein. Apparent association constants ($K'a$) between the *str* mRNA and S7 or its mutant derivatives were calculated from the binding isotherms and are presented in Table 1.



Chapitre IV

A functional interaction between ribosomal proteins S7 and S11 within the bacterial ribosome.

Francis Robert and Léa Brakier-Gingras

Département de Biochimie
Université de Montréal
Montréal, H3C 3J7
Québec, Canada

Journal of Biological Chemistry, sous-presse.

ABSTRACT

In this study, we used site-directed mutagenesis to disrupt an interaction that had been detected between ribosomal proteins S7 and S11 in the crystal structure of the bacterial 30S subunit. This interaction, which is located in the E site, connects the head of the 30S subunit to the platform and is involved in the formation of the exit channel through which passes the 30S-bound messenger RNA. Neither mutations in S7 nor mutations in S11 prevented the incorporation of the proteins into the 30S subunits but they perturbed the function of the ribosome. *In vivo* assays showed that ribosomes with either mutated S7 or S11 were altered in the control of translational fidelity, having an increased capacity for frameshifting, readthrough of a nonsense codon and codon misreading. Toeprinting and filter-binding assays showed that 30S subunits with either mutated S7 or S11 have an enhanced capacity to bind mRNA. The effects of the S7 and S11 mutations can be related to an increased flexibility of the head of the 30S, to an opening of the mRNA exit channel and to a perturbation of the proposed allosterical coupling between the A and E sites. Altogether, our results demonstrate that S7 and S11 interact in a functional manner and support the notion that protein-protein interactions contribute to the dynamics of the ribosome.

Keywords: Ribosome/ribosomal proteins/protein-protein interactions/translational accuracy.

INTRODUCTION

The ribosome is the cellular machinery responsible for protein synthesis in all living organisms. The elucidation of the crystal structure of the prokaryotic ribosome has led to a major progress in understanding its function (1-7). Analysis of the ribosome structure combined with a wealth of biochemical data clearly showed that ribosomal RNA (rRNA) is the key player in the functions of the ribosome, and it is currently assumed that the main task of the ribosomal proteins is to help and stabilize rRNA folding and to facilitate conformational changes in rRNA (8-10). However, a growing list of examples suggests that ribosomal proteins directly participate to protein synthesis. The X-ray structure of the ribosome reveals that S12 is part of the decoding site (11, 12, reviewed in 13). It also shows that the 30S proteins S13, S15 and the 50S proteins L2, L5, L14, L19 are involved in intersubunit bridges, while the 30S proteins S9, S13 and the 50S proteins L1, L5, L33 interact with tRNAs, suggesting that they could participate in the translocation step (12). Studies in solution also point to a role for the ribosomal proteins, such as an involvement in mRNA binding for S1 (14-16), a participation in peptidyl transferase activity for L2 (17-19) and the prevention of mRNA slippage for L9 (20).

Several protein-protein interactions were identified in the crystal structure of the 30S subunit (21, 22) but, so far, only the interaction between proteins S4 and S5 has been directly related to a particular ribosome function, that is the control of translational fidelity. Indeed, mutations that disrupt the S4-S5 interaction decrease translational accuracy (23, 24). Among the other protein-protein interactions observed in the ribosome, one involves S7, a primary binding protein located in the head of the 30S, which interacts with S11, a tertiary binding protein, positioned on the platform. This S7-S11 interaction encompasses S7 residues 148, 150, 152, 153 and 154 (in *Escherichia coli* numbering) in the 148-155 region following the carboxy-terminal α -helix (helix 6), and S11 residues 55, 58, 59, 60 and 63 within the loop preceding the first α -helix (helix 1) (Figure 1A). It is well documented that the 30S head and platform undergo a series of conformational changes and move one relative to the other during protein synthesis. For example, X-ray and cryo-EM studies clearly showed that such changes occur upon subunit association, binding of aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) or factors, and during

translocation (5, 12, 24-30). Thus, the S7-S11 interaction, which constitutes a contact between the 30S head and platform, likely participates in the conformational changes undergone by the 30S, breaking and re-forming during translation.

The crystal structure of the 70S ribosome complexed with tRNA and mRNA showed that the carboxy-terminal α -helix of S7, close to the region of interaction with S11, contacts the anticodon loop of the E-site-bound tRNA (5, 12). In agreement with the X-ray studies, S7 and S11 were cross-linked to the anticodon loop of the E-site bound tRNA (31, 32). The crystal structure of the 70S ribosome also showed that the S7-S11 interaction contributes to the formation of the so-called exit channel, a narrow channel through which passes the mRNA, upstream from the decoding site. The loop of S11 that interacts with S7 is positioned very close to the Shine-Dalgarno helix formed between the mRNA and the 3' end of 16S rRNA (33, reviewed in 34). Again, in agreement with the X-ray studies, it was observed that the carboxy-terminal region of S7 could be cross-linked to the Shine-Dalgarno region of mRNA (35).

In this study, we investigated the effect of disrupting the interaction between *E. coli* S7 and S11 by mutating residues 148 to 155 of S7 and residues 55, 58, 59, 60 and 63 of S11. These mutations were shown not to interfere with the incorporation of the proteins into the 30S subunit. We found, however, that disruption of the S7-S11 interaction makes the ribosome more error-prone. Also, with toeprinting and filter-binding assays, we observed an enhanced binding of mRNA to 30S subunits containing mutated S7 or S11. Finally, we found that the mutations in S7 that disrupt the interaction with S11 impair subunit association, but, surprisingly, the corresponding mutations in S11 did not affect subunit association.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of plasmids used in this study.

All the enzymes used in this study were from Amersham Pharmacia Biotech, unless otherwise specified. All the oligonucleotides were from Biocorp Inc. All PCR amplifications were carried out with the Deep Vent DNA polymerase (New England

Biolabs) in a RobocyclerTM 40 from Stratagene. Plasmid pET-21a(+)-S7, which codes for *E. coli* K12A19 S7 under control of a T7 promoter, and mutant pET-21a(+)-S7 Δ 148-178, with a deletion of the last 31 amino acids of S7, are derivatives of pET-21a(+) (Novagen) and were obtained as described (36), except that there was a histidine tag at the C-terminus instead of the N-terminus of the protein. Mutant pET-21a(+)-S7 Δ 156-178 was derived from pET-21a(+)-S7 by introducing a stop codon at position 156, using PCR. Mutant pET-21a(+)-S7_{subs}148-155, where the sequence corresponding to residues 148-155 of S7 was substituted with the sequence AGAGAAAA, was derived from pET-21a(+)-S7 by PCR, using the overlap extension procedure with four oligonucleotides (37). These two constructs also contain a sequence coding for a histidine tag at the C-terminus of protein S7. Another construct that was identical to pET-21a(+)-S7 Δ 156-178 except that the histidine tag is at the N-terminus of S7 was also made. The S11 gene was amplified by PCR from *E. coli* K12A19 genomic DNA obtained as described (38), with primers designed to introduce a histidine tag at the C-terminus of protein S11. The amplified fragment was digested with *Nde*I and *Bam*HI, purified with the GFXTM PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Pharmacia Biotech) and ligated into the appropriately digested pET-21a(+), generating pET-21a(+)-S11. This plasmid was subsequently used for the construction of the S11 substitution mutant with mutations R55A, T58A, P59G, F60A and Q63A (pET-21a(+)-S11_{subs}55-63), which was produced by overlap extension PCR.

For the construction of the plasmids producing luciferase, we used as a starting point pSDLucNWT (39), a derivative of pBluescriptSK-, containing the luciferase gene with a Shine-Dalgarno sequence under control of a T7 promoter. The origin of replication of this plasmid was replaced by ligating the *Bgl*II-*Sma*I fragment containing the luciferase gene to the *Bgl*II-*Sma*I fragment of plasmid pACYC177 (New England Biolabs) containing the p15A origin of replication. This generated pACYpET-Luc, which is compatible with the pET-21a(+) plasmids, which have the pBR322 origin of replication. Different derivatives of pACYpET-Luc were constructed to analyze the control of translation fidelity with ribosomes containing mutated S7 or S11. To this end, using PCR, the beginning of luciferase gene in pACYpET-Luc was replaced with that of the luciferase gene from plasmids pRNALuc2-FS-1, pRNALuc2-UGA or pRNALuc2

(40) generating pACYpET-Luc-1, pACYpET-Luc-UGA and pACYpET-Luc-0, where production of luciferase is dependent upon a -1 frameshift, a stop codon readthrough and a conventional translation, respectively. The beginning of the luciferase genes from plasmids pRNALuc2-FS-1, pRNALuc2-UGA and pRNALuc2 was first amplified, using primers designed to revert the Shine-Dalgarno sequence, which is mutated in these plasmids, to a wild-type sequence. The PCR products were digested with *Bam*HI and *Xba*I and ligated into the appropriately digested plasmid pACYpET-Luc. Plasmid pACYpET-Luc-R218G has a substitution in the active site of luciferase, such that production of luciferase requires a misincorporation at this site. It was derived from pACYpET-Luc-0 by PCR designed to mutate the first base of codon 218 from an A to a G (Arg to Gly), which impairs luciferase activity (41). The PCR products were digested with *Eco*RI and *Psp*5II and ligated into the appropriately digested plasmid pACYpET-Luc-0.

Plasmid pUC188G32 (42) and pLRCAT (43) were used for the *in vitro* transcription of the T4 gene 32 and the gene coding for chloramphenicol acetyl transferase (CAT), respectively, and the mRNAs produced were used for toeprinting and filter-binding studies.

Fractionation of cell lysates and assessment of the incorporation of plasmid-encoded proteins S7 and S11 into 30S subunits, ribosomes and polysomes.

E. coli BLR(DE3)/pLysS cells transformed with plasmid pET-21a(+)-S7, pET-21a(+)-S11 or their mutant derivatives were grown in LB until an $A_{600\text{ nm}}$ of 0.05 was reached. S7 or S11 overexpression was induced by the addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Bioshop Canada Inc.) at 1mM for 90 min, followed by lysis of the cells according to a standard procedure (44). The cell lysates were analyzed by centrifugation as described in the Figure 3 legend. The detection of the plasmid-encoded protein into the free 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes was done by Western blot. Ribosomal subunits, 70S ribosomes and polysomes (2.2 pmols) containing S7, S11 or their mutant derivatives were fractionated by a 12% SDS-PAGE, and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. For wild-type S7 and S7subs148-155, blots were probed with diluted polyclonal goat anti-S7 (1:1000) and were resolved with horseradish peroxidase conjugated rabbit-anti-goat antisera (diluted

1:5000) (Santa Cruz Biotechnology), followed by detection by chemiluminescence. To assess the incorporation of plasmid-encoded S7 Δ 148-178, S7 Δ 156-178 and wild-type or mutant S11, the intensity of the bands on a blot detected with an anti-histidine tag antibody coupled to horseradish peroxidase (diluted 1:100) (Santa Cruz Biotechnology) was compared to that of an identical blot probed with an anti-S7 or anti-S11 polyclonal goat antibody (diluted 1:1000). The intensity of the bands was measured using Adobe Photoshop 6.0. The sensitivity of the anti-histidine tag antibody relative to the anti-S7 or anti-S11 antibody was determined using plasmid-encoded S7 or S11 as a control.

Subunit association experiments

The dissociated 30S and 50S ribosomal subunits were obtained by centrifuging 40 units of $A_{260\text{ nm}}$ of the cell lysate through a 15-40% sucrose gradient in a low magnesium buffer, according to standard procedures. Subunit association assays were done as described in the Figure 5 legend.

***In vitro* transcription, toeprint assays and filter-binding assays.**

A fragment of the T4 gene 32 mRNA and the CAT mRNA were produced by run-off transcription by T7 RNA polymerase of plasmid pUC118G32 and pLRCAT, respectively, linearized with *Bam*HI. Extension inhibition assays were performed as described (45), using primers complementary to bases +64 to +85 of T4 gene 32 mRNA and +57 to +73 of CAT mRNA, position 1 corresponding to the A of the initiator AUG. The reaction mixture (14 μ l) contained 1.5 pmol of mRNA, 2 pmols of heat-reactivated 30S subunits and 20 pmols of uncharged *E. coli* tRNA^{Met} (Sigma). The primer extension was resolved on an 8% SDS-PAGE. The filter-binding assays were performed as described (46), with a constant amount of mRNA (63 pmols) and increasing amounts of 30S (1.4 to 72 pmols), in a reaction volume of 50 μ l.

Luciferase assays

For the assays measuring luciferase activity, BLR(DE3) cells were co-transformed with a plasmid coding for luciferase (pACYpET-Luc-0, pACYpET-Luc-1, pACYpET-Luc-UGA or pACYpET-Luc-R218G) and a plasmid coding for S7 or S11 (pET-21a(+)-S7, pET-21a(+)-S11 or their mutant derivatives). The expression of the ribosomal proteins and luciferase was induced with 1 mM IPTG at an $A_{600\text{ nm}}$ of 0.1. The

luciferase activity was measured after 60 and 120 min, and normalized for the increase in optical density of the cell culture. The luciferase assays were done as described (40).

RESULTS

This study focuses on ribosomal proteins S7 and S11 from *E. coli*. The interaction between the two proteins was observed in the crystal structure of the ribosome from a thermophilic bacterium (21, 22). About 140 sequences of S7 and 90 sequences of S11 from different organisms in all three major evolutionary kingdoms were obtained, using the Swiss-Prot protein database (<http://us.expasy.org/sprot>) and compared. Figure 2 shows representative examples of S7 and S11 sequences illustrating this comparison. It can be seen that the region of interaction between S7 and S11 is extremely well conserved in bacteria. In eukaryotes and archaeobacteria, the region corresponding to the 148-155 region of bacterial S7 is missing whereas region 55-63 of S11 is present although slightly less conserved. One can thus predict that the interaction between S7 and S11 observed within the ribosome of a thermophilic bacterium is maintained in *E. coli*. We, therefore, decided to investigate whether the disruption of this interaction affects the function of the *E. coli* ribosome. Plasmid pET-21a(+)-S7 and pET-21a(+)-S11, which contain, respectively, *E. coli* K S7 and S11 gene with a histidine tag at the C-terminus under control of a T7 promoter, were used for the construction and expression of mutants of S7 and S11. In one S7 mutant, the sequence 148-KAFAHYRW-155 was substituted with the glycine-alanine containing sequence 148-AGAGAAAA-155. We also investigated two S7 deletion mutants, mutant S7 Δ 148-178 where the sequence 148-178 is removed, thus lacking region 148-155, and mutant S7 Δ 156-178, where the sequence 156-178 is deleted. The *E. coli* K S7 contains an additional 23 amino acid extension at its C-terminus, compared to the *E. coli* B S7, and mutant S7 Δ 156-178 thus corresponds to *E. coli* B S7 protein. One S11 substitution mutant was produced by making mutations in the loop that precedes the first α -helix and interacts with S7. To minimize any perturbation in the structure of this α -helix, only the residues in the 55-63 region that interact with S7 in the crystal structure of the 30S subunit were mutated as follows: R55A, T58A, P59G, F60A and Q63A, generating

plasmid pET-21a(+)-S11subs55-63. The different mutant proteins used in this study are summarized in Figure 1B.

Effect of mutating S7 and S11 on their incorporation into 30S subunits and on ribosome profiles.

For the assays described below, we used *E. coli* BLR(DE3)/pLysS as a host cell for the pET-derived plasmids encoding S7 or S11 under control of the T7 promoter, except when otherwise mentioned. This strain carries the T7 RNA polymerase under control of the *lac* promoter in its genome and also contains plasmid pLysS, which allows a stringent control of the expression of the cloned genes with the T7 promoter (47, 48). The host cells were transformed with pET-21a(+)-S7 or pET-21a(+)-S11 or their mutant derivatives. Addition of IPTG to the cell culture induced transcription of the ribosomal protein genes. We first examined whether the overexpression of the wild-type and mutant proteins affects cell growth by measuring the optical density at 600 nm of the cell culture at different times (data not shown). As previously reported, overexpression of wild-type S7 leads to a major bacterial growth defect (49, 50). This effect results from the repression of translation of the polycistronic chromosomal *str* mRNA by S7. This mRNA encodes S12 and elongation factors EF-G and EF-Tu in addition to S7, and repression of its translation likely reduces the number of ribosomes actively engaged in translation (51). Overexpression of mutant S7 Δ 156-178 and S7subs148-155 interfered with bacterial growth like wild-type S7, while overexpression of mutant S7 Δ 148-178, as previously observed, affected growth rate to a larger extent (50). Neither overexpression of S11, which is not a repressor protein, nor that of its mutant affected the cell growth.

The incorporation of the plasmid-encoded proteins into the 30S, 70S ribosomes and polysomes was investigated by Western blot after overexpressing S7, S11 or their derivatives for 90 min. First, a fractionation of the cell lysate by centrifugation through a sucrose gradient containing 10 mM magnesium was performed (Figure 3). Overexpression of wild-type S7 and S7 Δ 156-178 were both seen to cause an increase in the amount of the ribosomal subunits relative to the ribosomes and polysomes (profiles 2 and 3, respectively), an effect related to the repression of the translation of the *str* mRNA, as explained above. Interestingly, when either S7 Δ 148-178 or S7subs148-155

was overexpressed, the relative increase in the amount of free ribosomal subunits was larger (profiles 4 and 5, respectively), suggesting that the 30S subunits with S7 that lacks the region of interaction with S11 have an association defect. Contrasting with S7 and its derivatives, overexpression of S11 or its mutant did not affect the ribosome profile (profiles 6 and 7 respectively). Next, the incorporation of plasmid-encoded S7, S11 and their mutant derivatives in the subunit, ribosome and polysome fractions was analyzed by Western blot. To this end, we used an anti-S7 antibody for the wild-type and mutant S7_{subs148-155} (Figure 4A), that are longer than the chromosome-encoded *E. coli* B S7 by 23 amino acids, which enable us to readily discriminate between plasmid-encoded and chromosome-encoded S7. The other S7 mutants (S7 Δ 156-178 and S7 Δ 148-178), and the plasmid-encoded wild-type and mutated S11 cannot be discriminated from the chromosome-encoded proteins on the basis of their size. The incorporation of plasmid-encoded versus chromosome-encoded protein was assessed by comparing the intensity of the bands detected with an anti-histidine tag antibody, which reveals exclusively the plasmid-encoded protein, to that of the bands detected with an anti-S7 or S11 antibody, which reveals both the plasmid-encoded and chromosome-encoded proteins. It was observed that about 80% of S7, S11 or their derivatives present in the 30S subunits originate from the plasmid, indicating that neither the mutations nor the presence of the histidine tag prevent the incorporation of the proteins into the 30S subunit. In the 70S ribosomes and polysomes, the level of incorporation was about 75% for the plasmid-encoded wild-type S7 and S7 Δ 156-178, and for the plasmid-encoded wild-type or mutated S11. However, the proportion of S7 Δ 148-178 and S7_{subs148-155}, which lack the sequence interacting with S11, decreased to about 40% in 70S ribosomes and polysomes, indicating that the population of the mutated 30S within the 70S and within the polysomes is lower than in the free subunit pool (see Figure 4B).

In the results described above, S7 and its mutants had a histidine tag at the C-terminus. Since the mutations in S7 are located in its C-terminal region, we also examined the results obtained with plasmids expressing S7, S7 Δ 156-178 and S7 Δ 148-178 but where the histidine tag was located at the N-terminus. In all the assays carried out in this study, whether the histidine tag was located at the N-terminus or the C-terminus of S7 did not cause any difference (data not shown).

Effect of disrupting the interaction between S7 and S11 on subunit association.

The observation that the overexpression of S7 Δ 148-178 and S7_{subs}148-155 into the 30S subunits causes a relative increase in the free subunit populations prompted us to analyze *in vitro* the association between the 30S containing the mutated S7 and the 50S subunit. Protein S7 or S11 was overexpressed for 90 min and the ribosomal subunits were isolated from the whole cell extract by centrifugation through a sucrose gradient containing 2 mM magnesium. The amount of the plasmid-encoded wild-type or mutated S7 in the isolated 30S was about 80%, as assessed by Western blot. The 30S and 50S subunits were then incubated at a molar ratio of one to one in a buffer containing 10 mM magnesium and their association was monitored by centrifugation through a sucrose gradient (Figure 5). We found that the 30S containing either the wild-type S7 (profile #1) or S7 Δ 156-178 (profile #2) associated efficiently with the 50S whereas the S7_{subs}148-155 mutation (profile #3) significantly decreased subunit association. Assays with mutant S7 Δ 148-178, which was omitted in subsequent experiments, provided a profile that was very similar to that observed with mutant S7_{subs}148-155 (data not shown). The 30S subunit with mutated S11 was also investigated (profile #4), and, contrasting with the effect of mutations in S7, the presence of the mutated S11 in the 30S did not affect its capacity to associate with the 50S. This was expected since no change in the ribosome profiles was observed when overexpressing the S11 mutant.

Effect of disrupting the S7-S11 interaction on the binding of 30S subunits to mRNA.

A decrease in the capacity of 30S subunits with mutated S7 to bind mRNA could also account for an increased amount of free subunits containing this mutated protein. To address this possibility, we investigated the interaction between the mutated 30S and mRNA by toeprinting, using the T4 gene 32 mRNA. A toeprint assay allows the detection of canonical initiation complexes, because an mRNA-bound 30S, in presence of the initiator tRNA (tRNA^{fMet}), blocks the extension of a primer by the reverse transcriptase. This stop, called the toeprint signal, occurs at position +16 and also, at a lower extent, at +17 on the mRNA (the A of the initiator codon is +1) (45, 52, 53). Examples of typical toeprint experiments are presented in Figure 6. The 30S subunits

used in these assays were isolated as described for the association assays. With the 30S subunits that contain S7_{subs148-155}, the toeprint signal was much more intense than that obtained with the wild-type 30S or with 30S containing mutant S7 Δ 156-178 (compare lane 3 with 1 and 2, respectively, in Figure 6). The relative toeprint, which corresponds to the ratio of the intensity of the toeprint signal to that of the full-length extension signal, was approximately 10-fold higher for S7_{subs148-155} than that for wild-type S7. The toeprint assays using wild-type 30S or 30S with mutated S11 show that the relative signal with the 30S with mutated S11 (Figure 6, line 4) was also more intense than that seen with wild-type 30S, and was comparable to the relative signal obtained with the 30S containing the mutated S7. Similar results were obtained with another mRNA, coding for the chloramphenicol acetyl transferase (data not shown). Thus, the 30S subunits where the S7-S11 interaction is disrupted have a higher capacity to bind mRNA than wild-type 30S subunits.

We also directly assessed the binding of the mutated 30S to mRNA by nitrocellulose filter-binding assays. In these assays, a radiolabelled T4 gene 32 mRNA was mixed with increasing amounts of 30S subunits and filtered through a nitrocellulose membrane that retains the subunits and the mRNA bound to them. We found that 30S with mutated S7_{subs148-155} or mutated S11 retain more mRNA on the filter than wild-type 30S or those containing mutant S7 Δ 156-178 (Figure 7). This fully agrees with the toeprint assays showing that the 30S subunits in which the S7-S11 interaction is disrupted have an enhanced capacity to bind mRNA.

Effect of disrupting the S7-S11 interaction on translational fidelity.

As indicated in the Introduction, ribosomal proteins S7 and S11 are part of the E site. Their interaction could thus affect the binding of the E-site tRNA. Since a coupling has been proposed between the E and A sites (54, 55), this led us to investigate whether the disruption of the S7-S11 interaction affects the control of tRNA selection at the A site. This was done by measuring the *in vivo* level of amino acid misincorporation, stop codon readthrough and spontaneous frameshifting of ribosomes with mutated S7 or S11. To this end, plasmids coding for the luciferase gene under control of a T7 promoter were used. With plasmid pACYpET-Luc-1, production of luciferase depends upon a -1 frameshift, with plasmid pACYpET-Luc-UGA, production of luciferase depends upon

the readthrough of a UGA stop codon and with plasmid pACYpET-Luc-R218G, a mutation at codon 218 of the luciferase gene impairs the activity of the enzyme, so that a misreading of this codon is required to produce an active luciferase protein. The BLR(DE3) cells were co-transformed with either one of these plasmids and one of the derivatives of pET-21a(+) that encodes S7, S11 or their mutants. At an $A_{600\text{ nm}}$ of 0.1, the production of the plasmid-encoded ribosomal proteins and that of luciferase was induced and the luciferase activity was measured after 60 and 120 min of induction and normalized for the increase in the optical density of the cell culture. The level of translational error was calculated in percent by dividing the normalized increase in luciferase activity between 60 and 120 min of induction with pACYpET-Luc-1, pACYpET-Luc-UGA or pACYpET-Luc-R218G by the normalized increase in luciferase activity with a control plasmid (pACYpET-Luc-0), for which luciferase expression depends upon conventional translation. It was found that disruption of the S7-S11 interaction (ribosomes with S7_{subs148-155} or S11_{subs55-63}) significantly increased the level of frameshift efficiency, stop codon readthrough and codon misreading (Figure 8), showing that breaking the S7-S11 interaction decreases the translational fidelity of the ribosomes.

DISCUSSION

In this study, we used site-directed mutagenesis to disrupt an interaction between region 148-155 of S7 and region 55-63 of S11, which had been detected in the crystal structure of the bacterial 30S subunit (21, 22). Analysis of S7 and S11 sequences that are proposed to interact showed that they are conserved in bacteria, suggesting that the S7-S11 interaction is maintained and is important for the ribosome function. We found that mutating the site of contact of either S7 or S11 did not interfere with the assembly of the mutated proteins into the 30S, but the mutations made the ribosomes error-prone and increased the capacity of the 30S to bind mRNA. However, the 30S with mutated S7 but not those with mutated S11 within the corresponding contact site had a decreased capacity to associate to the 50S subunits. A simple interpretation of this result could be that, while the mutations in either S7 or S11 that disrupt their interaction make the

ribosomes error-prone and enhance the capacity of the 30S to bind mRNA, the mutations in S7 can additionally perturb the structure of the 30S subunit in a more dramatic way, affecting its ability to associate to the 50S subunit. Another interpretation could be that the flexible C-terminal region of S7 must interact with another partner than S11 to promote the association of the 30S with the 50S, a likely candidate for this interaction being the 3' end of 16S rRNA, which has been UV-cross-linked to S7 (56). The cell growth was identical when overexpressing wild-type or mutated S7. However, overexpression of S7, whether wild-type or mutated, causes a growth defect resulting from the repression of the *str* mRNA, as explained above. This could mask any effect on growth resulting from the association problem with 30S having a mutated S7.

Our results reveal that disruption of the S7-S11 interaction facilitates the mRNA binding to the 30S subunits, as shown by toeprinting and filter-binding assays. This can be readily related to the role of the S7-S11 interaction in the formation of the exit channel for the mRNA. Since translation can occur on circular mRNAs (57), one can infer that this exit channel must open to allow mRNA binding to the 30S subunit, implying a transient disruption of the S7-S11 interaction. A permanent disruption of the S7-S11 interaction would keep the exit channel open, making it easier for the mRNA to bind. *In vivo*, this does not result in an increase in the portion of the mutated 30S in the polysomes. However, the 30S with S7 mutated have an association defect, which prevents a possible increase in the portion of this mutated 30S in the polysomes. Nevertheless, the 30S with mutated S11, which do not have an association problem, are not detected in a higher portion in the polysomes than wild-type 30S. It is possible that, *in vivo*, the presence of initiation factors, such as IF3, which binds close to the site of the S7-S11 interaction (58, 59), induces the opening of the mRNA channel and thus minimizes the difference observed *in vitro* in the binding of mRNA between wild-type and mutated 30S. Previous studies indeed showed that addition of IF3 to the 30S subunits facilitates mRNA binding (60, 61, reviewed in 62), an effect similar to that observed when the S7-S11 interaction is disrupted. More recently, cryo-EM studies showed that the regions surrounding the cleft between the head and the platform moves upon binding of IF3 (58). Finally, in the termination process, it was proposed that binding of IF3 enables the 30S to slide along the mRNA so that it can reach an initiation

site (63). Such a sliding obviously requires a loosening of the grip of the 30S on the mRNA, consistent with the opening of the exit channel.

