



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Etude de la conformation de l'ARNt initiateur et de l'ARN ribosomique 16S d'Escherichia coli lors de l'initiation de la biosynthese des proteines : relations structure-fonction
Author(s)	Wakao, Hiroshi
Description	Présentée à l'U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Terre de l'Université Louis Pasteur, pour obtenir le titre de docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg en Biologie Moléculaire
Degree Grantor	Université Louis Pasteur
Degree Name	博士(医学)
Issue Date	1990
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/40188
Type	journal article
File Information	wakao_thesis.pdf



THESE

Présentée à l'U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Terre
de l'Université Louis Pasteur

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
DE STRASBOURG
en Biologie Moléculaire

par

Hiroshi WAKAO

ETUDE DE LA CONFORMATION DE L'ARNt
INITIATEUR ET DE L'ARN RIBOSOMIQUE 16S
D'ESCHERICHIA COLI LORS DE L'INITIATION DE
LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES.
RELATIONS STRUCTURE-FONCTION.

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 4 JANVIER 1990
DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M	J.P.	EBEL
MME	C.	BRANLANT
M	R.	GIEGE
MME	M.	GRUNBERG-MANAGO
M	B.	EHRESMANN
MME	C.	EHRESMANN

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité

THESE

Présentée à l'U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Terre
de l'Université Louis Pasteur

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
DE STRASBOURG
en Biologie Moléculaire

par

Hiroshi WAKAO

ETUDE DE LA CONFORMATION DE L'ARNt
INITIATEUR ET DE L'ARN RIBOSOMIQUE 16S
D'*ESCHERICHIA COLI* LORS DE L'INITIATION DE
LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES.
RELATIONS STRUCTURE-FONCTION.

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 4 JANVIER 1990
DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M	J.P.	EBEL
MME	C.	BRANLANT
M	R.	GIEGE
MME	M.	GRUNBERG-MANAGO
M	B.	EHRESMANN
MME	C.	EHRESMANN

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre Invité

Je tiens tout d'abord à témoigner ma reconnaissance au gouvernement français et à tout le peuple français pour m'avoir donné l'occasion d'étudier dans un des meilleurs instituts scientifiques français.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Pierre Ebel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail.

Je remercie vivement Madame le Professeur M. Grunberg-Manago et Madame C. Branlant de l'honneur qu'elles me font en jugeant cette thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur R. Giegé qui a suivi mon travail avec intérêt et je le remercie de bien vouloir faire partie de ce jury.

J'exprime ma gratitude à Bernard et Chantal Ehresmann, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire et m'ont constamment encouragé et guidé dans ce travail. Je n'oublierai jamais leur disponibilité et leur chaleur humaine aussi bien dans le domaine scientifique que dans la vie privée.

Mes plus profonds remerciements vont également à Pascale Romby pour son aide efficace, sa constante disponibilité et ses chaleureux encouragements durant ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Eric Westhof pour m'avoir fait découvrir le monde de la modélisation graphique par ordinateur.

Je ne voudrais pas oublier tous les amis du Laboratoire, qui savent s'amuser, travailler et avec qui j'ai partagé des moments très heureux : Arend, Claude, Christine, Christine, Flore, Florence, Marylène, Hervé, Nasser et Roland.

Je voudrais aussi remercier Joceline Colin pour la synthèse des oligonucléotides indispensables à ce travail.

Enfin, je remercie Bee, Gilbert et Well de leur intérêt pour mon travail et de leur aide dans la réalisation de cette thèse.

祇園精舎乃鐘乃聲諸行無常乃響
有り。娑羅雙樹乃花の色盛者必衰
理りそあらはす。たごれる人そ久しからず。
惟春乃夜乃夢アでもし。醒き者も
逝には成ひぬ。歸に國の利は度
に同じ。

いろはにほへも

ろりぬるを

あかふたわれ

ふねくらむ

うろのおくせま

けふこゑと

あさきゆめみし

ふしもせす

諸行無常是生滅法

盛衰成已寂滅空衆

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	3
MATERIEL ET METHODES	21
I. TAMPONS UTILISES	23
II. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE	25
1. Culture des bactéries	25
2. Préparation de ribosomes 70S "tight couples"	25
3. Préparation de sous-unités 30S	25
4. Préparation de l'ARNr 16S	26
5. Préparation du facteur d'initiation IF2	26
6. Préparation de l'ARNt initiateur, aminoacylation et formylation	27
6.1. Préparation de l'extrait enrichi en enzymes	27
6.2. Préparation de l'acide 10-formyl-tétrahydrofolique	27
6.3. Aminoacylation et formylation de l'ARNt initiateur	28
6.4. Mesure des taux d'aminoacylation et de formylation	28
7. Formation du complexe binaire [IF2/fMet-ARNt _f ^{Met}]	28
8. Formation du complexe [30S/IF2/fMet-ARNt _f ^{Met} /AUG/GTP]	30
III. ETUDE CONFORMATIONNELLE DES ARN EN SOLUTION	30
1. Marquage radioactif de l'ARNt et de l'ARNr 16S	30
1.1. Marquage de l'extrémité 3' de l'ARNt	30
1.1.1. Enlèvement du CCA terminal	30
1.1.2. Marquage de l'extrémité 3'	30
1.2. Marquage de l'extrémité 5' de l'ARNt	31
1.2.1. Déphosphorylation	31
1.2.2. Marquage de l'extrémité 5'	31
1.3. Marquage de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S	31

2. Hydrolyses enzymatiques et modifications chimiques	32
2.1. Origine des enzymes et réactifs chimiques utilisés	32
2.2. Renaturation du matériel biologique	32
2.3. Hydrolyses enzymatiques	32
2.4. Modifications de l'ARN par les sondes chimiques	33
2.4.1. Modification au DMS	33
2.4.2. Modification au DEPC	33
2.4.3. Modification au CMCT	33
2.4.4. Modification à l'ENU	34
3. Détection des coupures et des modifications chimiques	34
3.1. Méthode directe	34
3.1.1. Identification des purines modifiées en leur position N7 par le DMS ou le DEPC	34
3.1.2. Identification de la position N3 des cytosines méthylées par le DMS	35
3.1.3. Identification des phosphates alkylés par l'ENU	35
3.1.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide/urée	35
3.2. Méthode d'élongation par la transcriptase inverse	35
3.2.1. Préparation de l'amorce d'ADN	35
3.2.2. Elongation par la transcriptase inverse	36
3.2.3. Séquençage hétérologue	36
3.2.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide/urée	236
4. Modélisation graphique de l'ARNt initiateur	37
 IV. PONTAGE ARN-PROTEINE	 37
1. Conditions de pontage	37
1.1. Traitement d'IF2 par le <i>t</i> -DDP	37
1.2. Pontage entre IF2 et l'ARNt initiateur	37
1.3. Pontage entre IF2 et les sous-unités 30S	38
2. Isolement des complexes pontés ARNr 16S/IF2	38
3. Isolement des complexes pontés IF2/oligoribonucléotides	38
3.1. Hydrolyse ménagée par la RNase T ₁ des complexes ARNr/IF2	38
3.2. Hydrolyse ménagée par la RNase T ₁ des complexes ARNr 16S/IF2	38
4. Identification des oligoribonucléotides pontés à IF2	39
4.1. Réversion du pontage	39
4.2. Marquage à l'extrémité 5'	39
4.3. Séquençage	39
4.4. Détermination du nucléotide 5' terminal des fragments d'ARN	40

STRATEGIE EXPERIMENTALE : Etude conformationnelle de l'ARN et pontage ARN-protéine	41
I. ANALYSE CONFORMATIONNELLE DE L'ARN	45
1. Spécificité des sondes utilisées	45
1.1. Les sondes enzymatiques	45
1.1.1. Nucléase S ₁	45
1.1.2. RNase V ₁	45
1.2. Les sondes chimiques	45
1.2.1. Le diméthylsulfate (DMS)	45
1.2.2. Le diéthylpyrocarbonate (DEPC)	46
1.2.3. Le 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl)-carbodiimide métho-p-toluène sulfonate (CMCT)	46
1.2.4. L'éthylnitrosourée (ENU)	46
1.3. Avantages et limites d'utilisation des sondes de structure	46
2. Conditions d'utilisation des sondes	47
3. Détection des coupures enzymatiques et modifications chimiques	49
3.1. Méthode de détection directe	49
3.2. Méthode de détection par élongation d'amorce	49
II. MODELISATION GRAPHIQUE DE L'ARN_t INITIATEUR	50
III. PONTAGE ARN-PROTEINE	51

**CHAPITRE 1 : Etude de la conformation de l'ARN_t initiateur d'*E. coli* .
Interaction avec le facteur d'initiation IF2 et la sous-unité ribosomique 30S**

I. INTRODUCTION	57
II. ETUDE DE LA STRUCTURE EN SOLUTION DE L'ARN_t^{Met} :	
ARTICLE 1 : <i>the solution structure of the E. coli initiator tRNA and its interaction with initiation factor IF-2 and the ribosomal 30S subunit</i>	63
III. TOPOGRAPHIE DU COMPLEXE IF2/fMet-ARN_t^{Met}	91
1. Résultats	91
1.1. Formation du complexe IF2/fMet-ARN _t ^{Met} et pontage	91
1.2. Identification de la région de l'ARN _t initiateur impliquée dans le pontage avec IF2	93
2. Discussion et conclusion	99

CHAPITRE 2 : Etude de la conformation de l'ARN ribosomique 16S lors de l'initiation de la synthèse protéique. Interaction avec l'ARNt initiateur et le facteur d'initiation IF2	101
I. INTRODUCTION	103
II. ETUDE DE LA CONFORMATION DE L'ARNr 16S LORS DE LA FORMATION DU COMPLEXE D'INITIATION	107
1. Modification chimique des phosphates par l'ENU	107
2. Rappel de l'analyse conformationnelle de l'ARNr 16S isolé et dans la sous-unité 30S à l'aide de l'ENU	107
3. Etude de la conformation de l'ARNr 16S dans le complexe d'initiation. <i>Article 2 : the binding of initiation factor 2 and initiator tRNA to the E. coli ribosomal 30S subunit induces allosteric transitions in 16S rRNA</i>	111
III. TOPOGRAPHIE DU COMPLEXE IF2/30S	133
1. Résultats	133
1.1. Formation du complexe ponté IF2/30S/GTP et isolement des oligonucléotides pontés	133
1.2. Identification des fragments d'ARN pontés	135
2. Discussion et conclusion	139
CONCLUSION GENERALE	143
REFERENCES	151

ABREVIATIONS

A	: adénine
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ARNr	: acide ribonucléique ribosomique
ARNt	: acide ribonucléique de transfert
ATP	: adénosine 5'-triphosphate
BSA	: sérum albumine bovine
β -SH	: β -mercaptoéthanol
C	: cytosine
CMCT	: 1-cyclohexyl-3-(2 N-morpholinoéthyl)-carbodiimide-metho-p-toluène sulfonate
cpm	: coups par minute
CTP	: cytidine 5'-triphosphate
dATP	: désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP	: désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	: désoxyguanosine 5'-triphosphate
dUTP	: désoxyuridine 5'-triphosphate
dNTP	: désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
ddATP	: didésoxyadénosine 5'-triphosphate
ddCTP	: didésoxycytidine 5'-triphosphate
ddGTP	: didésoxyguanosine 5'-triphosphate
ddTTP	: didésoxythymidine 5'-triphosphate
ddNTP	: didésoxynucléoside 5'-triphosphate
DEAE	: diéthylaminoéthyle
DEPC	: diéthylpyrocarbonate
DMS	: diméthylsulfate
DO	: densité optique
DTE	: dithioérythritol
DTT	: dithiothréitol
EDTA	: éthylène diamine tétra acétate de sodium
ENU	: éthylnitrosourée
G	: guanine
GTP	: guanosine 5'-triphosphate
PM	: poids moléculaire
RNase	: ribonucléase
rpm	: rotations par minute
S	: unité Svedberg
SDS	: dodécylsulfate de sodium
"stains all"	: 1 éthyl 2 (3-(1 éthylnaphto (1-2d)-thiazolin-2 ylidène)-2 méthyl propényl) naphto 1-2d-thiazolium
TCA	: acide trichloracétique
<i>t</i> -DDP	: <i>trans</i> -diaminodichloroplatine
Tris	: tris (hydroxyméthyl) aminométhane
U	: uracile
UTP	: uridine 5'-triphosphate
UV	: ultra-violet
vol	: volume
VPDE	: phosphodiesterase de venin de cobra

INTRODUCTION

La vie peut être définie par un ensemble de processus chimiques et physiques par lesquels la structure extrêmement raffinée de la matière est maintenue et reproduite à partir des constituants chimiques simples du milieu environnant. Deux composants cellulaires jouent dans ces processus un rôle fondamental : les protéines et les acides nucléiques. Il va sans dire que le dogme central (ADN-ARN-Protéine) a joué et joue toujours un rôle très important dans le développement de la "Biologie Moléculaire". Pendant longtemps, les acides nucléiques ne furent considérés qu'en tant que support permanent ou transitoire de l'information génétique, alors que les protéines étaient les éléments primordiaux pour la fonction de la cellule. En fait, la situation s'est avérée être beaucoup plus complexe.

Alors que le rôle primordial de l'acide désoxyribonucléotide (ADN) reste le support permanent et transmissible de l'information génétique, de nombreux rôles biologiques sont maintenant attribués à son cousin l'acide ribonucléique (ARN). La découverte de l'auto-épissage de l'ARN précurseur des RNA ribosomiques (pré-ARNr) de *Tetrahymena* (Cech *et al.*, 1981) a ainsi mis en évidence l'activité catalytique de l'ARN et le terme de "ribozyme" est actuellement utilisé pour exprimer l'existence de cette nouvelle fonction (pour revue, voir Cech et Bass, 1986). Dans certains virus, l'ARN exerce le rôle de porteur de l'information génétique. Mais l'ARN est surtout universellement impliqué dans la traduction génétique. En effet, au cours de la biosynthèse des protéines, les ARN de transfert (ARNt) apportent les aminoacides au niveau du ribosome où a lieu le décodage du message génétique porté transitoirement par l'ARN messager (ARNm). Toutes ces réactions s'effectuent au niveau d'une particule ribonucléoprotéique, le ribosome. Les ARN ont aussi été trouvés impliqués dans de nombreux mécanismes de régulation de type traductionnel (par exemple, Nomura *et al.*, 1984 ; Springer *et al.*, 1985 ; Draper, 1988, 1989 ; Portier *et al.*, 1990), ou encore transcriptionnel (Yanovsky, 1981). Des rôles d'amorces leur ont été attribués dans la synthèse du DNA mitochondrial (Wong et Clayton, 1986) et pour la transcriptase inverse de l'ARN génomique chez les rétrovirus (Kikuchi *et al.*, 1986). Tous ces mécanismes moléculaires font appel à des reconnaissances spécifiques entre les diverses macromolécules impliquées. L'élucidation de ces différents mécanismes moléculaires nécessite de définir les différents sites d'interaction ainsi que la caractérisation des forces impliquées dans la formation des complexes. Une telle étude nécessite une connaissance détaillée de la structure tertiaire des différentes macromolécules et des changements conformationnels induits lors des divers états fonctionnels.

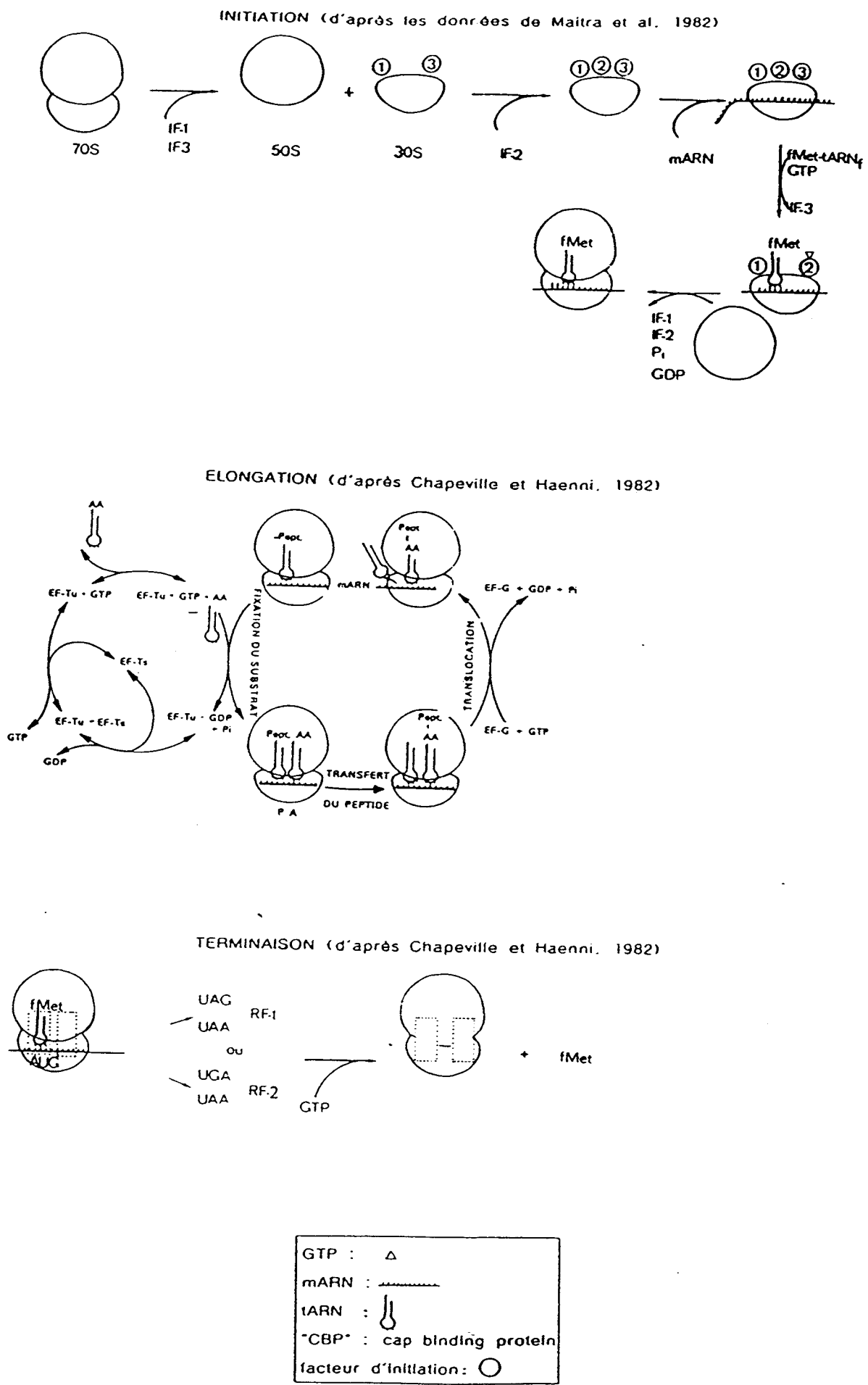


Figure 1 : Les étapes de la synthèse protéique chez les procaryotes.

Dans ce travail, nous avons voulu contribuer à une meilleure connaissance des structures des ARN dans le but de définir la relation existant entre leur structure et leur fonction biologique. Nous avons choisi le système de la biosynthèse des protéines comme modèle d'étude qui est une des étapes essentielles pour la vie de la cellule. Ce processus complexe met en jeu deux systèmes fondamentaux : la transcription de l'information génétique en ARNm et la traduction de cet ARN en protéines. La traduction a été largement décrite en détail chez les bactéries (pour revue, voir Hershey, 1987), celle-ci étant plus complexe chez les eucaryotes (pour revues, voir Maitra *et al.*, 1982 ; Moldave *et al.*, 1985). Un schéma général de la traduction de l'information génétique en protéines est représenté dans la figure 1. Trois événements essentiels caractérisent la traduction : la lecture du message sur le ribosome, l'apport des acides aminés par l'ARNt spécifique et la formation des liaisons peptidiques entre chaque acide aminé. La traduction peut être ainsi scindée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La fidélité de la traduction nécessite un haut degré de spécificité, tant au niveau de l'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon complémentaire de l'ARNt, qu'au niveau de la réaction d'aminacylation qui fait intervenir une reconnaissance stricte entre l'ARNt et l'aminacyl-ARNt synthétase correspondante. Ainsi, la traduction génétique reste encore un vaste domaine passionnant, où de nombreux chercheurs s'attachent à résoudre les problèmes subsistants. Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'initiation de la biosynthèse des protéines. Dans ce qui va suivre, nous avons résumé les connaissances actuelles concernant cette étape clé. Dans ce processus, le ribosome, particule nucléoprotéique, représente le siège de la synthèse protéique. L'organisation de ses constituants ainsi que son fonctionnement sont gouvernés par un ensemble d'interactions ARN-ARN, ARN-protéines et protéines-protéines. L'élucidation des mécanismes moléculaires intervenant dans la biosynthèse des protéines repose en partie sur la connaissance détaillée de la structure du ribosome.

Le ribosome.

Pendant longtemps le ribosome fut considéré comme un élément passif servant de support aux éléments actifs tels que l'ARNm, l'ARNt et les divers facteurs protéiques d'initiation, d'élongation et de terminaison. En fait, le ribosome joue un rôle actif dans ce processus où il opère avec une efficacité remarquable : en une seconde, sur un seul ribosome bactérien, 20 acides aminés sont ajoutés à une chaîne polypeptidique en voie de formation.

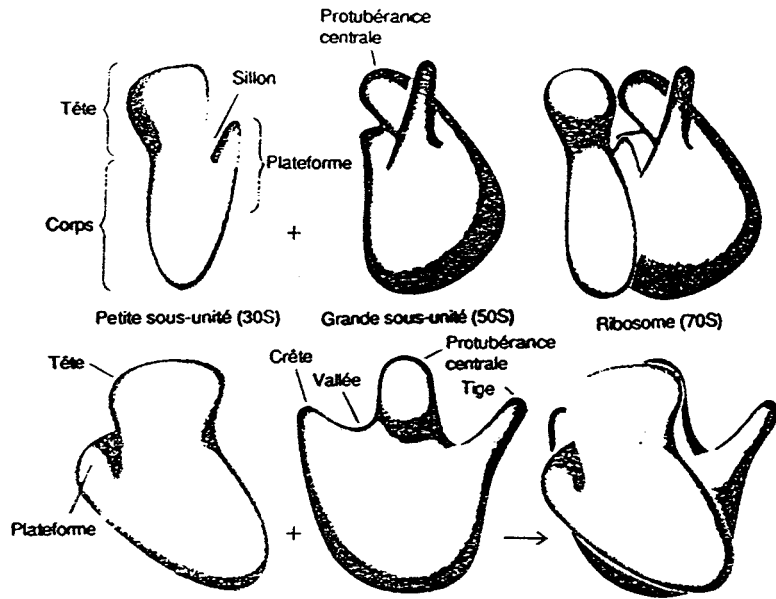


Figure 2 : Représentation schématique des deux sous-unités 30S et 50S et de leur arrangement relatif dans le ribosome d'*E. coli* selon Oakes et al. (1986). Les particularités structurales de chacune des deux sous-unités sont désignées. La longueur du ribosome est d'environ 250 Å.

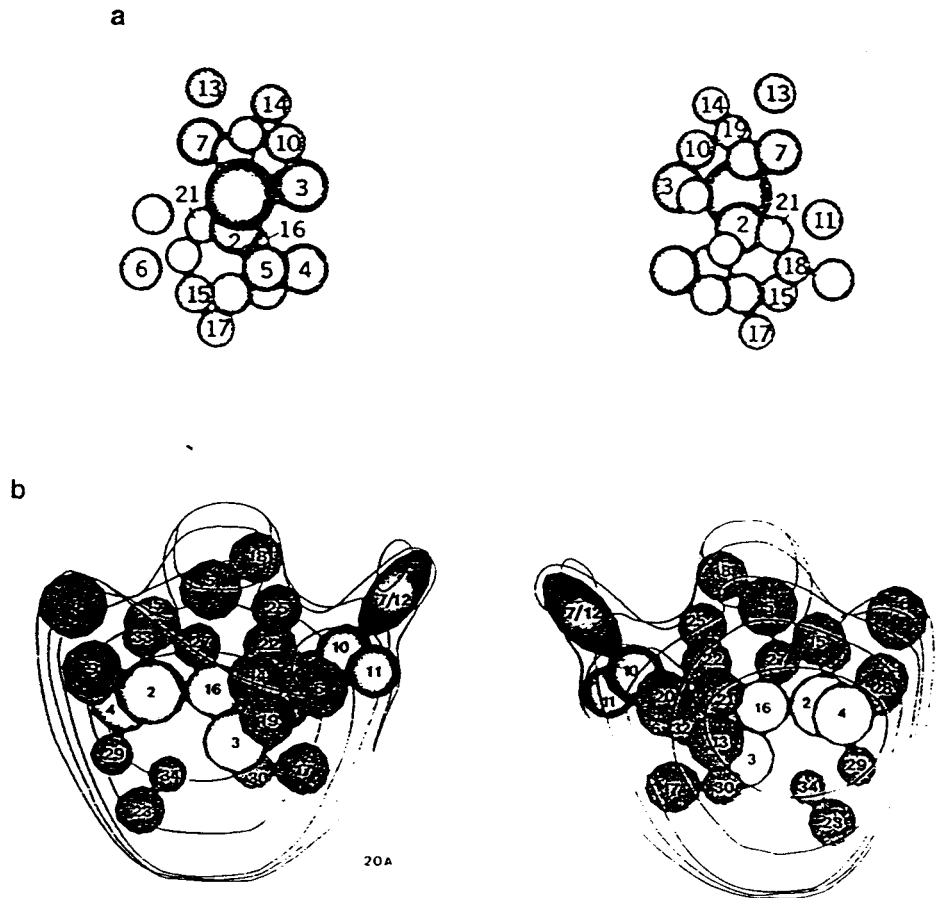


Figure 3 : Topographie des protéines dans les sous-unités 30S et 50S. (a) La disposition spatiale des protéines de la sous-unité 30S a été déterminée par diffusion des neutrons [Capel et al. (1987)]. (b) La disposition spatiale des protéines de la sous-unité 50S a été déterminée par pontage protéine-protéine, [Walleczeck et al. (1989a)]. Dans les deux cas, les deux vues diffèrent par rotation de 180° de l'axe longitudinal.

Le ribosome le mieux étudié à l'heure actuelle est celui d'un procaryote, *Escherichia coli*. Cette particule ribonucléoprotéique (PM $2,5 \times 10^6$), de constante de sédimentation 70S et est formé de deux sous-unités de taille inégales, la sous-unité 30S (PM $0,9 \times 10^6$) et la sous-unité 50S (PM $1,6 \times 10^6$). *In vitro*, l'association et la dissociation du ribosome en sous-unités dépendent de la concentration en magnésium et en sels monovalents. La sous-unité 30S se compose d'une molécule d'ARN, l'ARNr 16S (1542 nucléotides) et de 21 protéines différentes (S1 à S21). La sous-unité 50S est constituée de deux molécules d'ARN, l'ARNr 5S (120 nucléotides) et l'ARNr 23S (2904 nucléotides), et de 32 protéines différentes (L1 à L34). Les protéines L7 et L12 sont présentes sous deux formes et L8 correspond à un complexe binaire entre L10 et L12. Le poids moléculaire de ces protéines s'échelonnent entre 7 000 et 32 000, excepté celui de la protéine S1 (62 000). Dans les deux sous-unités, l'ARNr correspond à deux tiers environ de leur poids.

La structure primaire de toutes les protéines ribosomiques a été déterminée (pour revues, voir Wittman, 1982 ; Wittman-Liebold, 1986). La structure tridimensionnelle de certaines d'entre elles a été étudiée par différentes techniques telles que la cristallographie des rayons X, le dichroïsme circulaire et la diffusion des neutrons (pour revue, voir Giri *et al.*, 1984). L'architecture générale du ribosome d'*E. coli* et de ses deux sous-unités, telle qu'elle a été déterminée par microscopie électronique (Stöffler et Stöffler-Meilicke, 1986 ; Lake, 1985), est représentée sur la figure 2. La topographie des protéines de la sous-unité 30S a été largement étudiée par diverses techniques, telles que l'utilisation de réactifs de pontages protéine-protéine qui permettent de déterminer un proche voisinage entre protéines (pour revue, voir Traut *et al.*, 1980), la fluorescence (Huang *et al.*, 1975), l'immuno-microscopie électronique (Stöffler et Stöffler-Meilicke, 1986 ; Oakes *et al.*, 1986) et la diffusion des neutrons. Cette dernière approche a permis d'établir la carte complète des protéines dans la sous-unité 30S (Capel *et al.*, 1987). En ce qui concerne, la sous-unité 50S, une grande partie des protéines a été localisée par immuno-microscopie électronique (Lotti *et al.*, 1989), par pontage protéine-protéine (Walleczek *et al.*, 1989a) et par diffusion des neutrons (Nowotny *et al.*, 1986 ; 1989). Les différents modèles de la topographie des protéines dans les sous-unités 30S et 50S sont présentés dans la figure 3.

La séquence des trois ARN ribosomiques a été déterminée par divers groupes : pour l'ARNr 5S par Brownlee *et al.* (1967), pour l'ARNr 16S par Brosius *et al.* (1978) et Carbon *et al.* (1978), pour l'ARNr 23S par Brosius *et al.* (1981). L'analyse de l'accessibilité de l'ARN à diverses sondes de structure, la recherche par ordinateur d'appariements thermodynamiquement stables et la comparaison phylogénétique de diverses séquences ont conduit à l'élaboration de modèles de structure secondaire [pour

l'ARN 5S par Fox et Woese, 1975 ; pour l'ARN 16S par Woese *et al.* (1980), Glotz et Brimacombe (1980) et Stiegler *et al.* (1981) ; pour l'ARN 23S par Noller *et al.* (1981) et Branlant *et al.* (1981)]. Diverses approches expérimentales ont permis d'apporter des informations sur la structure tridimensionnelle de l'ARNr 16S : l'introduction de pontages ARN-ARN et ARN-protéine (Thompson et Hearst, 1983 ; Brimacombe *et al.*, 1986), l'isolement et l'analyse de dimères formés de fragments d'ARN obtenus par hydrolyse ménagée de l'ARN 16S (Spitnik-Elson *et al.*, 1985) et l'étude de la réactivité de chaque nucléotide de l'ARN 16S à diverses sondes de structure (Van Stolk et Noller, 1984 ; Moazed *et al.*, 1986 ; Mougel *et al.*, 1987 ; Baudin *et al.*, 1987, 1989 ; Stern *et al.*, 1989). Ces études ont en outre permis de mettre en évidence des changements conformationnels induits par l'assemblage des sous-unités (Brimacombe *et al.*, 1983 ; Baudin *et al.*, 1987, 1989 ; Stern *et al.*, 1989), ou dans divers états fonctionnels (par exemple, Moazed et Noller, 1986, 1987, 1989a, 1989b ; Gornicki *et al.*, 1989). Ainsi, la participation directe de l'ARN dans la fonction du ribosome devient une évidence. Les protéines ribosomiques interviendraient dans la fonction de l'ARN en induisant et en stabilisant des conformations particulières de l'ARN nécessaires à l'architecture de sites fonctionnels. En ce qui concerne l'ARN 5S, son rôle biologique dans le ribosome reste encore très controversé (pour revue, voir Delihais *et al.*, 1984). En revanche, le rôle fonctionnel des ARN 16S et 23S a été largement décrit. Les régions fonctionnelles sont toutes partiellement ou hautement conservées à travers l'évolution. Parmi les principales, citons :

pour l'ARNr 16S :

- la séquence riche en pyrimidines à l'extrémité 3' de l'ARN (séquence anti Shine-Dalgarno), complémentaire de la séquence Shine-Dalgarno de l'ARNm, qui est impliquée dans la formation du complexe ribosome-ARN messager (Shine et Dalgarno, 1974) ;
- la région située à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S qui interagit avec l'ARNm lors de l'élongation de la synthèse protéique (Weiss *et al.*, 1988) ;
- la région autour du nucléotide 1400 qui est impliquée dans la fixation de l'ARNt au ribosome (Prince *et al.*, 1982 ; Ehresmann *et al.*, 1984 ; Moazed et Noller, 1986) ;
- la cytosine 1054 et la séquence UCAUCA (1199-1204) dans le domaine III qui sont impliqués dans le processus de terminaison (Murgola *et al.*, 1988) ;
- deux régions, l'une dans le domaine central (nucléotides 819-859), l'autre à l'extrémité 3' proche de la région anti Shine et Dalgarno, qui sont impliquées dans l'interaction avec le facteur d'initiation IF3 (Ehresmann *et al.*, 1986) ;
- les sites d'interaction de certains antibiotiques qui sont connus pour inhiber la traduction (Moazed et Noller, 1987).

Pour l'ARN 23S :

- les nucléotides qui sont impliquées dans l'activité de la peptidyl-transférase (Barta *et al.*, 1984) et ceux correspondant aux sites de fixation des antibiotiques comme le chloramphénicol, l'érythromycine et la vernamycine localisés près du site de la peptidyl-transférase (Moazed et Noller, 1986).;
- des nucléotides conservés qui sont impliqués dans les sites d'interaction avec les facteurs d'élongation EF-Tu (autour du nucléotide 1067 dans le domaine II) et EF-G (autour des nucléotides 1067 dans le domaine II et 2660 dans le domaine VI) (Moazed *et al.*, 1988) et avec l'ARNt (Moazed et Noller, 1989 a, b).

La connaissance de la topographie des protéines de la sous-unité 30S (Capel *et al.*, 1987) et de la localisation des domaines d'interaction des protéines sur l'ARNr 16S, déterminée, soit par pontages ARN-protéine, soit par la mise en évidence de l'empreinte des protéines sur l'ARN 16S par l'utilisation de différentes sondes de structure, a conduit à l'élaboration des premiers modèles de structure tridimensionnelle de l'ARNr 16S au sein de la sous-unité 30S (Brimacombe *et al.*, 1988 ; Stern *et al.*, 1988). Ces modèles représentent un premier pas vers la compréhension de la relation qui existe entre la structure et la fonction. De plus, la résolution de la structure des sous-unités 30S et 50S par cristallographie des rayons X est maintenant devenue envisageable puisque des cristaux de sous-unités 30S et 50S ont été obtenus (Trakhanov *et al.*, 1989 ; Yonath et Wittman, 1989).

L'initiation de la traduction.

L'initiation de la biosynthèse des protéines est une série de réactions qui se produisent avant la formation de la première liaison peptidique. Ce processus est présumé être l'étape limitante de la biosynthèse des protéines dans la cellule. Un grand nombre de revues ont été consacrées à l'initiation (par ex. Grunberg-Manago, 1980; Maitra *et al.*, 1982 ; Gualerzi *et al.*, 1986 ; Hershey, 1987). Bien que tous les ligands qui interagissent de manière coordonnée au cours de l'initiation soient connus à présent, l'ordre dans lequel ceux-ci interviennent et le mécanisme moléculaire précis conduisant à la formation du complexe d'initiation [70S/ARNm/fMet-ARNt^{Met}/GTP] est encore controversé. La formation de ce complexe d'initiation impliquent trois étapes essentielles : (1) la dissociation du ribosome en sous-unités ; (2) la formation d'un pré-complexe entre la sous-unité 30S, l'ARNt^{Met} initiateur aminoacylé et formylé, l'ARNm, le GTP et les trois facteurs protéiques d'initiation IF1, IF2 et IF3 ; (3) la fixation de la sous-unité 50S et le

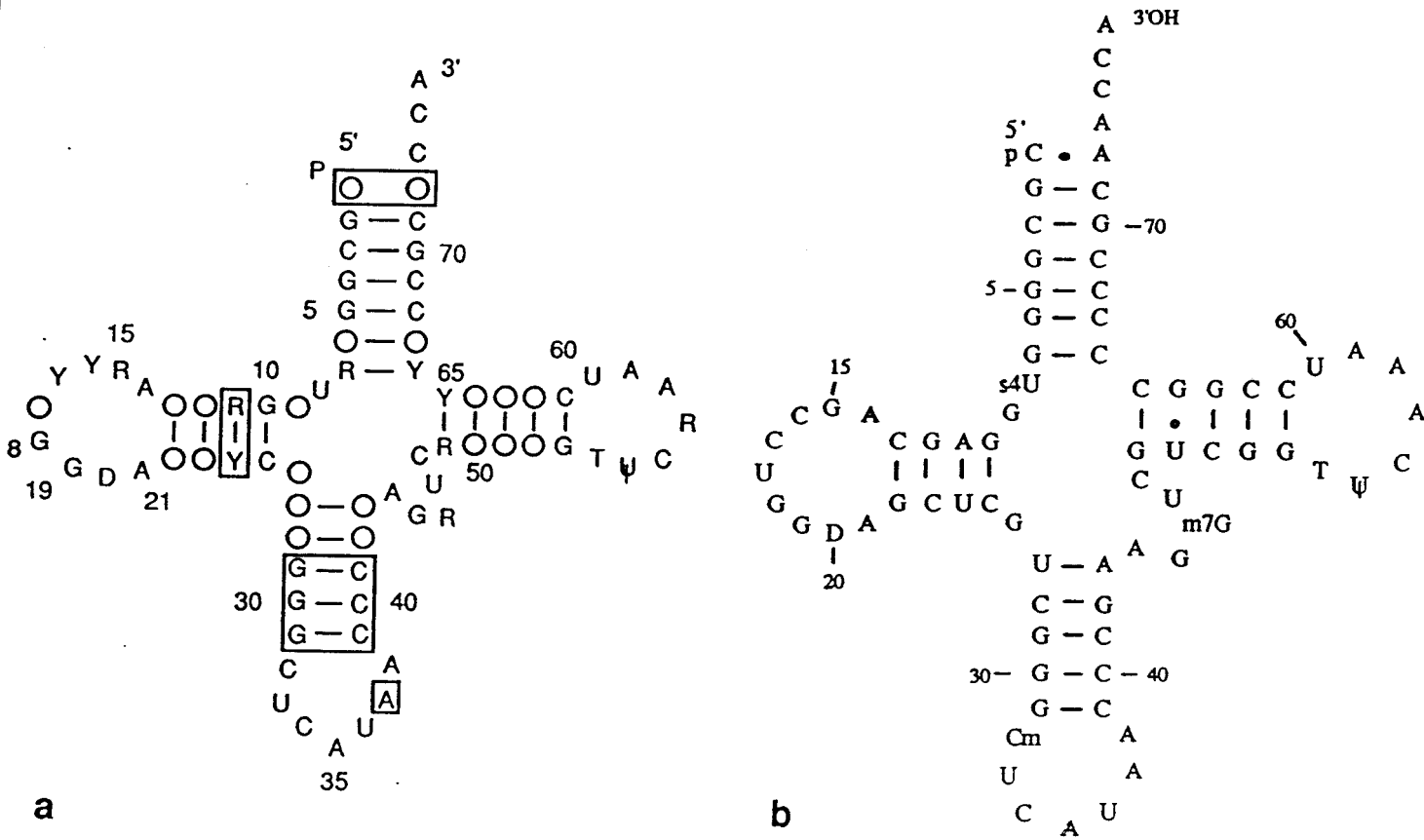


Figure 4 : Structure secondaire de l'ARNt^{Met} d'*E. coli* (b) et structure secondaire consensus de l'ARNt initiateur chez les procaryotes (a). La structure secondaire de l'ARNt initiateur d'*E. coli* a été déterminée par Dube et al. (1968). (○) représente les nucléotides non conservés ; R signifie purines et Y pyrimidines ; les séquences encadrées représentent les caractéristiques structurales de l'ARNt initiateur.

départ des trois facteurs d'initiation après hydrolyse du GTP. Dans ce qui va suivre, nous allons décrire brièvement les divers composants intervenant dans ce complexe d'initiation ainsi que les mécanismes d'interaction proposés.