We also showed that the ribosomes with either S7 or S11 mutated are more error-prone than the wild-type ribosomes. A possible explanation for this result is that disrupting the S7-S11 interaction perturbs the structure of the E site, where the S7-S11 interaction is located. It has been proposed that the E site is allosterically coupled to the A site and that this coupling controls the capacity of the ribosomes to discriminate between cognate and non-cognate tRNAs at the A site (54, 55). One can suggest that a perturbation of the E site impairs the coupling between the E and A sites, which could contribute to decrease the translational fidelity. A communication between the E site and the binding site for the elongation factors EF-G and EF-Tu was also suggested (64) (reviewed in 6), reinforcing the possibility that perturbations in the E site could affect the binding to the ribosome of the aa-tRNA complexed to EF-Tu. Another explanation for the decreased translational accuracy with the mutated ribosomes could be that the disruption of the S7-S11 interaction facilitates a movement of the head, promoting the so-called closed conformation of the 30S subunit that is required for the binding and accommodation in the A site of the incoming aa-tRNA (24). The transition to the closed conformation requires a disruption of the S4-S5 interaction at the interface between the shoulder and the platform of the 30S, and mutations that impair the S4-S5 interaction promote this closed conformation (23, 24), making the ribosomes error-prone (ribosomal ambiguity or *ram* mutations). Like the classical S4 and S5 *ram* mutations, the S7 and S11 mutations that make the ribosomes error-prone also consist in the disruption of a protein-protein interaction. The S7 and S11 *ram* mutations do not affect cell growth, and this is also the case for the S4 and S5 *ram* mutants (65, 66). However, one can predict that the simultaneous presence of mutations that break the S4-S5 interaction and those that break the S7-S11 interaction would interfere with cell growth. Interestingly, in line with this prediction, the growth of mutants in which the S7-S11 interaction is broken was more sensitive to sublethal doses of streptomycin, a translational error-inducing agent (data not shown). The increase in frameshifting observed with the ribosomes mutated in S7 or S11 could directly result from the increased misincorporation of the aa-tRNA, as suggested by the dual-error model, a

model that proposes that incorporation of a non-cognate tRNA enhances the probability of a frameshift that restores a cognate codon-anticodon interaction (67, 68). Alternatively, the increase in frameshifting could result from an increased probability for the mRNA to slide on the ribosome when the S7-S11 interaction is broken and the exit channel is open. After tRNA accommodation in the A site and peptide bond formation, the translocation step takes place. It involves a rotation of the head (69) and requires a sliding of the mRNA together with the tRNA (70, 71). We hypothesize that translocation requires disruption of the S7-S11 interaction, releasing the grip on the mRNA while allowing a movement of the head relative to the platform. Interestingly, cryo-EM studies showed a widening of the exit channel upon binding of the elongation factor EF-G (29), which is consistent with a disruption of the S7-S11 interaction during translocation.

The results of the present study demonstrate that S7 and S11 interact in a functional manner since the disruption of this interaction perturbs the ribosome function. These results also suggest that the S7-S11 interaction participates in the dynamics of the bacterial ribosome. This is a second example, after the S4-S5 interaction, of a protein-protein interaction that affects the dynamic behavior of the ribosome. The S7-S11 interaction is not conserved in eukaryotes. Therefore, it would be interesting to identify the interactions controlling the movement of the head of the small ribosomal subunit in these organisms. A complete mechanistic understanding of the function of the ribosome requires a detailed characterization of its dynamics. It is likely that other protein-protein interactions play a part in the conformational rearrangements undergone by the ribosome, stressing that, in the modern ribosome, the role of the proteins may be less ancillary than presently assumed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Simpson Joseph for the generous gift of plasmid pUC118G32 and Richard Brimacombe for the generous gift of the anti-S7 and anti-S11 antibodies. We also thank Martin Baril, François Bélanger, Guy Boileau, Luc Desgroseillers, Dominic Dulude and Sergey V. Steinberg for helpful discussions and comments. This work was

supported by a grant from the CIHR to L. B.-G. Francis Robert held a scholarship from the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).

REFERENCES

1. Brimacombe, R. (2000) *Structure Fold Des.* **8**, R195-200
2. Dahlberg, A. E. (2001) *Science* **292**, 868-869
3. Maguire, B. A., and Zimmermann, R. A. (2001) *Cell* **104**, 813-816
4. Moore, P. B. (2001) *Biochemistry* **40**, 3243-3250
5. Noller, H. F., and Baucom, A. (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1159-1161
6. Ramakrishnan, V. (2002) *Cell* **108**, 557-572
7. Yonath, A. (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 257-273
8. Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 725-768
9. Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002) *Nature* **418**, 229-235
10. Green, R., and Noller, H. F. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 679-716
11. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001) *Science* **292**, 897-902
12. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001) *Science* **292**, 883-896
13. Rodnina, M. V., Daviter, T., Gromadski, K., and Wintermeyer, W. (2002) *Biochimie* **84**, 745-754
14. Gualerzi, C. O., Brandi, L., Caserta, E., La Teana, A., Spurio, R., Tomsic, J., and Pon, C. L. (2000) in *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions* (Garrett, R. A., Douthwaite, S. R., Liljas, A., Matheson, A. T., Moore, P. B. and Noller, H. F., eds), pp. 477-494, ASM Press, Washington, DC

15. Sengupta, J., Agrawal, R. K., and Frank, J. (2001) *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11991-11996
16. Komarova, A. V., Tchufistova, L. S., Supina, E. V., and Boni, I. V. (2002) *RNA* **8**, 1137-1147
17. Cooperman, B. S., Wooten, T., Romero, D. P., and Traut, R. R. (1995) *Biochem. Cell Biol.* **73**, 1087-1094
18. Khaitovich, P., Mankin, A. S., Green, R., Lancaster, L., and Noller, H. F. (1999) *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 85-90
19. Diedrich, G., Spahn, C. M., Stelzl, U., Schafer, M. A., Wooten, T., Bochkariov, D. E., Cooperman, B. S., Traut, R. R., and Nierhaus, K. H. (2000) *EMBO J.* **19**, 5241-5250
20. Herr, A. J., Nelson, C. C., Wills, N. M., Gesteland, R. F., and Atkins, J. F. (2001) *J. Mol. Biol.* **309**, 1029-1048
21. Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., and Yonath, A. (2000) *Cell* **102**, 615-623
22. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000) *Nature* **407**, 327-339
23. Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000) *Nature* **407**, 340-348
24. Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., and Ramakrishnan, V. (2002) *Cell* **111**, 721-732
25. Agrawal, R. K., Lata, R. K., and Frank, J. (1999) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**, 243-254
26. Agrawal, R. K., Heagle, A. B., Penczek, P., Grassucci, R. A., and Frank, J. (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 643-647

27. Stark, H., Rodnina, M. V., Wieden, H. J., van Heel, M., and Wintermeyer, W. (2000) *Cell* **100**, 301-309
28. Carter, A. P., Clemons, W. M., Jr., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Hartsch, T., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2001) *Science* **291**, 498-501
29. Frank, J., and Agrawal, R. K. (2001) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**, 67-75
30. Frank, J. (2003) *Biopolymers* **68**, 223-233
31. Wower, J., Scheffer, P., Sylvers, L. A., Wintermeyer, W., and Zimmermann, R. A. (1993) *EMBO J.* **12**, 617-623
32. Doring, T., Mitchell, P., Osswald, M., Bochkariov, D., and Brimacombe, R. (1994) *EMBO J.* **13**, 2677-2685
33. Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001) *Cell* **106**, 233-241
34. Culver, G. M. (2001) *Structure (Camb)* **9**, 751-758
35. Greuer, B., Thiede, B., and Brimacombe, R. (1999) *RNA* **5**, 1521-1525
36. Robert, F., Gagnon, M., Sans, D., Michnick, S., and Brakier-Gingras, L. (2000) *RNA* **6**, 1649-1659
37. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene* **77**, 51-59
38. Davies, C., Bussiere, D. E., Golden, B. L., Porter, S. J., Ramakrishnan, V., and White, S. W. (1998) *J. Mol. Biol.* **279**, 873-888
39. Brunelle, M. N., Payant, C., Lemay, G., and Brakier-Gingras, L. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 4783-4791
40. Bélanger, F., Léger, M., Saraiya, A. A., Cunningham, P. R., and Brakier-Gingras, L. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 979-989
41. Viviani, V. R., Uchida, A., Viviani, W., and Ohmiya, Y. (2002) *Photochem. Photobiol.* **76**, 538-544

42. Wilson, K. S., Ito, K., Noller, H. F., and Nakamura, Y. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 866-870
43. Pinard, R., Payant, C., and Brakier-Gingras, L. (1995) *Biochemistry* **34**, 9611-9616
44. Spedding, G. (1990) in *Ribosomes and Protein Synthesis; a Practical Approach* (Spedding, G., ed), pp. 1-29, Oxford University Press, New York, NY
45. Hartz, D., McPheeters, D. S., Traut, R., and Gold, L. (1988) *Methods Enzymol.* **164**, 419-425
46. Grill, S., Gualerzi, C. O., Londei, P., and Blasi, U. (2000) *EMBO J.* **19**, 4101-4110
47. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 60-89
48. Studier, F. W. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 37-44
49. Fredrick, K., Dunny, G. M., and Noller, H. F. (2000) *J. Mol. Biol.* **298**, 379-394
50. Robert, F., and Brakier-Gingras, L. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 677-682
51. Saito, K., Mattheakis, L. C., and Nomura, M. (1994) *J. Mol. Biol.* **235**, 111-124
52. Spedding, G., Gluick, T. C., and Draper, D. E. (1993) *J. Mol. Biol.* **229**, 609-622
53. Joseph, S., and Noller, H. F. (1998) *EMBO J.* **17**, 3478-3483
54. Nierhaus, K. H. (1990) *Biochemistry* **29**, 4997-5008
55. Márquez, V., Wilson, D. N., and Nierhaus, K. H. (2002) *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 133-140
56. Greuer, B., Osswald, M., Brimacombe, R., and Stöffler, G. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 3241-3255
57. Bretscher, M. S. (1968) *Nature* **220**, 1088-1091
58. McCutcheon, J. P., Agrawal, R. K., Philips, S. M., Grassucci, R. A., Gerchman, S. E., Clemons, W. M., Jr., Ramakrishnan, V., and Frank, J. (1999) *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4301-4306
59. Dallas, A., and Noller, H. F. (2001) *Mol. Cell* **8**, 855-864

60. Gualerzi, C., Risuleo, G., and Pon, C. L. (1977) *Biochemistry* **16**, 1684-1689
61. Broude, N. E., Kussova, K. S., Medvedeva, N. I., and Budowsky, E. I. (1983) *Eur. J. Biochem.* **132**, 139-145
62. Gualerzi, C. O., Brandi, L., Caserta, E., Garofalo, C., Lammi, M., La Teana, A., Petrelli, D., Spurio, R., Tomsic, J., and Pon, C. L. (2001) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**, 363-376
63. Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (1999) *Mol. Cell* **3**, 601-609
64. Feinberg, J. S., and Joseph, S. (2001) *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11120-11125
65. Piepersberg, W., Nosedá, V., and Bock, A. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **171**, 23-34
66. Andersson, D. I., Bohman, K., Isaksson, L. A., and Kurland, C. G. (1982) *Mol. Gen. Genet.* **187**, 467-472
67. Farabaugh, P. J., and Björk, G. R. (1999) *EMBO J.* **18**, 1427-1434
68. Stahl, G., McCarty, G. P., and Farabaugh, P. J. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**, 178-183
69. Frank, J., and Agrawal, R. K. (2000) *Nature* **406**, 318-322
70. Joseph, S. (2003) *RNA* **9**, 160-164
71. Noller, H. F., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., and Cate, J. H. (2002) *FEBS Lett.* **514**, 11-16
72. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 147-150
73. Nicholas, K. B., and Nicholas, H. B. (1997) <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>, distributed by the authors

Figure 4-1: Interaction between ribosomal proteins S7 and S11 in the 30S subunit. **A.** Crystallographic structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*. The zoomed picture shows the interaction between S7 and S11 with interacting amino acid residues in blue and green, respectively, in *E. coli* numbering. The image was produced using Weblab ViewerPro software version 4 (Molecular Simulation Inc.). **B.** Schematic representation of the *E. coli* S7 and S11 mutants used in this study. The boxed regions represent deleted sequences of S7. Amino acids in red correspond to the mutations introduced in the proteins. The histidine tag sequence at the C-terminus of the proteins is not indicated.

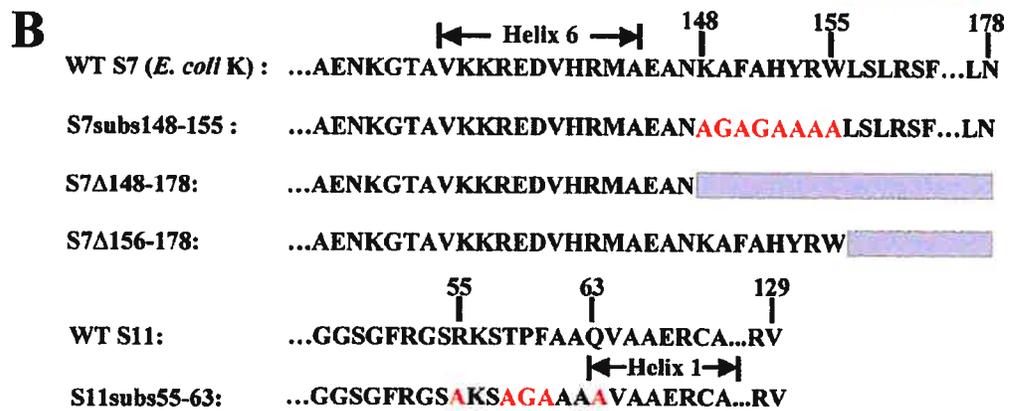
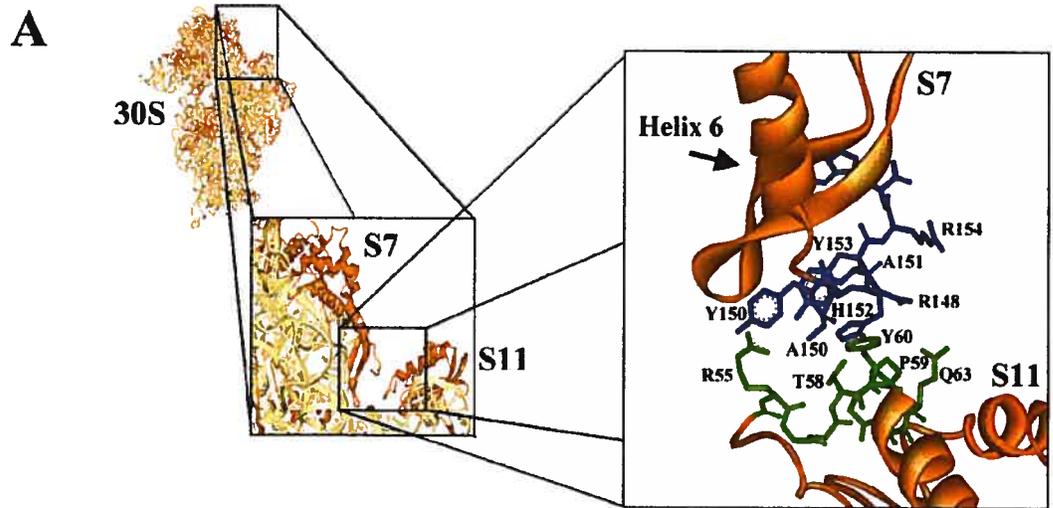


Figure 4-2: Alignment of sequences of ribosomal proteins S7 and S11. Sequences from the Swiss-Prot protein database (<http://us.expasy.org/sprot>) were aligned, using ClustalW (72), and formatted, using GeneDoc version 2.6.02 (73). **A.** A representative sequence alignment of the C-terminal region of ribosomal protein S7 from different organisms. The black residues correspond to a 100% similarity for all sequences, the dark grey residues correspond to a 75 to 100% similarity, the light grey residues have a 50 to 75% similarity and the white residues less than 50% similarity. The region interacting with S11 is shown by a line above the sequence. *Eco K*: *Escherichia coli* strain K; *Eco B*: *Escherichia coli* strain B; *Sty*: *Salmonella typhimurium*; *Bsu*: *Bacillus subtilis*; *Tth*: *Thermus thermophilus*; *Hep*: *Helicobacter pylori*; *Nit chlo*: *Nicotiana tabacum* chloroplast; *Ath chlo*: *Arabidopsis thaliana* chloroplast; *Rec mito*: *Reclinomonas americana* mitochondria; *Hsa mito*: *Homo sapiens* mitochondria; *Hsa*: *Homo sapiens*; *Rno*: *Rattus norvegicus*; *Sce*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Mja*: *Methanococcus jannaschii*; *Hma*: *Haloarcula marismortui*; **B.** A representative sequence alignment of the region encompassing residues 55-63 of ribosomal protein S11 from different organisms. The level of similarity conservation is indicated as in A. The line above the sequence delineates the region interacting with S7.

A

← Helix 6 →

<i>Eco K</i>	133	-AVKRE	EDVHRM	EANK	AFAHYRWLSLRSFSHQAGASSKQPALGYLN-178
<i>Eco B</i>	133	-AVKRE	EDVHRM	EANK	AFAHYRW-155
<i>Sty</i>	133	-AVKRE	EDVHRM	EANK	AFAHYRW-155
<i>Bsu</i>	133	-AVKRE	EDTHKM	EANK	AFAHYRW-155
<i>Tth</i>	133	-AVKRE	EDVERM	EANK	AFAYHYRW-155
<i>Hep</i>	133	-AFKRE	EDVHRM	EANK	AFAHYRW-155
<i>Nit chlo</i>	133	-ALPKR	EETHRM	EANK	AFAFHFR-155
<i>Ath chlo</i>	133	-ALPKR	EETHRM	EANK	AFAFHFP-155
<i>Rec mito</i>	137	-AIDRF	ISMHRM	ESNR	AFAYHYRWQ-159
<i>Hsa mito</i>	218	-VLEFR	HDLHVM	EANK	BALAHYRWW-242
<i>Hsa</i>	188	-AKKRE	DELEERV	AKSNR	-204
<i>Rno</i>	188	-AKKRE	DELEERV	AKSNR	-204
<i>See</i>	208	-AKKRE	DELEERV	AKSNR	-224
<i>Mja</i>	175	-AVRFR	EETERV	AQSAR	-191
<i>Hma</i>	189	-AVNQR	EKEERV	AAAR	-205

B

← Helix 1 →

<i>Eco K</i>	41	-IGWA	AGSGFRGSRKST	PPFAAQV	AAERCADAVK-75
<i>Eco B</i>	41	-IGWA	AGSGFRGSRKST	PPFAAQV	AAERCADAVK-75
<i>Sty</i>	41	-IGWA	AGSGFRGSRKST	PPFAAQV	AAERCADAVK-75
<i>Bsu</i>	43	-ISWS	AGALGFRGSRKST	PPFAAQMAA	ETAAKGSI-77
<i>Tth</i>	38	-ITWS	GVIGYKGSRKGT	PPFAAQLA	ALDAAKKAM-72
<i>Hep</i>	42	-ICWS	AGLGFKGSKKS	PPFAAQQA	AVESALS KAK-76
<i>Nit chlo</i>	50	-ISWS	ATSGFKGTRRG	PPFAAQTAT	ANAI RTVV-84
<i>Ath chlo</i>	50	-ISWS	ATCGFRGTRRG	PPFAAQTAT	AGNAIRAVV-84
<i>Rec mito</i>	41	-ISWA	SSGFKGARRS	PPFAAQAAA	ENAGKKA I-75
<i>Hsa mito</i>	106	-IAFA	CTEGFRNAKKG	PPFAAQTAT	IAAAAARAK-140
<i>Hsa</i>	52	-ICRV	G MKVKADRDES	PPFAAMLAA	QDV AQRC-86
<i>Rno</i>	52	-ICRV	G MKVKADRDES	PPFAAMLAA	QDV AQRC-86
<i>See</i>	37	-IAPV	G MKVKADRDES	PPFAAMLAA	QDV AA KCR-71
<i>Mja</i>	33	-IARV	G RVTRNQPDEG	PPFAA MQAA	FKLA EVLK-67
<i>Hma</i>	33	-IAKS	G TVVKQNRDEA	PPFAA MQMA	EVVA EKAL-67

Figure 4-3: Ribosome profile of bacterial cells overexpressing S7, S11 or their mutant derivatives. *E. coli* BLR(DE3)/pLysS cells were transformed with the pET-21a(+) plasmids coding for S7, S11 or their mutant derivatives and overexpression of the ribosomal proteins was induced for 90 min. The cell lysates (40 units of $A_{260\text{ nm}}$) were fractionated for 18 hours at 22 000 rpm in a Beckman SW-28 rotor through a 15-40% sucrose gradient in buffer A (20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 10.5 mM MgCl_2 , 300 mM NH_4Cl , 2 mM DTT and 0.5 mM EDTA) and the subunits, ribosomes and polysomes were fractionated using an ISCO apparatus and detected at 260 nm. The open arrows point to the ribosomal subunits and the filled arrows point to the 70S ribosomes and polysomes. 1: pET-21a(+), 2: pET-21a(+)-S7, 3: pET-21a(+)-S7 Δ 156-178, 4: pET-21a(+)-S7 Δ 148-178, 5: pET-21a(+)-S7subs148-155 6: pET-21a(+)-S11, 7: pET-21a(+)-S11subs55-63.

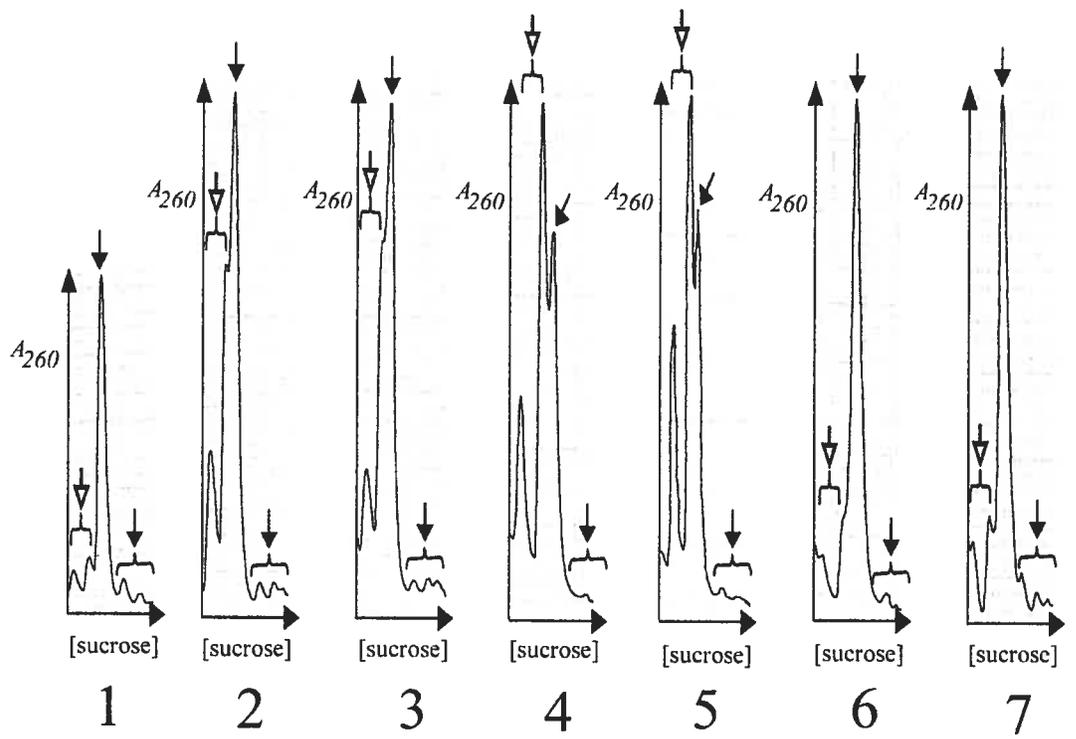


Figure 4-4: Incorporation of plasmid-encoded S7, S11 or their mutant derivatives into 30S, 70S or polysomes as determined by Western blot. BLR(DE3)/pLysS cells were transformed with the pET-21a(+) plasmids coding for S7, S11 or their mutant derivatives and overexpression of the ribosomal proteins was induced for 90 min. The 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes were fractionated as described in the Figure 3 legend. **A.** Examples of Western blots showing the detection of plasmid-encoded S7 or S7_{subs148-155} and chromosome-encoded S7 with a goat anti-S7 antibody. Lane 1: cell lysate when wild-type S7 is overexpressed; lane 2: 30S when wild-type S7 is overexpressed; lane 3: 70S when wild-type S7 is overexpressed; lane 4: polysomes when wild-type S7 is overexpressed; lane 5: 30S when S7_{subs148-155} is overexpressed; lane 6: 70S when S7_{subs148-155} is overexpressed; lane 7: polysomes when S7_{subs148-155} is overexpressed. **B.** Relative incorporation of the plasmid-encoded proteins into 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes. The incorporation was assessed by measuring the intensities of the bands detected in the Western blots, as described in the Experimental Procedures. The values are means \pm standard deviation of at least three independent experiments.

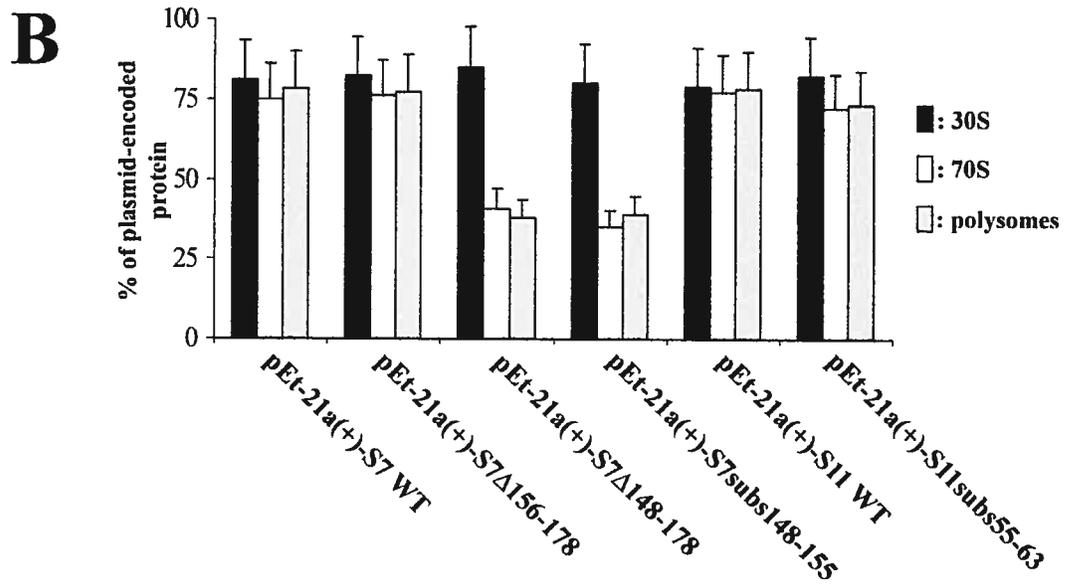
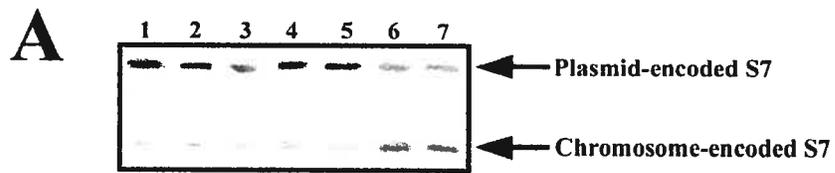
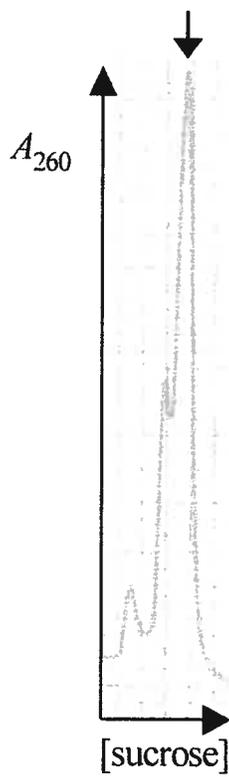


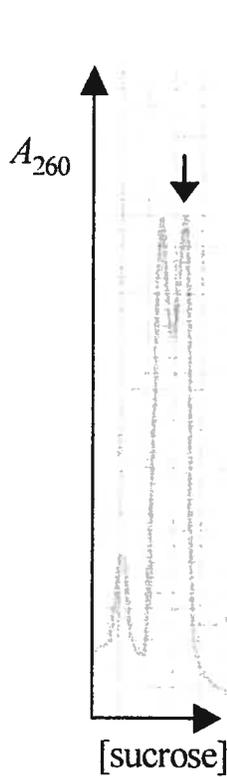
Figure 4-5: Association assays with wild-type 30S or 30S containing mutated S7 or S11. The 30S and 50S subunits (72 pmols) were incubated in a molar ratio of one to one and the formation of the 70S was monitored by centrifugation as described in the Figure 3 legend. The association of the subunits was detected at 260 nm using an ISCO apparatus. The arrows point to the 70S ribosomes. 1: wild-type 30S, 2: 30S with S7 Δ 156-178, 3: 30S with S7 subs148-155, 4: 30S with S11subs55-63.



1



2



3



4

Figure 4-6: Toeprinting analysis of the formation of the 30S initiation complex with 30S subunits containing wild-type or mutated S7 or S11. Toeprinting was performed as described in the Experimental Procedures. C and T lanes are sequencing lanes. Lane 0: primer extension with T4 gene 32 mRNA without 30S and tRNA^{fMet}; lane 1: primer extension with wild-type 30S and tRNA^{fMet}; lane 2: primer extension with 30S containing S7 Δ 156-178 and tRNA^{fMet}; lane 3: primer extension with 30S containing S7subs148-155 and tRNA^{fMet}; lane 4: primer extension with 30S containing S11subs55-63 and tRNA^{fMet}. The position +1 corresponds to the A of the initiator AUG codon of the mRNA. The relative toeprint is the ratio of the intensity of the toeprint signal to that of the full-length extension signal.