L'ARNt^{Met} initiateur.

Dans la cellule, il existe deux types d'ARNt spécifiques de la méthionine, l'ARNt^{Met} initiateur et l'ARNt^{Met} élongateur. L'ARNt initiateur est utilisé exclusivement pour initier la synthèse protéique. Celui-ci est placé directement dans le site P du ribosome en présence du facteur d'initiation IF2, alors que l'ARNt élongateur, pris en charge par le facteur d'élongation EF-Tu, interagit directement dans le site A. Les ARNt^{Met} initiateur et élongateur sont tous aminoacylés par la même méthionyl-ARNt synthétase. Dans les organismes procaryotiques et les organelles (chloroplaste ou mitochondrie), l'ARNt^{Met} initiateur est formylé alors que dans les organismes eucaryotiques, il ne l'est pas. La formylation est catalysée par une Met-ARNt transformylase (Dickerman *et al.*, 1967). Le fMet-ARNt^{Met} est d'ailleurs le seul ARNt résistant à l'action de la peptidyl-ARNt hydrolase (Kossel et RajBhandary, 1968). Certaines caractéristiques structurales spécifiques de l'ARNt initiateur ont été décrites, qui pourraient expliquer ces différences fonctionnelles entre les deux types d'ARNt. La structure secondaire de l'ARNt initiateur d'*E. coli* ainsi que la structure consensus des ARNt initiateurs procaryotiques sont représentées sur la figure 4. L'absence d'un appariement de type Watson-Crick entre les résidus 1 et 72 à l'extrémité du bras accepteur, la présence d'une adénine non hypermodifiée en position 37 et de l'appariement R11-Y24 sont des caractéristiques trouvées chez tous les ARNt initiateurs procaryotiques ; la présence de trois paires de bases G-C dans le bras de l'anticodon est commune à tous les ARNt initiateurs (Grosjean *et al.*, 1982 ; Sprinzl *et al.*, 1989). Il a été montré que le remplacement chez les ARNt initiateurs des résidus 1 et 72 par des résidus permettant la formation d'un appariement de type Watson-Crick leur confère un comportement d'élongateur (Seong et RajBhandary, 1987b) ; de même, la substitution des trois paires de bases G-C par des paires moins stables perturbe la fixation de l'ARN au site P du ribosome (Seong et RajBhandary, 1987a). La structure cristallographique de deux ARNt initiateurs a été déterminée à faible résolution, celui d'*E. coli* (Woo *et al.*, 1980) et celui de levure (Schevitz *et al.*, 1979). Il en résulte que leur structure globale est analogue à celle de l'ARNt^{Phe} de levure. Cependant, l'analyse de la conformation de l'ARNt^{Met} initiateur de levure en solution révèle une particularité structurale de l'interaction entre les boucles T et D (A. Garcia, communication personnelle). Pour l'ARNt^{Met} d'*E. coli*, trois particularités ont été signalées se situant dans l'extrémité

CCA, la boucle D et au niveau de l'uridine en position 33 (Woo *et al.*, 1980). Il apparaît que cette uridine, hautement conservée, est rejetée vers le solvant alors qu'elle se trouve normalement empilée dans la boucle de l'anticodon où s'effectue le tournant qui permet de maintenir une continuité structurale avec le bras anticodon. Cependant, il est à rappeler que cette structure n'est pas affinée puisqu'elle n'a été résolue qu'à faible résolution. Ainsi, cette étude ne permet pas de définir sans ambiguïtés les caractéristiques structurales de cet ARNt qui lui confèrent le rôle particulier dans la biosynthèse des protéines.

L'ARN messenger.

Les ARNm procaryotiques sont souvent polycistroniques et possèdent plusieurs sites de démarrage et d'arrêt, générant ainsi différentes protéines. Puisque la traduction est couplée à la transcription, le ribosome doit interagir avec l'ARNm au niveau des séquences d'initiation avant même que la transcription soit terminée et que l'ARNm soit libéré. La comparaison des séquences de divers messagers a permis de distinguer des caractéristiques communes dans les régions d'initiation (pour revue, voir Gold *et al.*, 1988). En particulier, une région riche en purines, GGAGG, appelée séquence Shine-Dalgarno (séquence SD), hautement conservée chez tous les messagers reconnus par les ribosomes procaryotiques, a été mise en évidence (Shine et Dalgarno, 1974). Cette séquence est complémentaire à une séquence de l'ARNr 16S également hautement conservée (séquence anti-SD), localisée près de l'extrémité 3' terminale. L'interaction directe entre ces deux régions a été démontrée par le fait que des mutations compensatoires entre la séquence SD de l'ARNm et la séquence anti-SD de l'ARN 16S, rétablissent une traduction efficace (Hui *et al.*, 1988). L'étude structurale de différentes régions d'initiation d'ARNm et de mutants ayant une efficacité de traduction diminuée ont permis de révéler l'existence d'autres structures dans l'ARNm qui influenceraient l'interaction de l'ARNm au ribosome (Kozak, 1983 ; Gold *et al.*, 1988 ; Dreyfus, 1988) : en position -3 (+1 étant l'adénine du codon d'initiation AUG) se trouve généralement une adénine, la séquence suivant le codon AUG entre +4 et +7 est souvent GCUA ou AAAA et des séquences non aléatoires sont présentes entre la séquence SD et le codon AUG. Il est intéressant de noter que l'implication directe de la structure de l'ARNm a été mise en évidence dans le contrôle traductionnel de diverses protéines telles que les protéines ribosomiques (Nomura *et al.*, 1984 ; Draper, 1988 ; 1989 ; Philippe *et al.*, 1990) et la thréonyl-ARNt synthétase (Moine *et al.*, 1988b ; 1990).

Les facteurs d'initiation.

Trois facteurs protéiques d'initiation (IF1, IF2 et IF3) catalysent la formation du

complexe d'initiation [30S/fMet-ARN_t^{Met}/ARN_m/GTP]. Les principales caractéristiques de ces facteurs sont résumées dans le tableau 1ci-dessous.

Facteurs	PM et Nombre d'acide aminés	Gène	Taux cellulaires (Facteurs par ribosome)	Fonctions
IF1	8 119 (71)	<i>infA</i>	0,18	- Stimule les fonctions de IF2 et IF3 - Dissocie le ribosome
IF2 α IF2 β	97 300 (889) 79 700 (732)	<i>infB</i> <i>infB</i>	0,10 0,05	- Interagit avec le fMet-ARN _t ^{Met} - Interagit avec le GTP
IF3	20 668 (181)	<i>infC</i>	0,14	-Favorise la dissociation du ribosome - Favorise la fixation de l'ARN _m au ribosome - Sélectionne le fMet-ARN _t ^{Met}

Tableau 1 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des facteurs d'initiation (d'après Hershey, 1987).

La séquence des trois facteurs a été réalisée pour IF1 par Pon *et al.* (1979), pour IF2 par Sacerdot *et al.* (1984), pour IF3 par Brauer et Wittman-Liebold (1977) et par Sacerdot *et al.* (1984). Le taux cellulaire des trois facteurs est régulé de façon coordonnée à celui des ribosomes ; environ 0,15 à 0,2 molécule de chaque protéine est présente par ribosome (Howe et Hershey, 1981). Dans la cellule, IF2 existe sous deux formes α et β , toutes deux actives dans la syntèse protéique. Ces deux formes sont exprimées par le même gène possédant deux sites indépendants d'initiation (Plumbridge *et al.*, 1985). IF2 α possède un domaine N-terminal séparé du domaine C-terminal par une région présentant des séquences répétées fortement chargées, alors que IF2 β ne possède que le domaine C-terminal (Sacerdot *et al.*, 1984). Un modèle de structure tridimensionnel de ce domaine a été

construit par modélisation graphique (Plumbridge *et al.*, 1985). Des homologies étonnantes de séquence dans le domaine fixant le GTP ont été observées entre EF-Tu, IF2 et des protéines oncogènes de la famille ras qui fixent aussi le GTP (Lochrie *et al.*, 1985). On ne peut exclure que la partie N-terminale de IF2 soit impliquée dans d'autres processus cellulaires que la traduction. Il a d'ailleurs été décrit un effet de IF2 sur les propriétés transcriptionnelles de l'ARN polymérase (Travers *et al.*, 1980). Le facteur IF2 α a aussi été trouvé impliqué dans la synthèse de la β -galactosidase (Eskin *et al.*, 1978). En l'absence de données cristallographiques, très peu de données structurales sont disponibles. Les facteurs IF1 et IF3 sont des protéines basiques alors que IF2 est plutôt acide. Des prédictions de structure pour IF1 suggèrent que la protéine possède peu d'hélices α (5 à 10%) et ne contient pas de régions hydrophobes (Pawlik *et al.*, 1981). Des études de résonance magnétique nucléaire semble montrer une structure relativement simple qui présente une mobilité interne (Gualerzi *et al.*, 1986). IF3 est une protéine globulaire (Gualerzi et Pon, 1981), très structurée avec de grandes régions hydrophobes mais ne présentant pas de domaines distincts (Paci *et al.*, 1984). Des expériences de pontage et de microscopie électronique placent les trois facteurs près du sillon de la sous-unité 30S (pour revues, voir Grunberg-Manago, 1980 ; Hershey, 1987).

Le rôle fonctionnel de ces divers facteurs a été largement décrit dans différentes revues (par exemple, Grunberg-Manago, 1980 ; Maitra *et al.*, 1982 ; Gualerzi *et al.*, 1986 ; Hershey, 1987) et est résumé dans le tableau 1. Le rôle de IF1 est encore très peu connu. Il semblerait que la cible de IF1 soit la sous-unité 30S et que celui-ci stimulerait l'action des facteurs IF2 et IF3. Un rôle possible dans la dissociation du ribosome a été suggéré (Noll *et al.*, 1973 ; Hartz *et al.*, 1989). Bien qu'il y ait divergence sur le mécanisme d'action d'IF2, il existe un consensus sur le fait que le facteur est impliqué dans l'interaction de l'ARNt initiateur aminoacylé et formylé au niveau du ribosome (Van der Hofstad *et al.*, 1977 ; Petersen *et al.*, 1983 ; Gualerzi *et al.*, 1986 ; Hartz *et al.*, 1989). Il a été montré que IF2 interagit non seulement avec le GTP mais aussi avec le GDP, le GTP stimulant la formation du complexe d'initiation 30S (Pon *et al.*, 1985). L'implication de IF2 dans l'autorégulation de la synthèse des ARN ribosomiques chez *E. coli*, a été mise en évidence (Cole *et al.*, 1987). IF3 a été longtemps décrit comme ayant une double fonction : celle d'empêcher l'association des deux sous-unités (Kaempfer, 1972 ; Godefroy-Colburn *et al.*, 1975) et celle de favoriser l'interaction de l'ARNm au ribosome (Whaba *et al.*, 1969 ; Suttle et Ravel, 1974). Le mécanisme exact par lequel IF3 exerce son premier rôle n'est toujours pas compris (Chaires *et al.*, 1981 ; Goss *et al.*, 1982). Pour la seconde fonction,

deux possibilités ont été proposées : (1) IF3 induirait un changement conformationnel de l'ARNm favorisant ainsi sa fixation au ribosome (Schleich *et al.*, 1980), (2) IF3 agirait indirectement sur la sous-unité 30S permettant ainsi la fixation de l'ARNm. Cette deuxième hypothèse a été favorisée par notre laboratoire. En effet, IF3 a été trouvé ponté à la fois dans le domaine central (nucléotides 819-859) et à l'extrémité 3' de l'ARN 16S (Ehresmann *et al.*, 1986). Ces auteurs postulèrent que dans la sous-unité 30S, la séquence anti-SD localisée près de l'extrémité 3' terminale de l'ARN 16S interagirait avec une région complémentaire (pseudo-SD) située dans le domaine central. IF3 interagirait directement avec le domaine central libérant ainsi la région 3' terminale de l'ARN 16S qui serait alors susceptible d'interagir avec la séquence SD de l'ARNm. Récemment, l'effet de IF3 sur la conformation de l'ARN 16S dans la sous-unité 30S a été étudié et le domaine d'interaction a été localisé dans le domaine central de l'ARN (Muralikrishna et Wickström, 1989). Le facteur IF3 stimule aussi la fixation d'ARNt aminoacylés sur des polynucléotides synthétiques contenant le codon adéquat (Gualerzi et Pon, 1981). Récemment, Hartz *et al.* (1989) ont montré que *in vitro* les deux facteurs IF2 et IF3 sont impliqués de manière conjointe dans la sélection de l'ARNt initiateur dans le complexe d'initiation 30S et non 70S. IF2 sélectionnerait l'ARNt en reconnaissant spécifiquement la partie 3' terminale aminoacylée et formylée alors que IF3 positionnerait correctement l'ARNt au site P en interagissant avec la région anticodon.

Formation du complexe d'initiation.

Il est maintenant généralement admis que le complexe d'initiation [70S/ARNm/fMet-ARNt^{Met}] passe par un complexe intermédiaire [30S/ARNm/fMet-ARNt^{Met}/GTP] en présence des trois facteurs d'initiation. Toutefois, plusieurs écoles s'affrontent quant au schéma réactionnel qui conduit à la formation de ce complexe. Ces différences de point de vue concernent essentiellement le mécanisme d'action d'IF2. Le premier modèle implique un complexe binaire entre IF2 et le fMet-ARNt^{Met} (Van der Hofstad, 1977). L'interaction de ce complexe au ribosome sélectionnerait le signal d'initiation sur l'ARNm (Jay et Kaempfer, 1975). Cette hypothèse a été postulée à la suite d'une série d'observations : (1) un complexe entre IF2 et le fMet-ARNt^{Met} a été identifié en présence ou en absence de GTP, celui-ci est instable mais requiert la formylation du Met-ARNt^{Met} (pour revue, voir Petersen *et al.*, 1979) ; (2) des homologies existent entre EF-Tu et IF2 ; (3) chez les eucaryotes, la première étape correspond à la formation d'un complexe binaire entre un facteur et le Met-ARNt^{Met} initiateur en présence de GTP (pour revue, voir Moldave, 1985).

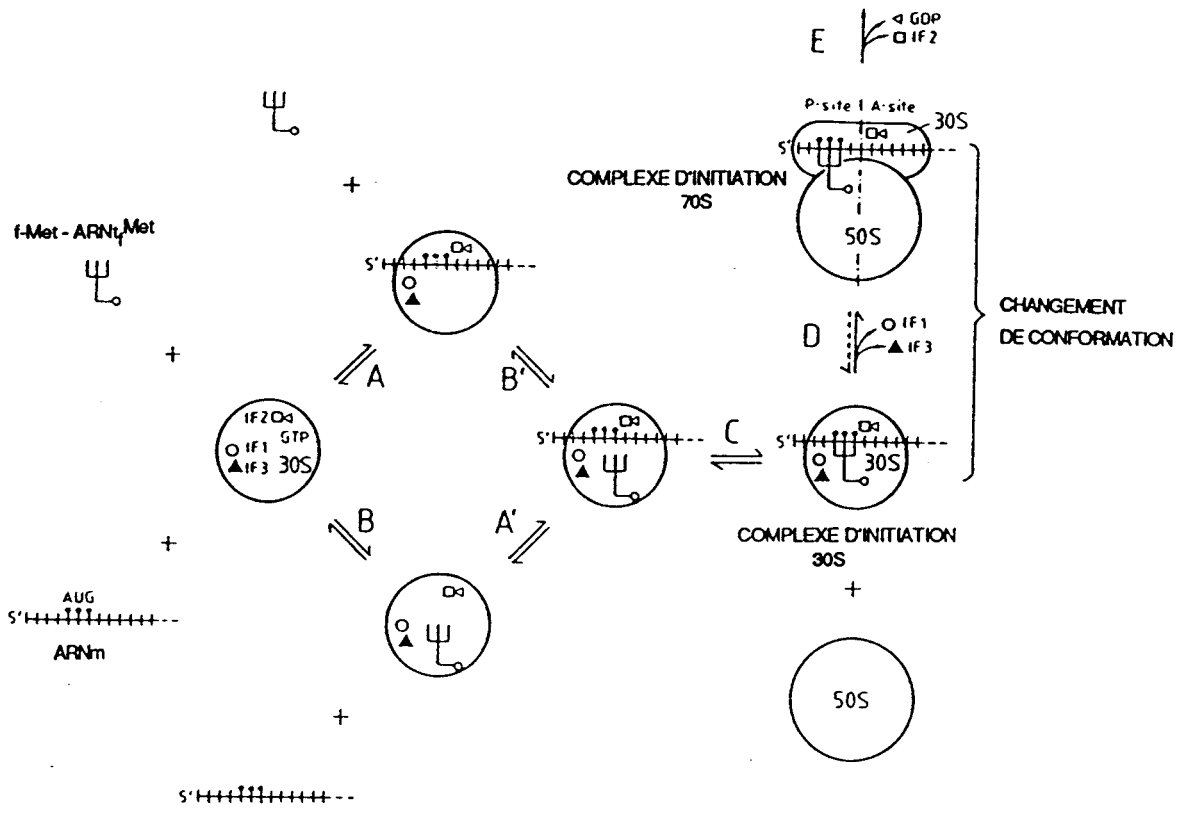


Figure 5 : Schéma réactionnel de l'étape d'initiation proposé par Gualerzi et al. (1986). Les étapes A, B, A' et B' sont en équilibre rapide.

Un modèle alternatif a été récemment proposé à la suite d'une analyse cinétique du système (pour revue, voir Gualerzi *et al.*, 1986). Dans ce cas, IF2 interagit directement avec la sous-unité 30S en présence des deux autres facteurs, l'interaction de l'ARNt ayant lieu au niveau du ribosome. L'enchaînement réactionnel présenté dans la figure 5 est basé sur différentes évidences expérimentales : (1) il n'existe pas d'ordre précis en ce qui concerne la fixation du fMet-ARNt^{fMet} ou de l'ARNm sur le ribosome (Gualerzi *et al.*, 1977 ; 1979). Ces auteurs ont ainsi proposé un mécanisme alternatif où les deux complexes binaires [30S/ARNm], [30S/fMet-ARNt^{fMet}] et le complexe ternaire [30S/ARNm/fMet-ARNt^{fMet}] sont en équilibre rapide, l'étape limitante étant la stabilisation du complexe pré-ternaire en un complexe actif (voir figure 5). (2) En l'absence de l'ARNt initiateur, les trois facteurs se fixent aux sous-unités 30S de façon coopérative (Weiel et Hershey, 1982 ; Boileau *et al.*, 1983). (3) Des expériences de cinétique rapide sur l'interaction N-AcPhe-ARNt^{Phe} à la sous-unité 30S en présence de poly-U ont été réalisées, mimant l'interaction de l'ARNt initiateur (Gualerzi *et al.*, 1986). Il en résulte que la fixation de l'ARNt à la sous-unité 30S est favorisée par IF2. De plus, le complexe est formé plus rapidement lorsque IF2 est préalablement incubé en présence des sous-unités 30S, qu'en présence de l'ARNt. Les expériences réalisées dans différentes conditions de concentrations entre IF2, les sous-unités 30S et l'ARNt montrent que IF2 se fixe de façon stoechiométrique aux sous-unités 30S (Gualerzi *et al.*, 1986).

L'étape suivante consiste en l'addition des sous-unités 50S pour former le complexe d'initiation 70S. Cette étape est plus rapide que la formation du complexe d'initiation 30S (Wishnia *et al.*, 1975 ; Noll et Noll, 1976) et est irréversible (Gottlieb et Davis, 1975). La formation de ce complexe doit s'accompagner du départ des facteurs d'initiation et de changements conformationnels du ribosome. L'ordre de départ des divers facteurs restent encore très hypothétique. Il semblerait toutefois, que les facteurs IF1 et IF3 soient éjectés au moment de l'addition des sous-unités 50S et non au moment de la fixation de l'ARNt initiateur (pour revue, voir Gualerzi *et al.*, 1986). Rappelons ici que la sélection de l'ARNt et son bon positionnement sur le ribosome est effectuée par les facteurs au niveau de la sous-unité 30S (Hartz *et al.*, 1989) et non au niveau du ribosome. IF2 est toujours présent dans le ribosome et son départ semble être induit par l'hydrolyse du GTP (pour revue, voir Hershey, 1987).

Notre participation.

Dans un premier temps, nous avons défini les déterminants structuraux de l'ARNt initiateur d'*E. coli* qui le différencient de l'ARNt élongateur et qui lui confèrent son rôle

particulier dans la biosynthèse des protéines, et nous avons défini les domaines précis d'interaction de l'ARNt initiateur avec IF2 dans le complexe binaire et lors de sa fixation au ribosome. L'effet de l'interaction de IF2 et de l'ARNt sur l'ARN 16S dans la sous-unité a été également déterminé. Dans ce but, il était nécessaire d'utiliser un complexe d'initiation simplifié qui fait intervenir la sous-unité 30S, IF2, l'ARNt^{Met} initiateur, le codon AUG comme messenger et le GTP.

MATERIEL ET METHODES

I. TAMPONS UTILISES

- *Tampon A* : Tris-HCl 20 mM pH7,5 ; acétate de Mg 6 mM ; NH₄Cl 60 mM ; β-SH 6 mM.
- *Tampon B* : Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; acétate de Mg 6 mM ; NH₄Cl 60 mM ; NaCl 400 mM ; β-SH 6 mM.
- *Tampon d'association* : Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; NH₄Cl 40 mM ; acétate de Mg 6 mM ; β-SH 2,5 mM ; 2,5% glycérol.
- *Tampon E* : borate de Na 50 mM pH 7,4 ; acétate de Mg 5 mM ; NH₄Cl 50 mM.
- *Tampon F* : cacodylate de Na 50 mM pH 7,4 ; acétate de Mg 5 mM ; NH₄Cl 50 mM.
- *Tampon de charge* : urée 7 M ; saccharose 20% ; xylène cyanol 0,03% ; bleu de bromophénol 0,03%.
- *Tampon d'éluion* : acétate de NH₄ 500 mM pH 6,5 ; EDTA 1 mM ; SDS 0,5%.
- *Tampon de dissociation M8-2B* : Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; LiCl 100 mM ; EDTA 2,5 mM ; SDS 0,5%.
- *Tampon de dissociation G* : borate de Na 40 mM ; LiCl 200 mM ; EDTA 4 mM ; SDS 1%.
- *Tampon N1* : Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; NH₄Cl 50 mM ; MgCl₂ 6 mM ; β-SH 16 mM.
- *Tampon N2* : cacodylate de Na 50 mM pH 7,5 ; NH₄Cl 50 mM ; MgCl₂ 6 mM ; β-SH 16 mM.
- *Tampon N3* : borate de Na 50 mM pH 7,6 ; NH₄Cl 50 mM ; MgCl₂ 6 mM ; β-SH 16 mM.
- *Tampon D1* : cacodylate de Na 50 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM.
- *Tampon D2* : borate de Na 50 mM pH 7,6 ; EDTA 1 mM.
- *Tampon RTB 5x* : Tris-HCl 250 mM ; MgCl₂ 30 mM ; KCl 0,2 M.
- *Tampon T1* : citrate de Na 20 mM pH 4,5 ; EDTA 1 mM.
- *Tampon TBE* : Tris-borate 90 mM ; EDTA 2 mM.
- *Tampon P1* : phosphate de Na 20 mM pH 7,5 ; acétate de Mg 1 mM ; β-SH 20 mM ; glycérol 10%.
- *Tampon P2* : phosphate de Na 250 mM pH 6,9 ; acétate de Mg 1 mM ; β-SH 20 mM ; glycérol 10%.

BROYAGE :

LAVAGE : + tampon A

CENTRIFUGATION

30 min, 15 000 rpm

CENTRIFUGATION

30 min, 15 000 rpm

CENTRIFUGATION

16 h, 18 000 rpm (SW 28), sur gradient
10%-30% saccharose dans le tampon A.

CENTRIFUGATION

16 h, 22 000 rpm (SW 28), sur gradient
10%-30% saccharose dans le tampon B.

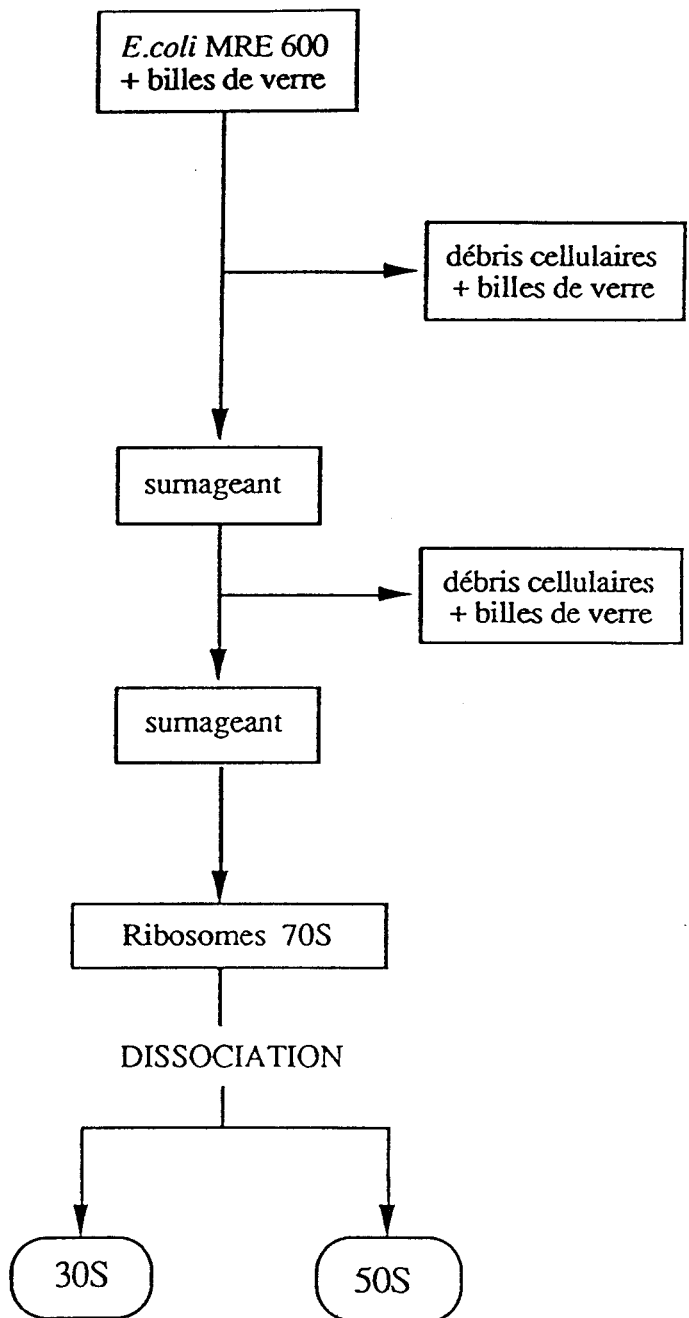


Tableau 2 : Préparation des ribosomes 70S et de leurs sous-unités ribosomiques 30S et 50S.

II. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE.

1. Culture des bactéries.

Les bactéries *Escherichia coli* MRE600 (RNase I⁻) sont cultivées dans un milieu ajusté à pH 7,5 contenant : bactotryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM et glucose 0,5%. La culture est effectuée à 37°C sous agitation. La croissance bactérienne est suivie en mesurant la DO à 550 nm. Une préculture de 30 ml (incubée pendant une nuit) a été utilisée pour ensemer 1 litre de culture ; celle-ci atteint le milieu de la phase exponentielle en 2 h 30 à 37°C. La culture est ralentie par refroidissement sous l'eau froide. Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 4 000 rpm pendant 15 min. Après lavage, le culot de cellules est remis en suspension dans 50 ml de tampon A. Les cellules sont ensuite stockées à -20°C.

2. Préparation de ribosomes 70S "tight couples".

Les ribosomes sont préparés selon la méthode décrite par Vassilenko *et al.* (1981). Toutes les étapes sont effectuées dans la glace. Les cellules congelées sont broyées en présence d'un même poids de billes de verre, puis reprises dans le tampon A. Les débris cellulaires et les billes sont éliminés par centrifugation à 15 000 rpm pendant 30 min et lavés dans le tampon A. Les débris cellulaires restants sont sédimentés à 30 000 rpm pendant 15 min (rotor SW50). Les ribosomes contenus dans le surnageant sont déposés sur un gradient linéaire de 10 à 30% de saccharose établi dans le tampon A et centrifugés à 4°C pendant 15 h à 19 000 rpm (rotor SW28). A cette concentration en magnésium (6 mM), les ribosomes "loose" sont dissociés en sous-unités 30S et 50S, alors que les "tight" restent sous forme de 70S. Leur profil de sédimentation est obtenu par lecture de la DO à 260 nm. Les fractions contenant les ribosomes 70S sont rassemblées, puis amenées à 10 mM en acétate de Mg. Leur concentration est déterminée par mesure de la DO à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à 60 µg de 70S par ml. Les ribosomes 70S sont précipités par 0,7 vol d'éthanol à 0°C pendant 30 min.

3. Préparation de sous-unités 30S.

La méthodologie générale utilisée pour la préparation des sous-unités ribosomiques est décrite dans le tableau 2. La dissociation des ribosomes 70S en sous-unités 30S et 50S

est effectuée dans le tampon B par augmentation de la concentration en sels monovalents. Les sous-unités 30S et 50S sont fractionnées par centrifugation à travers un gradient linéaire de saccharose (10-30%) dans le tampon B, à 22 000 rpm pendant 16 h à 4°C (rotor SW28). Les fractions contenant les sous-unités 30S sont récoltées et précipitées par addition de 0,7 vol d'éthanol à 0°C pendant 30 min. Après centrifugation, les sous-unités 30S sont reprises dans le tampon A contenant 10 mM d'acétate de Mg, et stockées en petites fractions à -20°C. Leur concentration est déterminée comme ci-dessus.

4. Préparation de l'ARNr 16S.

L'ARNr 16S est extrait directement des ribosomes 70S selon la technique de Fellner (1969). Après traitement des ribosomes dans le tampon de dissociation M8-2B pendant 20 min à température ambiante, les ARNr déprotéinisés sont fractionnés par centrifugation à 10°C, pendant 16 h à 26 000 rpm (rotor SW28) dans le même tampon. Les fractions contenant l'ARNr 16S sont rassemblées, précipitées par addition de 2,5 vol d'éthanol et 0,1 vol d'acétate de Na 3 M pendant 30 min à -80°C. Le culot éthanolique est repris dans de l'acétate de Na 0,3 M et reprecipité deux fois afin d'éliminer toute trace de SDS, lavé avec de l'éthanol 80%, puis séché et repris finalement dans de l'eau bidistillée. La concentration de l'ARNr 16S est déterminée par lecture de la DO à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à 40 µg d'ARN par ml. L'ARNr 16S est stocké à -20°C sous forme de précipité éthanolique.

5. Préparation du facteur d'initiation IF2.

Le facteur d'initiation IF2 α d'*E. coli* a été préparé par S. Laalami (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris). Le protocole utilisé est celui décrit par Dondon *et al.* (1985). Le gène d'IF2 a été cloné et la protéine surproduite 10 fois dans un vecteur thermosensible. La protéine IF2 a ensuite été purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium (50%), suivie d'un passage sur une colonne de DEAE cellulose puis d'une chromatographie sur phosphocellulose.

6. Préparation de l'ARNt initiateur, aminoacylation et formylation.

6-1. Préparation de l'extrait enrichi en enzymes.

Un extrait brut contenant tous les enzymes nécessaires à l'aminacylation et à la formylation de l'ARNt (les aminoacyl-ARNt synthétases et la formylase) a été obtenu après broyage des cellules d'*E. coli*, élimination des débris cellulaires par deux centrifugations successives à 15 000 rpm pendant 60 et 30 min et sédimentation des ribosomes par centrifugation à 48 000 rpm pendant 2 h (rotor Ti 50.2). Ce surnageant est ensuite dialysé contre le tampon P1. Les protéines (150 mg) contenues dans cette fraction soluble sont chromatographiées sur une colonne DEAE-cellulose (colonne 1x16 cm) prééquilibrée dans le même tampon. L'élution est réalisée dans le tampon P2. Les fractions enrichies en enzymes sont rassemblées et la quantité de protéines est évaluée par lecture de la DO à 280 nm, en estimant qu'une DO correspond à 1 mg/ml. Les protéines sont ensuite concentrées par dialyse contre 1 l de tampon (Tris-acétate 20 mM pH 7,5 ; acétate de Mg 1 mM ; DTT 1 mM ; glycérol 30%) , puis deux fois contre 600 ml de ce même tampon mais en présence de 50% de glycérol. Après détermination de la quantité de protéines comme précédemment, l'extrait enrichi en enzymes est réparti en aliquote de 50 µl et conservé à -80°C.

6-2. Préparation de l'acide 10-formyl-tétrahydrofolique.

L'acide 10-méthyl-tétrahydrofolique (10-méthyl-FH4) est préparé à partir du sel de calcium de l'acide *dl* 5-formyl-tétrahydrofolique (5-formyl-FH4) selon Rabinowitz (1963) : 25 mg de 5-formyl-FH4 dissous dans 2 ml de β -SH 1 M, ajusté à pH 1,5 avec HCl, sont précipités à 4°C pendant 4 h sous agitation. Après centrifugation, le précipité est repris dans 1 ml d'HCl 1 mM pour donner le 5,10-méthényl-FH4. La synthèse du 5,10-méthényl-FH4 est contrôlée par son spectre d'absorption de longueur d'onde entre 340 et 450 nm, le produit ayant un maximum d'absorption à 360 nm. Le 10-formyl-FH4 est obtenu par neutralisation du 5,10-méthényl-FH4 avec une solution de KOH 10 mM à 0°C pendant 4 h. La conversion du 5,10-méthényl-FH4 en 10-formyl-FH4 est suivie par la disparition de l'absorption à 360 nm ; l'absorption maximale du 10-formyl-FH4 étant de 258 nm dans une solution neutre.

6-3. Aminoacylation et formylation de l'ARNt initiateur.

L'ARN_t^{Met} d'*E. coli* provient de Böerhinger (Mannheim, RFA). La formation du Met-ARN_t^{Met} (aminoacylation) et du fMet-ARN_t^{Met} (formylation) sont réalisées de façon conjointe à 37°C pendant 15 min dans 75 µl de milieu réactionnel (HEPES-KOH 50 mM pH 7,5 ; ATP 4 mM ; acétate de Mg 16 mM ; DTT 16 mM ; RNasin 1,5 U ; extrait enrichi en enzymes 0,2 DO₂₈₀ ; 10-formyl-FH4 0,34 mM ; ARN_t^{Met} 1-2 OD₂₆₀ ; [³H]méthionine 0,52 mM à 25 µCi/mmoles.

Après arrêt de la réaction dans la glace, l'ARN est extrait par un mélange phénol-chloroforme saturé dans l'acétate de Na 50 mM pH 5,8. Les sels et les traces de phénol sont éliminés par passage à travers une colonne de Sephadex G-25. L'ARNt est ensuite précipité par 3 vol d'éthanol en présence d'acétate de Na 0,3 M, puis conservé à -20°C dans l'acétate de Na 2 mM pH 5,8.

6-4. Mesure des taux d'aminoacylation et de formylation.

La quantité d'ARNt aminoacylé est déterminée en précipitant l'ARNt contenu dans une fraction aliquote de 10 µl du milieu réactionnel décrit ci-dessus, avec 1 ml de TCA 10% en présence de 100 µl de BSA 0,1% pendant 5 min dans la glace. Le mélange est ensuite filtré sur membrane de nitrocellulose (Millipore, type HA 0,45 µm). Le filtre est introduit dans 5 ml de liquide de scintillation et la radioactivité totale correspondant au [³H]Met-ARN_t^{Met} et au f[³H]Met-tRNA_t^{Met} est comptée.