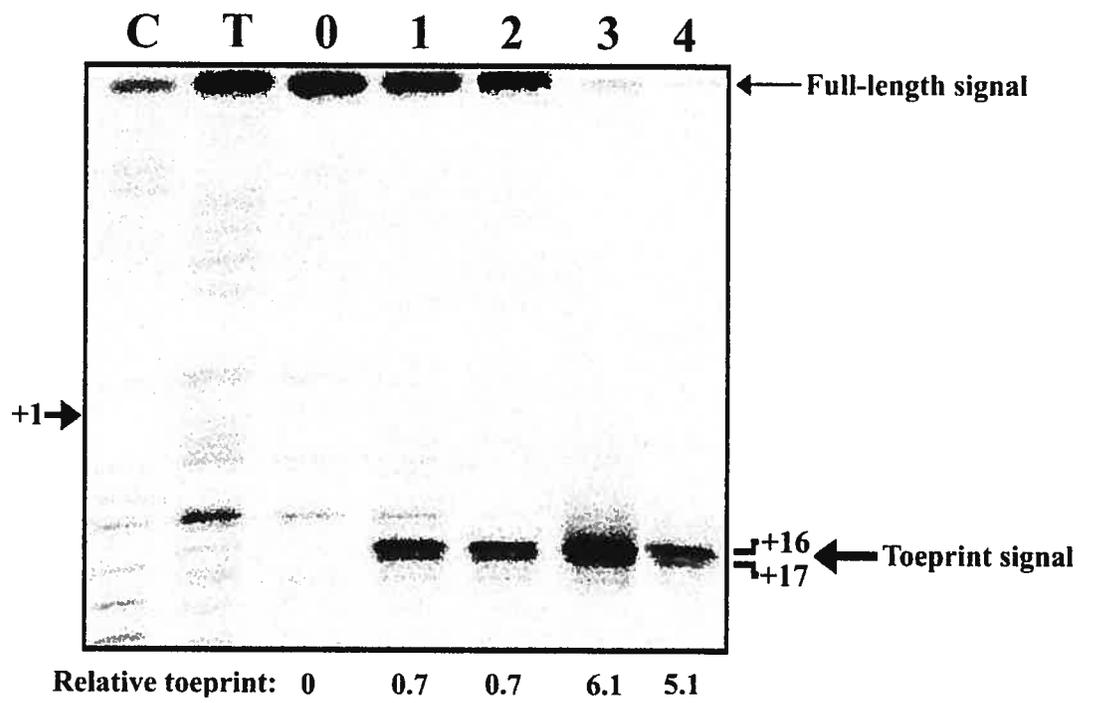


Figure 4-7: Filter-binding assays for the interaction between mRNA and 30S containing wild-type or mutated S7 or S11. A ^{32}P -labelled fragment of T4 gene 32 mRNA (63 pmols) was incubated with increasing amounts (1.4 to 72 pmols) of heat-activated 30S containing wild-type or mutated S7 or S11 in a Tris-acetate buffer containing 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$. The mixture was filtered through a 0.45 μm nitrocellulose filter (Millipore) and the radioactivity retained on the filter was counted. Typical examples of RNA retention curves are presented. Each experiment was performed at least three times with three independent 30S preparations.

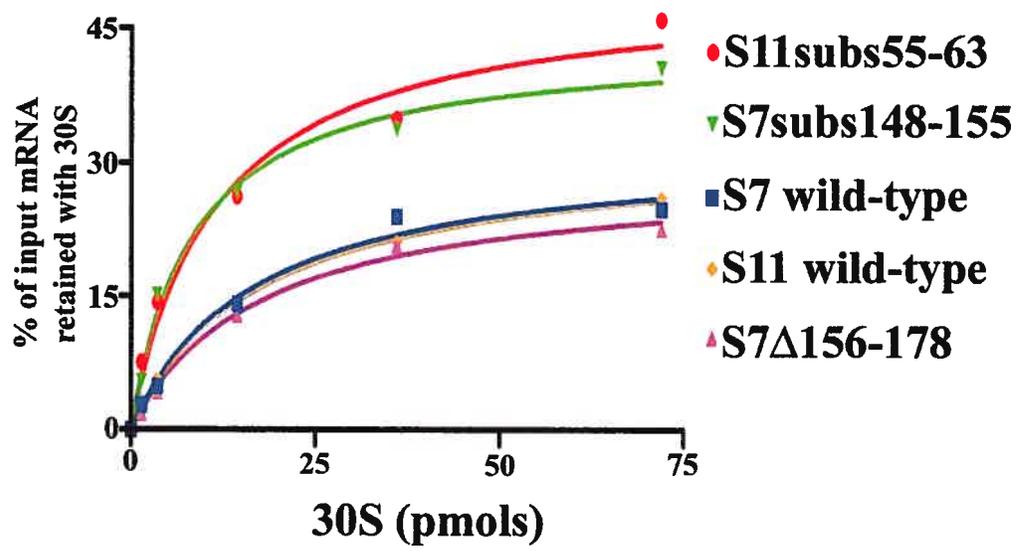
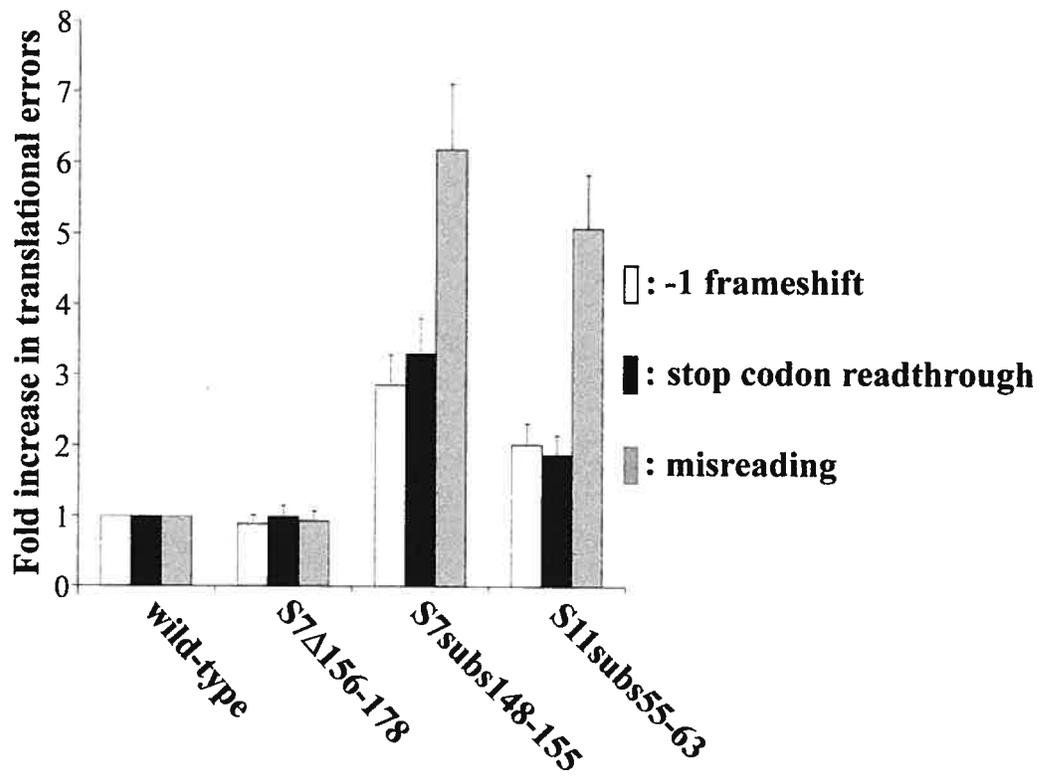


Figure 4-8: Effect of disrupting the S7-S11 interaction on translation fidelity. *E. coli* BLR(DE3) cells were co-transformed with a pET-21a(+) plasmid coding for S7, S11 or their mutant derivatives and with plasmid pACYpET-Luc-1, for measuring -1 frameshift, or pACYpET-Luc-UGA, for measuring UGA stop codon readthrough or pACYpET-Luc-R218G, for measuring misreading. Luciferase activity was measured in the cell lysates after 60 and 120 min of induction and the enzyme activity was normalized for the increase in optical density of the cell culture. The levels of frameshift efficiency, stop codon readthrough and misreading, which were measured as described in the Experimental Procedures, were, respectively, 0.14 ± 0.04 , 3.5 ± 0.8 and $0.05 \pm 0.002\%$ when either wild-type S7 or S11 was overexpressed and were arbitrarily ascribed a value of 1. The results are the means of at least four independent experiments with bars representing the standard deviation.



Chapitre V

Discussion

Lorsque la communauté scientifique a entamé l'étude du ribosome, les chercheurs pensaient que les protéines ribosomiques jouaient le rôle essentiel dans la synthèse protéique. Depuis la découverte des ARN catalytiques et de l'implication de l'ARNr dans le fonctionnement du ribosome, cette vision a changée radicalement, reléguant les protéines ribosomiques au second plan. Cependant, le rôle joué par les protéines ribosomiques est loin d'être négligeable et plusieurs études ont montré qu'elles peuvent participer activement à la synthèse protéique (voir sections 1.4). L'ensemble de nos travaux a eu pour objectif d'examiner l'implication de la protéine ribosomique S7 dans le fonctionnement du ribosome, en étudiant son interaction avec l'ARNr 16S et avec une protéine ribosomique voisine, S11. De plus, nous avons examiné le rôle de S7 dans son interaction avec son propre ARN messenger.

Notre recherche a tout d'abord consisté à étudier l'interaction entre S7 et l'ARN 16S, une interaction cruciale pour l'assemblage d'un domaine de la sous-unité 30S, et aussi entre S7 et son propre ARNm, dont elle contrôle la traduction. Notre objectif était de déterminer quels sont les résidus de la protéine S7 responsables de son interaction avec chacune des molécules d'ARN. Nous avons donc cloné la protéine à partir du génome d'*E. coli* dans un vecteur d'expression procaryote et lui avons ajouté une étiquette histidine pour faciliter sa purification. Nous avons ensuite muté la protéine à plusieurs endroits et examiné la liaison des mutants à des fragments de l'ARNr 16S et de son ARNm qui contiennent le site de liaison de S7. Les résultats que nous avons obtenus nous renseignent sur les moyens utilisés par S7 pour interagir avec les deux cibles d'ARN.

Un second volet de notre recherche a consisté à étudier le rôle d'une interaction protéine-protéine détectée dans la structure cristalline de la sous-unité 30S et qui implique S7, située dans la tête de la sous-unité 30S, et S11, située dans la plate-forme. Nous avons examiné comment des mutations qui empêchent l'interaction S7-S11 affectent le fonctionnement du ribosome. Nos résultats suggèrent que l'interaction entre S7 et S11 intervient dans le contrôle de la dynamique du ribosome.

5.1 Identification des déterminants de la protéine ribosomique S7 d'*Escherichia coli* contrôlant sa liaison à l'ARNr 16S

La liaison de la protéine ribosomique S7 à la partie inférieure du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S (Figure 2-1A) est cruciale pour le repliement de ce domaine qui forme la tête de la sous-unité 30S (voir section 1.3). Une analyse par mutagenèse effectuée dans notre laboratoire a identifié le fragment minimal du domaine 3' majeur capable de lier S7 (Figure 2-1B) (Dragon et Brakier-Gingras, 1993). Ce fragment contient deux boucles irrégulières, A et B, jointes par l'hélice 29, d'où émergent, respectivement, une portion de l'hélice 42 ainsi que l'hélice 43 et une portion de l'hélice 28. Des mutations indépendantes dans différentes régions de ce fragment affectent la liaison de S7 sans toutefois la supprimer complètement. Ceci suggère que la protéine interagit avec au moins deux régions de l'ARNr (Dragon *et al.*, 1994). Cette hypothèse est appuyée par des pontages entre S7 et l'ARNr 16S et par l'analyse des empreintes de S7 sur l'ARNr 16S (voir section 1.2.1.3). La carte d'assemblage de la sous-unité 30S montre que l'incorporation de sept protéines dans la tête de la sous-unité ribosomique dépend de la liaison préalable de S7. Ceci indique que S7 doit maintenir l'ARNr dans une conformation active qui est reconnue par les protéines secondaires, S9, S13 et S19, et, ensuite, par les protéines tertiaires, S14, S10, S3, S2, de la tête de la sous-unité 30S (Figure 1-22). Ce rôle de S7 est en accord avec la suggestion qu'il y a plus d'un point d'ancrage entre S7 et le domaine 3' majeur de l'ARNr 16S.

Dans notre première étude, nous avons voulu identifier les déterminants utilisés par S7 pour interagir avec l'ARNr 16S. Pour ce faire, nous avons cloné le gène de S7 provenant de la souche K12A19 de la bactérie *E. coli* dans un vecteur d'expression de la famille pET, sous contrôle d'un promoteur T7. Ce vecteur permet l'expression de la protéine clonée dans une bactérie hôte qui contient le gène de la T7 ARN polymérase dans son génome. Le vecteur contenant S7 a ensuite été utilisé pour construire des mutants de la protéine, altérés en des sites choisis d'après leur conservation au travers des espèces et leur exposition au solvant dans la structure cristallographique de la

protéine isolée (Wimberly *et al.*, 1997; Hosaka *et al.*, 1997). Rappelons ici que S7 contient un domaine compact composé de cinq hélices α , les hélices 1 à 5, à partir duquel sont exposés au solvant un feuillet β , l'hélice 6 et les deux extrémités flexibles de la protéine. Le positionnement des hélices 1 et 4 et du feuillet β forme une surface concave qui contient plusieurs résidus d'acides aminés chargés positivement. Il a été proposé que cette surface est responsable de l'interaction de S7 avec l'ARNr 16S et que le feuillet β s'insère dans le sillon mineur d'une portion hélicoïdale de l'ARNr (voir section 1.2.2.1). La Figure 2-3 résume les délétions et les substitutions qui ont été effectuées dans la séquence de S7 pour notre étude. La protéine sauvage et chacun de ses mutants ont été exprimés et purifiés, et nous avons étudié leur liaison à un fragment d'ARN correspondant à la partie inférieure du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S obtenu par transcription *in vitro*. Nous avons vérifié au préalable par dichroïsme circulaire que les mutations dans S7 n'affectent pas significativement le repliement secondaire de la protéine. Cependant, nous n'excluons pas le fait que les mutations peuvent causer des perturbations locales dans la structure de la protéine qui ne sont pas détectées par cette méthode d'analyse. Les études de liaison ont été faites par filtration sur membranes de nitrocellulose dans deux conditions: soit dans un tampon à force ionique élevée (300 mM K^+ ; 20 mM Mg^{++}) utilisé pour l'assemblage de la 30S, soit dans un tampon de force ionique modérée se rapprochant des conditions existantes dans le milieu intracellulaire (175 mM K^+ ; 2 mM Mg^{++}). Nous avons observé que dans le tampon de force ionique modérée, l'affinité de S7 pour le fragment d'ARN est six fois plus élevée que dans le tampon de force ionique élevée. Comme les interactions électrostatiques entre les protéines et l'ARN ont plus de difficultés à se former dans un environnement à force ionique élevée (Draper, 1999), nous suggérons que les contacts électrostatiques entre S7 et l'ARNr 16S contribuent de façon importante à la liaison de la protéine à l'ARN. La structure du complexe entre S7 et l'ARNr 16S observée dans la structure cristalline de la 30S publiée peu de temps après notre étude a confirmé cette proposition. En effet, les contacts que fait l'ARNr 16S avec S7 impliquent, dans la plupart des cas, des liaisons entre les résidus chargés négativement des phosphates du squelette de l'ARN (Figure 5-1A) et des résidus d'acide aminés chargés positivement de la protéine (Wimberly *et al.*, 2000; Schlünzen *et al.*, 2000; revue par Brodersen *et al.*, 2002). De plus, malgré

l'ampleur des empreintes de S7 dans la partie inférieure du domaine 3' majeur (Figure 5-1A), les contacts observés sont limités à deux régions du domaine 3' majeur. Le site d'interaction principal sur l'ARNr est localisé au niveau de la boucle B à la jonction des hélices 28, 29 et 43 de l'ARNr 16S et le deuxième site d'interaction se situe à la jonction de la boucle A et de l'hélice 41 (Figure 5-1B).

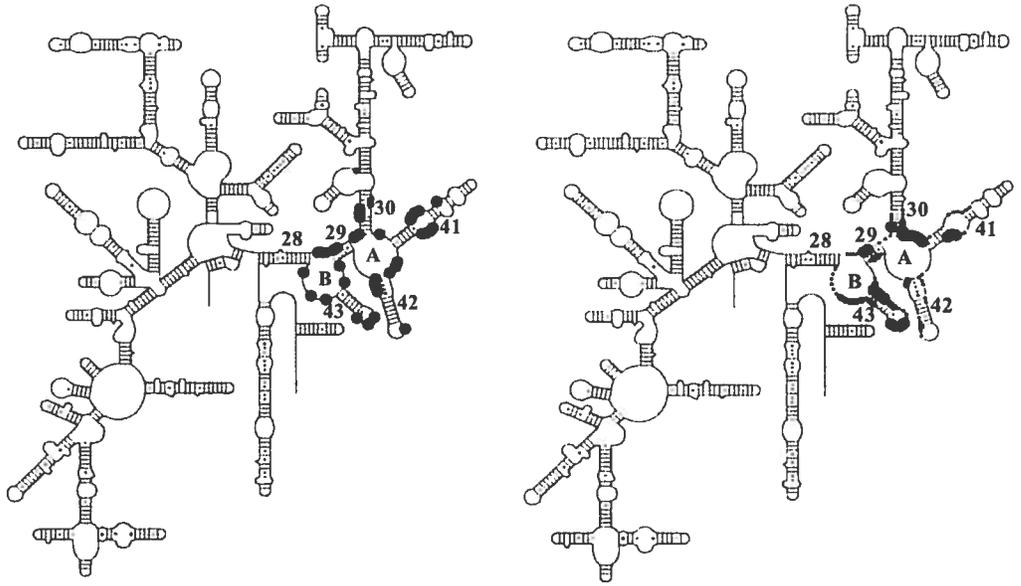
L'examen de l'affinité des mutants de S7 pour le fragment de l'ARN 16S contenant le site de liaison de la protéine a permis d'identifier les régions de S7 importantes pour cette liaison. Ces résultats sont résumés dans les Tableaux 2-1 et 2-2. Les résultats avec les mutants de délétion de S7 ont indiqué qu'au moins trois régions de la protéine sont importantes pour sa liaison à l'ARNr 16S. La délétion de l'extrémité N-terminale de S7 inhibe la liaison de la protéine à l'ARNr 16S tandis que la délétion du feuillet β et celle de la portion terminale de l'hélice 6 (résidus 138-148) perturbent cette liaison, mais ne l'empêchent pas complètement. La protéine S7 des bactéries d'*E. coli* appartenant à la souche K possède 178 acides aminés alors qu'elle n'en possède que 155 dans les bactéries d'*E. coli* de la souche B. La différence se trouve dans l'extrémité C-terminale de S7 K qui est plus longue de 23 acides aminés que S7 B. Le rôle de cette extension est encore inconnu. La délétion des 31 derniers acides aminés de S7 (mutant S7 Δ 148-178) n'affecte pas la liaison de la protéine de manière significative, suggérant que cette extension ne participe pas à l'interaction de la protéine avec l'ARNr 16S. Les effets des mutants de substitution R3Q, Q8A et F17G, dans l'extrémité N-terminale, Y84A, dans le feuillet β et M143A dans l'hélice 6 sur la liaison de S7 à l'ARNr 16S appuient les résultats obtenus avec les mutants de délétion concernant l'implication de l'extrémité N-terminale, du feuillet β et de l'hélice 6 dans la liaison de la protéine à l'ARNr, même si les effets observés sont moins marqués. De plus, les mutants de substitution nous ont permis de mettre en évidence trois autres régions de S7 importantes pour son interaction avec l'ARN 16S, soit, la boucle 2 (mutant K35A), qui relie les hélices 1 et 2, la boucle 3 (mutant G54S), qui relie les hélices 2 et 3 et la boucle 5 (mutant M115G) qui relie les hélices 4 et 5. Il est à noter que la boucle 2 contient deux lysines très conservées, K34 et K35, mais que seule la mutation de la deuxième lysine (K35) affecte la liaison de S7 à l'ARNr. Les résultats des essais de liaison des mutants

Figure 5-1: Interaction du domaine 3'majeur de l'ARNr 16S avec la protéine ribosomique S7 (adapté de Powers et Noller, 1995).

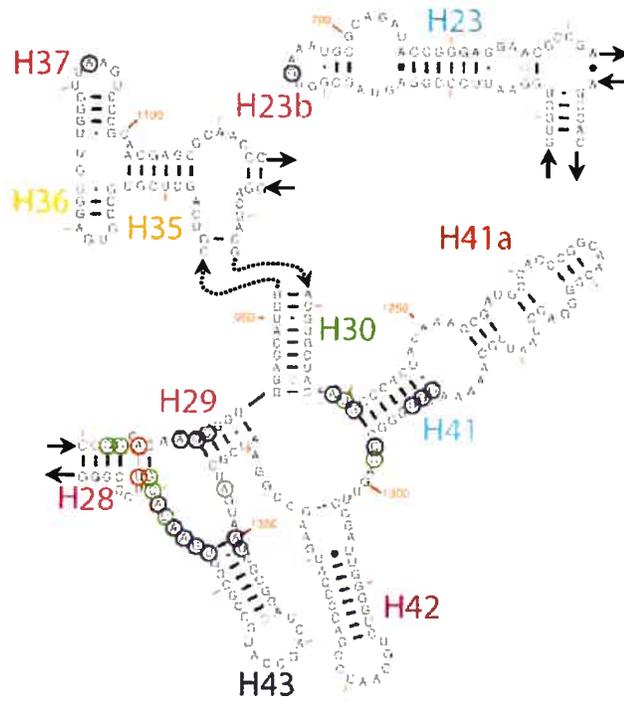
A. Positions de l'ARNr 16S protégées des attaques par des agents chimiques lors de la liaison de S7. L'intensité de la protection est proportionnelle à la taille des cercles entourant les nucléotides (adapté de Powers *et al.*, 1995). Image de droite: bases protégées par la protéine S7 contre les attaques par des agents chimiques. Image de gauche: squelette de l'ARNr protégé par S7 contre les attaques par des radicaux libres.

B. Nucléotides de l'ARNr 16S qui interagissent avec S7 dans la structure cristalline de la sous-unité 30S. Les cercles bleus indiquent un contact entre le squelette de l'ARNr et S7, les cercles rouges indiquent un contact entre une base de l'ARNr et S7 et les cercles verts indiquent un contact impliquant à la fois une base et le squelette de l'ARNr 16S (adapté de Brodersen *et al.*, 2002).

A



B

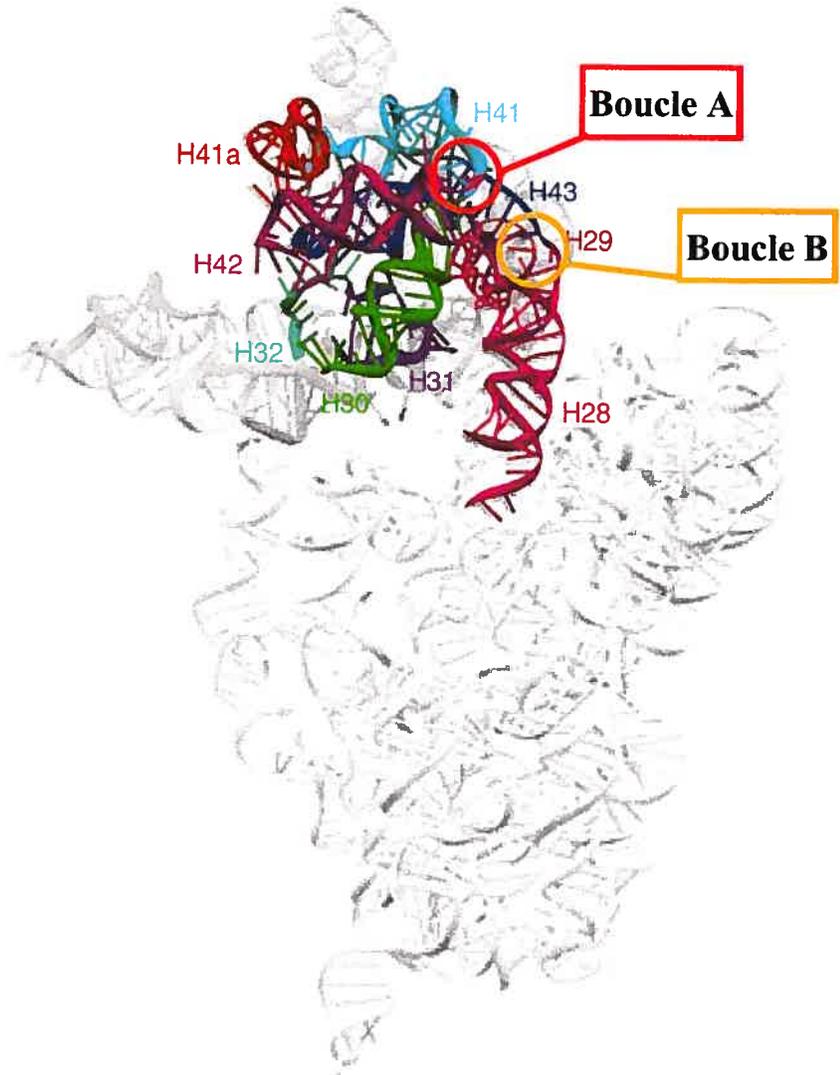
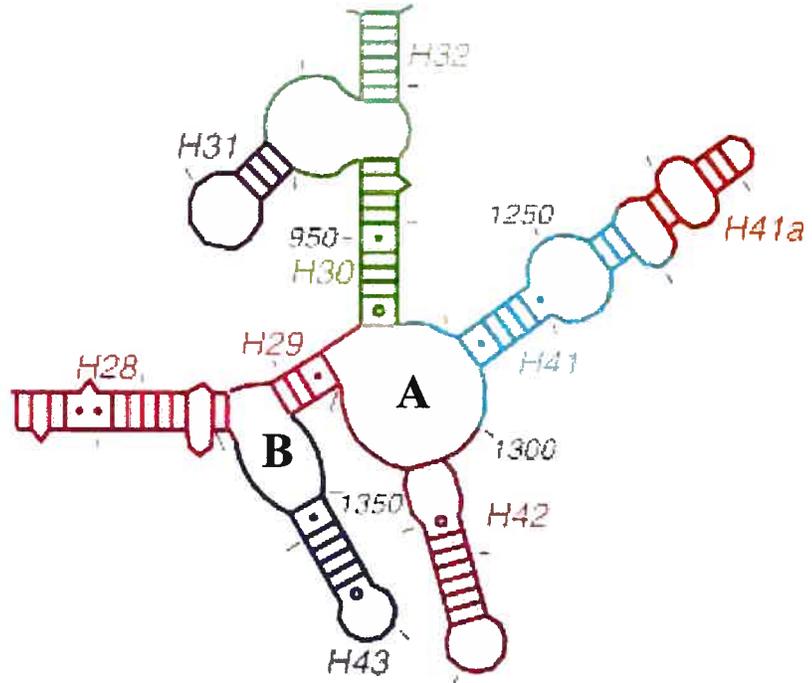


de S7 à l'ARN 16S sont en accord avec les données de pontages entre les deux molécules (voir section 1.2.1.3). En effet, les mutations de chacune des régions de S7 qui contient des résidus pontés à l'ARNr 16S (c'est-à-dire l'extrémité N-terminale, le feuillet β et les boucles 3 et 5) diminuent l'affinité de la protéine pour l'ARNr. De plus, dans la plupart des cas, lorsque des résidus basiques sont substitués ou éliminés, nous avons observé que l'effet sur la liaison était plus marqué dans le tampon de force ionique modérée, ce qui confirme l'implication d'interactions ioniques entre l'ARNr et des résidus basiques de S7. Pendant que nos travaux étaient en cours, une autre étude concernant l'interaction entre S7 et l'ARNr 16S a été publiée par le groupe de Tanaka. Ce groupe a examiné l'effet de mutations dans l'extrémité N-terminale, l'hélice 4 et le feuillet β de S7 de la bactérie *B. stearothermophilus* sur sa liaison à l'ARNr 16S (Miyamoto *et al.*, 1999). En accord avec nos travaux, les résultats de ce groupe ont souligné l'importance de l'extrémité N-terminale de S7 pour sa liaison à l'ARN. De plus, il a été observé qu'aucune des mutations ponctuelles dans la région concave de S7 n'affectait sévèrement la liaison de la protéine à l'ARN lorsque l'effet des mutations est examiné individuellement. Les résultats du groupe de Tanaka, combinés aux nôtres, suggèrent que cette région de S7 participe à son interaction avec l'ARNr via de multiples contacts, chacun de faible intensité.