Le taux de formylation est mesuré en incubant pendant 3 min à 37°C, une fraction aliquote de 10 µl du milieu réactionnel en présence de 100 µl de Tris-HCl 200 mM pH 7,5 contenant CuSO₄ 25 mM. L'ARNt est ensuite précipité par 1 ml de TCA 10% en présence de 100 µl de BSA 0,1%. Dans ces conditions, le Met-ARN_t^{Met} est hydrolysé tandis que le fMet-ARN_t^{Met} n'est pas affecté. La quantité de fMet-ARN_t^{Met} est déterminée par comptage de la radioactivité après précipitation par le TCA 10%, comme décrit ci-dessus. Le rapport f[³H]Met-ARN_t^{Met}/(f[³H]Met-ARN_t^{Met} + [³H]Met-ARN_t^{Met}) donne le taux de formylation : celui-ci est généralement supérieur à 95%.

7. Formation du complexe binaire [IF2/fMet-ARN_t^{Met}].

Les conditions de formation du complexe binaire ont été adaptées d'après Van der Hofstad *et al.* (1977). Le f[³H]Met-ARN_t^{Met} (12 pmoles) est incubé en présence de

concentrations croissantes d'IF2 pendant 5 min à 37°C dans 0,1 ml de tampon d'association.

La formation du complexe binaire est testée comme suit : le complexe formé est stabilisé par addition de glutaraldéhyde (3%) pendant 2 min à 0°C. Le milieu est ensuite filtré sur membrane de nitrocellulose (Millipore, type HA 45 μm). Après lavage avec 500 μl du tampon d'association, le filtre est séché et la radioactivité est comptée. La courbe de saturation est donnée dans la figure 6 ci-dessous.

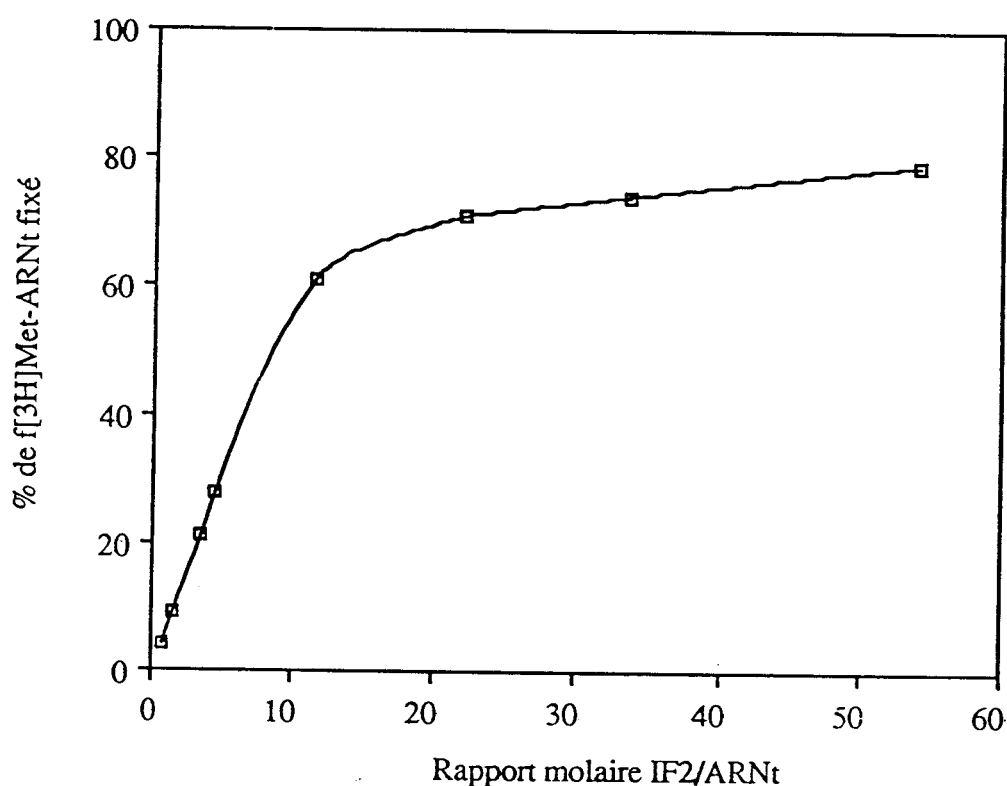


Figure 6 : Courbe de saturation du $f[^3\text{H}]\text{Met-ARNt}_f^{\text{Met}}$ (0,12 μM) en présence de quantités croissantes du facteur d'initiation IF2.

Pour une concentration d'IF2 15 fois supérieure à l'ARNt, la saturation est atteinte. Dans la suite du travail, les concentrations choisies pour la formation du complexe seront de 0,12 μM de $f\text{Met-ARNt}_f^{\text{Met}}$ et de 1,35 μM d'IF2.

8. Formation du complexe [30S/IF2/fMet-ARNt^{Met}/AUG/GTP].

Le complexe est formé par incubation de 10 pmoles de fMet-ARNt^{Met}, 135 pmoles d'IF2, 40 pmoles de sous-unités 30S, 900 pmoles d'AUG et 1 mM de GTP dans 0,1 ml du tampon d'association pendant 12 min à 37°C.

Pour l'étude de la conformation de l'ARNr 16S dans le complexe d'initiation, celui-ci est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation que précédemment mais en présence de 21 pmoles de sous-unités 30S, 1 mM de GTP, 40 pmoles de fMet-ARNt^{Met}, 140 pmoles d'IF2 et 900 pmoles d'AUG.

Dans les deux cas, la formation du complexe [30S/IF2/fMet-ARNt^{Met}/AUG/GTP] peut être vérifiée soit par filtration sur membrane de nitrocellulose, soit par fractionnement par centrifugation sur gradient de saccharose (10-30%, 50 000 rpm, pendant 2 h 15 à 4°C dans un rotor SW 60). Dans les deux cas, plus de 75% de l'ARNt est incorporé dans le complexe.

III. ETUDE CONFORMATIONNELLE DES ARN EN SOLUTION.

1. Marquage radioactif de l'ARNt et de l'ARNr 16S.

1-1. Marquage de l'extrémité 3' de l'ARNt.

1-1-1. Enlèvement du CCA terminal.

L'ARNt initiateur (10 µg) est incubé à température ambiante pendant 10 min dans 25 µl du milieu réactionnel contenant : Tris-HCl 50 mM pH 8,0 ; MgCl₂ 10 mM ; VPDE 1,25 µg (Philipps et Chiempraset, 1975). La réaction est arrêtée par deux extractions phénoliques successives, suivies d'extractions à l'éther afin d'éliminer l'excès de phénol. L'ARNt dépourvu du CCA terminal est ensuite précipité à l'éthanol.

1-1-2. Marquage de l'extrémité 3'.

L'ARNt-CCA (5 µg) est incubé à 37°C pendant 30 min dans 10 µl du milieu suivant: Tris-glycine 50 mM pH 8,5 ; DTE 8 mM ; MgCl₂ 10 mM ; CTP 50 µM ; [α -³²P]ATP 30 µM (410Ci/mmmole) ; ARNt nucléotidyltransférase 5 µg (Vlassov *et al.*, 1983). L'ARNt radioactif est ensuite purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% (1/20 bis-)/8 M urée dans le tampon TBE. Après autoradiographie, la bande de gel contenant l'ARNt est découpée, l'ARNt est ensuite élué dans le 100 µl de tampon d'élution à 4°C pendant une

nuit, précipité à l'éthanol, lavé, puis redissous dans 2 mM d'acétate de Na pH 5,8.

1-2. Marquage de l'extrémité 5' de l'ARNt.

1-2-1. Déphosphorylation.

L'ARNt (20 µg) est incubé pendant 2 min à 80°C dans 50 µl de milieu réactionnel contenant : Tris-HCl 50 mM pH 8,0 ; formamide 15% ; SDS 0,1% (Shinagawa et Padnanabhan, 1979). La réaction est effectuée pendant 30 min à 60°C en présence de 4×10^{-2} U de phosphatase alcaline. Cette étape est répétée une nouvelle fois. La réaction est arrêtée par addition d'un volume égal de phénol. L'ARNt extrait est ensuite précipité à l'éthanol, lavé puis purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% (1/20 bis-)/urée 8 M dans le tampon TBE. L'ARNt fractionné est visualisé sous UV. La bande correspondant à l'ARNt est découpée. L'ARNt est élué dans le tampon d'élution pendant une nuit à 4°C puis précipité deux fois à l'éthanol.

1-2-2. Marquage de l'extrémité 5'.

L'ARNt déphosphorylé (5 µg) est incubé pendant 30 min à 37°C dans 10 µl de milieu contenant : Tris-HCl 25 mM pH 8,0 ; $MgCl_2$ 10 mM ; β -SH 15 mM ; spermidine 1 mM ; $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ 30 µM (3200 Ci/mmmole), en présence de 2 U de T_4 polynucléotide kinase (Silberklang *et al.*, 1977).

Après marquage, l'ARNt peut être aminoacylé et formylé selon le protocole décrit dans le paragraphe II.6.3. L'ARNt aminoacylé mais non formylé est préparé de la même façon mais en absence de 10-formyl-FH4.

1-3. Marquage de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S.

L'ARNr 16S est marqué à son extrémité 3' *in situ* dans la sous-unité 30S. Les sous-unités 30S (12 pmoles) sont incubées à 4°C pendant 12 h en présence de pCp radioactif et de T_4 ARN ligase dans 20 µl de milieu réactionnel suivant : Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; $MgCl_2$ 10 mM ; ATP 100 µM ; DMSO 10% ; $[5'\text{-}^{32}P]\text{pCp}$ 300 µCi (3 Ci/mole) ; T_4 ARN ligase 12 U. Après marquage, les sous-unités 30S sont précipitées avec 15 µl d'éthanol en présence de 0,3 M d'acétate de Na, lavées et reprises dans 50 µl du tampon A, puis incubées à 37°C pendant 10 min. En parallèle, 80 pmoles de sous-unités 50S sont soumises au même processus. Les deux sous-unités sont rassemblées et incubées à 37°C pendant 30 min. Les ribosomes 70S ainsi obtenus sont isolés par centrifugation sur

gradient de saccharose (10-30%) à 21 000 rpm pendant 12 h à 4°C (rotor SW41). Les fractions contenant les particules 70S sont rassemblées et amenées à 0,4 M en NaCl afin de dissocier les sous-unités. Ces sous-unités sont ensuite fractionnées par centrifugation sur gradient de saccharose (10-30%) dans le tampon A contenant 0,4 M de NaCl. Les fractions contenant les sous-unités 30S radioactives sont rassemblées et précipitées. L'ARNr 16S radioactif est obtenu par déproténisation des sous-unités 30S dans le tampon M8-2B, puis centrifugation à travers un gradient de saccharose comme décrit dans le paragraphe II.4. Ce protocole permet d'obtenir un ARN homogène qui ne présente pas de dégradations.

2. Hydrolyses enzymatiques et modifications chimiques.

2-1. Origine des enzymes et réactifs chimiques utilisés.

CMCT : Merck (Darmstadt) ; DMS : Aldrich Chimie (France) ; ENU et DEPC : Sigma (USA) ; RNases T₁ et V₁ et nucléase S₁ : Pharmacia (France) ; polynucléotide kinase du phage T₄ et transcriptase inverse du virus du sarcome de Roux : Amersham (France) ; acrylamide et N-N' méthylène bis-acrylamide : BDH (Angleterre).

2-2. Renaturation du matériel biologique.

L'ARNt initiateur (non aminoacylé, aminoacylé, aminoacylé et formylé) est renaturé dans le tampon N1, N2 ou N3 par incubation à 55°C pendant 2 min et refroidi doucement à température ambiante pendant 20 min. Les sous-unités 30S sont préalablement activées à 37°C pendant 10 min dans le tampon adéquat.

Avant chaque modification chimique, la stabilité des complexes est vérifiée en présence de chaque réactif par la technique de filtration sur membrane de nitrocellulose (voir II.7 et II.8).

2-3. Hydrolyses enzymatiques.

Un essai standard contient 1 µg d'ARNt initiateur non radioactif et 50 000 cpm du même ARNt radioactif. Pour chaque réaction, un contrôle est traité en parallèle en absence d'enzyme afin de détecter les coupures spontanées dans l'ARN. L'hydrolyse enzymatique est réalisée dans 20 µl du tampon adéquat, en présence de RNase V₁ (0,025-0,05 U, 5 et 10 min à 37°C) ou de nucléase S₁ (50 U, 15 min à 37°C, en présence de ZnCl₂ 1 mM).

Après arrêt de la réaction par addition de 20 µl de phénol saturé par une solution contenant du SDS 0,1% et de l'acétate de Na 50 mM pH 5,8, l'ARN est ré-extrait par 20 µl de phénol-chloroforme (1/1, vol/vol) saturé en acétate de Na 50 mM pH 5,8. Après précipitation à l'éthanol, le culot est lavé deux fois à l'éthanol 80%, séché, puis repris dans 6 µl de tampon de charge.

2-4. Modification par les sondes chimiques.

Des précautions opératoires s'imposent du fait du pouvoir cancérigène des réactifs : manipulation sous une hotte aspirante, usage de gants, destruction du réactif excédentaire par immersion dans une solution de soude (pour le DMS, le DEPC et l'ENU) ou dans une solution d'acide acétique concentrée (pour le CMCT).

2-4-1. Modification au DMS.

-*Conditions natives* : 1 µl de DMS (dilué au 1/5 dans l'éthanol), 5 et 10 min à 37°C dans 40 µl de tampon N2, en présence de 2 µg de l'ARNt initiateur et en présence de 40 000 cpm d'ARNt initiateur radioactif.

-*Conditions semi-dénaturantes* : même protocole que pour les conditions natives, mais dans le tampon D1.

-*Conditions dénaturantes* : mêmes conditions que pour les conditions semi-dénaturantes, mais à 90°C pendant 1 min.

2-4-2. Modification au DEPC.

-*Conditions natives* : 4 µl de DEPC, 10 min à 37°C dans 40 µl de tampon N2, en présence de 2 µg de l'ARNt et de 40 000 cpm d'ARNt initiateur radioactif.

-*Conditions semi-dénaturantes* : même protocole que pour les conditions natives, mais dans le tampon D1.

-*Conditions dénaturantes* : mêmes conditions que pour les conditions semi-dénaturantes, mais 0,5 µl de DEPC à 90°C pendant 1 min.

2-4-3. Modification au CMCT.

-*Conditions natives* : 25 µl et 50 µl de CMCT (42 mg/ml). 5 et 10 min à 37°C dans 100 µl de tampon N3 en présence de 12 pmoles de l'ARNt initiateur et 5 µg d'ARNt^{Phe} dépourvu du CCA terminal.

-*Conditions semi-dénaturantes* : même protocole que pour les conditions natives, mais

dans le tampon D2.

-*Conditions dénaturantes*: même protocole que pour les conditions semi-dénaturantes, mais 1 min à 90°C.

2-4-4. Modification à l' ENU.

Modification de l'ARNt.

-*Conditions natives* : 5 µl d'une solution d'éthanol saturée en ENU, 3 h à 20°C et 1 h à 37°C dans 20 µl de tampon N3, en présence de 2 µg de l'ARNt et 50 000 cpm de l'ARNt initiateur radioactif.

- *Conditions dénaturantes* : 5 µl d'une solution d'éthanol saturée en ENU, dans 20 µl de tampon D2, 2 min à 80°C.

Modification de l'ARNr 16S.

Un essai standard contient 21 pmoles de 30S (correspondant à 14 µg d'ARNr 16S). Les conditions de formation des complexes [30S/IF2/GTP] et [30S/IF2/AUG/GTP/fMet-ARNt^{Met}] sont décrites dans le paragraphe II.8.

-*Conditions natives* : 8 µl d'une solution d'éthanol saturée en ENU pendant 45 min, 90 et 135 min à 37°C dans 50 µl de tampon N3.

-*Conditions dénaturantes* : 4 µl d'une solution d'éthanol saturée en ENU, 30 sec et 1 min à 80°C dans 20 µl de tampon D2 en présence de 14 µg d'ARNr 16S.

Les réactions réalisées sur les complexes sont arrêtées par extraction au phénol/chloroforme en présence de SDS 0,1%. Dans tous les cas, l'ARN est ensuite précipités deux fois à l'éthanol, lavé et séché.

3. Détection des coupures et des modifications chimiques.

3-1. Méthode directe.

3-1-1. Identification des purines modifiées en leur position N7 par le DMS ou le DEPC.

Le traitement chimique utilisé pour induire une coupure dans la chaîne ribose-phosphate au niveau des guanines méthylées en N7 par le DMS est celui décrit par Peattie (1979). Le précipité est repris dans 10 µl de Tris-HCl 0,1 M pH 8,2, avant l'addition de 10 µl de NaBH₄ 0,2 M préparé extemporanément. Après 5 min d'incubation à 0°C, l'ARNt est précipité deux fois à l'éthanol. Le précipité est lavé avec de l'éthanol 80%, séché, puis

repris dans 20 µl d'une solution d'aniline 9% dans l'acide acétique 5,5%. La réaction se fait à 60°C pendant 10 min à l'obscurité. Après transfert à 0°C, l'aniline est évaporée sous vide. Les traces d'aniline sont éliminées par trois lavages successifs avec 20 µl d'eau bidistillée. L'ARNt est ensuite dissous dans 6 µl de tampon de charge.

Pour la détection de la position N7 des adénines modifiées par le DEPC, seul le traitement à l'aniline est nécessaire.

3-1-2. Identification de la position N3 des cytosines méthylées par le DMS.

Après modification de l'ARNt par le DMS et précipitation alcoolique, le culot est repris dans 10 µl d'hydrazine 10% puis incubé 5 min à 0°C. La coupure de la chaîne ribose-phosphate est réalisée par l'aniline comme décrit précédemment.

3-1-3. Identification des phosphates alkylés par l'ENU.

Après modification, l'ARN alkylé est coupé au niveau de la liaison phosphotriester par incubation de 5 min à 50°C dans 10 µl de Tris-HCl 0,1 M pH 9. L'ARN est ensuite précipité deux fois à l'éthanol. Le culot est lavé à l'éthanol 80%, séché et repris dans 6 µl de tampon de charge.

3-1-4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide/urée.

Les fragments générés après hydrolyse enzymatique ou modification chimique sont fractionnés par électrophorèse sur gel (400 x 300 x 1 mm³) de polyacrylamide 10% ou 15% (1/20 bis-)/urée 8 M dans le tampon TBE. Le gel a été soumis à une pré-électrophorèse de 40 min à 20 mA avant la migration des échantillons (30 mA, pendant 3 h pour une migration courte et 6 h pour une migration longue). Parallèlement, deux échelles sont effectuées, l'une par hydrolyse statistique à la formamide (50 000 cpm d'ARNt radioactif, 1 µg d'ARNt total dans 4 µl de formamide désionisée, 25 min à 100°C), l'autre une hydrolyse statistique à la RNase T₁ sur un ARNt préalablement dénaturé (25 000 cpm d'ARNt marqué, 1 µg d'ARNt total dans 5 µl de tampon T1, RNase T₁ 10⁻³ U, 5 min à 50°C). Le gel est ensuite mis en autoradiographie.

3-2. Méthode d'élongation par la transcriptase inverse.

3-2-1. Préparation de l'amorce d'ADN.

Dans le cas de l'ARNt initiateur d'*E. coli*, l'amorce utilisée (5'TGGTTGCGG3') est complémentaire à la région 3' terminale de l'ARN. Pour l'ARNr 16S, nous avons utilisé 11

amorces différentes, complémentaires aux régions 110-124, 220-234, 330-344, 441-454, 550-564, 660-674, 761-777, 865-879, 986-1000, 1101-1116, 1220-1240, 1330-1347, 1435-1449 et 1498-1509. Ces amorces ont été synthétisées dans notre laboratoire par J. Colin, au moyen d'un synthétiseur automatique (Applied Biosystems) par la technique des phosphoramidites (Sinha *et al.*, 1984) et repurifiées sur HPLC. Ces oligodésoxyribonucléotides ne possèdent pas de groupement phosphate à leur extrémité 5'. Il est donc possible de les marquer par transfert du phosphate [γ - ^{32}P] de l'ATP à l'extrémité 5' de l'amorce en utilisant la polynucléotide kinase du phage T₄, comme décrit dans le paragraphe II.1.2.2.

3-2-2. Elongation par la transcriptase inverse.

La technique utilisée est dérivée de celle décrite par Lempereur *et al.* (1985). L'échantillon d'ARN modifié (2,5 μg dans 7 μl d'eau) et l'amorce radioactive (250 000 cpm environ) sont préincubés 5 min à 65°C, puis hybridés par une incubation de 5 min à 65°C après addition de 2 μl de tampon RTB 5X. Le mélange est ensuite refroidi lentement pendant 20 min à température ambiante. L'élongation est effectuée à 37°C pendant 30 min dans 15,5 μl en présence de deux unités de transcriptase inverse et de 2,5 mM de chacun des 4 dNTP. La réaction est arrêtée par addition de 200 μl d'acétate de Na 0,3 M et 800 μl d'éthanol. Le culot est lavé deux fois à l'éthanol 80%, séché et repris dans une solution contenant de la formamide désionisée en présence de 0,03% de xylène cyanol et de 0,03% de bleu de bromophénol.

3-2-3. Séquençage hétérologue.

La séquence de la région de l'ARN étudiée est réalisée selon la technique de Sanger *et al.* (1977). L'amorce d'ADNc marquée à son extrémité 5' est élongée comme précédemment, mais la présence de l'un des 4 ddNTP permet de bloquer l'élongation au niveau de la base correspondante. La concentration des dNTP est de 100 μM . En présence de ddNTP (2,5 μM), la concentration du dNTP correspondant à la même base est ramenée à 25 μM . Par exemple, dans le cas de la détection des G : ddGTP 2,5 μM , dGTP 25 μM et dTTP, dCTP et dATP 100 μM chacun. Le rapport dNTP/ddNTP est choisi de telle façon que l'incorporation du ddNTP se fasse de manière statistique. Les différents fragments d'ADN radioactifs sont ensuite repris dans une solution de formamide désionisée/colorants.

3-2-4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide/urée.

Les fragments d'ADNc radioactifs, repris dans la solution de formamide/colorants,

sont dénaturés par chauffage à 100°C pendant 2 min avant d'être fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8 ou 10% (1/20 bis-)/urée 8 M dans le tampon TBE. Le gel est soumis à une prémigration pendant 45 min à 20 mA. Les échantillons sont ensuite fractionnés par une électrophorèse de 2 h (migration courte) à 4 h (migration longue) à 1500 V. Après migration, le gel est fixé pendant 5 min dans une solution contenant de l'acide acétique 6% et de l'éthanol 10%, séché sous vide à 80°C, puis placé en autoradiographie à -80°C.

4. Modélisation graphique de l'ARNt initiateur.

Un modèle de structure tertiaire basé sur nos résultats expérimentaux a été construit par modélisation graphique par le Prof. E. Westhof (laboratoire de Cristallographie Moléculaire de l'IBMC). Cette modélisation est réalisée à l'aide de divers programmes informatiques installés sur les ordinateurs VAX du laboratoire de Cristallographie Biologique et avec la station PS300 d'Evans et Sutherland. Les vues stéréoscopiques représentées dans ce travail ont été réalisées avec le programme PLUTO (Motherwell et Evans, MRC Cambridge). Une description plus détaillée est donnée dans le chapitre "stratégie expérimentale".

IV. PONTAGE ARN-PROTEINE.

1. Conditions de pontage.

1-1. Traitement d'IF2 par le *t*-DDP.

Le *t*-DDP est préparé extemporanément à une concentration de 1,2 mg/ml dans l'eau. L'incubation de IF2 (3,5 μ M) en présence du *t*-DDP (1,5 mM) est réalisée à l'obscurité et à température ambiante pendant 1 h dans le tampon E pour le pontage entre IF2 et la sous-unité 30S, et dans le tampon F pour le pontage entre l'ARNt initiateur et IF2.

1-2. Pontage entre IF2 et l'ARNt initiateur.

Le facteur d'initiation IF2 modifié par le *t*-DDP est ajouté au fMet-ARNt^{fMet} (0,7 μ M) préalablement renaturé dans le tampon F. La réaction est ensuite effectuée à l'obscurité

pendant 10 min à 37°C. La réaction est arrêtée par deux précipitations éthanoliques successives de l'ARN.

1-3. Pontage entre IF2 et les sous-unités 30S.

Les sous-unités 30S (0,75 μ M, préincubées dans le tampon E pendant 10 min à 37°C), sont ajoutées à IF2 préalablement traité par le *t*-DDP. Le complexe IF2-Pt-30S est obtenu par incubation à 37°C pendant 5 min à l'obscurité. La réaction est arrêtée par addition d'un volume égal de tampon de dissociation G.

2. Isolement des complexes pontés ARNr 16S/IF2.

Les complexes pontés IF2/sous-unités 30S ainsi obtenus sont déprotéinisés par une centrifugation à travers un gradient de saccharose (5-25%) dans le tampon de dissociation G, pendant 17 h à 28 000 rpm à 10°C. Les fractions contenant l'ARNr 16S libre ou ponté à IF2 sont rassemblées puis précipitées deux fois à l'éthanol. Le culot est ensuite lavé deux fois à l'éthanol 80%, séché, puis repris dans 75 μ l de tampon E.

3. Isolement des complexes pontés IF2/oligoribonucléotides.

3-1. Hydrolyse ménagée par la RNase T₁ des complexes ARNt/IF2.

Le fMet-ARNt^{Met} libre ou ponté à IF2 est repris dans 200 μ l de tampon F contenant 0,4 M de NaCl. L'ARNt est préalablement dénaturé à 65°C pendant 5 min, puis est soumis à l'hydrolyse ménagée par la RNase T₁ (25 U) pendant 1 h à 37°C. La réaction est ralentie par addition de 500 μ l de tampon F contenant 0,4 M de NaCl et le milieu réactionnel est filtré sur membrane de nitrocellulose. Le filtre est lavé avec 20 ml du même tampon.

3-2. Hydrolyse ménagée par la RNase T₁ des complexes ARNr 16S/IF2.

La RNase T₁ (45 U) est ajoutée à l'ARNr 16S libre ou ponté à IF2 puis le mélange réactionnel est incubé 1 h à 37°C. L'hydrolyse est ralentie par addition de 20 μ l de NaCl 3 M (concentration finale en NaCl 0,7 M). Le milieu réactionnel est ensuite dilué par

addition de 1 ml de tampon E contenant 0,7 M de NaCl, puis filtré sur membrane de nitrocellulose, préalablement imbibé dans le même tampon. Le filtre est lavé avec 40 ml de tampon B contenant 0,7 M de NaCl, puis avec 40 ml du même tampon. Dans les deux cas, les produits pontés sont retenus sur le filtre alors que les fragments d'ARN libres passent à travers le filtre.

4. Identification des oligoribonucléotides pontés à IF2.

4-1. Réversion du pontage.

Après lavages, les filtres sont coupés en petits morceaux et incubés pendant 1 h à 37°C en présence de 450 µl de thiourée 2 M pour la réversion des pontages ARNr 16S/IF2 ou fMet-ARNt^{fMet}/IF2. Les filtres sont ensuite lavés par 350 µl de thiourée 2 M. Les fragments d'ARN libérés sont précipités deux fois à l'éthanol en présence de 60 µg de pAp servant d'entraîneur, puis lavés à l'éthanol 80%.

4-2. Marquage à l'extrémité 5'.

Les oligoribonucléotides libérés après réversion des pontages sont marqués (0,1 OD₂₆₀ par marquage) au ³²P à leur extrémité 5' par la T₄ polynucléotide kinase comme décrit dans le paragraphe III.1.2.2. Les oligoribonucléotides radioactifs sont fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% (3 h environ à 20 mA, selon la position des marqueurs) comme décrit précédemment. Après autoradiographie, les différentes bandes de gel contenant les fragments d'ARN sont excisées et le matériel nucléotidique est élué dans 75 µl de tampon d'élution pendant une nuit à température ambiante. Les fragments sont ensuite précipités à l'éthanol en présence de 10 µg d'ARNt total, lavés deux fois avec 200 µl d'éthanol 80%, séchés et repris dans 4 µl d'urée 10 M en présence des deux colorants xylène cyanol et bleu de bromophénol. Chaque fragment est repurifié sur gel de polyacrylamide 20% (1/20 bis-)/urée 8 M. Après élution et précipitation en présence de 10 µg d'ARNt total, chaque fragment est repris dans 10 µl d'eau bidistillée.

4-3. Séquençage.

La séquence de chacun des fragments d'ARN isolés ci-dessus a été déterminée par l'utilisation de diverses nucléases spécifiques. Les conditions d'utilisation sont telles que

moins d'une coupure sont statistiquement introduites par molécule. Nous avons utilisé la RNase T₁ (spécifique des guanines), la RNase U₂ (spécifique des adénines), la RNase *Phy M* (spécifique des adénines et uraciles) et la RNase de *Bacillus cereus* (spécifique des cytosines et uraciles). Après dénaturation à 50°C pendant 5 min, les fragments d'ARN sont soumis à l'hydrolyse par la RNase T₁ (0,02 U/μg d'ARN), par les RNases U₂ et *Phy M* (0,5 U/μg d'ARN) et par la RNase de *B. cereus* (0,25-0,5 U/μg d'ARN). L'incubation est réalisée à 55°C pendant 15 min (RNases T₁, U₂ et de *B. cereus*) et 30 min (RNase *Phy M*) dans un tampon (citrate de Na 20 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM, en présence d'urée 7 M pour les RNases T₁, U₂ et *Phy M* et en absence d'urée pour la RNase de *B. cereus*). Une échelle est réalisée en parallèle par une hydrolyse statistique de l'ARN dans 4 μl de formamide désionisée pendant 1 h à 90°C. Les échantillons sont ensuite fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20 ou 25% (1/20 bis-)/urée 8 M dans le tampon TBE.

4-4. Détermination du nucléotide 5' terminal des fragments d'ARN.

La RNase P₁ hydrolyse sans spécificité l'ARN libérant des nucléotides 5' phosphate. L'hydrolyse est réalisée dans 10 μl de tampon acétate de NH₄ 20 mM pH 4,5 en présence de 5 μg d'ARNt total et de 0,15 μg de RNase P₁ pendant une nuit à 37°C. Les nucléotides libérés sont séparés par chromatographie sur plaque de nitrocellulose en couche mince dans le solvant HCl/2-propanol/H₂O = (17,6/68/14,4). La plaque est ensuite séchée, puis placée en autoradiographie. L'identification du nucléotide 5' terminal est réalisée par superposition de l'autoradiographie et de la plaque de nitrocellulose visualisée sous UV.

STRATEGIE EXPERIMENTALE

Etude conformationnelle de l'ARN et pontage ARN-protéine

La structure d'une macromolécule peut être étudiée en solution ou à l'état cristallin. La radiocristallographie est la technique de choix qui a permis de révéler la structure d'un certain nombre de molécules d'ADN, de certains virus, de différents types de protéines ou de complexes ADN-protéines. En ce qui concerne l'ARN, seules sont connues à haute résolution la structure cristallographique de deux ARNt, l'ARNt^{Phe} et l'ARNt^{Asp} (Quigley *et al.*, 1975 ; Jack *et al.*, 1976 ; Westhof *et al.*, 1985) et celle du complexe ARNt^{Gln}/GlnRS (Rould *et al.*, 1989). Ceci réside dans le fait que très peu de cristaux diffractant à haute résolution ont pu être obtenus, reflétant les difficultés d'obtenir un matériel homogène, pur et intègre. En solution, l'analyse conformationnelle peut être réalisée dans des conditions expérimentales proches des conditions dites "physiologiques" et permet d'aborder plus facilement la dynamique de la molécule souvent liée à des problèmes fonctionnels. La résonance magnétique nucléaire a été développée pour l'étude structurale de diverses macromolécules, mais celle-ci ne permet pas encore d'obtenir d'informations pour des acides nucléiques excédant la taille d'une trentaine de nucléotides.

Dans notre laboratoire, nous avons adopté une stratégie expérimentale qui permet de donner une information sur l'accessibilité de chaque nucléotide à diverses sondes de structure (chimiques ou enzymatiques). Cette technique a l'avantage d'utiliser de faibles quantités de matériel et permet d'étudier les variations éventuelles de conformation de l'ARN en fonction de différents paramètres comme la température, la présence de cations, ou en présence de ses ligands spécifiques. A partir de ces données expérimentales combinées à la phylogénie, il est parfois possible de construire un modèle de structure tridimensionnelle qui tient compte de la stéréochimie. Ceci a été réalisé pour diverses molécules d'ARN telles que l'ARNt^{Ser} de mitochondrie de mammifère (De Bruijn et Klug, 1983), la structure en pseudo-ARNt de l'extrémité 3' terminale du virus de la mosaïque jaune du navet (Dumas *et al.*, 1987), le site de fixation sur l'ARNr 16S de la protéine S8 (Mougel *et al.*, 1987), l'ARNt^{Ser} de levure (Dock-Brégeon *et al.*, 1989) et l'ARNr 5S de chloroplaste d'épinard et de *Xenopus laevis* (Westhof *et al.*, 1989). De tels modèles peuvent être ensuite testés par l'étude conformationnelle de divers mutants de régions considérées stratégiques pour le repliement de la structure tertiaire. Cette méthode permet aussi de définir l'empreinte d'une protéine et de suivre la conformation de l'ARN dans divers états fonctionnels. Le proche voisinage des protéines peut être aussi étudié par des expériences de pontages ARN-protéine.

Dans ce chapitre, nous présenterons successivement la spécificité des différentes sondes de structure utilisées et décrirons les deux méthodes utilisées pour détecter les modifications chimiques ou les coupures enzymatiques. Les avantages et les limites de ces

SONDES	PM	SPECIFICITE	DETECTION	
			A	B
<i>-Sondes enzymatiques</i>				
-Nucléase S1	32 000	Nucléotides non appariés	[+]	+
-RNase V1	15 900	Nucléotides appariés ou empilés	[+]	+
<i>-Sondes chimiques</i>				
-DMS	126	N3-C	[s]	[+]
		N1-A	-	[+]
		N7-G	[s]	s
-DEPC	174	N7-A	[s]	+
-CMCT	424	N3-U	-	[+]
		N1-G	-	[+]
-ENU	117	Phosphates	[s]	s

Tableau 3 : Sondes enzymatiques et chimiques. (PM) poids moléculaire ; (A) détection directe par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de coupures des molécules d'ARN marquées à l'une de leurs extrémités ; (B) détection des coupures ou des modifications par élongation à la transcriptase inverse ; (+) indique que la méthode de détection concernée peut être utilisée ; (-) indique qu'elle ne peut pas l'être ; (s) indique qu'un traitement chimique permet de couper la chaîne ribose-phosphate au niveau du nucléotide modifié ; les crochets ([]) indiquent les méthodes utilisées dans ce travail.

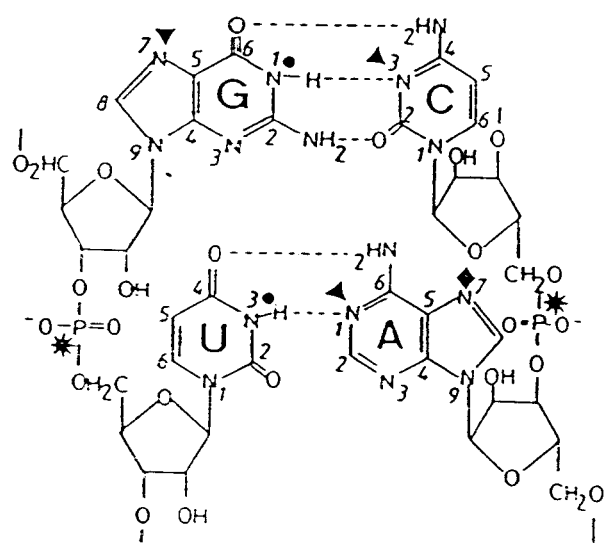


Figure 7 : Interactions Watson-Crick et positions cibles des sondes chimiques : (*) ENU ; (▽) DMS ; (●) CMCT ; (◆) DEPC.

deux méthodes sont discutées. Le principe de la construction d'un modèle de structure tertiaire de l'ARNt combinant nos résultats expérimentaux et tenant compte des contraintes stéréochimiques est également exposé. Enfin nous décrirons ici le principe de la technique de pontage ARN-protéine utilisée.

I. ANALYSE CONFORMATIONNELLE DE L'ARN.

1. Spécificité des sondes utilisées.

Les différentes sondes qui peuvent être utilisées pour l'étude conformationnelle de l'ARN sont décrites par Ehresmann *et al.* (1987). Dans ce travail, nous avons plus particulièrement utilisé comme sondes enzymatiques la RNase V₁ et la nucléase S₁ et, comme sondes chimiques, le DMS, le DEPC, la CMCT et l'ENU. Ces différentes sondes et leur spécificité sont représentées dans le tableau 3 et la figure 7 .

1.1. Les sondes enzymatiques.

1.1.1. Nucléase S₁.

La nucléase S₁, produite par *Aspergillus oryzae*, est spécifique des régions simples brins. Elle génère des fragments ayant une extrémité 5' phosphate. L'activité de cet enzyme requiert la présence d'ions Zn²⁺. Son pH optimum est de 4,5.

1.1.2. RNase V₁.

Cet enzyme, extraite du venin de cobra *Naja naja oxiana*, coupe sans spécificité de base les régions appariées ou empilées, libérant ainsi des fragments ayant une extrémité 5' phosphate. L'activité de cet enzyme requiert la présence de magnésium et son pH optimum est de 7,5.

1.2. Les sondes chimiques.

1.2.1. Le diméthylsulfate (DMS).

A pH neutre, le DMS méthyle les positions N1 des adénines, N7 des guanines et à un degré moindre la position N3 des cytosines. La réaction est sensible à la nature des bases environnantes et à l'empilement de bases.