Le complexe S7-ARNr 16S dans la structure cristalline de la sous-unité 30S (Wimberly *et al.*, 2000) nous permet d'analyser les résultats que nous avons obtenus en solution sur l'interaction entre S7 et cet ARNr. La structure montre que, dans le site de liaison de S7 sur l'ARN 16S, toutes les hélices sont repliées sur elles-mêmes dans un arrangement très compact (Figure 5-2). Les deux boucles B et A du domaine 3' majeur, qui composent respectivement le premier et le deuxième site d'interaction avec S7, sont positionnées à l'extrême droite de la 30S lorsque l'interface est présentée vers le lecteur. Ces boucles sont exposées au solvant et chacune des hélices de l'ARNr qui en émergent se dirige vers l'intérieur de la tête de la sous-unité. La condensation de ce domaine est stabilisée par des empilements verticaux des hélices et par plusieurs interactions horizontales entre ces hélices. Dans le premier site d'interaction de S7 sur l'ARNr 16S, soit celui entourant la boucle B, l'hélice 29 est solidement arrimée à la base de l'hélice

Figure 5-2: Repliement de la partie inférieure du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S observé dans la structure de la sous-unité 30S (adapté de Wimberly *et al.*, 2000). L'image du haut montre la structure secondaire de cette région de l'ARNr 16S avec les hélices colorées de couleurs différentes. L'image du bas montre la disposition de ces hélices dans la structure cristallographique de la 30S. Les protéines ont été enlevées pour augmenter la visibilité des hélices.

C



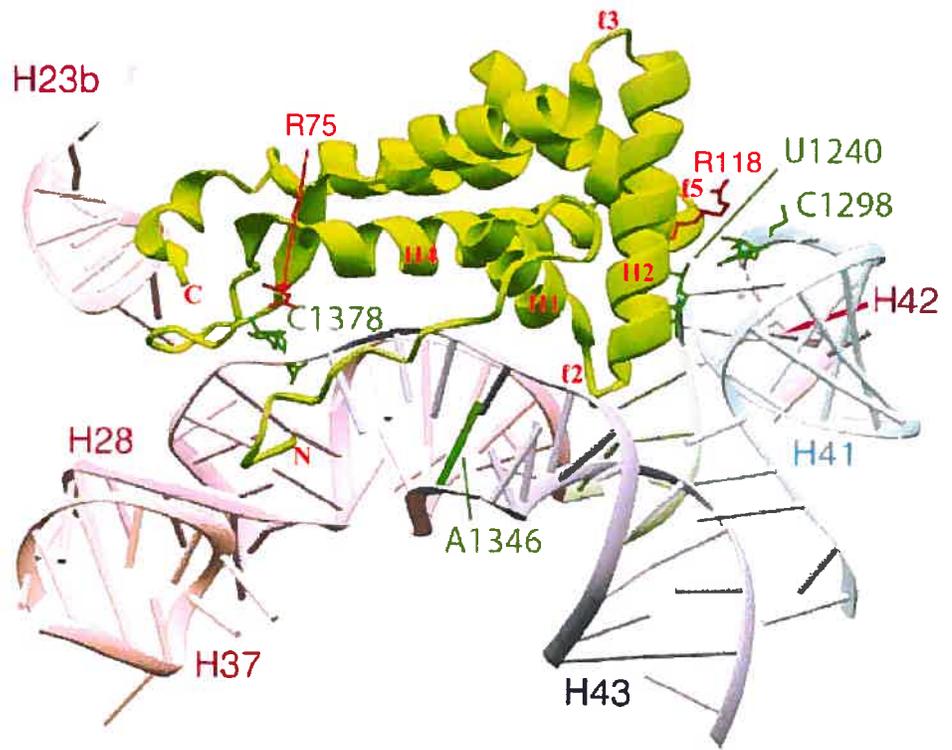
43, l'hélice 42 est empilée sur les hélices 30 et 41 et l'hélice 43 interagit avec l'hélice 41. L'interaction entre l'hélice 29 et l'hélice 43 induit une courbure sévère dans la boucle B, à la base de l'hélice 43, qui expose plusieurs phosphates de cette section de l'ARN. Les charges négatives de ces phosphates ainsi exposées sont neutralisées par des résidus basiques de plusieurs régions de S7 (Figure 5-3). Notons ici que la numérotation de la protéine S7 d'*E. coli* sera utilisée pour faciliter la comparaison de nos résultats avec les détails du complexe S7-ARNr 16S observés dans la structure de la sous-unité 30S de *T. thermophilus*. Tout d'abord, parmi les régions qui interagissent avec le premier site d'interaction de S7 sur l'ARNr 16S, il y a la surface concave de la protéine. Les contacts observés entre cette région et l'ARN impliquent principalement des résidus des hélices 1 et 4, dont l'asparagine 27 de l'hélice 1 qui interagit avec le squelette du nucléotide A1375 et les arginines 94 et 101 de l'hélice 4 de S7 qui interagissent avec le squelette du nucléotide G939. Ceci est en accord avec les résultats de mutagenèse du groupe de Tanaka qui ont montré que des mutations dans l'hélice 4 affectent la liaison de S7 à l'ARNr 16S (Miyamoto *et al.*, 1999). Le feuillet β de S7 participe aussi à l'interaction avec la boucle B du domaine 3' majeur, mais sa contribution n'est pas majeure, comme le groupe de Tanaka et nous l'avons observé (Miyamoto *et al.*, 1999; nos résultats). L'interaction entre cette région de la protéine et l'ARNr se fait principalement entre l'arginine 75 qui interagit avec le résidu 1378 de la boucle B. La structure du complexe entre S7 et l'ARNr 16S montre donc que la surface concave de S7 participe à l'interaction entre la protéine et l'ARN comme les analyses de la structure cristalline de S7 l'avaient proposé (section 1.2.2.1). Par contre, dans cette structure, le feuillet β de la protéine ne s'insère pas dans le sillon majeur d'une hélice de l'ARNr comme proposé initialement à partir de la structure de la protéine isolée (section 1.2.2.1). Il repose plutôt à la jonction des hélices 28 et 43. Le feuillet β de S7 interagit surtout avec l'ARNt au site E sur le ribosome (Yusupov *et al.*, 2001) et est d'ailleurs très conservé entre les espèces, ce qui est probablement relié au rôle qu'il jouerait dans la liaison de l'ARNt à ce site.

D'autres régions de S7 à l'extérieur de la surface concave dont nous avons parlé plus haut, participent aussi à l'interaction de la protéine avec la région entourant la

boucle B de l'ARNr 16S. Tout d'abord, il y a l'extrémité N-terminale de S7. Cette section de la protéine forme un crochet qui se cramponne à des nucléotides dans l'hélice 28 et dans la boucle B de l'ARNr 16S via ses résidus basiques (Figure 5-3). Notamment, l'arginine 3 interagit avec la base G933 et l'arginine 9, avec la base et le squelette du nucléotide A1346. Cette courte région de S7 fait beaucoup de contacts avec l'ARNr 16S. Il n'est donc pas surprenant que sa délétion ou que la substitution de résidus qu'elle contient ait un effet drastique sur la liaison de la protéine à l'ARNr (Miyamoto *et al.*, 1999; nos résultats). L'autre région de S7 qui participe à son interaction avec la boucle B est la boucle 2 qui relie les hélices 1 et 2 de la protéine. Parmi les résidus de cette boucle qui interagissent avec l'ARNr, il y a la lysine 35 qui fait un pont ionique avec le squelette du nucléotide A1374, en accord avec le fait que la mutation de cet acide aminé diminue la liaison de S7 à l'ARNr 16S (nos résultats).

Le deuxième site d'interaction de S7 sur l'ARN 16S est aussi très compact (Figure 5-2). Dans ce site, l'hélice 41 interagit avec l'hélice 43, ce qui cause l'exposition du squelette des bases G1491 et U1492 dans la portion inférieure de l'hélice 41. Les phosphates ainsi exposés sont neutralisés par l'arginine 40 de l'hélice 2 de S7. Le repliement de cette portion du domaine de liaison de S7 à l'ARNr 16S induit aussi des courbures à la jonction des hélices 30, 41 et 42, qui exposent le résidu U1240 ainsi que le squelette des nucléotides dans la région entourant cet U. Encore une fois, cette région exposée sert de surface d'interaction avec S7. La base U1240 s'insère profondément dans une poche hydrophobique créée par des résidus des boucles 2 et 5 de S7, comme l'isoleucine 29 de la boucle 2. Notons ici que la boucle 2 de S7 est la seule région de la protéine qui interagit simultanément avec la région entourant la boucle B et celle entourant la boucle A. Le squelette du nucléotide U1240 ainsi que celui de résidus voisins, à la base de l'hélice 41, sont neutralisés par d'autres acides aminés dans les boucles 2 et 5, comme les arginines 113 et 118 de la boucle 5, ou dans les hélices à proximité de ces boucles. L'ampleur des contacts que font ces boucles de S7 avec l'ARNr 16S explique le fait que des mutations dans ces régions causent un effet marqué sur la liaison de S7 à l'ARN (nos résultats). Étonnamment, un contact est aussi observé entre la lysine 34 de S7 dans la boucle 2 et le squelette du nucléotide G1241, mais la

Figure 5-3: Structure du complexe entre la protéine S7 (en vert) et l'ARNr 16S extraite de la structure cristallographique de la sous-unité 30S (adapté de Brodersen *et al.*, 2002). Des bases de l'ARNr et des résidus d'acides aminés de S7 qui interviennent dans la liaison sont colorés en vert et en rouge, respectivement. Des boucles de S7 sont identifiées par un ℓ et les hélices par un H. Les lettres N et C correspondent aux extrémités N- et C-terminales de S7, respectivement. Les bases de l'ARNr et les acides aminés de S7 sont numérotés selon leur séquence chez *E. coli*. L'image du bas montre l'orientation de S7 par rapport à la sous-unité 30S.



mutation de ce résidu chez *E. coli* n'affecte pas la liaison de S7 à l'ARNr 16S. Ce contact correspond probablement à des interactions additionnelles qui se produiraient entre S7 et l'ARNr 16S de la bactérie *T. thermophilus*, où une stabilité accrue est requise pour l'interaction de la protéine avec l'ARNr, vu la haute température du milieu dans lequel cette bactérie croît (Brodersen *et al.*, 2002).

Il est intéressant de noter que deux contacts entre S7 et l'ARNr 16S ont été observés dans la structure cristalline de la sous-unité 30S qui n'avaient pas été détectés précédemment par la technique des empreintes (Powers et Noller, 1995). Il s'agit d'un contact entre l'extrémité du feuillet β de S7 avec un nucléotide dans la boucle coiffant l'hélice 23b du domaine central, sur la plate-forme, et un contact entre l'extrémité N-terminale de S7 avec un nucléotide dans la boucle coiffant l'hélice 37 dans le domaine 3' majeur, à proximité du cou de la 30S. Cependant, ces contacts n'influencent pas la liaison de la protéine de manière significative, car S7 possède la même affinité pour le fragment de l'ARNr 16S, qui ne possède pas les hélices 23b et 37, que pour l'ARNr 16S complet (Dragon et Brakier-Gingras, 1993).

Nos résultats indiquent aussi que des mutations dans la boucle 3 et dans la portion terminale de l'hélice 6 de S7 affectent significativement la liaison de la protéine à l'ARNr 16S. Ces régions n'interagissent pas avec l'ARNr dans la structure cristalline de la 30S. Concernant la boucle 3, elle est située du côté opposé à la surface d'interaction à l'ARNr de S7. Il est possible que la mutation de cette région affecte subtilement l'orientation des hélices 2 et 3 qu'elle relie, ce qui pourrait perturber l'interaction de S7 avec l'ARNr. Une autre possibilité serait que cette boucle de S7 puisse faire un contact transitoire avec l'ARNr 16S. Le fait qu'un résidu de la boucle 3 de S7 ait été ponté à l'ARNr 16S dans les sous-unités 30S appuie cette hypothèse (Ehresmann *et al.*, 1976). De son côté, l'hélice 6 contacte le feuillet β de S7. La délétion de cette hélice ou des mutations dans cette région pourraient perturber l'orientation du feuillet β de S7 et empêcher sa contribution à la liaison de S7 à l'ARNr 16S. L'hélice 6 de S7 interagit aussi avec l'ARNt au site E du ribosome (Yusupov *et al.*, 2001), et la

conservation de plusieurs résidus dans cette hélice pourrait refléter l'importance de cette interaction.

Pendant que nous complétons notre étude sur la liaison de S7 à l'ARNr 16S, une étude du groupe de Noller a été publiée, qui décrivait les effets de mutations dans S7 sur l'incorporation de la protéine dans les sous-unités 30S (Fredrick *et al.*, 2000). Les résultats de cette étude sont en accord avec notre travail sur la caractérisation des sites de S7 importants pour la liaison à l'ARN 16S. En effet, Fredrick *et al.* ont observé que la délétion de l'extrémité N-terminale ou des substitutions dans cette région de S7 affectent drastiquement l'incorporation de la protéine dans les sous-unités. Aussi, la substitution du résidu K35, dans la boucle 2, perturbe fortement l'incorporation de S7 dans les 30S. L'incorporation de S7 était peu affectée par la mutation du résidu K34, et nous avons observé que la substitution de ce résidu n'affectait guère la liaison de S7 à l'ARN 16S. Cependant, nos résultats ont aussi indiqué que la délétion du feuillet β perturbe fortement la liaison de S7 à l'ARNr, alors que Fredrick *et al.* ont observé que cette délétion n'empêche pas significativement l'incorporation de S7 dans les sous-unités 30S. Ceci indique probablement que la dynamique de l'assemblage des sous-unités influence l'incorporation de S7 et pourrait compenser pour le défaut causé par la délétion du feuillet β . Fredrick *et al.* avaient aussi observé que la surexpression de S7 sauvage induit un défaut de croissance bactérienne (voir section 1.5.).

Nos résultats, en accord avec les publications de Miyamoto *et al.* et de Fredrick *et al.*, ont montré l'importance de l'extrémité N-terminale de S7 dans la liaison de S7 à l'ARNr 16S. Ceci nous a conduit à proposer un rôle particulier pour cette région de la protéine. Cette extrémité, très flexible, est riche en résidus basiques (6 sur 20). Ceci est une caractéristique d'un motif d'interaction avec l'ARN connu, le motif ARM, dont les charges positives permettent d'interagir avec le squelette chargé négativement de l'ARN (revues par Burd et Dreyfuss, 1994; Varani, 1997) (voir aussi section 1.2.2.3.3). Étant donné la flexibilité de la région N-terminale de la protéine S7, nous avons proposé qu'elle permettrait à cette protéine d'agripper le squelette de l'ARNr, d'établir ainsi le contact initial avec l'ARN, et, en positionnant S7 correctement par rapport à l'ARNr, de

permettre aux contacts subséquents de s'effectuer. Un tel rôle expliquerait pourquoi, même si S7 a d'autres points d'ancrage avec l'ARNr 16S, la liaison est pratiquement abolie si la région N-terminale est délétée. Il a été montré par mutagenèse que l'extrémité N-terminale flexible d'autres protéines interagissant avec l'ARNr peut aussi jouer un rôle important dans la liaison de ces protéines à l'ARN. C'est le cas, par exemple, des protéines ribosomiques L1 de *T. thermophilus* (Eliseikina *et al.*, 1996) ou S4 de *B. stearothermophilus* (Sayer *et al.*, 2000 et les références citées) ainsi que de protéines non-ribosomiques comme le facteur d'antiterminaison NusB de *E. coli* (Huenges *et al.*, 1998) ou la protéine N du bactériophage λ (Legault *et al.*, 1998). De plus, si l'on considère le grand nombre de protéines ribosomiques qui possèdent de longues extensions chargées positivement, il est possible que le rôle proposé pour l'extrémité N-terminale de S7 dans sa liaison à l'ARNr puisse s'appliquer à plusieurs protéines ribosomiques.

La comparaison des empreintes de S7 sur l'ARN 16S avec les contacts réels qui sont observés dans la structure cristalline de la sous-unité 30S explique le rôle que joue S7 dans la nucléation de ce domaine de l'ARNr 16S. En effet, la liaison de S7 protège des attaques chimiques certaines régions de l'ARNr 16S avec lesquelles elle n'a pas de contacts. Parmi ces régions, on trouve l'hélice 30, la première boucle de l'hélice 41, l'hélice 42, la portion supérieure de l'hélice 43 et la boucle coiffant cette hélice (comparer les Figures 5-1A et 5-1B). Comme mentionné plus haut, ces hélices interagissent entre elles dans la structure cristalline de la sous-unité 30S, indiquant que la liaison de S7 stabilise le repliement compact de cette portion du domaine 3' majeur. Il est très probable que cette stabilisation se fait via la neutralisation des charges négatives exposées de l'ARNr aux jonctions des hélices. De plus, certains résidus de ces mêmes hélices sont impliqués dans des interactions avec d'autres protéines ribosomiques dont la liaison dépend de celle de S7 lors de l'assemblage de la sous-unité (revue par Brodersen *et al.*, 2002). C'est le cas de la base de l'hélice 30 qui contacte les protéines S9 et S13, de la boucle inférieure de l'hélice 41 qui interagit avec la protéine S9, de l'hélice 42 où se lient les protéines S13, S14 et S19 et finalement de la boucle coiffant l'hélice 43, qui interagit avec la protéine S14. Ceci confirme les suggestions précédentes

indiquant, qu'en plus de stabiliser une conformation compacte de son site de liaison sur l'ARNr 16S, S7 promeut une conformation spécifique de l'ARNr qui est reconnue par les autres protéines ribosomiques de la tête de la sous-unité.

5.2 Les mêmes déterminants de la protéine ribosomique S7 d'*Escherichia coli* contrôlent la liaison de la protéine à l'ARNr 16S et à son ARN messenger

En plus d'interagir avec la portion inférieure du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S, S7 agit aussi comme répresseur traductionnel en contrôlant la traduction de son ARNm, l'ARNm polycistronique *str*, qui code, dans l'ordre, pour les protéines S12, S7, et les facteurs d'élongation EF-G et EF-Tu (Saito *et al.*, 1994). La protéine ribosomique S7 contrôle l'expression de cet opéron en se liant à la région intercistronique S12-S7 (RIC S12-S7). Une étude d'attaque par des agents chimiques et des enzymes par Saito et Nomura (1994) a suggéré que la région de l'ARNm qui lie S7 se replie en une longue tige-boucle irrégulière de près de 100 nucléotides qui débute au codon de terminaison de la séquence codant pour S12 et se termine au codon d'initiation du cistron de S7. Dans cette étude, Saito et Nomura (1994) avaient observé que S7 protège une soixantaine de résidus de la RIC S12-S7 localisés dans la partie apicale de la tige-boucle irrégulière (nucléotides -88 à -20, le premier nucléotide du codon d'initiation de S7 étant +1) et ils ont suggéré que cette région correspond au site de liaison de la protéine. Par contre, une étude plus récente par Spiridinova *et al.* (1999) a montré que S7 a une faible affinité pour un fragment de la RIC S12-S7 contenant les nucléotides -88 à -20, suggérant que d'autres régions de la RIC S12-S7 sont requises pour la liaison de S7. De plus, Spiridinova *et al.* ont analysé toutes les structures possibles de la RIC S12-S7 à l'aide d'un programme informatique de repliement d'ARN et ont proposé que la RIC S12-S7 pourrait aussi adopter une structure en pseudo-nœud. Que ce soit la structure proposée par Saito et Nomura (1994) ou celle proposée par Spiridinova *et al.* (1999) qui se forme, les structures secondaires proposées pour cette région de l'ARNm sont apparemment très différentes de celle qui est reconnue par S7 sur l'ARNr 16S (Figure 3-1).

Nous avons étudié la liaison de S7 à son ARNm en examinant l'effet des mutations dans la protéine sur cette interaction. Les mutations que nous avons utilisées sont celles qui ont été employées précédemment dans l'étude de la liaison de S7 à l'ARNr 16S. Nous avons cloné la région intercistronique S12-S7 de l'ARNm *str* dans un plasmide permettant la transcription *in vitro* de cette région. Nous avons ensuite étudié la liaison des différents mutants de S7 à ce fragment de l'ARNm par filtration sur membranes de nitrocellulose dans un tampon de force ionique élevée. Nos résultats indiquent que l'affinité de S7 sauvage pour son ARNm est d'environ $6.8 \pm 0.9 \mu\text{M}^{-1}$, qui est très proche de celle de la protéine pour l'ARNr 16S dans les mêmes conditions de force ionique ($5.3 \pm 0.5 \mu\text{M}^{-1}$). Cette situation diffère de celle rencontrée avec les protéines S15 et S8 d'*E. coli* qui possèdent une affinité pour l'ARNr 16S supérieure à celle qu'elles ont pour leur ARNm. Par contre, S4, une autre protéine qui agit comme répresseur traductionnel de son propre ARNm, a aussi la même affinité pour les deux cibles (voir section 1.5). Afin d'expliquer comment S4 se lie à son ARNm seulement lorsqu'il n'y a plus d'ARNr 16S disponible, Deckman et Draper (1985) ont suggéré que la coopérativité de l'assemblage des sous-unités permet l'incorporation préférentielle des protéines ribosomiques dans les sous-unités, par rapport à leur association avec leur ARNm. Nos résultats avec S7 appuient cette suggestion.

Contrairement à la situation observée avec d'autres protéines ribosomiques répresseurs comme S8 et L1 (revue par Zimmermann *et al.*, 2000), la structure secondaire des sites de liaison de S7 sur l'ARNr 16S et l'ARNm, semble très différente, comme indiqué plus haut (Figure 3-1). Cette observation nous amène à supposer que la protéine reconnaît deux structures d'ARN distinctes. Les résultats obtenus dans l'étude de la liaison des mutants de S7 au fragment de l'ARNm *str* n'appuient cependant pas cette suggestion. En effet, nous avons observé que les mutations de S7 affectent de manière semblable la liaison de la protéine à son ARNm et à l'ARNr 16S, c'est-à-dire que les mêmes mutations réduisent l'affinité de S7 pour les deux cibles (Tableau 3-1). La protéine utilise donc les mêmes déterminants pour interagir avec les deux ARN, suggérant que les deux sites de liaison de S7 présenteraient des similitudes dans leur

structure tridimensionnelle qui seraient reconnues par S7. Après un examen visuel de la structure proposée par Saito et Nomura (1994), nous avons identifié deux régions à simple brin dont la séquence est identique à celle de régions non appariées dans le site de liaison de S7 dans l'ARNr 16S (sections encadrées dans la Figure 3-1), qui correspondent au premier et au deuxième site de contact entre S7 et l'ARNr dans la structure cristalline de la sous-unité 30S (Figure 5-1A). Ceci suggère que ces régions de l'ARNm sont reconnues par S7. À partir de la structure secondaire du site de liaison de S7 proposée par Saito et Nomura (1994), il a été possible, en collaboration avec le Dr S. Steinberg de notre département, de modéliser la structure de la RIC S12-S7 de sorte que les régions d'interaction proposées avec S7 soient orientées comme les régions correspondantes dans l'ARNr 16S dans la structure cristalline de la sous-unité 30S (résultats non-publiés). Il serait intéressant aussi de vérifier expérimentalement ce modèle. Il est intéressant de remarquer que la protéine S7 de *T. thermophilus* interagit avec la RIC S12-S7 de l'ARNm *str* d'*E. coli* avec la même affinité que pour l'ARNr 16S d'*E. coli* même si, chez cet organisme, l'ARNm *str* ne possède pas de site de liaison de S7 dans la RIC S12-S7 (Spiridinova *et al.*, 1999). Ceci appuie l'hypothèse que S7 reconnaît des éléments dont la structure tridimensionnelle est semblable sur l'ARNr 16S et sur son ARNm.

La surexpression de la protéine S7 dans les bactéries cause un défaut de croissance qui peut être relié à la liaison de S7 à son ARNm. Ce défaut de croissance est probablement causé par l'inhibition de l'expression de la protéine S12 et du facteur EF-G, qui a été mis en évidence expérimentalement (Saito *et al.*, 1994). Rappelons qu'il y a deux gènes codants pour le facteur EF-Tu dans le génome de la bactérie *E. coli* (Jaskunas *et al.*, 1975), ce qui explique pourquoi l'expression de ce facteur n'est pas affectée par la surexpression de S7. Nous avons surexprimé dans *E. coli* les différents mutants de S7 avec l'hypothèse que pour les mutants de S7 à faible affinité pour leur ARNm, il y aurait peu ou pas de ralentissement de croissance bactérienne. Nos résultats sont en parfait accord avec cette hypothèse, car nous avons observé une corrélation directe entre la capacité des protéines mutantes à interagir avec l'ARNm et leur effet sur la croissance lorsqu'elles sont surexprimées (Tableau 3-2). Cependant, cette corrélation

n'est pas observée lors de la surexpression chez *E. coli* de la protéine mutée S7 Δ 148-178, où la région C-terminale est éliminée. En effet, la surexpression de cette protéine provoque un ralentissement de la croissance bactérienne plus sévère que celui causé par S7 sauvage, alors que S7 Δ 148-178 a une affinité très semblable à celle de la protéine sauvage pour les deux cibles d'ARN. Cette similitude dans l'affinité suggère que, lorsque S7 Δ 148-178 est surexprimée, elle est bien incorporée dans les sous-unités 30S (ce que nous avons confirmé par la suite) et elle réprime efficacement la traduction de son ARNm. Pour expliquer l'effet de cette mutation sur la croissance bactérienne, nous proposons qu'en plus d'inhiber la production d'EF-G et de S12, la surexpression de cette protéine mutée conduit à la formation de ribosomes dont le fonctionnement est perturbé (voir section 5-3). Un tel effet sur la croissance n'a pas été observé avec le mutant S7 Δ 136-178 où une plus grande portion C-terminale est éliminée. Cependant, l'affinité de cette protéine mutée pour l'ARNr 16S est inférieure à celle de la protéine sauvage, suggérant qu'elle pourrait ne pas être incorporée aussi bien dans les sous-unités 30S que le mutant S7 Δ 148-178 et qu'elle réprimerait moins efficacement la traduction de son ARNm. Les travaux effectués par Fredrick *et al.* (2000) dont nous avons parlé plus haut (section 5-2) avaient montré une corrélation entre la capacité de divers mutants de S7 à interférer avec la croissance cellulaire lorsqu'ils sont surexprimés et leur incorporation dans les sous-unités 30S, qui dépendent, respectivement, de leur liaison à l'ARNm de S7 et de leur liaison à l'ARNr 16S. Fredrick *et al.* avaient alors proposé que S7 pourrait reconnaître des éléments structuraux semblables sur les deux cibles. Notre étude démontre directement la validité de cette supposition. À la lumière des informations concernant la liaison de différentes protéines ribosomiques à leur ARNm présentées à la section 1-5 et de nos résultats, il semble donc, que, d'une manière générale, les protéines ribosomiques répresseurs utilisent les mêmes déterminants pour interagir avec l'ARNr et leur ARNm et que, même si les structures secondaires des cibles apparaissent différentes, ces protéines reconnaissent des éléments structuraux communs aux deux cibles.

5.3 Rôle de l'interaction entre les protéines ribosomiques S7 et S11 dans le fonctionnement du ribosome bactérien

La structure cristalline de la sous-unité 30S a révélé que des résidus dans la séquence 148-155 à l'extrémité COOH-terminale de S7 dans la tête de la sous-unité interagissent avec les résidus 55, 58, 59, 60 et 63 localisés dans la boucle qui précède la première hélice de la protéine S11, dans la plate-forme de la sous-unité (Figure 4-1). Cette interaction constitue donc un contact entre deux régions distinctes de la 30S. Plusieurs indices nous avaient conduit à supposer que l'interaction entre S7 et S11 est importante pour le fonctionnement du ribosome. Tout d'abord, lorsque le mutant S7 Δ 148-178 est surexprimé chez la bactérie, cela cause un défaut de croissance supérieur à celui induit par la surexpression de la protéine sauvage (section 5-2). La délétion dans S7 Δ 148-178 englobe la région 148-155 de S7 et nous avons proposé que l'incorporation de cette protéine mutante dans les 30S perturbe le fonctionnement du ribosome. Aussi, les résidus de S7 et de S11 impliqués dans l'interaction entre les deux protéines sont très conservés chez les procaryotes (Figure 4-2). De plus, les techniques de cryo-ME et de cristallographie aux rayons X ont montré que la tête de la sous-unité 30S se déplace par rapport à la plate-forme durant le déroulement de la synthèse protéique (voir les sections 1.4.1, 1.4.2.1 et 1.4.2.3). Ce mouvement suggère que l'interaction S7-S11 doit pouvoir se briser et se reformer au cours de la synthèse protéique. Afin de vérifier l'implication de l'interaction S7-S11 dans la traduction, nous avons décidé d'étudier les conséquences de la rupture de cette interaction. Nous avons cloné le gène de la protéine S11 d'*E. coli* dans un vecteur d'expression de la famille pET et avons utilisé ce plasmide, et celui exprimant S7, pour muter les résidus de S7 et de S11 impliqués dans l'interaction entre les protéines. Les résidus 148 à 155 de S7 ainsi que les résidus 55, 58, 59, 60 et 63 de S11 ont été substitués par des résidus de glycine et d'alanine. Nous avons surexprimé les mutants chez *E. coli* puis nous avons vérifié que les mutations étudiées n'empêchaient pas l'incorporation des protéines dans les 30S.