1.2.2. Le diéthylpyrocarbonate (DEPC).

Le DEPC réagit par carbéthoxylation avec la position N7 des adénines provoquant ainsi une labilisation de la double liaison N7-C8. Ce réactif, de par sa taille, est plus sensible que le DMS à l'empilement des bases. Ainsi, les adénines situées dans une hélice régulière ne sont jamais réactives à leur position N7.

Le DEPC, de même que le DMS, peut être utilisé dans une large gamme de température (de 4°C à 90°C) et de pH (de 4,5 à 9).

1.2.3. Le 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métho-p-toluène sulfonate (CMCT).

Le CMCT se fixe par l'intermédiaire de l'azote de la fonction carbodiimide sur la position N3 des uridines et, à un degré moindre, sur la position N1 des guanines. La réaction est très sensible au pH ; elle doit être effectuée à pH 8,0.

1.2.4. L'éthylnitrosourée (ENU).

L'ENU alkyle préférentiellement les atomes d'oxygène des phosphates des acides nucléiques. La réaction génère des groupements phosphotriesters instables qui peuvent être facilement coupés par un traitement alcalin. Son mécanisme d'action est détaillé dans le chapitre II. La réaction ne dépend ni de la séquence ni de la structure secondaire de l'ARN. Cette réaction permet d'identifier les phosphates impliqués dans des interactions tertiaires ou dans la coordination avec des ions magnésium.

1.3. Avantages et limites d'utilisation des sondes de structure.

Les enzymes sont très utiles pour l'établissement d'un modèle de structure secondaire. Cependant, leur taille relativement élevée les rend très sensible à l'encombrement stérique généré par la fixation d'une protéine ou par une structure particulière de l'ARN. De même, bien que les conditions d'hydrolyses soient statistiques, des coupures secondaires peuvent être générées, ce qui gêne l'interprétation des résultats. En effet, une première coupure peut induire un changement de conformation du fragment généré, favorisant ainsi une deuxième coupure (coupure dite secondaire) indépendante de la structure native de l'ARN. Ces coupures secondaires peuvent être révélées en réalisant les expériences en parallèle sur des molécules marquées d'une part en 3' et d'autre part en 5'.

En raison de leur faible poids moléculaire, les sondes chimiques sont moins sensibles à l'encombrement stérique et donnent des informations au niveau atomique. La non

réactivité d'un atome peut être la conséquence de plusieurs phénomènes : il peut être impliqué dans un appariement de type Watson-Crick, dans une interaction de type tertiaire (appariement non canonique, interaction à longue distance), dans une liaison de coordination avec un ion, ou dans un empilement de bases.

Il est à noter toutefois que la réactivité de l'atome ne peut pas toujours être corrélée à son accessibilité dans la molécule. En effet, la réactivité est influencée par l'environnement électrostatique de la molécule. Dans le cas de la modification de l'ARN par l'ENU, la réactivité du phosphate peut être directement corrélée à son accessibilité à cause du haut potentiel électrostatique négatif du phosphate (Lavery et Pullman, 1984 ; Furois-Corbin et Pullman, 1985). De plus, certains de ces réactifs réagissent avec les protéines ; en particulier le DEPC réagit avec les groupements histidines et cystéines. Il est donc nécessaire de réaliser des contrôles pour tester la stabilité des complexes en présence du réactif chimique. Dans certains cas, un excès de protéines est nécessaire pour protéger le complexe contre une éventuelle déstabilisation.

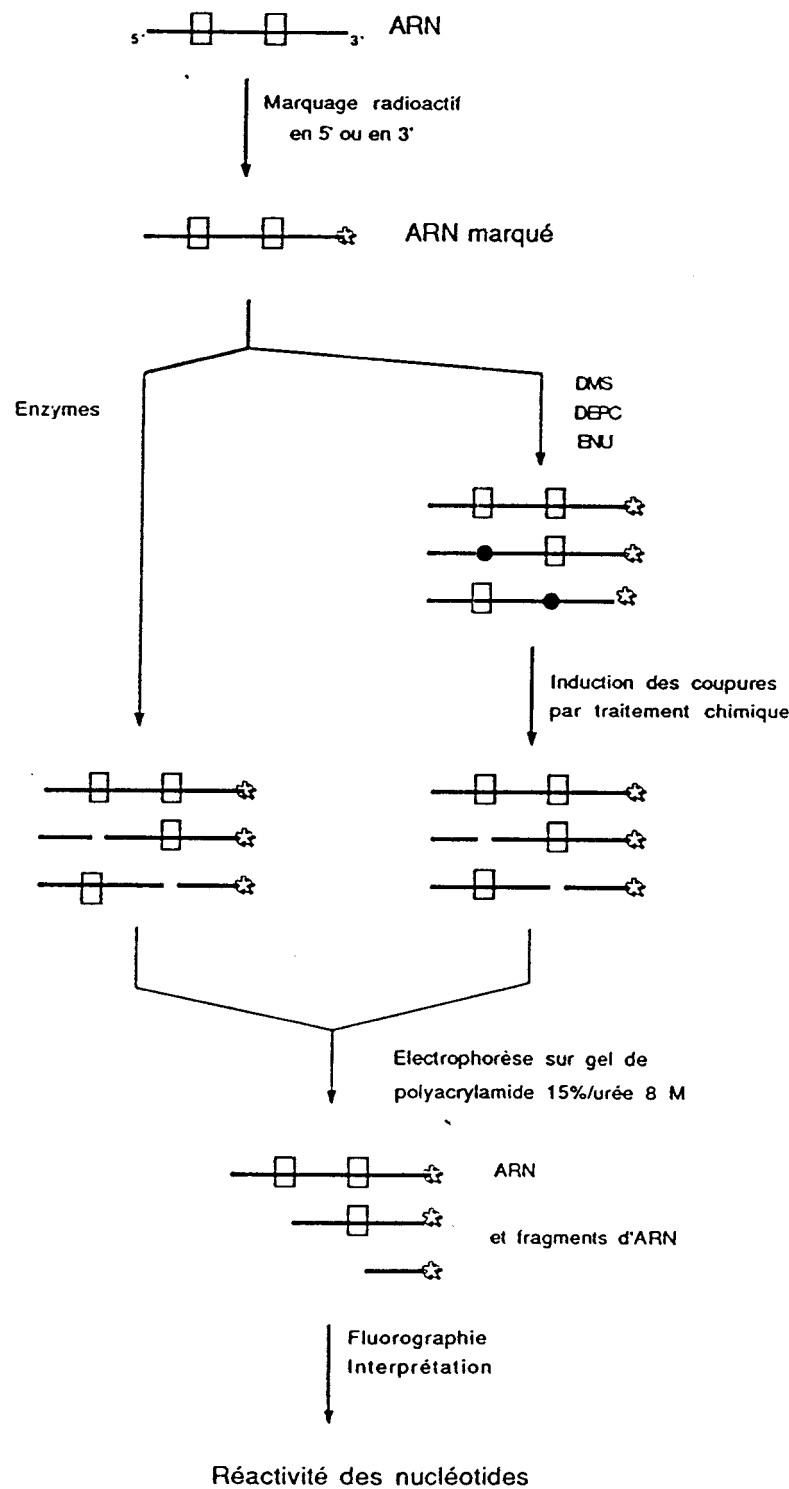
2. Conditions d'utilisation des sondes.

L'accessibilité (ou la réactivité) de chaque nucléotide de l'ARN, libre ou impliqué dans un complexe donné, est testé par l'utilisation de sondes de structures enzymatiques ou chimiques, dans des conditions n'excédant pas une coupure ou modification statistiquement répartie par molécule.

La conformation de l'ARN étant sensible à divers paramètres (pH, force ionique, concentration en magnésium, température), il est donc essentiel d'utiliser des conditions expérimentales strictement définies qui permettent d'obtenir la molécule d'ARN dans une conformation donnée. Ainsi, il est nécessaire d'ajuster pour chaque sonde, le rapport sonde chimique/ARN. Par exemple, l'hydrolyse de l'ARN par la nucléase S_1 dont le pH optimum est de 4,5, a été adaptée à pH 7,5. Dans le cas de la modification de l'ARN par la CMCT, la réaction doit être effectuée à pH 8,0.

Les réactions chimiques sont réalisées dans trois conditions expérimentales : en conditions natives (dans notre cas, les conditions choisies sont optimales pour la stabilité du complexe d'initiation, en présence de magnésium et de NH_4Cl à pH 7,5 et à basse température), en conditions semi-dénaturantes (en absence de magnésium, pH 7,5 et à basse température) et en conditions dénaturantes (en absence de magnésium, pH 7,5 et à 90°C). Ces conditions donnent une idée sur la stabilité relative des différents domaines de l'ARN. De plus, les interactions tertiaires, moins stables que les interactions Watson-Crick

METHODE DE DETECTION DIRECTE



METHODE DE DETECTION PAR ELONGATION A LA TRANSCRIPTASE INVERSE

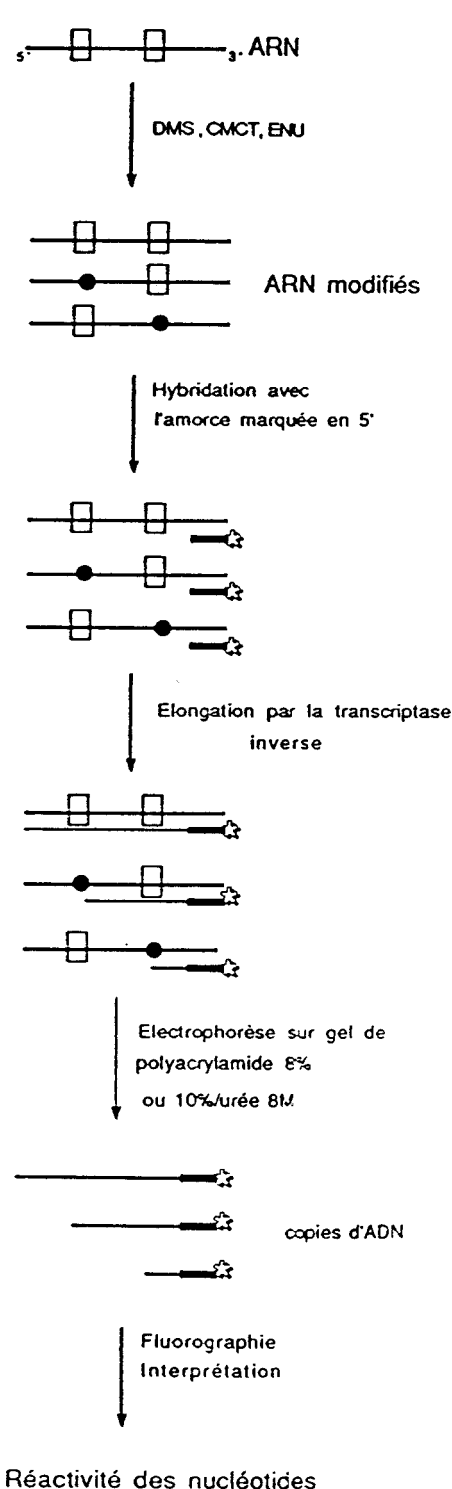


Tableau 4 : Principes généraux des deux stratégies employées pour localiser les sites d'hydrolyses enzymatiques, de modifications chimiques. (□) indique les positions cibles sur l'ARN ; (●) indique les positions modifiées sur l'ARN ; (⋆) indique un marquage radioactif terminal.

doivent fondre en conditions semi-dénaturantes.

3. Détection des coupures enzymatiques et modifications chimiques.

Cette analyse peut se faire par deux approches différentes, la méthode de détection directe et la méthode d'élongation d'amorce par transcription inverse. Le choix entre ces deux techniques dépend de la longueur de l'ARN et du type de modification chimique effectué. Le principe de ces deux approches décrites ci-dessous est schématisé dans le tableau 4.

3.1. Méthode de détection directe.

Cette technique ne permet de détecter que les coupures générées après hydrolyse ou traitement chimique et est limitée aux molécules d'ARN possédant une taille d'environ 200 nucléotides ou à la partie terminale de grandes molécules.

Dans cette approche, l'ARN doit être préalablement marqué à l'une de ses extrémités avant d'être soumis aux sondes enzymatiques et chimiques dans les conditions strictement définies. Cette technique a été utilisée pour détecter les coupures enzymatiques et les modifications chimiques aux positions N3-C, N7-G, N7-A et sur les phosphates, pour lesquelles il existe des traitements chimiques additionnels qui conduisent à la coupure de la chaîne ribose-phosphate au niveau du nucléotide modifié. Le principe de ces coupures est décrit en détail par Ehresmann *et al.* (1987). Les fragments générés sont fractionnés selon leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Une hydrolyse statistique à la formamide et une hydrolyse statistique à la RNase T₁ (spécifique des guanines) ou à la RNase U₂ (spécifique des adénines) permettent de localiser les sites de coupures ou de modifications chimiques dans la séquence de l'ARN. Des contrôles d'incubation en absence du réactif chimique ou de l'enzyme sont réalisés afin de détecter les coupures non générées par l'action de ces diverses sondes.

3.2. Méthode de détection par élongation d'amorce.

Cette approche permet de tester des régions internes de grandes molécules d'ARN telles que les ARN ribosomiques, les ARN messagers ou les ARN viraux.

L'ARN est modifié par les différentes sondes de structure dans les conditions déterminées, puis est hybridé à un oligodésoxyribonucléotide marqué à son extrémité 5' et

complémentaire à une région donnée de l'ARN. L'élongation se fait à partir de cette amorce en présence de la transcriptase inverse et des quatre dNTP. L'introduction de coupures dans la chaîne ribose-phosphate ou de modifications aux positions Watson-Crick bloque la progression de la transcriptase inverse. Les fragments d'ADN ainsi synthétisés sont fractionnés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. L'ARN est séquencé en parallèle par la technique de Sanger pour localiser les nucléotides modifiés ou coupés. Cette technique a été utilisée pour tester les positions N1-A et N3-C par le DMS, N1-G et N3-U par le CMCT. Pour tester les positions N7-G par le DMS et les phosphates par l'ENU, il est nécessaire de réaliser un traitement chimique additionnel pour induire une coupure au niveau du nucléotide modifié (voir tableau 3 et Matériel et Méthodes).

Il est à noter que la présence de certaines bases naturellement modifiées à une position Watson-Crick bloque totalement l'élongation par la transcriptase inverse. Cette méthode n'est donc pas toujours applicable pour sonder les régions des ARN qui présentent de telles bases modifiées. De plus, certaines pauses non spécifiques peuvent refléter la difficulté de l'enzyme de fondre des structures secondaires de l'ARN très stables. Des coupures spontanées ont aussi souvent lieu au niveau des séquences de type pyrimidine-adénine, qui reflètent une certaine flexibilité de cette séquence (pour revue, voir Dock-Brégeon et Moras, 1987). Toutes ces pauses peuvent gêner l'interprétation des résultats ; il est donc important de réaliser, dans toutes les expériences, des contrôles d'incubation avec l'ARN non traité par les sondes de structure.

II. MODELISATION GRAPHIQUE DE L'ARN_t INITIATEUR D'*E. COLI*.

A partir des résultats obtenus par l'étude conformationnelle de l'ARN en solution à l'aide des différentes sondes de structure utilisées et de la connaissance de la structure cristallographique connue de l'ARN_t^{Phe} de levure (Quigley *et al.*, 1975 ; Jack *et al.*, 1976), nous avons construit un modèle de structure tridimensionnelle de l'ARN_t initiateur d'*E. coli* par modélisation graphique en collaboration avec E. Westhof (voir article 1). L'ARN_t^{Phe} a été choisi comme base de donnée structurale, puisque celui-ci présente un certain nombre de nucléotides cruciaux pour le repliement de l'ARN_t qui sont identiques à l'ARN_t^{Met}. Les régions C1-G15 et G18-A76 ont été construites par le programme FRAGMENT (Westhof, 1988) qui peut projeter toute séquence dans une structure tertiaire connue contenue dans la banque de données. Cette banque contient toutes les structures cristallographiques connues à haute résolution (ARN_t, ADN) et les structures modélisées

(ARN^{tSer}, structure pseudo-ARN^t des virus, boucle T de divers ARN^{tASP} mutants...). Avec le programme NAHELIX, les trois nucléotides de la boucle D (C16, C17 et U17.1) ont été construits. Ces différents fragments ont été ensuite assemblés de manière interactive par le programme FRODO (Jones, 1978). Le modèle est ensuite soumis à des contraintes stéréochimiques, géométriques et énergétiques qui réduisent le nombre de degrés de liberté, par le programme NUCLIN/NUCLSQ (Konnert et Hendrickson, 1980 ; Westhof *et al.*, 1985).

A la fin de la modélisation, de même que pendant la construction des sous-structures, le programme ACCESS basé sur l'algorithme de Richmond (1984), permet une mesure quantitative de l'accessibilité (stérique) des atomes du modèle proposé. L'accessibilité de chaque atome est calculée en utilisant une sphère, de rayon adapté à la taille de la sonde chimique utilisée (1,4 à 2,8 Å), qui roule sur les surfaces de Van der Waals du modèle. Ces valeurs calculées sont ensuite comparées aux valeurs expérimentales et le modèle est modifié de façon à obtenir une bonne corrélation entre ces deux données. Certaines ambiguïtés peuvent subsister du fait que le calcul ne tient pas compte de la stabilité thermodynamique ou de la dynamique moléculaire de l'environnement de l'atome sondé. Toutefois, la validité de cette méthode repose sur le fait qu'une très bonne corrélation a été observée entre les structures cristallographiques connues et les résultats obtenus en solution pour l'ARN^{tASP} et l'ARN^{tPhe} de levure (Holbrook et Kim, 1983 ; Romby *et al.*, 1985, 1987). De plus, il est à noter que l'étude conformationnelle de l'ARN^t initiateur repose sur la réactivité de chaque nucléotide à l'une de leur position Watson-Crick, de la position N7 des purines et des phosphates dans des conditions expérimentales strictement définies. Une telle étude exhaustive n'avait jamais été réalisée auparavant sur un ARN^t.

III. PONTAGE ARN-PROTEINE.

L'étude du proche voisinage entre ARN et protéines dans un complexe nucléoprotéique donné peut être abordée par l'introduction de pontages entre les deux types de molécules. Cette méthode ne permet pas d'identifier avec précision les points de contact entre les molécules mais elle fournit des renseignements précieux sur les régions en proche voisinage et donne une idée de l'orientation des diverses macromolécules dans le complexe. L'irradiation aux UV a été utilisée pour induire des pontages covalents directs entre ARN et protéines (Ebel *et al.*, 1979 ; Zwieb et Brimacombe, 1979 ; Ehresmann *et al.*, 1980). Les réactifs bifonctionnels qui permettent de créer des ponts entre une molécule d'ARN et une protéine, ont été particulièrement développés ces dernières années pour

l'étude de la topographie du ribosome (pour revue, voir Brimacombe *et al.*, 1983) et pour l'étude de divers complexes tels que le complexe ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase (Leon et Schulmann, 1987).