Ensuite, nous avons examiné les effets des mutations dans plusieurs étapes de la synthèse protéique. Nous avons observé que lorsque les résidus de S7 et S11 impliqués dans l'interaction entre les deux protéines sont mutés afin d'empêcher cette interaction, les 30S ont une capacité accrue à lier les ARNm et les ribosomes font plus d'erreurs de lecture lors de la traduction. De plus, les 30S contenant la protéine S7 mutée s'associent moins efficacement avec les sous-unités 50S, mais cet effet n'est cependant pas observé avec les 30S qui contiennent la protéine S11 mutée.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'interaction S7-S11 est importante pour le fonctionnement du ribosome durant la traduction. Les effets des mutations combinées aux connaissances que nous avons du fonctionnement du ribosome nous permettent d'expliquer de quelle manière l'interaction S7-S11 intervient dans la synthèse protéique. La traduction débute avec la liaison de l'ARNm à la 30S. La structure du ribosome 70S complexé aux ARNt et à l'ARNm montre que ce dernier se lie autour du cou de la sous-unité 30S et traverse deux tunnels étroits, les tunnels d'entrée en 3' et de sortie en 5' (Yusupov *et al.*, 2001; section 1.4.1). Étant donné que les ribosomes peuvent traduire des ARNm circulaires (Bretscher, 1968), nous pouvons prédire que les deux tunnels de la 30S, s'ils sont déjà formés dans la sous-unité, doivent s'ouvrir pour permettre la liaison de l'ARNm et son positionnement correct autour de son cou de la sous-unité. De chaque côté de la 30S, les tunnels d'entrée et de sortie sont fermés par des contacts non covalents entre la tête et la plate-forme et entre la tête et le corps, respectivement. Du côté du site A, le tunnel d'entrée est fermé par des contacts entre les hélices 33 et 34 dans le bec de la 30S avec les hélice 16 et 18 du corps, alors que du côté du site E, le tunnel de sortie est fermé par l'interaction entre les protéines S7 et S11 (Schlünzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000). Nous avons observé que les sous-unités 30S où l'interaction S7-S11 est brisée ont une capacité accrue pour lier les ARNm par comparaison avec les sous-unités sauvages, comme l'ont montré des expériences de « toeprint » avec des complexes d'initiation 30S ou de filtration sur membranes de nitrocellulose avec des complexes mRNA-30S (Figure 5-6 et 5-7). Ces résultats suggèrent que la rupture de l'interaction entre S7 et S11 favoriserait l'ouverture du tunnel de sortie des ARNm sur la 30S, ce qui permet à la sous-unité d'interagir plus

aisément avec les ARNm. De plus, il pourrait y avoir une communication entre les deux tunnels de sorte que l'ouverture du tunnel de sortie favoriserait l'ouverture de l'autre tunnel, ce qui faciliterait la liaison de l'ARNm. Une autre possibilité suggérée par des images de cryo-ME serait que le tunnel d'entrée se forme après l'association de la 50S, quand l'ARNm est déjà lié et que seul le tunnel de sortie existe dans la 30S isolée, en solution. Il est aussi possible que l'ouverture du tunnel de sortie favorise le positionnement autour du cou de la 30S d'un ARNm qui est déjà lié à la sous-unité. En effet, dans les 30S sauvages, la séquence anti-Shine-Dalgarno de l'ARNr 16S qui est reconnue par l'ARNm est localisée dans la partie supérieure de la plate-forme et est donc exposée au solvant. Ceci lui permettrait d'interagir directement avec un ARNm, indépendamment de l'ouverture ou de la fermeture des tunnels. L'ouverture du tunnel de sortie avec les 30S mutées dans S7 ou S11 favoriserait le placement de l'ARNm autour du cou de la 30S et réduirait alors la probabilité de dissociation de l'ARNm. Selon notre modèle, le tunnel de sortie de la 30S doit donc s'ouvrir pour permettre aux ARNm de se lier correctement et il doit y avoir un mécanisme cellulaire qui contrôle cette ouverture lors de l'initiation de la traduction *in vivo*. Le facteur d'initiation IF3 est un bon candidat pour ce contrôle. Ce facteur se lie sur la plate-forme de la 30S à proximité des protéines S7 et S11 et du tunnel de sortie (McCutcheon *et al.*, 1999; Dallas et Noller, 2001 et les références citées). De plus, des études de cryo-ME ont montré que lorsque IF3 se lie à la 30S, la tête et la plate-forme se déplacent l'une par rapport à l'autre (McCutcheon *et al.*, 1999), ce qui pourrait correspondre à l'ouverture du tunnel de sortie de l'ARNm. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que, tout comme les mutations de S7 et S11 que nous avons étudiées, l'addition de IF3 aux 30S facilite la liaison des ARNm (Gualerzi *et al.*, 1977; Broude *et al.*, 1983, revue par Gualerzi *et al.*, 2001).

Puisque les mutations de S7 et S11 facilitent la liaison des ARNm par les 30S, nous aurions pu supposer qu'il y aurait une augmentation de la proportion des 30S contenant ces protéines mutantes dans les polysomes par rapport à la situation observée quand nous exprimons les protéines sauvages. L'expérience révèle cependant que ce n'est pas le cas. Concernant S7, les mutations qui rompent la liaison avec S11 causent toutefois un défaut d'association des 30S aux 50S (comme discuté plus bas) et ce défaut

pourrait contrecarrer une incorporation préférentielle des 30S mutantes dans les polysomes. Cependant, cette explication n'est pas valable pour les 30S contenant S11 mutée qui n'ont pas ce défaut d'association et qui ne se retrouvent pourtant pas en plus grande proportion dans les polysomes. Il se pourrait que *in vivo*, la présence d'IF3 en contrôlant l'ouverture du tunnel de sortie de l'ARNm minimise les différences de liaison de l'ARNm aux 30S sauvages et mutantes.

Lors de l'initiation de la synthèse protéique, suite au placement de l'ARNm autour du cou de la 30S et de l'ARNt initiateur au site P, la sous-unité 50S se joint à la 30S et cause l'éjection des facteurs d'initiation. La mutation des résidus 148-155 de S7 dans les 30S perturbe l'association de la 50S à la 30S, comme l'ont révélé les profils des populations des ribosomes extraits des bactéries suite à la surexpression du mutant de S7 (Figure 3-4), les essais d'association *in vitro* (Figure 3-5) et aussi la diminution de la proportion de 30S contenant la protéine S7 mutante dans les 70S et les polysomes (Figure 3-2). Étant donné que cet effet n'est pas observé avec les mutations correspondantes dans S11, nous en déduisons qu'il ne résulte pas de la rupture de l'interaction S7-S11. Pour expliquer nos résultats, nous proposons que les mutations dans S7, en plus de briser l'interaction S7-S11, affectent localement la conformation de la tête de la 30S et que cette perturbation empêcherait la formation de certains ponts entre les sous-unités. Nous pouvons toutefois proposer une autre explication. Il est possible que la région 148-155 de S7 interagisse alternativement avec deux partenaires, S11 et une autre région de la 30S: lorsque S7 interagit avec S11 le tunnel de sortie des ARNm serait fermé et lorsqu'elle interagit avec l'autre partenaire, le tunnel serait ouvert. Un candidat possible pour cette deuxième interaction serait l'extrémité 3' de l'ARN 16S avec qui S7 a été pontée (Greuer *et al.*, 1987). Cette interaction hypothétique pourrait faire partie des changements conformationnels qui se produisent dans la 30S lors de l'association de la 50S. En perturbant ces changements de conformation, la mutation dans S7 pourrait donc influencer la capacité des 30S à s'associer aux 50S. La Figure 4-2 montre que tous les résidus de la séquence 148-155 de S7 sont extrêmement conservés chez toutes les bactéries. Cependant, les deux derniers résidus de cette séquence, l'arginine 154 et la tryptophane 155, sont relativement éloignés de S11 dans

la structure cristalline de la sous-unité 30S, indiquant qu'ils ne participent pas à l'interaction entre les deux protéines (Figure 4-1). Ces résidus pourraient cependant être impliqués dans l'interaction de S7 avec le second partenaire.

La première étape de l'élongation de la traduction consiste en la sélection de l'ARNt au site A par les ribosomes. Nos résultats montrent que les ribosomes qui contiennent S7 ou S11 mutée sont moins précis lors du décodage des ARNm: la rupture de l'interaction S7-S11 cause une augmentation des erreurs dans la sélection des ARNt, dans la reconnaissance des codons stop et du niveau de changement du cadre de lecture aléatoire (« frameshift »). L'augmentation du taux d'erreurs dans la sélection des ARNt, que ce soit dans l'incorporation d'ARNt ou dans la lecture du codon stop, peut être expliquée par l'accroissement de la flexibilité de la tête de la petite sous-unité. Nous avons vu que lorsque le centre de décodage de la 30S reconnaît qu'il y a une interaction codon-anticodon correcte au site A, une adaptation induite se produit dans la sous-unité qui résulte en un mouvement de la tête et de l'épaule vers le site A, et qui se traduit par le passage d'une conformation dite ouverte vers une conformation dite fermée (voir section 1.4.2.1). Ce changement induit d'ailleurs la séparation de l'épaule de la 30S et du corps impliquant la rupture d'une interaction entre S4 et S5 (Ogle *et al.*, 2002). L'interaction S7-S11 pourrait contribuer à maintenir la tête dans une position déterminée par rapport au corps et l'augmentation de la flexibilité de la tête par la rupture de cette interaction pourrait faciliter les mouvements de la tête et le passage de la forme ouverte à la forme fermée, favorisant ainsi l'acceptation des ARNt au site A. Cet effet serait semblable à celui produit par les mutations *ram* dans les protéines S4 et S5 qui favorisent la conformation fermée des 30S et diminuent la fidélité de lecture des ARNm par les ribosomes (section 1.4.2.1). Il est également possible que l'accroissement des erreurs d'incorporation des acides aminés durant la traduction par les mutations dans S7 ou S11 soit causé par une perturbation du couplage réciproque entre les sites A et E (revue par Nierhaus, 1990; Márquez *et al.*, 2002) (voir section 1.4.1). En bref, selon ce modèle, la présence d'un ARNt désaminoacylé au site E perturbe la conformation du site A et diminue l'affinité des ARNt à ce site de sorte que seul un ARNt correct peut se lier et induire l'éjection de l'ARNt au site E. Notons que ce modèle ne tient pas compte

du contrôle de la sélection des ARNt par l'étape du « proofreading » expliquée dans la section 1.4.2.1. La structure du ribosome 70S complexé aux ARNt et à l'ARNm montre que la protéine S7 participe à l'interaction de la 30S avec l'ARNt au site E via des contacts entre son feuillet β et son hélice 6 et la boucle de l'anticodon de l'ARNt. Le positionnement de S7 par rapport au chemin de sortie de l'ARNt indique que S7 doit se déplacer pour permettre l'éjection de cet ARNt. Il est possible que la destruction de l'interaction entre S7 et S11 perturbe la conformation du site E de la 30S, ce qui affecterait le couplage entre les sites A et E et réduirait la capacité de sélection des ARNt par la 30S. Il est généralement admis que lorsqu'un ARNt est accommodé au site A du ribosome, l'ARNt qui occupe le site E est éjecté. Le mécanisme par lequel se fait cette éjection n'est pas encore défini avec précision, mais il requiert des mouvements de S7 et L1 qui sont positionnés en travers du chemin de sortie des ARNt (Yusupov *et al.*, 2001). Il est probable que ce mouvement de S7 implique la destruction de son interaction avec S11. Il est donc aussi possible que les mutations dans S7 ou S11 qui rompent l'interaction S7-S11, causent une plus grande flexibilité dans la région de sortie des ARNt, ce qui causerait leur éjection prématurée. Ceci faciliterait alors l'incorporation de l'ARNt au site A, et augmenterait les erreurs de lecture. L'accroissement du taux de « frameshift » lorsque l'interaction S7-S11 est rompue peut être expliqué par l'augmentation du taux d'erreurs de sélection des ARNt au site A. En effet, selon l'hypothèse des erreurs doubles, la sélection erronée d'un ARNt (première erreur) pourrait être suivie d'un changement de cadre de lecture (deuxième erreur), si ce mouvement rétablit un appariement parfait entre l'anticodon de l'ARNt incorrect et le codon de l'ARNm (Farabaugh et Björk, 1999; Stahl *et al.*, 2002). Ainsi, toute augmentation du taux d'erreur dans la sélection des ARNt, s'accompagne nécessairement d'une augmentation du taux de « frameshift ». Un autre mécanisme pourrait aussi contribuer à l'augmentation du « frameshift » avec les 30S mutées dans S7 ou S11. Dans la structure cristalline du ribosome 70S complexé à un ARNm et aux ARNt, l'ARNm fait plusieurs interactions avec l'ARNr ou avec des protéines ribosomiques (Yusupova *et al.*, 2001). L'interaction S7-S11 qui participe à la fermeture du tunnel de sortie en amont de l'ARNm permet fort probablement le maintien de

l'ARNm en place sur la 30S. En ouvrant le tunnel par les mutations de S7 et S11, l'ARNm sera moins bien maintenu en place par la 30S et il lui sera plus facile de glisser, changeant le cadre de lecture durant la traduction.

Après l'accommodation des ARNt au site A et la formation du lien peptidique, l'étape suivante de la synthèse protéique est la translocation qui déplace l'ARNm et les ARNt de trois bases en direction 3' par rapport au ribosome. Cette étape implique que le ribosome doit transitoirement relâcher sa prise sur l'ARNm pour lui permettre de glisser. Ce relâchement est probablement causé par la liaison du facteur d'élongation EF-G, dont la liaison au ribosome provoque l'ouverture des tunnels de sortie et d'entrée de la 30S (Frank et Agrawal, 2000). Nous proposons que, tout comme la liaison de IF3 à la 30S, la liaison de EF-G au ribosome rompt l'interaction entre S7 et S11.

Nous avons vu que la surexpression de S7 sauvage induit un défaut de croissance bactérienne provoqué par la répression de la traduction de son ARNm (section 5-2). La surexpression des mutants de S7 ou S11 où l'interaction S7-S11 est rompue ne cause pas un défaut de croissance plus sévère que celui provoqué par la surexpression des protéines sauvages et ce, malgré les problèmes observés dans le fonctionnement du ribosome. Il est probable que les effets des mutations dans S7 sur l'association des sous-unités et sur la fidélité de lecture sont masqués par le défaut de croissance causé par la surexpression de la protéine sauvage. Un défaut de croissance avait cependant été observé lors de la surexpression de la protéine mutante S7 Δ 148-178, dans laquelle l'extrémité C-terminale et une portion de l'hélice 6 de S7 sont éliminées. Nous pensons que cette délétion provoque des perturbations additionnelles à celles causées par la rupture de l'interaction S7-S11 dans la structure de la 30S, qui se répercutent sur la croissance bactérienne. La protéine S11 n'est pas une protéine ribosomique répresseur et donc n'influence pas la croissance bactérienne lorsqu'elle est surexprimée. La surexpression du mutant S11_{subs55-63} ne perturbe pas non plus la croissance bactérienne, mais augmente le taux d'erreur de traduction tout comme les mutations dans S7. Nos résultats indiquent donc que la diminution de fidélité de lecture des ribosomes ne se répercute pas sur la croissance des bactéries. Ceci avait aussi été

observé dans le cas des mutations *ram* des protéines S4 et S5 (Piepersburg *et al.*, 1979; Anderson *et al.*, 1982). Cependant, si nous ajoutons aux cultures bactériennes qui expriment les mutants de S7 ou S11 des quantités sublétales de streptomycine, un agent qui induit des erreurs de lecture, la croissance bactérienne ralentit, comparativement à l'ajout de mêmes quantités de streptomycine aux cultures bactériennes exprimant les protéines S7 ou S11 sauvages (résultats non-publiés). Ceci indique qu'au-delà d'un certain seuil, les erreurs de traduction peuvent influencer la croissance bactérienne.

Finalement, le ribosome termine la traduction lorsqu'il rencontre un codon stop sur l'ARNm. Lors de cette étape, la protéine nouvellement synthétisée, les ARNt et la sous-unité 50S sont dissociés du complexe de traduction (voir section 1.4.2). Dans la plupart des cas, la sous-unité 30S reste accrochée à l'ARNm et glisse alors jusqu'au codon d'initiation du cistron suivant où elle peut débiter la traduction. Ce glissement de la 30S le long du messenger doit nécessairement impliquer la rupture des interactions entre les deux qui maintiennent normalement l'ARNm en place pour éviter les changements du cadre de lecture lors de la traduction. Il a récemment été montré que la liaison du facteur IF3 à la 30S est requise pour que ce glissement soit possible (Karimi *et al.*, 1999). Ceci est donc en accord avec notre modèle qui propose que lorsque l'interaction S7-S11 est brisée, et dans des conditions physiologiques, ceci serait provoqué par la liaison de IF3, l'ARNm n'est plus maintenu par la 30S, ce qui permet à cette dernière de glisser le long de l'ARNm.

5.4 Conclusion et perspectives

Nos travaux ont permis de mettre en lumière différents rôles joués par la protéine ribosomique S7 dans la synthèse protéique. Notre première étude a montré que plusieurs régions de S7 sont requises pour organiser le repliement du domaine 3' majeur de l'ARNr 16S, comme l'avaient suggéré des travaux précédents. Dans l'ensemble, les mutations que nous avons créées dans S7 et qui exercent des effets marqués sur la liaison de S7 à l'ARN 16S correspondent à la rupture de contacts entre S7 et l'ARNr 16S identifiés dans la structure cristalline de la sous-unité 30S. Cette corrélation montre

que la structure du complexe statique S7-ARNr 16S analysée dans les cristaux correspond à l'interaction qui s'effectue en solution. L'équivalent de la protéine S7 d'*E. coli* chez les eucaryotes est la protéine S5 et le niveau de conservation des résidus impliqués dans l'interaction de S7 à l'ARNr 16S est très élevé chez les organismes eucaryotes. Ceci suggère que la protéine eucaryote peut se lier à l'ARNr 18S d'une manière similaire à celle de S7 pour l'ARNr 16S. Parmi les différences entre S7 procaryote et S5, on trouve l'extrémité N-terminale de la protéine et la région 148-155 qui interagit avec la protéine S11 chez les bactéries. Concernant l'extrémité N-terminale de S7, nous avons vu qu'elle joue un rôle crucial dans la liaison de la protéine bactérienne à l'ARN 16S et le fait que cette séquence ne soit pas conservée chez les eucaryotes indique que S5 ne requiert pas de contact initial entre son extrémité N-terminale et l'ARNr 18S pour se lier. Il serait intéressant d'examiner l'interaction de la protéine S5 eucaryote et de mutants de cette protéine avec l'ARNr 16S d'*E. coli*, pour vérifier si le mode d'interaction entre la protéine et l'ARNr est conservé. Une telle étude nous permettrait de déterminer comment la protéine eucaryote a remplacé la contribution de l'extrémité N-terminale de la protéine procaryote dans la liaison à l'ARNr 16S. Finalement, il serait possible de mettre à profit les différences dans la liaison de la S7 bactérienne et de son équivalent eucaryote à l'ARNr, notamment dans l'implication de l'extrémité N-terminale, afin de sélectionner des substances qui interféreraient avec la liaison de S7 à l'ARNr 16S, sans affecter celle de la protéine S5 à l'ARNr 18S. Les agents qui bloqueraient l'assemblage de la sous-unité 30S bactérienne pourraient évidemment avoir une utilisation clinique, et l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques employés actuellement souligne l'importance potentielle de tels agents.

Notre deuxième étude a montré que la protéine S7 se lie avec la même affinité à l'ARNr 16S et à son ARNm et qu'elle utilise les mêmes déterminants pour interagir avec les deux cibles. Ceci implique que, dans la bactérie, l'ARNm *str* pourrait compétitionner avec l'ARNr 16S pour la liaison de S7, et selon l'hypothèse proposée par Deckman et Draper (1985) pour S4, à savoir que la coopérativité de l'assemblage des sous-unités favorise la liaison des protéines ribosomiques à l'ARNr 16S, la liaison

de S7 à l'ARN 16S serait favorisée. De plus, nos résultats suggèrent que S7 reconnaît des éléments similaires dans les structures tridimensionnelles de l'ARNr 16S et de son ARNm. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la répression de la traduction des ARNm par des protéines ribosomiques. Cette répression se ferait soit par une compétition entre la liaison de la protéine et la sous-unité 30S pour le site d'initiation de la traduction sur l'ARNm soit par un mécanisme de piégeage de la 30S sur l'ARNm, où la liaison de la protéine répresseur à l'ARNm induirait un changement de structure de cet ARNm, qui bloquerait la 30S, mais ne permettrait pas à la traduction de se poursuivre (voir section 1.5.). Concernant S7, Saito *et al.* (1994) ont montré que la liaison de la protéine à son ARNm empêche le couplage traductionnel, c'est-à-dire, que dans ce cas, les 30S provenant des ribosomes ayant traduit le cistron de S12 ne peuvent pas réinitier la traduction du cistron de S7. Cependant, cette liaison n'empêche pas des sous-unités 30S provenant du milieu intracellulaire d'initier la traduction directement au cistron de S7, permettant l'expression d'un niveau basal de la protéine. Ceci indique que la répression de l'expression de l'ARNm *str* par S7 ne résulte pas d'une compétition avec les sous-unités 30S pour se lier au site d'initiation de la traduction de la région codant pour S7 et suggère qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme de piégeage des sous-unités 30S provenant de la traduction du cistron précédent. Comme décrit plus haut dans la section 5.2, des structures secondaires différentes ont été proposées pour le site de liaison de S7 sur son ARNm et il serait intéressant d'examiner en détail la conformation qu'adopte la RIC S12-S7 en présence et en absence de S7 par mutagenèse dirigée et par des attaques chimiques et enzymatiques plus approfondies que celles qui ont déjà été effectuées. Ces études nous permettraient de déterminer si S7 favorise, elle aussi, la formation d'une conformation particulière de l'ARNm comme c'est le cas pour la protéine S4 d'*E. coli* (Schlax *et al.*, 2001).

Enfin, nous avons montré que l'interaction entre S7 dans la tête de la 30S et S11 dans la plate-forme de la 30S est importante pour la dynamique du ribosome dans la synthèse protéique. Des études indépendantes ont permis de conclure que d'autres protéines ribosomiques peuvent aussi influencer cette dynamique. En effet, S4 et S5 contrôlent des mouvements entre le corps et l'épaule de la 30S, l'un par rapport à l'autre

durant la sélection de l'ARNt au site A, comme expliqué plus haut. Aussi, S13 et L5 sont impliquées dans les mouvements de la tête de la 30S par rapport à la 50S lors de la translocation via la formation et la rupture d'un pont entre les sous-unités. Nos études suggèrent que l'interaction S7-S11 intervient dans le contrôle des mouvements de la tête de la sous-unité 30S par rapport à la plate-forme durant plusieurs étapes de la traduction. L'interaction entre les deux protéines contribuerait à maintenir l'ARNm en place suite à la fermeture du tunnel de sortie de cet ARNm et à bloquer l'ARNt au site E, en limitant la flexibilité de la protéine S7. À l'inverse, lorsque l'interaction est rompue, l'ARNm se lierait plus aisément à la 30S, l'ARNm pourrait glisser relativement au ribosome durant la translocation et l'éjection de l'ARNt au site E serait favorisée lors de l'accommodation d'un nouvel ARNt au site A. Il serait donc intéressant d'examiner si les mutations dans les protéines S7 et S11 qui brisent l'interaction entre les deux protéines modifient les patrons de pontage entre l'ARNm et la 30S. Si c'est le cas, cela démontrerait que la rupture de l'interaction S7-S11 augmente la liberté de mouvements de l'ARNm sur la sous-unité. Nous pourrions aussi examiner si la rupture de l'interaction S7-S11 induit des changements dans la conformation de la 30S du côté du site A, en accord avec la suggestion d'un couplage entre les sites A et E. Pour ce faire, nous pourrions soumettre la 30S à l'action d'agents pontants et comparer la situation où l'interaction S7-S11 peut se former à celle où elle est brisée. Finalement, nous pourrions examiner si les mutations dans S7 et S11 perturbent la liaison des ARNt au site E et facilitent son éjection du ribosome. De telles études consistant à examiner la liaison d'ARNt arrivé au site E peuvent être faites par pontage (Kirillov *et al.*, 2000) ou par empreintes chimiques (Moazed et Noller, 1989), encore une fois en comparant la situation où l'interaction S7-S11 peut se former à celle où l'interaction est rompue.

La comparaison des séquences de la protéine S7 dans divers organismes indique que la région 148-155 impliquée dans l'interaction avec S11 n'est pas conservée chez les archaebactéries et les eucaryotes, comme nous l'avons dit plus haut. Ceci contraste avec la protéine S11, dont les résidus qui interagissent avec S7 sont conservés. L'absence de conservation pour la séquence 148-155 de S7 suggère néanmoins que l'interaction S7-S11 ne serait pas présente chez les eucaryotes. Cependant, la structure

du ribosome 70S de la levure *Saccharomyces cerevisiae* déterminée par cryo-ME à une résolution de 15 Å indique qu'un contact entre les protéines S7 et S11 (S5 et S14 chez ces organismes) est maintenu chez les eucaryotes (Spahn *et al.*, 2001). Ceci suggère que ces organismes utilisent une autre interaction entre les équivalents de S7 et S11 dans le ribosome et qu'elle pourrait aussi être importante fonctionnellement chez les eucaryotes. Il serait intéressant à plus long terme de caractériser cette interaction.

À partir de l'analyse de nos résultats et des résultats présentés dans l'Introduction de cette thèse, il est évident, qu'en plus d'avoir un rôle essentiel dans la stabilisation de la conformation de l'ARN, les protéines ribosomiques contribuent au fonctionnement du ribosome en contrôlant sa dynamique. Nous pouvons conclure qu'elles participent à l'optimisation de son fonctionnement. En terme de catalyse du lien peptidique, le ribosome est un ribozyme, mais si l'on considère l'ensemble des étapes de la synthèse protéique, il est cependant essentiel de réviser l'affirmation que les protéines sont accessoires pour la traduction des ARNm par les ribosomes.

Bibliographie

- Aagard, C. et Douthwaite, S. (1994) Requirement for a conserved, tertiary interaction in the core of 23S ribosomal RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **91**, 2989-2993.
- Adamski, F.M., Atkins, J.F. et Gesteland, R.F. (1996) Ribosomal protein L9 interactions with 23 S rRNA: the use of a translational bypass assay to study the effect of amino acid substitutions. *J. Mol. Biol.*, **261**, 357-371.
- Aevarsson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., al-Karadaghi, S., Svensson, L.A., et Liljas, A.(1994) Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus Thermophilus*. *EMBO J.*, **13**, 3669-3677.
- Agalarov, S.C. et Williamson, J.R. (2000) A hierarchy of RNA subdomains in assembly of the central domain of the 30 S ribosomal subunit. *RNA*, **6**, 402-408.
- Agalarov, S.C., Sridhar Prasad, G., Funke, P.M., Stout, C.D. et Williamson, J.R. (2000) Structure of the S15, S6, S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain. *Science*, **288**, 107-113.
- Agalarov, S.C., Zheleznyakova, E., Selivanova, O.M., Zheleznayan L.A., Matvienko, N.I., Vasiliev, V.D. et Spirin, A.S. (1998) *In vitro* assembly of a ribonucleoprotein particle corresponding to the platform domain of the 30S ribosomal subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **95**, 999-1003.
- Agalarov, S.C., Selivanova, O.M., Zheleznyakova, E.N., Zheleznayan L.A., Matvienko, N.I., Vasiliev, V.D. et Spirin, A.S. (1999) Independent in vitro assembly of all three major morphological parts of the 30S ribosomal subunit of *Thermus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 533-537.
- Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A. et Frank, J. (1998) Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **95**, 6134-6138.
- Agrawal, R.K., Heagle, A.B., Penczek, P., Grassucci, R.A., Frank, J. (1999) EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 643-647.

- Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., Li, Y., Leith, A., Nierhaus, K.H. et Frank, J. (1996) Direct visualisation of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the *Escherichia coli* ribosome. *Science*, **271**, 1000-1002.
- Al-Karadaghi, S., Davydova, N., Elieseikina, I., Garber, M., Liljas, A., Nevskaya, N., Nikonov, S., Tishchenko (2000) Ribosomal proteins and their structural transition on and off the ribosome. Dans *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 65-72.
- Alix, J.H. et Nierhaus, K.H. (2003) DnaK-facilitated ribosome assembly in *Escherichia coli* revisited. *RNA*, **9**, 787-793.
- Allard, P., Rak, A.V., Wimberly, B.T., Clemons, W.M.Jr., Kalinin, A., Helgstrand, M., Garber, M.B., Ramakrishnan, V. et Hard, T. (2000) Another piece of the ribosome: solution structure of S16 and its location in the 30S subunit. *Struct. Fold Des.*, **8**, 875-882.
- Asai, T., Zaporozhets, D., Squires, C. et Squires C.L. (1999) An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **96**, 1971-1976.
- Auerbach, T., Bashan, A., Harms, J., Schlünzen, F., Zarivach, R., Bartels, H., Agmon, I., Kessler, M., Pioletti, M., Franceschi, F. et Yonath, A. (2002) Antibiotics targeting ribosomes: crystallographic studies. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **2**, 169-186.
- Baker, A.M. et Draper, D.E. (1995) Messenger RNA recognition by fragments of ribosomal protein S4. *J. Biol. Chem.*, **270**, 22939-22945.
- Bakin, A., Kowalk, J.A., McCloskey, J.A. et Ofengand, J. (1994) The single pseudouridine residue in *Escherichia coli* 16S RNA is located at position 516. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3681-3684.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.

- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature*, **400**, 841-847.
- Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Grassucci, R.A., Sweet, R., Frank, J., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (1998) A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell*, **93**, 1105-1115.
- Barker, M.M. et Gourse, R.L. (2003) Control of Stable RNA Synthesis. Dans *Translation Mechanisms* (Lapointe, J. et Brakier-Gingras, L. éds), Landes Bioscience, Georgetown, TX., et Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, pp. 370-382.
- Bashan, A., Agmon, I., Zarivach, R., Schlünzen, F., Harms, J., Berisio, R., Bartels, H., Franceschi, F., Auerbach, T., Hansen, H.A.S., Kossoy, E., Kessler, M. et Yonath, A. (2003) Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol. Cell*, **11**, 91-102.
- Bélanger, F., Léger, M., Saraiya, A.A., Cunningham, P.R. et Brakier-Gingras, L. (2002) Functional studies of the 900 tetraloop capping helix 27 of 16S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, **320**, 979-989.
- Belitsina, N.V., Tnalina, M.V. et Spirin, A.S. (1981) Template-free ribosomal synthesis of polylysine from lysyl-tRNA. *FEBS Lett.*, **131**, 289-292.
- Benard, L., Philippe, C., Ehresmann, B., Ehresmann, C. et Portier, C. (1996). Pseudoknot and translational control in the expression of the S15 ribosomal protein. *Biochimie*, **78**, 568-576.
- Berglund, H., Rak, A.V., Serganov, A., Garber, M. et Härd, T. (1997) Solution structure of the ribosomal RNA binding protein S15 from *Thermus thermophilus*. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 20-23.
- Beringer, M., Adio, S., Wintermeyer, W. et Rodnina, M.V. (2003) The G2447A mutation does not affect ionization of a ribosomal group taking part in peptide bond formation. *RNA*, **9**, 919-922.

- Betzl, C., Lorenz, S., Fuerste, J.P., Bald, R., Zhang, M. Schneider, T.R., Wilson, K.S. et Erdmann, V.A. (1994) Crystal structure of domain A of *Thermus flavus* 5S rRNA and the contribution of water to its structure. *FEBS Lett.*, **351**, 159-164.
- Bilgin, N. et Ehrenberg, M. (1994) Mutations in 23S ribosomal RNA perturb transfer RNA selection and can lead to streptomycin dependence. *J. Mol. Biol.*, **235**, 813-824.
- Bocharov, E.V., Gudkov, A.T. et Arseniev, A.S. (1996) Topology of the secondary structure elements of ribosomal protein L7/L12 from *E. coli* in solution. *FEBS Lett.*, **379**, 291-294.
- Böck, A., Turnowsky, F. et Hogenauer, G. (1982) Tiamulin resistance mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **151**, 1253-1260.
- Brakier-Gingras, L., Bélanger, F. et O'Connor, M. (2003) Probing the role of ribosomal RNA in protein synthesis through mutagenesis. Dans *Translation Mechanisms* (Lapointe, J. et Brakier-Gingras, L. édés), Landes Bioscience, Georgetown, TX., et Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, pp. 247-259.
- Bretscher, M.S. (1968). Direct translation of a circular messenger DNA. *Nature*, **220**, 1088-1091.
- Brimacombe, R. (1991) RNA-protein interaction in the *E. coli* ribosome. *Biochimie*, **73**, 927-936.
- Brimacombe, R. (1995) The structure of ribosomal RNA: A three dimensional jigsaw puzzle. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 365.
- Brimacombe, R. (2000) The Bacterial Ribosome at Atomic Resolution. *Structure Fold Des.*, **8**, R195-200.
- Brimacombe, R., Atmadja, J., Stiege, W. et Schüler, D. (1988) A detailed model of the three-dimensional structure of *E. coli* 16S ribosomal RNA *in situ* in the 30S ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.*, **199**, 115-136.
- Brimacombe, R., Greuer, B., Mueller, F., Osswald, M., Rinke-Appel, J. et Sommer, I. (2000) Three-dimensional organization of the bacterial ribosome and its subunits: Transition from low-resolution models to high-resolution structures. Dans *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*.

- (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 151-164.
- Brimacombe, R. Greur, B., Mitchell, P., Osswald, M., Rinke-Appel, J., Schüler, D. et Stade, K. (1990) Three-dimensional structure and function of *Escherichia coli* 16S and 23S rRNA as studied by cross-linking techniques. Dans: *The Ribosome: Structure, Function and Evolution* (Hill, W.E. Dahlberg, A., Garrett, R.A., Moore, P.B., Schlessinger, D. et Warner, J.R., éds), American society for microbiology, Washington, DC, pp. 93-106.
- Brink, M.F., Verbeet, M.P. et de Boer, H.A. (1993) Formation of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for initiation of translation. *EMBO J.*, **12**, 3987-3996.
- Brink, M.F., Verbeet, M.P. et de Boer, H.A. (1995) Specialized ribosomes: highly specific translation in vivo of a single targetted mRNA species. *Gene*, **156**, 215-222.
- Brodersen D.E et Ramakrishnan, V. (2003) Shape can be seductive. *Nature Struct. Biol.*, **10**, 78-80.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M.Jr., Carter, A.P., Wimberly, B.T. et Ramakrishnan, V. (2002) Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J. Mol. Biol.*, **316**, 725-768.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M.Jr., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. et Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, **103**, 1143-1154.
- Brosius, J., Dull, T.J. et Noller, H.F. (1980) Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **77**, 201-204.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. et Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **75**, 4801-4805.

- Broude, N.E., Kussova, K.S., Medvedeva, N.I. et Budowsky, E.I. (1983) Proteins of 30-S subunit of *Escherichia coli* ribosomes which interact directly with natural mRNA. *Eur. J. Biochem.*, **132**, 139-145.
- Buckingham, R.H. et Ehrenberg, M. (2003) Translational termination, ribosome recycling and tmRNA function. Dans *Translation Mechanisms* (Lapointe, J. et Brakier-Gingras, L. édés), Landes Bioscience, Georgetown, TX., et Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, pp. 340-348.
- Burd, C.G, et Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, **265**, 615-620.
- Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A.G., Proctor, M. et St Johnston, D. (1995) NMR solution structure of a double-stranded RNA-binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J.*, **14**, 3563-3571.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J.P., Proctor, M., Freund, S.M.V. et 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.
- Calnan, B.J., Biancalana, S., Hudson, D. et Frankel, A.D. (1991) Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat proteins reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev.*, **5**, 201-210.
- Calogero, R.A., Pon, C.L., Canonaco, M.A. et Gualerzi, C.O. (1988) Selection of the mRNA translation initiation region by *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **85**, 6427- 64312.
- Cannone, J.J., Subramanian, S., Schnare, M.N., Collett, J.R., D'Souza, L.M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L.V., Müller, K.M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N. et Gutell, R.R. (2002) The Comparative RNA Web (CRW) Site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*, **3**, 1471-2105.
- Carbon, P. Ehresmann, C. Ehresmann, B. et Ebel, J.P. (1979) The complete nucleotide sequence of the ribosomal 16S RNA from *Eshcerichia coli*. Experimental details and cistron heterogeneities. *Eur. J. Biochem.*, **100**, 399-410.

- Capel, M.S. et Ramakrishnan, V. (1988) Neutron-scattering topography of proteins of the small ribosomal subunit. *Methods Enzymol.*, **164**, 117-131.
- Capel, M.S., Engelman, D.M., Freeborn, B.R., Kjeldgaard, M., Langer, J.A., Ramakrishnan, V., Schindler, D.G., Schneider, D.K., Schoenborn, B.P., Sillers, I.Y. et Moore, P.B. (1987). A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Science*, **238**, 1403-1406.
- Carter, A.P., Clemons, W.M.Jr., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. et Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**, 340-348.
- Carter, A.P., Clemons, W.M.Jr., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Hartsh, T., Wimberly, B.T. et Ramakrishnan, V. (2001) Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal protein. *Science*, **291**, 498-501.
- Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, T.N., Earnest, H.F. et Noller, H.F. (1999) X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science*, **285**, 2095-2104.
- Cate, J.H., Gooding, A.R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B.L., Kundrot, C.E., Cech, T.R. et Doudna, J.A. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA stacking. *Science*, **273**, 1678-1685.
- Cech, T.R. (2000) Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, **289**, 878-879.
- Cerretti, D.P., Mattheakis, L.C., Kearney, K.R., Vu, L. et Nomura, M. (1988) Translational regulation of the *spc* operon in *Escherichia coli*. Identification and structural analysis of the target site for S8 repressor protein. *J. Mol. Biol.*, **204**, 309-329.
- Cheong, C., Varani, G. et Tinoco, I. (1990) Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'GGAC(UUCG)GUCC. *Nature*, **346**, 680-682.
- Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E. et Burley, S.K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364**, 412-420.

- Clemons, W.M.Jr., Davies, C., White, S.W. et Ramakrishnan, V. (1998) Conformational variability of the N-terminal helix in the structure of ribosomal protein S15. *Structure*, **6**, 429-438.
- Clemons, W.M., May, J.L.C., Wimberly, B.T., McCutcheon, J.B., Capel, M.S., Ramakrishnan, V. (1999) Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*, **400**, 833-840.
- Conn, G.L., Draper, D.E., Lattman, E.E. et Gittis, A.G. (1999) Crystal structure of a conserved ribosomal protein-RNA complex. L11-RNA. *Science*, **284**, 1171-1174.
- Coopermann, B.S., Wooten, T., Romero, D.P. et Traut, R.R. (1995) Histidine 229 in protein L2 is apparently essential for 50S peptidyl transferase activity. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 1087-1094.
- Correl, C.C., Freeborn, B., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (1997) Metals, motifs and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell*, **91**, 705-712.
- Culver, G.M. (2001) Meanderings of the mRNA through the ribosome. *Structure*, **9**, 751-758.
- Culver, G.M. (2003) Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Biopolymers*, **68**, 234-249.
- Culver, G.M. et Noller, H.F. (1998) Directed hydroxyl radical probing of 16S ribosomal RNA in ribosomes containing FeII tethered to ribosomal protein S20. *RNA*, **4**, 1471-1480.
- Culver, G.M., Cate, J.H., Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M. et Noller, H.F. (1999) Identification of an RNA-protein bridge spanning the ribosomal subunit interface. *Science*, **285**, 2133-2135.
- Cunningham, P.R., Weitzmann, C.J., Nègre, D., Sinning, J.G., Frick, V., Nurse, K. et Ofengand, J. (1990) *In vitro* analysis of the role of rRNA in protein synthesis: site-specific mutation and methylation. Dans: *The Ribosome: Structure Function and Evolution*. (Éds Hill, W.E., Dahlberg, A., Garrett, R.A. Moore, P.B., Shlessinger, D. et Warner, J.), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 243-252.

- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A. et Moore, P.B. (1994) The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.*, **13**, 3661-3668.
- Dabrowski, M., Spahn, C.M., Schafer, M.A., Patzke, S. et Nierhaus, K.H. (1998) Protection patterns of tRNAs do not change during ribosomal translocation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32793-32800.
- Dahlquist, K.D. et Puglisi, J.D. (2000) Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site. *J. Mol. Biol.*, **299**, 1-15.
- Dahlberg, A.E. (2001) Ribosome structure. The ribosome in action. *Science*, **292**, 868-869.
- Dallas, A. et Noller H.F. (2001) Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol. Cell*, **8**, 855-864.
- Davies, C., White, S.W. et Ramakrishnan, V. (1996) The crystal structure of ribosomal protein S14 reveals an important organizational component of the translational apparatus. *Structure*, **4**, 1227-1232.
- Davies, C., Ramakrishnan, V. et White, S.W. (1996b) Structural evidence for specific S8-RNA and S8-protein interactions within the 30S ribosomal subunit: ribosomal protein S8 from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9 Å resolution. *Structure*, **4**, 1093-1104.
- Davies, C., Gerstner, R.B., Draper, D.E., Ramakrishnan, V, et White, S.W. (1998) The crystal structure of ribosomal protein S4 reveals a two-domain molecule with an extensive RNA-binding surface: one domain shows structural homology to the ETS DNA-binding motif. *EMBO J.*, **17**, 4545-4558.
- Dean, D., Yates, J.L. et Nomura, M. (1981a) *Escherichia coli* ribosomal protein S8 feedback regulates part of the *spc* operon. *Nature*, **289**, 89-91.
- Dean, D., Yates, J.L. et Nomura, M. (1981b) Identification of ribosomal protein S7 as a repressor of translation within the *str* operon of *E. coli*. *Cell*, **24**, 413-419.
- Deckman, I.C. et Draper, D.E. (1985) Specific interaction between ribosomal protein S4 and the α operon messenger RNA. *Biochemistry*, **24**, 7860-7865.

- Deckman, I.C. et Draper, D.E. (1987) S4-alpha mRNA translation regulation complex. II. Secondary structures of the RNA regulatory site in the presence and absence of S4. *J. Mol. Biol.*, **196**, 323-332.
- De Smit, M.H. et van Duin, J. (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **87**, 7668-7672.
- Diedrich, G., Spahn, C.M.T., Stelzl, U., Schäfer, M.A., Wooten, T., Bochkariov, D.E., Cooperman, B.S., Traut, R.R. et Nierhaus, K.H. (2000) Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunit, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer. *EMBO J.*, **19**, 5241-5250.
- Diges, C.M. et Uhlenbeck, O.C. (2001) *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *EMBO J.*, **20**, 5503-5512.
- Di Giulio, M. (1997) On the RNA world: Evidence in favour of an early ribonucleopeptide world. *J. Mol. Evol.*, **45**, 571-578.
- Donaldson, L.W., Peterson, J.M., Graves, B.J. et McIntosh, L.P. (1996) Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *EMBO J.*, **15**, 125-134.
- Dontsova, O., Tishkov, V., Dokudovskaya, S., Bogdanov, A., Döring, T., Rinke-Appel, J., Thamm, S., Greuer, B. et Brimacombe, R. (1994) Stem-loop IV of 5S rRNA lies close to the peptidyl transferase center. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **91**, 4125-4129.
- Dorner, S., Polacek, N., Schulmeister, U., Panuschka, C. et Barta, A. (2002) Molecular aspects of the ribosomal peptidyl transferase. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 1131-1136.
- Dragon, F. et Brakier-Gingras, L. (1993) Interaction of *Escherichia coli* ribosomal protein S7 with 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1199-1203.
- Dragon, F., Payant, C. et Brakier-Gingras, L. (1994) Mutational and structural analysis of the RNA binding site for *Escherichia coli* ribosomal protein S7. *J. Mol. Biol.*, **244**, 74-85.
- Draper, D.E. (1995) Protein-RNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 593-620.

- Draper, D.E. (1999) Themes in RNA-protein recognition. *J. Mol. Biol.*, **293**, 255-270.
- Draper, D.E. et Reynaldo, L.P. (1999) RNA binding strategies of ribosomal proteins. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 381-388.
- Dreyfuss, G. Swanson, M.S. et Pinol-Roma, S. (1988) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 86-91.
- Easterwood, T.R. et Harvey, S.C. (1995) Modeling the structure of the ribosome. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 751-756.
- Ehrenberg, M., Dincbas, V., Freistroffer, D., Heurgué-Hamard, V., Karimi, R., Pavlov, M., Buckingham, R. (2000) Mechanism of bacterial translation termination and ribosome recycling. Dans *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., édés), ASM Press, Washington, DC, pp. 65-72.
- Ehresmann, B., Reinbolt, J., Backendorf, C., Tritsch, D., Ebel, J.P. (1976) Studies of the binding sites of *Escherichia coli* ribosomal protein S7 with 16S RNA by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.*, **67**, 316-319.
- Ehresmann, B. Backendorf, C., Ehresmann, C., Millon, R. et Ebel, J.P. (1980) Effect of ultraviolet irradiation on 30-S ribosomal subunits. Identification of the RNA region crosslinked to protein S7. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 255-262.
- Ehresmann, C., Baudin, F., Mougél, M., Romby, P. Ebel, J.-P. et Ehresmann, B. (1987) Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9109-9128.
- Ehresmann, C., Philippe, C., Westhof, E., Benard, L., Portier, C. et Ehresmann B. (1995) A pseudoknot is required for efficient translational initiation and regulation of the *Escherichia coli* rpsO gene coding for ribosomal protein S15. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 1131-1140.
- Egebjerg, J., Christiansen, J. et Garrett, R.A. (1991) Attachment sites of primary binding proteins L1, L2 and L23 on 23 S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **222**, 251-264.

- Eliseikina, I.A., Avliyakov, N.K., Grishkovskaya, I.B., Muranova, T.A., Sedelnikova, S.E. et Garber, M.B. (1996) RNA binding properties of ribosomal protein L1 from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 1461–1464.
- Farabaugh, P.J. et Björk, G.R. (1999) How translational accuracy influences reading frame maintenance. *EMBO J.*, **18**, 1427-1434.
- Fedorov, R., Nevskaya, N., Khairullina, A., Tishchenko, S., Mikhailov, A., Garber, M., Nikonov, S. (1999) Structure of ribosomal protein L30 from *Thermus thermophilus* at 1.9 Å resolution: conformational flexibility of the molecule. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **55**, 1827-1833.
- Feinberg, J.S. et Joseph, S. (2001) Identification of molecular interactions between P-site tRNA and the ribosome essential for translocation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **98**, 11120-11125.
- Fellner, P. et Sanger, F. (1968) Sequence analysis of specific areas of the 16S and 23S ribosomal RNAs. *Nature*, **219**, 236-238.
- Ferradon, D. Elphick, L., Nusslein-Volhard, C. et St Johnston, D. (1994) Stauf protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles which move in a microtubule-dependent manner. *Cell*, **79**, 1221-1232.
- Feunteun, J., Monier, R., Garrett, R.A., Le Bret, M. et Le Pecq, J.B. (1975) Effect of 50S subunit proteins L5, L18 and L25 on the fluorescence of 5S RNA-bound ethidium bromide. *J. Mol. Biol.*, **93**, 535-541.
- Fink, D.L., Chen, R.O., Noller, H.F. et Altman, R.B. (1996) Computational methods for defining the allowed conformational space of 16S rRNA based on chemical footprinting data. *RNA*, **2**, 851-866.
- Fountain, M.A., Serra, M.J., krugh, T.R. et Turner, D. (1996) Structural features of a six-nucleotide RNA hairpin loop found in ribosomal RNA. *Biochemistry*, **35**, 6539-6548.
- Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C. et Puglisi, J.D. (1996) Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, **274**, 1367-1371.

- Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C. et Puglisi, J.D. (1998) Paromomycin binding induces a local conformation change in the A-site of 16S rRNA. *J. Mol. Biol.*, **277**, 333-345.
- Frank, J. (2001) Cryo-electron microscopy as an investigative tool: the ribosome as an example. *Bioessays*, **23**, 725-732.
- Frank, J. (2002) Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 303-319.
- Frank, J. (2003) Electron microscopy of functional ribosome complexes. *Biopolymers*, **68**, 223-233.
- Frank, J. et Agrawal, R.K. (2000) ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature*, **406**, 318-322.
- Frank, J., Radermacher, M., Wagenknecht, T. et Verschoor, A. (1988) Studying ribosome structure by electron microscopy and computer-image processing. *Methods Enzymol.*, **164**, 3-35.
- Frank, J., Penczeck, P., Grassucci, R. et Srivastava, S. (1991) Three-dimensional reconstruction of the 70S *Escherichia coli* ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA. *J. Cell Biol.*, **115**, 597-605.
- Frank, J., Zhu, J., Penczeck, P., Li, Y., Srivastava, S., Verschoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R., Lata, R.K et Agrawal, A. (1995a) A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the *E. coli* ribosome. *Nature*, **376**, 441-444.
- Frank, J., Verschoor, A., Li, Y., Zhu, J., Lata, R.K., Radermacher, M., Penczeck, P., Grassucci, R., Agrawal, A. et Srivastava, S. (1995b) A model of the translational apparatus based on a three-dimensional reconstruction of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 757-765.
- Fredrick, K. et Noller, H.F. (2003) Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin. *Science*, **300**, 1159-1162.
- Fredrick, K., Dunny, G.M. et Noller, H.F. (2000) Tagging ribosomal protein S7 allows rapid identification of mutants defective in assembly and function of 30S subunits. *J. Mol. Biol.*, **298**, 379-394.

- Fuchs, E. (1999) The translation initiation signal in *E. coli* and its control. Dans: *Genetic Engineering*, vol. 21. (Setlow, J.K., éd.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, pp. 15-35.
- Gabashvili, I.S., Agrawal, R.K., Spahn, C.M.T., Grassucci, R.A., Frank, J. et Penczek, P. (2000) Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell*, **100**, 537-549.
- Gagnon, M.G. et Steinberg, S.V. (2002) GU receptors of double helices mediate tRNA movement in the ribosome. *RNA*, **8**, 873-877.
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S.M., Van Roey, P., Agrawal, R.K., Harvey, S.C., Sali, A., Chapman, M.S. et Frank, J. (2003) Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*, **113**, 789-801.
- Glötz, C., Müssig, J., Gewitz, H.S., Makowski, I., Arad, T., Yonath, A. et Wittmann, H.G. (1987) Three-dimensional crystals of ribosomes and their subunits from eu- and archaebacteria. *Biochem. Int.*, **187**, 953-960.
- Golden, B.L., Ramakrishnan, V. et White, S.W. (1993a) Ribosomal protein L6: structural evidence of gene duplication from a primitive RNA binding protein. *EMBO J.*, **12**, 4901-4908.
- Golden, B.L., Hoffman, D.W., Ramakrishnan, V. et White, S.W. (1993b) Ribosomal protein S17: characterization of the three-dimensional structure by 1H and 15N NMR. *Biochemistry*, **32**, 12812-12820.
- Garvilova, L.P., Kostianshina, O.E., Koteliansky, V.E., Rutkevitch, N.M. et Spirin, A.S. (1976) Factor-free ("non-enzymatic") and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.*, **101**, 537-552.
- Grunberg-Manago M, Dessen P, Pantaloni D, Godefroy-Colburn T, Wolfe AD, Dondon J. (1975) Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.*, **94**, 461-478.

- Green, R. et Noller, H.F. (1996) *In vitro* complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for *Escherichia coli*, 50S ribosomal subunit assembly and function. *RNA*, **2**, 1011-1021.
- Green, R. et Noller, H.F. (1997) Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 679-716.
- Green, R. et Noller, H.F. (1999) Reconstitution of functional 50S ribosomes from *in vitro* transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry*, **38**, 1772-1779.
- Gregory, S.T., Lieberman, K.R. et Dahlberg, A.E. (1994) Mutations in the peptidyl transferase region of *E. coli* 23S rRNA affecting translational accuracy. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 279-284.
- Greuer, B., Osswald, M., Brimacombe, R. et Stöffler, G. (1987) RNA-protein cross-linking in *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits; determination of sites on 16S RNA that are cross-linked to proteins S3, S4, S7, S9, S10, S11, S17, S18 and S21 by treatment with *bis*-(2chloroethyl)-methylamine. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3241-3255.
- Gualerzi, C.O., Risuelo, G. et Pon, C.L. (1977) Initial rate kinetic analysis of the mechanism of initiation complex formation and the role of initiation factor IF-3. *Biochemistry*, **16**, 1684-1689.
- Gualerzi, C.O., Brandi, L., Caserta, E., La Teana, A., Spurio, R., Tomsic, J. et Pon, C.L. (2000) Translation initiation in bacteria. Dans *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 477-494.
- Gualerzi, C.O., Brandi, L., Caserta, E., Garofalo, M., Lammi, M., La Teana, A., Petrelli, D., Spurio, R., Tomsic, J., et Pon, C.L. (2001) Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria. *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **66**, 363-376.
- Gutell, R.R. (1996) Comparative sequence analysis and the structure of 16S and 23S rRNA. In *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing and Function in*

- proteins Biosynthesis*. (Dahlberg A.E., Zimmermann, R.A., eds) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 111-126.
- Gutell, R.R. et Woese, C.R. (1990) Higher order structural elements in ribosomal RNAs: pseudo-Knots and the use of noncanonical pairs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **87**, 663-667.
- Gutell, R.R., Lee, J.C. et Cannone, J.J. (2002) The accuracy of ribosomal RNA comparative structure models. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 301-310.
- Glötz, C., Zwieb, C., Brimacombe, R., Edwards, K. et Kossel, H. (1981) Secondary structure of the large subunit ribosomal RNA from *Escherichia coli*, *Zea mays* chloroplast, and human and mouse mitochondrial ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3287-3306.
- Haggerty, T.J. et Lovett, S.T. (1997) IF3-mediated suppression of GUA initiation codon mutation in the *recJ* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **179**, 6705-6713.
- Hampl, H., Schulze, H. et Nierhaus, K.H. (1981) Ribosomal components from *Escherichia coli* 50 S subunits involved in the reconstitution of peptidyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, **256**, 2284-2288.
- Hansen, J.L., Schmeing, M., Moore, P.B. et Steitz, T. (2002a) Structural insight into peptide bond formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **99**, 11670-11675.
- Hansen, J.L., Ippolito, J.A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2002b). The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell*, **10**, 117-128.
- Harada, N., Maemura, K., Yamasaki, N. et Kimura, M. (1998) Identification by site-directed mutagenesis of amino acid residues in ribosomal protein L2 that are essential for binding to 23S ribosomal RNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **1429**, 176-186.
- Hard, T., Rak, A., Allard, P., Kloo, L. et Garber, M. (2000) The solution structure of ribosomal protein L36 from *Thermus thermophilus* reveals a zinc-ribbon-like fold. *J. Mol. Biol.*, **296**, 169-180.
- Harms, J.M., Bartels, H., Schlünzen, F. et Yonath, A. (2003) Antibiotics acting on the translational machinery. *J. Cell Sci.*, **116**, 1391-1393.

- Harms, J.M., Schlünzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. et Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, **107**, 679-688.
- Heilek, G.M. et Noller, H.F. (1996a) Site-directed hydroxyl radical probing of the rRNA neighbourhood of ribosomal protein S5. *Science*, **272**, 1659-1662.
- Heilek, G.M. et Noller, H.F. (1996b) Directed hydroxyl radical probing of the rRNA neighbourhood of ribosomal protein S13 using tethered FeII. *RNA*, **2**, 597-602.
- Held, W.A., Mizushima, S. et Nomura, M. (1973) Reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from purified molecular components. *J. Biol. Chem.*, **248**, 5720-5730.
- Held, W.A., Ballou, B., Mizushima, S. et Nomura, M. (1974) Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3103-3111.
- Helgstrand, M., Rak, A.V., Allard, P., Davydova, N., Garber, M.B. et Härd, T. (1999) Solution structure of ribosomal protein S19 from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.*, **292**, 1071-1081.
- Herold, M. et Nierhaus, K.H. (1987) Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8826-8833.
- Hershey, J.W.B. (1987) Protein synthesis. Dans: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology*. Vol. 1 (Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. et Umberger, H.E., éds), ASM Press, Washington, DC, p. 613-647.
- Hoffman, D.W., Cameron, C.S., Davies, C., White, S.W. et Ramakrishnan, V. (1996) Ribosomal protein L9: a structure determination by the combined use of X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, **264**, 1058-1071.
- Hoffman, D.W., Davies, C., Gerchman, S.E., Kycia, J.H., Porter, S.J., White, S.W. et Ramakrishnan, V. (1994) Crystal structure of prokaryotic ribosomal protein L9: a bi-lobed RNA-binding protein. *EMBO J.*, **13**, 205-212.

- Holmberg, L. et Noller H.F. (1999) Mapping the ribosomal RNA neighbourhood of protein L11 by directed hydroxyl radical probing. *J. Mol. Biol.*, **289**, 223-233.
- Hopfield, J.J. (1974) Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **71**, 4135-4139.
- Hosaka, H., Yao, M., Kimura, M. et Tanaka, I. (2001) The structure of the archaeobacterial ribosomal protein S7 and its possible interaction with 16S rRNA. *J. Biochem.*, **130**, 696-701.
- Hosaka, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Harada, N., Sano, K., Kimura, M., Yao, M. et Wakatsuki, S. (1997) Ribosomal protein S7: a new RNA-binding motif with structural similarities to a DNA architectural factor. *Structure*, **5**, 1199-1208.
- Huang, K.H. et Cantor, C.R. (1975) Studies of 30S *Escherichia coli* ribosome reassembly using individual proteins labelled with an environmentally sensitive fluorescent probe. *J. Mol. Biol.*, **97**, 423-441.
- Huang, K.H., Fairclough, R.H. et Cantor, C.R. (1975) Singlet energy transfer studies of the arrangement of proteins in the 30S *Escherichia coli* ribosome. *J. Mol. Biol.*, **97**, 443-470.
- Huang, S.G., Wang, Y.X. et Draper, D.E. (1996) Structure of a hexanucleotide RNA hairpin loop conserved in ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.*, **258**, 308-321.
- Huenges, M., Rölz, C., Gschwind, R., Peteranderl, R., Berglechner, F., Richter, G., Bacher, A., Kessler, H. et Gemmecker, G. (1998) Solution structure of the antitermination protein NusB of *Escherichia coli*: A novel all-helical fold for an RNA-binding protein. *EMBO J.*, **17**, 4092-4100.
- Hui, A.S. et de Boer, H.A. (1987) Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **84**, 4762-4766.
- Hummel, H., Piepersburg, W. et Böck, A. (1979) Analysis of lincomycine resistance mutations in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **169**, 345-347.
- Ito, K., Uno, M. et Nakamura, Y. (2000) A tripeptide anticodon deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature*, **403**, 680-684.

- Iwasaki, K., Kikukawa, S., Kawamura, S., Kouzuma, Y., Tanaka, I., Kimura, M. (2002) On the interaction of ribosomal protein L5 with 5S rRNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 103-109.
- Jacob, W.F., Santer, M. et Dahlberg, A.E. (1987) A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **84**, 4757-4761.
- Jaishree, T.N., Ramakrishnan, V. et White, S.W. (1996) Solution structure of prokaryotic ribosomal protein S17 by high-resolution NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **35**, 2845-2853.
- Jaskunas, S.R., Lindahl, L., Nomura, M. et Burgess, R.R. (1975) Identification of two copies of the gene for the elongation factor EF-Tu in *E. coli*. *Nature*, **257**, 458-462.
- Jeffares, D.C., Poole, A.M. et Penny, D. (1998) Relics from the RNA world. *J. Mol. Evol.*, **46**, 18-36.
- Jinks-Robertson, S. et Nomura, M. (1987) Ribosomes and tRNA. Dans: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Vol. 1 (Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M. et Umberger, E. éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 1358-1385.
- Joseph, S. (2003) After the ribosome structure: How does translocation work? *RNA*, **9**, 160-164.
- Joseph, S., Weiser, B. et Noller, H.F. (1997) Mapping the inside of the ribosome with an RNA helical ruler. *Science*, **278**, 1093-1098.
- Kaltschmidt, E. et Wittmann, H.G. (1970a) Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal. Biochem.*, **36**, 401-412.
- Kaltschmidt, E. et Wittmann, H.G. (1970b) Ribosomal proteins. XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **67**, 1276-1282.

- Kalurachi, K., Uman, K., Zimmermann, R.A. et Nokonowicz, E.P. (1997) Structural features of the binding site for ribosomal protein S8 in *Escherichia coli* 16S rRNA defined using NMR spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **94**, 2139-2144.
- Karimi, R., Pavlov, M.Y., Buckingham, R.H., et Ehrenberg, M. (1999) Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol. Cell*, **3**, 601-609.
- Katunin, V.I., Savelsberg, A., Rodnina, M.V. et Wintermeyer, W. (2002a) Coupling of GTP hydrolysis by elongation factor G to translocation and factor recycling on the ribosome. *Biochemistry*, **41**, 12806-12812.
- Katunin, V.I., Muth, G.W., Strobel, S.A., Wintermeyer, W. et Rodnina, M.V. (2002b) Important contribution to catalysis of peptide bond formation by a single ionizing group within the ribosome. *Mol. Cell*, **10**, 339-346.
- Keener, J. et Nomura, M. (1996) Regulation of ribosome synthesis. Dans: *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, 2ème édition, vol. 1 (Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaecher, M. et Umberger, H.E. éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 1417-1431.
- Khaitovich, P. et Mankin, A.S. (2000) Reconstruction of the 50S subunit with *in vitro*-transcribed 23S rRNA: a new tool for studying peptidyltransferase. Dans *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 229-243.
- Khaitovich, P., Mankin, A.S., Green, R., Lancaster, L. et Noller, H.F. (1999) Characterization of functional active subribosomal particles from *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **96**, 85-90.
- Kim, D.F. et Green, R. (1999) Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Mol. Cell*, **4**, 859-864.
- Kirillov, S.V., Wower, J., Hixson, S.S. et Zimmermann, R.A. (2002) Transit of tRNA through the *Escherichia coli* ribosome: cross-linking of the 3' end of tRNA to ribosomal proteins at the P and E sites. *FEBS Lett.*, **514**, 60-66.

- Kisselev, L., Ehrenberg, M. et Frolova, L. (2003) Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J.*, **22**, 175–182.
- Klaholz, B.P., Pape, T., Zavialov, A.V., Myasnikov, A.G., Orlova, E.V., Vestergaard, B., Ehrenberg, M. et van Heel, M. (2003) Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature*, **421**, 87-90.
- Klein, D.J., Schmeing, T.M., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2001) The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *EMBO J.*, **20**, 4214-4221.
- Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Supina, E.V. et Boni, I.V. (2002) Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. *RNA*, **8**, 1137-1147.
- Kooi, E.A., Rutgers, C.A., Mulder, A., Van't Riet, J., Venema, J. et Raue, H.A. (1993) The phylogenetically conserved doublet tertiary interaction in domain III of the large subunit rRNA is crucial for ribosomal protein binding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **90**, 213-216.
- Krzyzosiak, W., Denman, R., Nurse, K., Hellmann, W., Boublik, M., Gehrke, C.W., Agris, P.F. et Ofengand, J. (1987) *In vitro* synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome. *Biochemistry*, **38**, 1780-1788.
- Kurland, C.G., Hughes, D. et Ehrenberg, M. 1996. Limitations of translational accuracy. Dans: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology*. Vol. 1 (Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M et Umbarger, E., éds), ASM Press, Washington, DC, p.979-1004.
- Lake, J.A. (1976) Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *J. Mol. Biol.*, **105**, 131-159.
- Lambert, J.M. et Traut, R.R. (1981) The subunit interface of the *Escherichia coli* ribosome. Identification of proteins at the interface between the 30S and 50S subunits by crosslinking with 2-iminothiolane. *J. Mol. Biol.*, **149**, 451-476.

- Lambert, J.M., Boileau, G., Cover, J.A. et Traut, R.R. (1983) Cross-links between ribosomal proteins of 30S subunits in 70S tight couples and in 30S subunits. *Biochemistry*, **22**, 3913-3920.
- Lancaster, L., Kiel, M.C., Kaji, A. et Noller, H.F. (2002) Orientation of ribosome recycling factor in the ribosome from directed hydroxyl radical probing. *Cell*, **111**, 129-140.
- Lara, K.R., Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R., Zhu, J. et Frank, J. (1996) Three-dimensional reconstruction of the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit in ice. *J. Mol. Biol.*, **262**, 43-52.
- La Teana, A., Gualerzi, C.O. et Brimacombe, R. (1995) From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of initiation factors. *RNA*, **1**, 772-782.
- La Teana, A., Gualerzi, C.O. et Dahlberg, A.E. (2001) Initiation factor IF-2 binds to the α -sarcin loop and helix 89 of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *RNA*, **7**, 1173-1179.
- La Teana, A., Brandi, A., O'Connor, M., Freddi, S. et Pon, C.L. (2000) Translation during cold adaptation does not involve mRNA-rRNA base pairing through the downstream box. *RNA*, **6**, 1393-1402.
- Laursen, B.S., Siwanowicz, I., Larigauderie, G., Hedegaard, J., Ito, K., Nakamura, Y., Kenney, J.M., Mortensen, K.K. et Sperling-Petersen, H.U. (2003) Characterization of mutations in the GTP-binding domain of IF2 resulting in cold-sensitive growth of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **326**, 543-551.
- Lee, K.S., Holland-Staley, C.A. et Cunningham, P.R. (1996) Genetic analysis of the Shine-Dalgarno interaction: selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. *RNA*, **2**, 1270-1285.
- Legault, P., Li, J., Mogridge, J., Kay, L.E. et Greenblatt, J. (1998) NMR structure of the bacteriophage λ N peptide/boxB RNA complex: Recognition of a GNRA fold by an arginine-rich motif. *Cell*, **93**, 289-299.

- Leontis, N.B., Stombaugh, J. et Westhof, E. (2002) Motif prediction in ribosomal RNAs: Lessons and prospects for automated motif prediction in homologous RNA molecules. *Biochimie*, **84**, 961-973.
- Leijonmarck, M., Eriksson, S. et Liljas, A. (1980) Crystal structure of a ribosomal component at 2.6 Å resolution. *Nature*, **286**, 824-826.
- Lieberman, K.R. et Noller, H.F. (1998) Ribosomal protein L15 as a probe of 50 S ribosomal subunit structure. *J. Mol. Biol.*, **284**, 1367-1378.
- Liiv, A., Tenson, T. et Remme, J. (1996) Analysis of the ribosome large subunit assembly and 23S rRNA stability *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, **263**, 396-410.
- Liljas, A. (1991) Comparative biochemistry and biophysics of ribosomal proteins. *Inter. Rev. of cytol.*, **124**, 103-135.
- Lilley, D.M. (2001) The ribosome functions as a ribozyme. *ChemBiochem*, **2**, 31-35.
- Lindahl, M., Svensson, L.A., Liljas, A., Sedelnikova, S.E., Eliseikina, I.A., Fomenkova, N.P., Nevskaya, N., Nikonov, S.V., Garber, M.B. et Muranova T.A. (1994) Crystal structure of the ribosomal protein S6 from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.*, **13**, 1249-1254.
- Lodi, P.J., Ernst, J.A., Kuszewski, J., Hickman, A.B., Engelman, A., Craigie, R., Clore, G.M. et Gronenborn, A.M. (1995) Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. *Biochemistry*, **34**, 9826-9833.
- Lodmell, J.S. et Dahlberg, A.E. (1997) A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science*, **277**, 1262-1267.
- Lohse, P.A. et Szostak, J.W. (1997) Ribozyme-catalyzed amino-acid transfer reaction. *Nature*, **381**, 442-444.
- Lu, M. et Steitz, T.A. (2000) Structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L25 complexed with a 5S rRNA fragment at 1.8-Å resolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **97**, 2023-2028.
- Maguire, B.A. et Zimmermann, R.A. (2001) The ribosome in focus. *Cell*, **104**, 813-816.
- Maki, J.A., Schnobrich, D.J. et Culver, G.M. (2002) The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal assembly. *Mol. Cell*, **10**, 129-138.

- Malhotra, A. et Harvey, S.C. (1994) A quantitative model of the *Escherichia coli* 16S rRNA in the 30S ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.*, **240**, 308-340.
- Malhotra, A., Penczek, P., Agrawal, R.K., Gabashvili, I.S., Grassucci, R.A., Jünemann, R., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H. et Frank, J. (1998) *Escherichia coli* 70S ribosome at 15 Å resolution by cryo-electron microscopy: localization of fMet-tRNA_f^{met} and fitting of L1 protein. *J. Mol. Biol.*, **280**, 103-116.
- Mandiyan, V., Tumminia, S.J., Wall, J.S., Hainfels, J.F. et Boublik, M. (1991) Assembly of the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit reveals protein-dependent folding of the 16S rRNA domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **88**, 8174-8178.
- Markus, M.A., Gerstner, R.B., Draper, D.E. et Torchia, D.A. (1998) The solution structure of ribosomal protein S4 delta41 reveals two subdomains and a positively charged surface that may interact with RNA. *EMBO J.*, **17**, 4559-4571.
- Markus, M.A., Hinck A.P., Huang, S., Draper, D.E. et Torchia, D.A. (1997) High resolution structure of ribosomal protein L11-C76, a helical protein with a flexible loop that becomes structured upon binding to RNA. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 70-77.
- Márquez, V., Wilson, D.N., et Nierhaus, K.H. (2002) Functions and interplay of the tRNA-binding sites of the ribosome. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 133-140.
- Marzi, S., Knight, W., Brandi, L., Caserta, E., Soboleva, N., Hill, W.E., Gualerzi, C.O. et Lodmell, J.S. (2003) Ribosomal localization of translation initiation factor IF2. *RNA*, **9**, 958-969.
- Masquida, B., Felden, B. et Westhof, E. (1997) Context dependent RNA-RNA recognition in a three-dimensional model of the 16S rRNA core. *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 1021-1035.
- Matadeen, R., Patwardhan, A., Gowen, B., Orlova, E.V., Pape, T., Cuff, M., Mueller, F., Brimacombe, R. et van Heel, M. (1999) The *Escherichia coli* large ribosomal subunit at 7.5 Å resolution. *Structure Fold Des.*, **7**, 1575-1583.
- Mattaj, I.W. (1993) RNA recognition: a family matter. *Cell*, **73**, 837-840.

- May, R.P., Nowotny, V., Nowotny, P., Voss, H. et Nierhaus, K.H. (1992) Structural model of the 50S subunit of *E. coli* ribosomes from solution scattering. *EMBO J.*, **11**, 373-378.
- McCarthy, J.E. et Brimacombe, R. (1994) Prokaryotic translation: The interactive pathway leading to initiation. *Trends Genet.*, **10**, 402-407.
- McCutcheon, J.P., Agrawal, R.K., Philips, S.M., Grassucci, R.A., Gerchman, S.E., Clemons, W.M.Jr., Ramakrishnan, V. et Frank, J. (1999) Location of translational initiation factor IF3 on the small ribosomal subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **96**, 4301-4306.
- Melançon, P., Tappich, W.E. et Brakier-Gingras, L. (1992) Single-base mutations at position 2661 of *Escherichia coli* 23S rRNA increase efficiency of translational proofreading. *J. Bacteriol.*, **174**, 7896-7901.
- Melançon, P., Gravel, M., Boileau, G. et Brakier-Gingras, L. (1987) Reassembly of active 30S ribosomal subunits with an unmethylated *in vitro* transcribed 16S rRNA. *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 1022-1030.
- Merryman, C., Moazed, D., Daubresse, G. et Noller, H.F. (1999a) Nucleotides in 23S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.*, **285**, 107-113.
- Merryman, C., Moazed, McWhirter, J. et Noller, H.F. (1999b) Nucleotides in 16S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.*, **285**, 97-105.
- Miyamoto, A., Usui, M., Yamasaki, N., Yamada, N., Kuwano, E., Tanaka, I. et Kimura, M. (1999) Role of the N-terminal region of ribosomal protein S7 in its interaction with 16S rRNA which binds to the concavity formed by the beta-ribbon arm and the alpha-helix. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 591-598.
- Mitchell, P., Osswald, M. et Brimacombe, R. (1992) Identification of intermolecular RNA cross-links at the subunit interface of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochemistry*, **31**, 3004-3011.
- Mizushima, S. et Nomura, M. (1970) Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature*, **226**, 1214-1218.

- Moazed, D. et Noller, H.F. (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, **342**, 142-148.
- Moine, H. et Dahlberg, A.E. (1994) Mutations in helix 34 of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA have multiple effects on ribosome function and synthesis. *J. Mol. Biol.*, **243**, 402-412.
- Montpetit, A., Payant, C., Nolan, J.M. et Brakier-Gingras, L. (1998) Analysis of the conformation of the 3' major domain of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA using site-directed photoaffinity crosslinking. *RNA*, **4**, 1455-1466.
- Moore, P.B. (1998) The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 35-58.
- Moore, P.B. (2001) The ribosome at atomic resolution. *Biochemistry*, **40**, 3243-3250.
- Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2003) After the ribosome structures: how does peptidyl transferase work? *RNA*, **9**, 155-159.
- Morelli, M., Stier, G., Gibson, T., Joseph, C., Musco, G., Pastore, A. et Travè, G. (1995) The KH module has an $\alpha\beta$ fold. *FEBS lett.*, **358**, 193-198.
- Mueller, F. et Brimacombe, R. (1997a) A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. II. The RNA-protein interaction data. *J. Mol. Biol.*, **271**, 545-565.
- Mueller, F. et Brimacombe, R. (1997b) A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. I. Fitting the RNA to a 3D electron microscopic map at 20 Å. *J. Mol. Biol.*, **271**, 524-544.
- Mueller, F., Stark, H., van Heel, M., Rinke-Appel, J. et Brimacombe, R. (1997) A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. The topography of the functional centre. *J. Mol. Biol.*, **271**, 566-587.
- Mueller, F., Sommer, I., Baranov, P., Matadeen, R., Stoldt, M., Wohnert, J., Gorkach, M., van Heel, M. et Brimacombe, R. (2000) The 3D arrangement of the 23 S and 5 S rRNA in the *Escherichia coli* 50 S ribosomal subunit based on a cryo-electron microscopic reconstruction at 7.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **298**, 35-59.

- Murzin, A.G. (1993) OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.*, **12**, 861-867.
- Murzin, A.G. (1995) A ribosomal protein module in EF-G and DNA gyrase. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 25-26.
- Muth, G.W. et Hill, W.E. (2001) Phenanthroline–Cu(II). Cleavage as a probe of rRNA structure. *Methods*, **23**, 218–232.
- Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L. et Strobel, S.A. (2000) A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science*, **289**, 947-950.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T.H., Li, J. et Evans, P.R. (1990) Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small ribonucleoprotein A. *Nature*, **348**, 515-520.
- Nagai, K. (1996) RNA-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 53-61.
- Nakagawa, A., Nakashima, T., Taniguchi, M., Hosaka, H., Kimura, M. et Tanaka, I. (1999) The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome. *EMBO J.*, **18**, 1459-1467.
- Nevskaya, N., Tishchenko, S., Nikulin, A., al-Karadaghi, S., Liljas, A., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Garber, M. et Nikonov, S. (1998) Crystal structure of ribosomal protein S8 from *Thermus thermophilus* reveals a high degree of structural conservation of a specific RNA binding site. *J. Mol. Biol.*, **279**, 233-244.
- Nevskaya, N., Tischenko, S., Fedorov, R., Al-Karadaghi, S., Liljas, A., Kraft, A., Piendl, W., Garber, M., Nikonov, S. (2000) Archaeal ribosomal protein L1: the structure provides new insights into RNA binding of the L1 protein family. *Structure Fold Des.*, **8**, 363-371.
- Nevskaya, N., Tishchenko, S., Paveliev, M., Smolinskaya, Y., Fedorov, R., Piendl, W., Nakamura, Y., Toyoda, T., Garber, M. et Nikonov, S. (2002) Structure of ribosomal protein L1 from *Methanococcus thermolithotrophicus*. Functionally important structural invariants on the L1 surface. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **58**, 1023-1029.

- Newberry, V., Brosius, J. et Garrett, R (1978). Fragment of protein L18 from the *Escherichia coli* ribosome that contains the 5S RNA binding site. *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1753-1766.
- Newcomb, L.F. et Noller, H.F. (1999a) Directed hydroxyl radical probing of 16S ribosomal RNA in 70S ribosomes from internal positions of the RNA. *Biochemistry*, **38**, 945-951.
- Newcomb, L.F. et Noller, H.F. (1999b) Directed hydroxyl radical probing of 16S rRNA in the ribosome: spatial proximity of RNA elements of the 3' and 5' domains. *RNA*, **5**, 849-855.
- Nierhaus, K.H. (1990b) Reconstitution of ribosomes. Dans: *Ribosomes and protein synthesis: a practical approach*. (Spedding, G. éd.), Oxford University Press, New York, NY, pp.161-189.
- Nierhaus, K.H. (1990b) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future. *Biochemistry*, **29**, 4997-5000.
- Nierhaus, K.H., Schulze, H. et Cooperman, B.S. (1980) Molecular mechanisms of the ribosomal peptidyltransferase center. *Biochem. Int.*, **1**, 185-192.
- Nierhaus, K.H., Spahn, C., Burkhardt, N., Dabrowski, M., Diedrich, G., Einfeldt, E., Kamp, D., Marquèz, V., Patzke, S., Schäfer, M.A., Stelzl, U., Blaha, G., Willumeit, R. et Stuhmann, H.B. (2000) Ribosomal Elongation Cycle. Dans *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp.319-335.
- Nikonov, S., Nevskaya, N., Eliseikina, I., Fomenkova, N., Nikulin, A., Ossina, N., Garber, M., Jonsson, B.H., Briand, C., Al-Karadaghi, S., Svensson, A., Aevansson, A., Liljas, A. (1996) Crystal structure of the RNA binding protein L1 from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.*, **15**, 1350-1359.
- Nikulin, A., Serganov, A., Ennifar, E., Tishchenko, S., Nevskaya, N., Shepard, W., Portier, C., Garber, M., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Nikonov, S. et Dumas, P. (2000) Crystal structure of the S15-rRNA complex. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 273-277.

- Nikulin, A., Eliseikina, I., Tishchenko, T., Nevskaya, N., Davydova, N., Platonova, O., Piendl, W., Selmer, M., Liljas, A., Drygin, D., Zimmermann, R.A., Garber, M., et Nikonov, S. (2003) Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nature Struct. Biol.*, **10**, 104-108.
- Ninio, J. (1975) Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie*, **57**, 587-595.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**, 920-930.
- Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2001) RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: The A-minor motif. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **98**, 4899-4903.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F. et Nyborg, J. (1995a) Crystal structure of the ternary complex of phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and GTP analog. *Science*, **270**, 1464-1472.
- Noller, H.F. (1993) On the origin of the ribosome: Coevolution of subdomains of tRNA and rRNA. Dans: *The RNA world* (Gesteland, R.F. et Atkins, J.F. éds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, pp. 137-156.
- Noller, H.F. et Woese, C.R. (1981) Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*, **212**, 403-411.
- Noller, H.F. et Baucom, A. (2002) Structure of the 70S ribosome: implications for movement. *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 1159-1161.
- Noller, H.F., Hoffarth, V. et Zimniak, L. (1992) Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, **256**, 1416-1419.
- Noller, H.F., Powers, T., Allen, P.N., Moazed, D. et Stern, S. (1996) rRNA and translation: tRNA selection and movement in the ribosome. Dans: *Ribosomal RNA. Structure, Evolution, Processing and Function in protein synthesis*. (Zimmermann, R.A. et Dahlberg, A.E. éds), CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 239-258.
- Noller, H.F., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A. et Cate, J.H.D. (2002) Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett.*, **514**, 11-16.

- Noller, H.F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R.R., Kopylov, A.M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D.A., Gupta, R. et Woese, C.R. (1981) Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6167-6189.
- Noller, H.F., Green, R., Heilek, G., Hoffarth, V., Huttenhoffer, A., Joseph, S., Lee, I., Lieberman, K., Mankin, A. et Merryman, C. (1995) Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 997-1009.
- Noller, H.F., Cate, J., Dallas, A., Culver, G., Earnest, T.N., Green, R., Holmberg, L., Joseph, S., Lancaster, L., Lieberman, K., Merryman, C., Newcomb, L., Samaha, R., von Ahsen, U., Yusupov, M., Yusupova, G. et Wilson, K. (2000) Studies on the structure and function of ribosomes by combined use of chemical probing and X-ray crystallography. Dans: *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F. éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 129-150.
- Nowotny, V. et Nierhaus, K.H. (1988) Assembly of the 30S subunit from *Escherichia coli* ribosomes occurs via two assembly domains which are initiated by S4 and S7. *Biochemistry*, **27**, 7051-7055.
- Nomura, M., Yates, J.L., Dean, D. et Post, L.E. (1980) Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: structural homology of ribosomal RNA and ribosomal proteins mRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **77**, 7984-7988.
- Oakes, M.I., Henderson, E., Scheinman, A., Clark, M.W. et Lake, J.A. (1986a). Ribosome structure, function and evolution: mapping ribosomal RNA, proteins, and functional sites in three dimensions. Dans: *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes*. (Hardesty, B. et Kramer, G. éds), Springer-Verlag, New York, NY, pp. 47-67.
- Oakes, M.I., Clark, M.W., Henderson, E. et Lake, J.A. (1986b) DNA hybridization electron microscopy: ribosomal RNA nucleotides 1392-1407 are exposed in the cleft of the small subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **83**, 275-279.

- Oakes, M.I. et Lake, J.A. (1990b) DNA-hybridization electron microscopy: Localization of five regions of 16S rRNA on the surface of 30S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.*, **211**, 897-906.
- Oakes, M.I., Kahan, L. et Lake, J.A. (1990a) DNA-hybridization electron microscopy: Tertiary structure of 16S RNA. *J. Mol. Biol.*, **211**, 907-911.
- O'Connor, M. et Dahlberg, A.E. (1995) The involvement of two distinct regions of 23S RNA in tRNA selection. *J. Mol. Biol.*, **254**, 838-847.
- O'Connor, M. et Dahlberg, A.E. (1996) The influence of base identity and base pairing on the function of the α -sarcin loop of 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2701-2705.
- O'Connor, M. et Dahlberg, A.E. (2001) Enhancement of translation by the epsilon element is independent of the sequence of the 460 region of 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1420-1425.
- O'Connor, M., Thomas, C.L., Zimmermann, R.A. et Dahlberg, A.E. (1997) Decoding fidelity at the ribosomal A and P sites: influence of mutations in three different regions of the decoding domain in 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1185-1193.
- O'Connor, M., Asai, T., Squires, C. et Dahlberg, A.E. (1999) Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **96**, 8973-8978.
- O'Connor, M., Bayfield, M., Gregory, S.T., Mimi Lee, W.-C., Lodmell, J.S., Mankad, A., Thompson, J.R., Vila-Sanjuro, A., Squires, C.L., et Dahlberg, A.E. (2000) Probing ribosomal structure and function: analysis with rRNA and protein mutants. Dans: *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 217-228.
- Ogle, J.M., Carter, A.P. et Ramakrishnan, V. (2003) Insight into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 259-266.

- Ogle, J.M., Murphy IV, F.V., Tarry, M.J. et Ramakrishnan, V. (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*, **111**, 721-732.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons W.M.Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P. et Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, **292**, 897-902.
- Osswald, M., Greuer, R., Brimacombe, R., Stöffler, G., Baumert, H., et Fasold, H. (1987) RNA-protein cross-linking in *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits; determination of sites on 16S RNA that are cross-linked to proteins S3, S4, S5, S7, S8, S9, S11, S13, S19 and S21 by treatment with methyl p-azidophenyl acetimidate. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3221-3240.
- Osterberg, R. et Garret, R.A. (1977) Small-angle X-ray titration study on the complex formation between 5-S RNA and the L18 protein of the *Escherichia coli* 50-S ribosome particle. *Eur. J. Biochem.*, **79**, 67-72.
- Østergaard, P., Phan, H., Johansen, L.B., Egebjerg, Østergaard, L., Pörse, B.T. et Garret, R.A. (1998) Assembly of proteins and 5S rRNA to transcript of the major structural domains of 23S rRNA. *J. Mol. Biol.*, **284**, 227-240.
- Pape, T., Wintermeyer, W. et Rodnina, M.W. (1998) Complete kinetics mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. *EMBO J.*, **17**, 7490-7497.
- Pape, T., Wintermeyer W. et Rodnina, M.V. (1999) Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.*, **18**, 3800-3807.
- Pape, T., Wintermeyer, W. et Rodnina, M.V. (2000) Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature struct. Biol.*, **7**, 104-107.
- Pettersson, I., Hardy, S.J. et Liljas, A. (1976) The ribosomal protein L8 is a complex L7/L12 and L10. *FEBS Lett.*, **64** 135-138.
- Philippe, C., Eyermann, F., Bernard, L., Portier, C., Ehresmann, B. et Ehresmann, C. (1993) Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own

- translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **90**, 4394-4398.
- Piepenberg, O., Pape, T., Pleiss, J.A., Wintermeyer, W., Uhlenbeck, O.C. et Rodnina, M.V. (2000) Intact aminoacyl-tRNA is required to trigger GTP hydrolysis by elongation factor Tu on the ribosome. *Biochemistry*, **39**, 1734-1738.
- Pinard, R., Côté, M., Payant, C. et Brakier-Gingras, L. (1994) Positions 13 and 914 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA are involved in the control of translational accuracy. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 619-624.
- Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M, Avila, H., Bashan, A., Bartels, H., Auerbach, T., Jacobi, C., Hartsh, T., Yonath, F. et Franceschi, F. (2001) Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.*, **20**, 1829-1839.
- Pon, C.L., Paci, M., Pawlik, R.T. et Gualerzi, C.O. (1985) Structure-function relationship in *Escherichia coli* initiation factors. Biochemical and biophysical characterization of the interaction between IF-2 and guanosine nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8918-8924.
- Pörse, B.T. et Garrett, R.A. (1995) Mapping important nucleotides in the peptidyl transferase centre of 23S rRNA using a random mutagenesis approach. *J. Mol. Biol.*, **249**, 1-10.
- Powers, T. et Noller, H.F. (1990) Dominant lethal mutations in a conserved loop in 16S rRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **87**, 1042-1046.
- Powers, T. et Noller, H.F. (1991) A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.*, **10**, 2203-2214.
- Powers, T. et Noller, H.F. (1995) Hydroxyl radical footprinting of ribosomal proteins on 16S rRNA. *RNA*, **1**, 194-209.
- Powers, T., Daubresse, G. et Noller, H.F. (1993) Dynamics of in vitro assembly of 16S rRNA into 30 S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.*, **232**, 362-374.
- Puglisi, E.V., Green, R., Noller, H.F. et Puglisi, J.D. (1997) Structure of a conserved RNA component of the peptidyl transferase centre. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 775-778.

- Puglisi, J.D, Blanchard, S.C., Green, R. (2000) Approaching translation at atomic resolution. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 855-861.
- Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A. et Frank, J. (1987) Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *J. Microsc.*, **146**, 113-136.
- Raibaud, S., Lebars, I., Guillier, M., Chiaruttini, C., Bontems, F., Rak, A., Garber, M., Allemand, F., Springer, M. et Dardel, F. (2002) NMR structure of bacterial ribosomal protein L20: implications for ribosome assembly and translational control. *J. Mol. Biol.*, **323**, 143-151.
- Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, **108**, 557-572.
- Ramakrishnan, V. et White, S.W. (1992) Structure of ribosomal protein S5 reveals sites of interaction with 16S RNA. *Nature*, **358**, 768-771.
- Ramakrishnan, V. et White, S.W. (1998) Ribosomal protein structures: insight into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 208-212.
- Ramakrishnan, V. et Moore, P.B. (2001) Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 144-154.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D. et Varani G. (2000) RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J.*, **19**, 997-1009.
- Rawat, U.B.S., Zavialov, A.V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R.A., Linde, J., Vestergaard, B., Ehrenberg, M. et Frank, J. (2003) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature*, **421**, 90-94.
- Reinisch, K.M., Chen, L., Verdine, G.L. et Lipscomb, W.N. (1995) The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell*, **82**, 143-153.

- Ringquist, S., Jones, T., Snyder, E.E., Gibson, T., Boni, I. et Gold, L. (1995) High-affinity RNA ligands to *Escherichia coli* ribosomes and ribosomal protein S1: comparison of natural and unnatural binding sites. *Biochemistry*, **34**, 3640-3648.
- Rodnina, M.V. et Wintermeyer, W. (2001) Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading, and induced fit. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 415-435.
- Rodina, M.V. et Wintermeyer, W. (2003) Peptide bond formation on the ribosome: structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 334-340.
- Rodnina, M.V., Savelsbergh, A., Katunin, V.I. et Wintermeyer, W. (1997) Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature*, **385**, 37-51.
- Rodnina, M.V., Daviter, T., Gromadski, K. et Wintermeyer, W. (2002) Structural dynamics of ribosome RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie*, **84**, 745-754.
- Rodnina, M.V., Pape, T., Fricke, R, Kuhn, L. et Wintermeyer, W. (1996) Initial binding of the elongation factor Tu•GTP•aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J. Biol. Chem.*, **271**, 646-652.
- Rodnina, M.V., Stark, H., Savelsbergh, A., Wieden, H.J., Mohr, D., Matassova, N.B., Peske, F., Daviter, T., Gualerzi, C.O., et Wintermeyer, W. (2000) GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *Biol. Chem.*, **381**, 377-387.
- Rould, M.A., Perona, J.J. et Steitz, T.A. (1991) Structural basis of anticodon loop recognition by glutamyl-tRNA synthetase. *Nature*, **352**, 213-218.
- Rozenski, J., Crain, P.F. et McCloskey, J.A. (1999) The RNA Modification Database: update. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 196-197.
- Ryter, J.M. et Schultz, S.C. (1998) Molecular basis of double stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.*, **17**, 7505-7513.
- Saarma, U. et Remme, J. (1992) Novel mutants of 23S RNA: characterization of functional properties. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3147-3152.

- Saarma, U., Spahn, C.M., Nierhaus, K.H. et Remme, J. (1998) Mutational analysis of the donor substrate binding site of the ribosomal peptidyltransferase center. *RNA*, **4**, 189-194.
- Said, B., Cole, J.R. et Nomura, M. (1988) Mutational analysis of the L1 binding site of 23S rRNA in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 10529-10545.
- Saito, K. et Nomura, M. (1994) Post-transcriptional regulation of the *str* operon in *Escherichia coli*. Structural and mutational analysis of the target site for translational repressor S7. *J. Mol. Biol.*, **235**, 125-139.
- Saito, K., Mattheakis, L.C. et Nomura, M (1994) Post-transcriptional regulation of the *str* operon in *Escherichia coli*. Ribosomal protein S7 inhibits coupled translation of S7 but not its independent translation. *J. Mol. Biol.*, **235**, 111-124.
- Samaha, R.R., Green, R. et Noller, H.F. (1995) A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature*, **377**, 309-314.
- Samaha, R.R., O'Brien, B., O'Brien, T.W. et Noller, H.F. (1994) Independent in vitro assembly of a ribonucleoprotein particle containing the 3' domain of 16S rRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **91**, 7884-7888.
- Savelsberg, A., Katunin, V.I., Mohr, D., Peske, F., Rodnina, M.V. et Wintermeyer, W. (2003) An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol. Cell*, **11**, 1517-1523.
- Sayers, E.W., Gerstner, R.B., Draper, D.E. et Torchia D.A. (2000) Structural preordering in the N-terminal region of ribosomal protein S4 revealed by heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **39**, 13602-13613.
- Schaup, H.W., Green, M. et Kurland, C.G. (1971) Molecular interactions of ribosomal components. II. Site-specific complex formation between 30S proteins and ribosomal RNA. *Mol. Gen. Genet.*, **112**, 1-8.
- Scheinman, A. Atha, T., Aguinaldo, A.M., Kahan, L., Shankweiler, G. et Lake, J.A. (1992) Mapping the three-dimensional locations of ribosomal RNA and proteins. *Biochimie*, **74**, 307-317.
- Schlax, P.J., Xavier, K.A., Gluick, T.C. et Draper, D.E. (2001) Translational repression of the *Escherichia coli* α operon mRNA: importance of an mRNA

- conformational switch and a ternary entrapment complex. *J. Biol. Chem.*, **276**, 8494-8501.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. et Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyltransferase centre in eubacteria. *Nature*, **413**, 814-821.
- Schlünzen, F. Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. et Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell*, **102**, 615-623.
- Schmeing, T.M., Seila, A.C., Hansen, J.L., Freeborn, B., Soukup, J.K., Scaringe, S.A., Strobel, S.A., Moore, P.B. et Steitz, T.A. (2002) A pretranslocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 225-230.
- Schuler, D. et Brimacombe, R. (1988) The *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit; an optimized three-dimensional fit between the ribosomal proteins and the 16S RNA. *EMBO J.*, **7**, 1509-1513.
- Schwarzbauer, J. et Craven, G.R. (1981) Apparent association constant for *E. coli* ribosomal proteins S4, S7, S8, S15, S17 and S20 binding to 16S RNA. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2223-2237.
- Schwedler, G., Albrecht-Ehrlich, R. et Rak, K.H. (1993) Immunoelectron microscopic localization of ribosomal proteins BS8, BS9, BS20, BL3 and BL21 on the surface of 30S and 50S subunits from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 361-369.
- Scott, L.G. et Williamson, J.R. (2001) Interaction of the *Bacillus stearothermophilus* ribosomal protein S15 with its 5'-translational operator mRNA. *J. Mol. Biol.*, **314**, 413-422.
- Sengupta, J., Agrawal, R.K. et Frank, J. (2001) Visualisation of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **98**, 11991-11996.

- Serganov, A., Ennifar, E., Portier, C., Ehresmann, B. et Ehresmann, C. (2002) Do mRNA and rRNA binding sites of *E. coli* ribosomal protein S15 share common structural determinants? *J. Mol. Biol.*, **320**, 963-978.
- Serganov, A., Polonskaia, A., Ehresmann, B., Ehresmann, C. et Patel, D.J. (2003) Ribosomal protein S15 represses its own translation via adaptation of an rRNA-like fold within its mRNA. *EMBO J.*, **22**, 1898-1908.
- Sergieiev, P., Dokudovskaya, S., Romanova, E., Topin, A., Bogdanov, A., Brimacombe, R. et Dontsova, O. (1998) The environment of 5S rRNA in the ribosome: cross-links to the GTPase-associated area of 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2519-2525.
- Sergieiev, P., Leonov, A., Dukodovskaya, S., Shpanchenko, O., Dontsova, Bogdanov, A., Rinke-Appel, J., Mueller, F., Osswald, M., von Knoblauch, K., et Brimacombe, R. (2001) Correlating the X-ray structure for halo- and thermophilic ribosomal subunits with biochemical data for the *Escherichia coli* ribosome. *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **66**, 87-100.
- Shatsky, I.N., Bakin, A.V., Bogdanov, A.A. et Vasiliev, V.D. (1991) How does the mRNA pass through the ribosome? *Biochimie*, **73**, 937-945.
- Shevack, A., Gewitz, H.S., Hennemann, B., Yonath, A. et Wittmann, H.G. (1985) Characterization and crystallization of ribosomal particles from *Halobacterium marismortui*. *FEBS Lett.*, **184**, 68-71.
- Shine, J. et Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **71**, 1342-1346.
- Shine, J. et Dalgarno, L. (1975) Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*, **254**, 34-38.
- Shpanchenko, O.V., Zvereva, M.I., Dontsova, O.A., Nierhaus, K.H. et Bogdanov, A.A. (1996) 5S rRNA sugar-phosphate backbone protection in complexes with specific ribosomal proteins. *FEBS Lett.*, **394**, 71-75.

- Siomi, H. Matunis, M.J., Michael, W.M. et Dreyfuss, G. (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1193-1198.
- Sommer, A. et Traut, R.R. (1976) Identification of neighbouring protein pairs in the *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunit by crosslinking with methyl-4-mercaptobutyrimidate. *J. Mol. Biol.*, **106**, 995-1015.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A. et Barford, D. (2000) The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell*, **100**, 311-321.
- Southworth, D.R., Brunelle, J.L. et Green, R. (2002) EFG-independent translocation of the mRNA:tRNA complex is promoted by modification of the ribosome with thiol-specific reagents. *J. Mol. Biol.*, **324**, 611-623.
- Spahn, C.M.T., Grassucci, R.A., Penczek, P. et Frank, J. (1999) Direct three-dimensional localization and positive identification of RNA helices within the ribosome by means of genetic tagging and cryo-electron microscopy. *Structure*, **7**, 1567-1573.
- Spahn, C.M.T., Penczek, P., Leith, A., Frank, J. (2000) A method for differentiating protein from nucleic acids in intermediate-resolution density maps: cryo-electron microscopy defines the quaternary structure of the *Escherichia coli* 70S ribosome. *Structure*, **8**, 937-948.
- Spierer, P. et Zimmermann, R.A. (1976) RNA-protein interactions in the ribosome. Binding of proteins L1, L3, L6, L13 and L23 to specific fragments of the 23S RNA. *FEBS Lett.*, **68**, 71-75.
- Spierer, P., Bogdanov, A.A., et Zimmermann, R.A. (1978) Parameters for the interaction of ribosomal proteins L5, L18, and L25 with 5S RNA from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **17**, 5394-5398.
- Spiridinova, V.A., Rozhdestvensky, T.S. et Kopylov, A.M. (1999) A study of the thermophilic ribosomal protein S7 binding to the truncated S12-S7 intercistronic

- region provides more insight into the mechanism of regulation of the *str* operon of *E. coli*. *FEBS Lett.*, **460**, 353-356.
- Sprengart, M.L. et Porter, A.G. (1997) Functional importance of RNA interactions in selection of translation initiation codons. *Mol. Microbiol.*, **24**, 19-28.
- Springer, M et Portier, C. (2003) More than one way to skin a cat: translational regulation by ribosomal protein S15. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 420-422.
- Stagg, S.M., Mears, J.A. et Harvey, S.C. (2003) A structural model for the assembly of the 30S subunit of the ribosome. *J. Mol. Biol.*, **328**, 49-61.
- Stahl, G., McCarty, G.P. et Farabaugh, P.J. (2002) Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 178-183.
- Stark, H. (2002) Three-dimensional electron cryomicroscopy of ribosomes. *Current protein and peptide science*, **3**, 79-91.
- Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., van Heel, M. et Wintermeyer, W. (2000) *Cell*, **100**, 301-309.
- Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., Zemlin, F., Wintermeyer, W. et van Heel, M. (2002) Ribosome interactions of aminoacyl and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 849-854.
- Stark, H., Müller, F., Orlova, E.V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R., et van Heel, M. (1995). The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure*, **3**, 815-821.
- Stark, H., Orlova, E.V., Rinke-Appel, J., Junke, N., Müller, F., Rodnina, M., Wintermeyer, W., Brimacombe, R. et van Heel, M. (1997) Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopy. *Cell*, **88**, 19-28.
- Steitz, T.R. (2000) Structural Biology: Enhanced: The ribosome is a ribozyme. *Science*, **289**, 878-879.
- Steitz, J.A. et Jakes, K. (1975) How ribosomes select initiator regions in mRNA: base-pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during

- initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **72**, 4734-4738.
- Stelzl, U., Zengel, J.M., Tovbina, M., Walker, M., Nierhaus, K.H., Lindahl, L. et Patel, D.J. (2003) RNA-structural mimicry in *E. coli* ribosomal protein L4-dependent regulation of the S10 operon. *J. Biol. Chem.*, **278**, 28237-28245.
- Stern, S., Weiser, B. et Noller, H.F. (1988) Model for the three-dimensional folding of 16S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, **204**, 447-481.
- Stöffler, G. et Stöffler-Meilicke, M. (1986) Immuno electron microscopy on *Escherichia coli* ribosomes. Dans: *Structure, Function and Genetics of Ribosomes* (Hardesty, B. et Kramer, G. éds), Springer-Verlag, New York, NY, pp. 28-46.
- Stöffler, G. et Stöffler-Meilicke, M. (1987) The topography of ribosomal proteins on the surface of the 30S subunit of *Escherichia coli*. *Biochimie*, **69**, 1049-1064.
- Stöffler, G. et Stöffler-Meilicke, M. (1990) Topography of the ribosomal proteins from *Escherichia coli* within the intact subunits as determined by immunoelectron microscopy and protein-protein crosslinking. In *The ribosome: Structure, Function and Evolution* (Hill, W.E., Dahlberg, A., Garrett, R.A., Moore, P.B., Schlessinger, D. et Warner, J.R., éds), American society for microbiology, Washington, DC. pp.123-133.
- Stoldt, M., Wöhnert, J., Görlach, M. et Brown, L.R. (1998) The NMR structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L25 shows homology to general stress protein and glutaminyl-tRNA synthetases. *EMBO J.*, **17**, 6377-6384.
- Stoldt, M., Wöhnert, J., Ohlenschläger, O., Görlach, M. et Brown, L.R. (1999) The NMR structure of the 5S rRNA E-domain-protein L25 complex shows preformed and induced recognition. *EMBO J.*, **18**, 6508-6521.
- Studer, S.M., Feinberg, J.S. et Joseph, S. (2003) Rapid kinetic analysis of EF-G-dependent mRNA translocation in the ribosome. *J. Mol. Biol.*, **327**, 369-381.
- Stringer, E.A., Sarkar, P., et Maitra, U. (1977) Function of initiation factor 1 in the binding and release of initiation factor 2 from ribosomal initiation complexes in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1739-1744.

- Sussman, J.K., Simons, E et Simons R.W. (1996) *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon *in vivo*. *Mol. Microbiol.*, **21**, 347-360.
- Svergun, D.I. et Nierhaus, K.H. (2000) A map of protein-rRNA distribution in the 70S *Escherichia coli* ribosome. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14432-14439.
- Svergun, D.I., Koch, M.H., Pedersen, J.S. et Serdyuk, I.N. (1996) Structural model of the 50S subunit of *E. coli* ribosomes from solution scattering. *Basic Life Sci.*, **64**, 149-174.
- Szewczak, A.A. et Moore, P.B. (1995) The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J. Mol. Biol.*, **247**, 81-98.
- Tan, R., Chen, L., Buettner, J.A., Hudson, D. et Frankel, A.D. (1993) RNA recognition by an isolated α helix. *Cell*, **73**, 1031-1040.
- Tanaka, I., Nakagawa, A., Hosaka, H., Wakatsuki, S., Mueller, F. et Brimacombe, R. (1998) Matching the crystallographic structure of ribosomal protein S7 to a three-dimensional model of the 16S ribosomal RNA. *RNA*, **4**, 542-550.
- Tang, C.K. et Draper, D.E. (1989) Unusual mRNA pseudoknot structure is recognized by a protein translational repressor. *Cell*, **57**, 531-536.
- Tapprich, W.E. et Dahlberg A.E. (1990) A single base mutation at position 2661 in *E. coli* 23S ribosomal RNA affects the binding of ternary complex to the ribosome. *EMBO J.*, **9**, 2649-2655.
- Tate, W.P. et Mannering, S.A. (1996) Three, four or more: the translational stop signal at length. *Mol. Microbiol.*, **21**, 213-219.
- Terhorst, C., Moller, W., Laursen, R. et Wittmann-Liebold, B. (1973) The primary structure of an acidic protein from 50-S ribosomes of *Escherichia coli* which is involved in GTP hydrolysis dependent on elongation factors G and T. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 138-152.
- Thompson, J., Kim, D.F., O'Connor, M., Lieberman, K.R., Bayfield, M.A., Gregory, S.T., Green, R., Noller, H.F. et Dahlberg AE (2001) Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **98**, 9002-9007.

- Tishchenko, S., Nikulin, A., Fomenkova, N., Nevskaya, N., Nikonov, O., Dumas, P., Moine, H., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Piendl, W., Lamzin, V., Garber, M., Nikonov, S. (2001) Detailed analysis of RNA-protein interactions within the ribosomal protein S8-rRNA complex from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J. Mol. Biol.*, **311**, 311-324.
- Tocij, A., Schlünzen, F., Janell, D., Glühmann, M., Hansen, H.A.S., Harms, J., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. et Yonath, A. (1999) The small ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*, at 4.5 Å resolution: Pattern fittings and the identification of a functional site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **96**, 14252-14257.
- Tomsic, J., Vitali, L.A., Daviter, T., Savelsbergh, A., Spurio, R., Striebeck, P., Wintermeyer, W. et Rodnina, M.V. et Gualerzi, C.O. (2000) Late events of translation initiation in bacteria: a kinetic analysis. *EMBO J.*, **19**, 2127-2136.
- Trakhanov, S.D., Yusupov, M.M., Agalarov, S.C., Garber, M.B., Ryzantsev, S.N., Tishchenko, S.V. et Shirokov, V.A. (1987) Crystallization of 70S ribosomes and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.*, **220**, 319-322.
- Traub, P. et Nomura, M. (1968) Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **59**, 777-784.
- Traub, R.R., Lambert, J.M., Boileau, G. et Kenny, J.W. (1980) Dans: *Ribosomes, Structure, Function and Genetics*. (Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Davies, K., Kahan, L. et Nomura, M., édés), Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, pp. 89-110.
- Traub, R.R., Dey, D., Bochkariov, D.E., Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Hamman, B. et Jameson, D. (1995) Location and domain structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12: site specific cysteine crosslinking and attachment of fluorescent probes *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 949-958.
- Traub, R.R., Dey, D., Bochkariov, D.E., Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Hamman, B. et Jameson, D. (1995) Location and domain structure of *Escherichia coli*

- ribosomal protein L7/L12: site specific cysteine crosslinking and attachment of fluorescent probes. *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 949-958.
- Triman, K.L. (1995) Mutation analysis of 16S ribosomal RNA structure and function in *Escherichia coli*. *Adv. Genet.*, **33**, 1-39.
- Triman, K.L. (1996) The 16S ribosomal RNA mutation database (16SMDB). *RNA*, **24**, 166-168.
- Triman, K.L., Peister, A., et Goel, R.A. (1998) Expanded version of the 16S and 23S ribosomal RNA mutation databases (16SMDBexp and 23SMDBexp). *Nucleic Acids Res.*, **26**, 280-284.
- Tzareva, N.V., Makhno, V.I. et Boni, I.V. (1994) Ribosome-messenger recognition in the absence of the Shine-Dalgarno interactions. *FEBS Lett.*, **337**, 189-194.
- Uhlein, M., Wagoner, W., Urlaub, H. et Wittmann-Liebold, B. (1998) Functional implications of ribosomal protein L2 in protein biosynthesis as shown by *in vivo* replacement studies. *Biochem. J.*, **331**, 423-430.
- Unger, J., Berg, A., Al-Kharadaghi, S., Nikulin, A., Nikonov, S., Davydova, N., Nevskaya, N., Garber, M. et Liljas, A. (1998) The crystal structure of ribosomal protein L22 from *Thermus thermophilus*: insights into the mechanism of erythromycin resistance. *Structure*, **6**, 1577-1586.
- Urlaub, H., Kruff, V., Bischof, O., Muller, E.C. et Wittmann-Liebold, B. (1995) Protein-rRNA binding features and their structural and functional implications in ribosomes as determined by cross-linking studies. *EMBO J.*, **14**, 4578-4588.
- Urlaub, H., Thiede, B., Muller, E.C., Brimacombe, R. et Wittmann-Liebold, B. (1997) Identification and sequence analysis of contact sites between ribosomal proteins and rRNA in *Escherichia coli* 30 S subunits by a new approach using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry combined with N-terminal microsequencing. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14547-14555.
- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M. et Frank, J. (2003) Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell*, **114**, 123-134.

- Valle, M., Sengupta, J., Swami, N.K., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H., Agrawal, R.K. et Frank, J. (2002) Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J.*, **21**, 3557-3567.
- van Heel, M. (2000) Unveiling ribosomal structures: the final phases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 259-264.
- Varani, G. (1997) RNA-protein intermolecular recognition. *Accounts of Chemical Research*, **30**, 189-195.
- Vasiliev, V.D., Selivanova, O.M., Baranov, V.I. et Spirin A.S. (1983) Structural study of translating ribosomes from *Escherichia coli*. I. Electron microscopy. *FEBS Lett.*, **155**, 167-172.
- Verschoor, A., Frank, J., Wagenknecht, T., Boublik, M. (1986) Computer-averaged views of the 70S monosome from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **187**, 581-590.
- Vestergaard, B., Bich Van, L., Andersen, G.R., Nyborg, J., Buckingham, R.H. et Kjeldgaard, M. (2001) Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell*, **8**, 1375-1382.
- Vila, A., Viril-Farley, J. et Tapprich, W.E. (1994) Pseudoknot in the central domain of small subunit ribosomal RNA is essential for translation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **91**, 11148-11152.
- Vila-Sanjurjo, A. et Dahlberg, A.E. (2000) Mutational analysis of the conserved bases C1402 and A1500 in the center of the decoding domain of *Escherichia coli* 16S rRNA reveals an important tertiary interaction. *J. Mol. Biol.*, **308**, 457-463.
- Vila-Sanjurjo, A., Ridgeway, W.K., Seymaner, V., Zhang, W., Santoso, S., Yu, K., et Cate, J.H.D. (2003) X-ray crystal structures of the WT and a hyper-accurate ribosome from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **100**, 8682-8687.
- Vicens, Q. et Westhof, E. (2001) Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*, **9**, 647-658.
- Von Böhlen, K., Makowski, I., Hansen, H.A.S., Bartels, H., Berkovitch-Yellin, Z., Zaytzev-Bashan, A., Meyer, S., Paulke, C., Franceschi, F. et Yonath, A. (1991) Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large

- ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting at 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **222**, 11-15.
- Voorma, H.O. (1996) Control of translation initiation in prokaryotes. Dans: *Translational control*. (Hershey, J.W.B., Mathews, M.B., et Sonenberg, N. éds), Cold spring Harbor laboratory press, Cold spring Harbor, NY, pp.759-777.
- Wahl, M.C., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. et Huber, R. (2000) Flexibility, conformational diversity and two dimerization modes in complexes of ribosomal protein L12. *EMBO J.*, **19**, 174-186.
- Wakao, H., Romby, P., Ebel, J.P., Grunberg-Manago, M., Ehresmann, C. et Ehresmann, B. (1991) Topography of the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit-initiation factor 2 complex. *Biochimie*, **73**, 991-1000.
- Walleczek, J., Schüler, D., Stöffler-Meilicke, M., Brimacombe, R., et Stöffler, G. (1988) A model for the spatial arrangement of the proteins in the large subunit of the *Escherichia coli* ribosome. *EMBO J.*, **7**, 3571-3576.
- Weitzmann, C.J., Cunningham, P.R. et Ofengand, J. (1990) Cloning, *in vitro* transcription, and biological activity of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic acids Res.*, **18**, 3515-3520.
- Weston, S.A., Lahm, A. et Suck, D. (1992) X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **226**, 1237-1256.
- Whirl-Carrillo, M., Gabashvili, I.S., Basa, M., Banatao, D.R. et Altman, R.B. (2002) Mining biochemical information: Lessons taught by the ribosome. *RNA*, **8**, 279-289.
- White, S.A., Nilges, M., Huang, A., Brunger, A.T., Moore, P.B. (1992) NMR analysis of helix I from 5S RNA of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **31**, 1610-1620.
- White, S.W., Clemons, W.M.Jr., Davies, C., Ramakrishnan, V. et Wimberly, B.T., (2000) Structures of bacterial ribosomal proteins: High-resolution probes of the architecture and mechanism of the ribosome. Dans *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 73-84.

- Williamson, J.R. (2003) After the ribosome structure: How are the subunits assembled? *RNA*, **9**, 165-167.
- Willumeit, R., Diedrich, G., Forthmann, S., Beckmann, J., May, R.P., Stuhmann, H.B., Nierhaus, K.H. (2001) Mapping proteins of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1520**, 7-20.
- Wilson, K.S., Appelt, K., Badger, J., Tanaka, I., White, S.W. (1986) Crystal structure of a prokaryotic ribosomal protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **83**, 7251-7255.
- Wimberly, B.T. (2003) Crystal structure of the ribosomal subunits. Dans *Translation Mechanisms* (Lapointe, J. et Brakier-Gingras, L. édés), Landes Bioscience, Georgetown, TX., et Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, pp. 237-242.
- Wimberly, B.T., White, S.W. et Ramakrishnan, V. (1997) The structure of ribosomal protein S7 at 1.9 Å resolution reveals a beta-hairpin motif that binds double-stranded nucleic acids. *Structure*, **5**, 1187-1198.
- Wimberly, B.T., Guymon, R., McCutcheon, J.P., White, S.W. et Ramakrishnan, V. (1999) A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11-RNA complex. *Cell*, **97**, 491-502.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonrhein, C, Hartsch, T. et Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**, 327-339.
- Wittman H.G. et Wittman-Liebold, B. (1974) Chemical structure of the bacterial ribosomal proteins. Dans: *Ribosomes*. (Nomura, M. Tissières, A. et Lengyel, P., édés), Cold Spring Harbor, NY, pp. 115-140.
- Woese, C.R., Magrum, L.J., Gupta, R., Siegel, R.B., Stahl, D.A., Kop, J., Crawford, N., Brosius, J. Gutell, R., Hogan, J.J. et Noller H.F. (1980) Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2275-2293.
- Woestenenk, E.A., Gongadze, G.M., Shcherbakov, D.V., Rak, A.V., Garber, M.B., Härd, T. et Berglund, H. (2002) The solution structure of ribosomal protein L18

- from *Thermus thermophilus* reveals a conserved RNA-binding fold. *Biochem. J.*, **363**, 553-561.
- Wower, I.K., Wower, J. et Zimmermann, R.A. (1998) Ribosomal protein L27 participates in both 50S subunit assembly and the peptidyl transferase reaction. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19847-19852.
- Wower, I., Kowaleski, M.P., Sears, L.E. et Zimmerman, R.A. (1992). Mutagenesis of ribosomal protein S8 from *Escherichia coli*: defects in regulation of the *spc* operon. *J. Bacteriol.*, **174**, 1213-1221.
- Wower, J., Kirillov, S.V., Wower, I.K., Guven, S., Hixson, S.S. et Zimmermann, R.A. (2000) Transit of tRNA through the *Escherichia coli* ribosome. Cross-linking of the 3' end of tRNA to specific nucleotides of the 23 S ribosomal RNA at the A, P, and E sites. *J. Biol. Chem.*, **275**, 37887-37894.
- Wu, H., Wower, I. et Zimmermann, R.A. (1993) Mutagenesis of ribosomal protein S8 from *Escherichia coli*: expression, stability, and RNA-binding properties of S8 mutants. *Biochemistry*, **32**, 4761-4768.
- Yates, J.L., Arfsten, A.E. et Nomura, M. (1980) *In vitro* expression of *Escherichia coli* ribosomal protein genes: autogenous inhibition of translation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **77**, 1837-1841.
- Yonath, A. (2002) The search and its outcome: High-resolution structure of ribosomal particles from mesophilic, thermophilic and halophilic bacteria at various functional states. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 257-273.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D. et Puglisi, J.D. (1999) Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science*, **285**, 1722-1725.
- Yonath, A., Mussig, J., Tesche, B., Lorenz, S., Erdmann, V.A. et Wittmann, H.G. (1980) Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Int.*, **1**, 428-435.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. et Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, **292**, 883-896.

- Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M., Cate, J.H.D. et Noller H.F. (2001) The path of messenger RNA through the Ribosome. *Cell*, **106**, 233–241.
- Zavialov, A.V. et Ehrenberg, M. (2003) Peptidyl-tRNA regulates the GTPase activity of translation factors. *Cell*, **114**, 113–122.
- Zavialov, A.V., Buckingham, R.H. et 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. et 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.
- Zengel, J.M. et Lindahl, L. (1994) Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **47**, 331-370.
- Zhang, B. et Cech, T. R. (1998) Peptide bond formation by *in vitro* selected ribozymes. *Nature*, **390**, 96-100.
- Zimmermann, R.A. (1996) The decoding domain. Dans: *Ribosomal RNA. Structure, Evolution, Processing and Function in protein synthesis*. (Zimmermann, R.A. et Dahlberg, A.E. éds), CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 277-310.
- Zimmermann, R.A., Alimov, I., Uma, K., Wu, H., Wower, I., Nikonowicz, E.P., Drygin, D., Dong, P. et Jiang, L. (2000) How ribosomal protein and rRNA recognize one another. Dans: *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. (Garrett, R.A., Douthwaite, S.R., Liljas, A., Matheson, A.T., Moore, P.B. et Noller, H.F., éds), ASM Press, Washington, DC, pp. 93-104.
- Zwieb, C., Glotz, C. et Brimacombe, R. (1981) Secondary structure comparisons between small subunit ribosomal RNA molecules from six different species. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3621-3640.