Dans ce travail, nous avons utilisé comme réactif de pontage le *trans*-diaminodichloro platine (II). Comme le montre la figure 8, ce composé est un complexe tétracoordiné à géométrie plane où les deux groupements NH₂ sont thermodynamiquement inertes alors que les deux atomes de chlore peuvent être déplacés par d'autres atomes tels que le soufre et l'azote. Dans la forme *cis*, la distance de 3,5 Å entre les deux atomes de chlore permet d'établir des pontages intra et inter brins dans la double hélice de l'ADN (Shooter *et al.*, 1972). En revanche, dans la forme *trans*, la distance entre les deux atomes de chlore étant de 7 Å, seuls des pontages inter brins peuvent se former (pour revue, voir Roberts et Thomson, 1979). De plus, le *t*-DDP peut établir des pontages entre acides nucléiques et protéines.

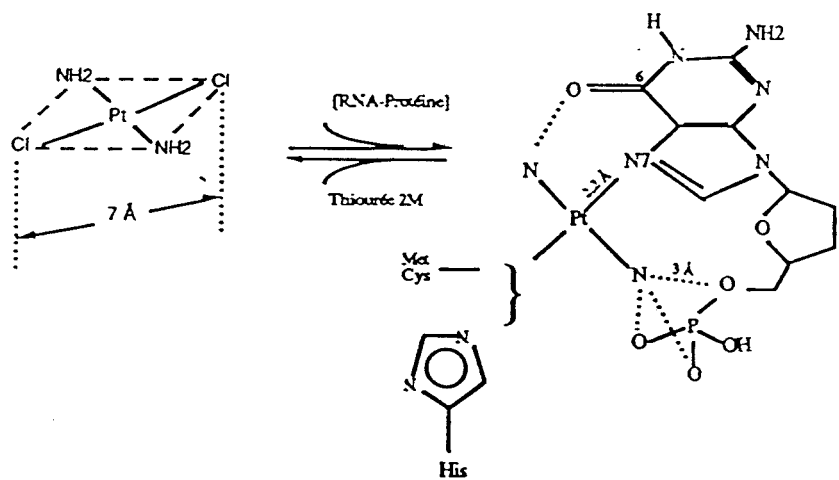


Figure 8 : Mécanisme de pontage ARN-protéine par le *trans*-diaminodichloro platine (II) ou *t*-DDP proposé par Tukalo *et al.* (1987).

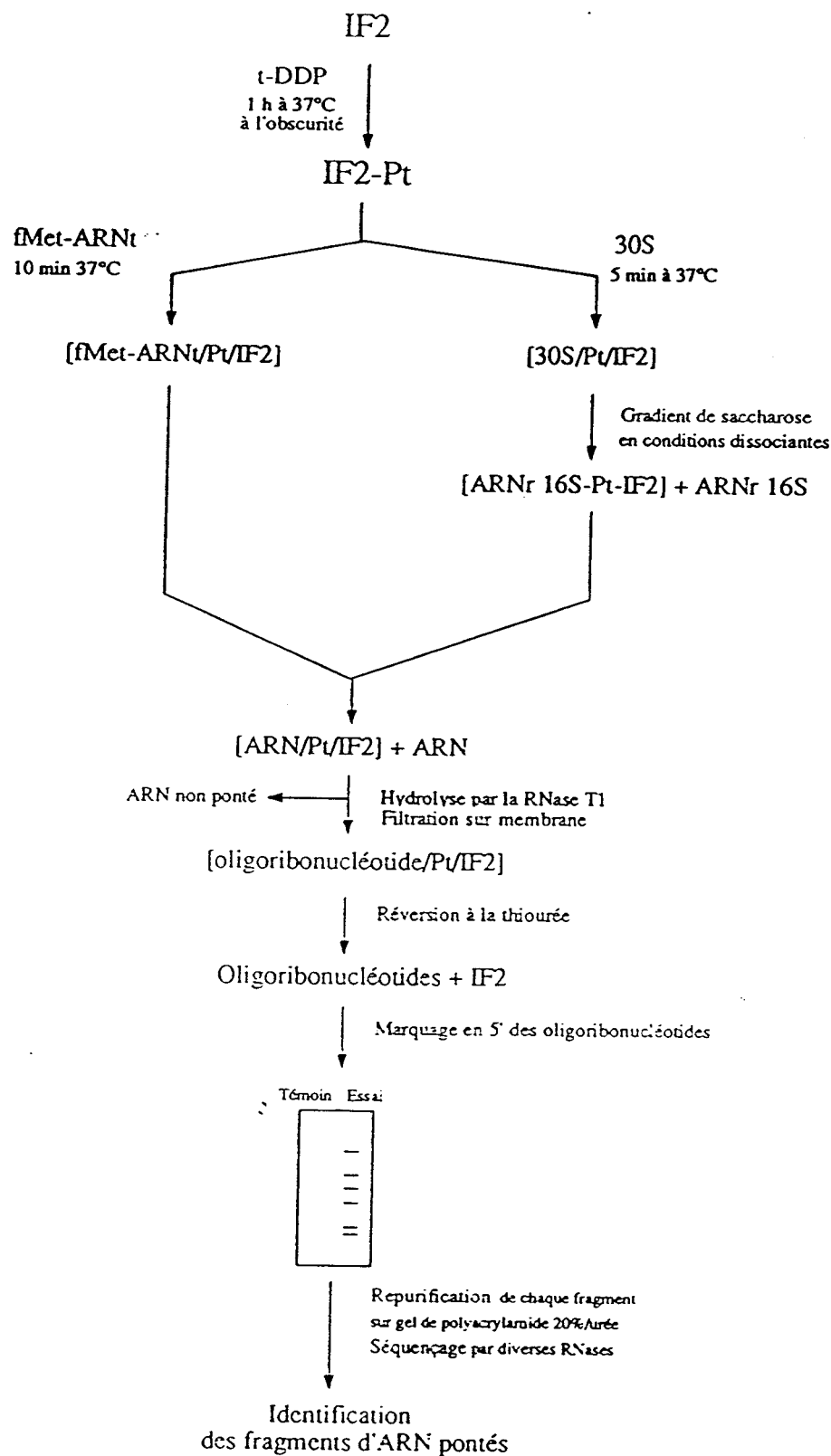


Tableau 5 : Méthode générale du pontage de l'ARNi initiateur ou de l'ARNr 16S et du facteur d'initiation IF2 et détermination des oligoribonucléotides pontés.

Il a été montré dans la structure cristallographique de l'ARN^t_{Phe} que le *t*-DDP interagit préférentiellement avec la position N7 des guanines et à un moindre taux avec les positions N1 et N7 des adénines et N3 des cytosines (Rubin *et al.*, 1983). Du côté protéique, les groupements les plus réactifs sont le soufre de la cystéine et de la méthionine ainsi que le groupement imidazole de l'histidine (Petzko, 1985). Le mécanisme de pontage par le *t*-DDP tel qu'il a été proposé par Tukalo *et al.* (1987) est représenté dans la figure 8. Les complexes ARN-protéine ainsi pontés sont stables en milieu alcalin et acide et peuvent être réversés par un agent nucléophile puissant comme la thiourée (Tukalo *et al.*, 1987).

Cette méthode de pontage réversible a été mise au point dans notre laboratoire et a été utilisée pour l'analyse de divers complexes ribonucléoprotéiques, tels que les complexes ARN^t/aminoacyl-ARN^t synthétase (Tukalo *et al.*, 1987), ARN^t/EF-Tu (Wikman *et al.*, 1987 ; Metz-Boutigue *et al.*, 1989), IF3/ARNr 16S dans la sous-unité 30S (Ehresmann *et al.*, 1986), protéine S18/ARNr 16S dans la sous-unité 30S (Moine *et al.*, 1988a); ARNr 5S/facteur de transcription TFIIA dans les oocytes de xénope (Baudin *et al.*, 1990).

Dans ce travail, nous avons déterminé par l'intermédiaire de ce réactif les points de pontage de l'ARN^t initiateur d'*E. coli* à IF2 et de l'ARNr 16S à IF2. Les conditions expérimentales décrites dans la partie "Matériel et Méthodes", sont résumées dans le tableau 5.

CHAPITRE 1

*Etude de la conformation de l'ARNt initiateur d'E. coli.
Interaction avec le facteur d'initiation IF2
et la sous-unité ribosomique 30S.*

I. INTRODUCTION

Afin de mieux comprendre la spécificité structurale et fonctionnelle de l'ARNt initiateur, il est sans doute nécessaire de résumer les connaissances actuelles sur la structure de l'ARNt et de son interaction avec ses divers ligands lors de la biosynthèse des protéines.

La fonction de l'ARNt.

Dès 1955, Crick postula l'existence de ces petites molécules d'ARN qu'il nomma adaptateurs, capables de faire le lien entre les acides nucléiques et les protéines. Leur rôle primordial est celui qu'ils exercent dans la biosynthèse des protéines puisqu'ils sont responsables de traduire le codon de l'ARNm en acide aminé. L'ARNt doit être tout d'abord aminoacylé par une aminoacyl-ARNt synthétase. Cette reconnaissance est spécifique puisqu'à chaque acide aminé correspond une aminoacyl-ARNt synthétase et au moins un ARNt. L'ARNt aminoacylé doit être amené ensuite au niveau du ribosome, soit dans le site A par le facteur d'élongation EF-Tu pour l'ARNt élongateur, soit dans le site P pour l'ARNt initiateur lors de la formation du complexe d'initiation. L'ARNt participe à de nombreux autres processus cellulaires, en particulier il est impliqué dans divers mécanismes de régulation (pour revues, voir La Rossa et Söll, 1980 ; Ofengand, 1982). De nos jours, de nouvelles fonctions lui sont attribuées, comme par exemple son rôle d'amorce dans la transcription inverse des ARN de rétrovirus (Kikuchi *et al.*, 1986), ou son implication dans la biosynthèse de la chlorophylle (Schön *et al.*, 1986).

La structure tertiaire de l'ARNt.

L'ARNt est le seul ARN biologique dont la structure tertiaire a été résolue par diffraction des rayons X. Les structures affinées à haute résolution sont celles de deux ARNt élongateurs de levure : l'ARNt^{Phe} (Jack *et al.*, 1976 ; Holbrook *et al.*, 1978 ; Sussman *et al.*, 1978 ; Westhof et Sundaralingam, 1986) et l'ARNt^{Asp} de levure (Westhof *et al.*, 1985). Le repliement de la structure tertiaire en feuille de trèfle (établie par Holley *et al.*, 1965) en structure tertiaire présente une forme en L. Cette forme particulière semble être commune à tous les ARNt, y compris à l'ARNt initiateur de levure (Schevitz *et al.*, 1979) et d'*E. coli* (Woo *et al.*, 1980). La figure 9 représente la structure secondaire et tertiaire de l'ARNt^{Phe} de levure. Deux domaines hélicoïdaux caractérisent cette structure :

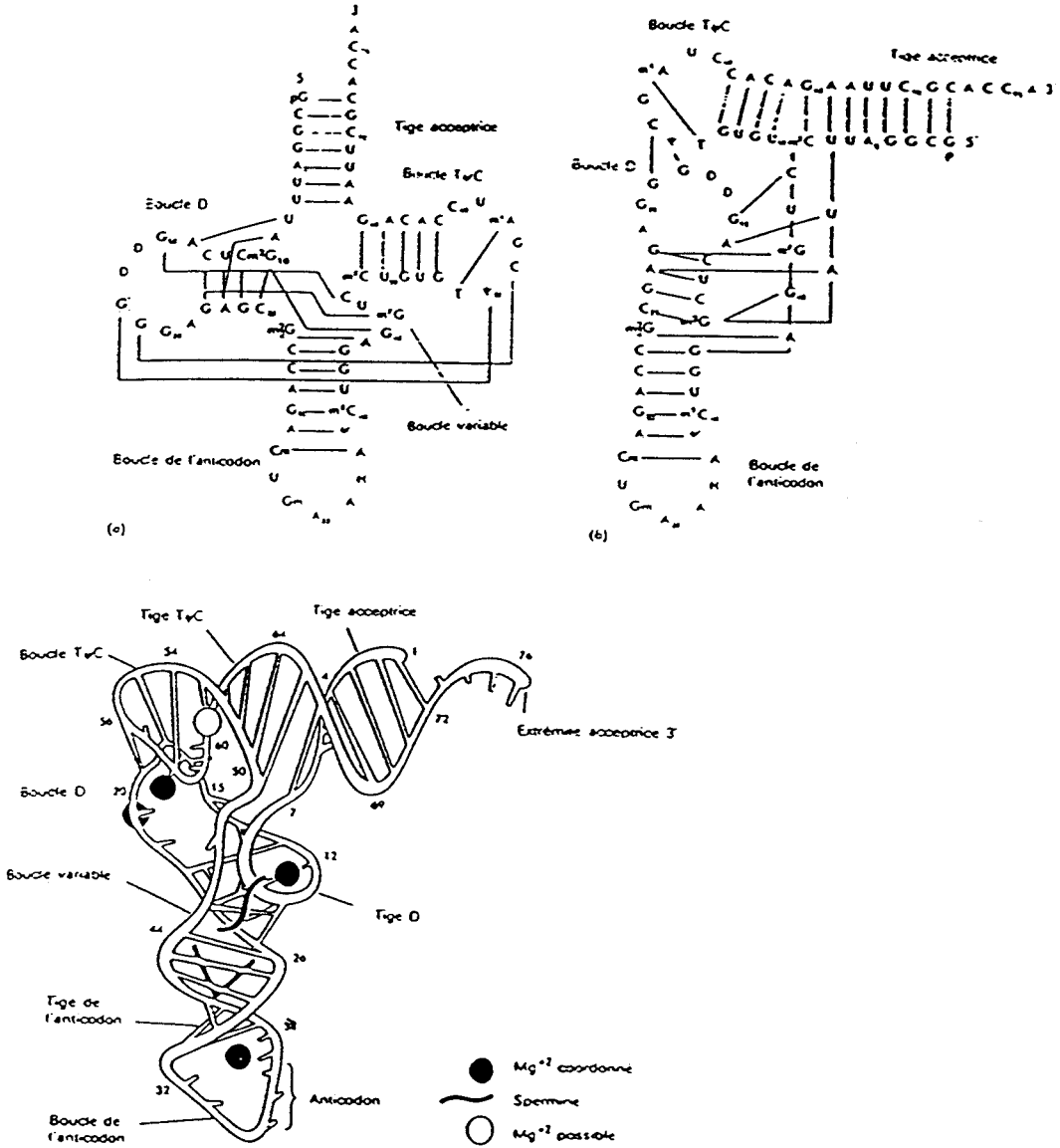


Figure 9 : Structure secondaire (a) et tertiaire de l'ARNi^{Phe} (b, c) de levure. (c) Sur la structure tertiaire sont représentés les sites d'interaction de la spermine (f) et du magnésium (●, ○), d'après Quigley *et al.* (1978).

l'un est obtenu par empilement coaxial des bras T et accepteur, l'autre par empilement coaxial des bras D et anticodon. La boucle T et la boucle de l'anticodon possèdent une conformation intrinsèque maintenue par des liaisons tertiaires internes. En revanche, la boucle D et la boucle variable peuvent varier en taille selon l'ARNt considéré (pour revue, voir Schimmel et Redfield, 1980). Les deux domaines sont stabilisés par la présence d'interactions à longue distance entre la boucle variable, la boucle T et la région D (liaison triple C13-G22-m⁷G46, appariement Hoogsteen réverse U8-A14, appariements R15-Y48 et G19-C56). Ces interactions impliquent la plupart des bases conservées (voir figure 9). Dans l'ARNt^{Asp}, l'interaction entre les boucles T et D est plus faible. En fait, cette structure correspondrait à une conformation particulière de l'ARNt lorsqu'il interagit avec le codon de l'ARNm (Moras *et al.*, 1986). Les deux régions fonctionnelles (l'anticodon et l'extrémité acceptrice) se trouvent distantes d'environ 75 Å. Cette topographie laisse ainsi une large surface du corps de l'ARNt pour interagir avec ses divers partenaires.

L'interaction entre l'ARNt et divers ligands.

Interaction ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase. Cette interaction a suscité un nombre considérable d'études (pour revue, voir Schimmel, 1989). Bien qu'une large surface de l'ARN soit en proche voisinage de l'enzyme (par exemple, Romby *et al.*, 1985 ; Garret *et al.*, 1984 ; Park et Schimmel, 1988 ; Dock-Brégeon *et al.*, 1989), il n'existerait qu'un nombre très faible de déterminants structuraux responsables de la spécificité (par exemple, Normanly *et al.*, 1986 ; Rogers et Söll, 1988 ; Hou et Schimmel, 1988 ; Mc Clain et Foss, 1988). Ainsi, dans le cas du système alanine, une seule paire de bases G3-U70 dans le bras accepteur lui confère sa spécificité (Hou et Schimmel, 1988 ; Mc Clain et Foss, 1988). Dans d'autres systèmes, l'anticodon est un déterminant important pour la reconnaissance spécifique (pour revue, voir Kisselev, 1985). Ceci a été particulièrement décrit dans le système méthionine (Schulman et Pelka, 1983). Des cristaux diffractant à haute résolution ont été obtenus pour des complexes spécifiques entre l'ARNt^{Asp} et l'aspartyl-ARNt synthétase (enzyme dimérique) de levure (Ruff *et al.*, 1987) et entre l'ARNt^{Gln} et la glutaminyl-ARNt synthétase (enzyme monomérique) d'*E. coli* (Perona *et al.*, 1987). Dans le premier cas, la structure à haute résolution est en cours ; toutefois, un modèle à basse résolution montre que chaque sous-unité de l'enzyme interagit avec une molécule d'ARNt sur une même face de l'ARNt. Dans le deuxième cas, la structure à haute résolution montre qu'il n'existe que deux contacts essentiels entre l'enzyme et l'ARNt : l'extrémité 3' et l'anticodon (Rould *et al.*, 1989). Ces deux études représentent un pas considérable dans la compréhension de la nature exacte des interactions entre les deux partenaires.

Interaction ARNt/EF-Tu/GTP. Bien que le facteur d'élongation soit impliqué dans diverses fonctions (pour revue, voir Bosch *et al.*, 1986), son rôle fondamental reste celui qu'il exerce dans l'étape d'élongation de la synthèse protéique où il assure la fixation spécifique d'un aminoacyl-ARNt au site A du ribosome en présence de GTP. L'étape cruciale dans ce processus est la reconnaissance de l'ARNt aminoacylé. EF-Tu n'opère que faiblement une distinction entre les différents aminoacyl-ARNt pour lesquels il présente une très forte affinité (pour revue, voir Johnson *et al.*, 1986). En revanche, son affinité est très faible pour les ARNt non aminoacylés, pour les analogues du peptidyl-ARNt (Ravel *et al.*, 1967) ou pour des aminoacyl-ARNt dont l'extrémité 3' a été modifiée (par exemple, Ofengand et Chen, 1972 ; Baksht, 1975). Cette situation contraste avec la reconnaissance spécifique des ARNt par les aminoacyl-ARNt synthétases. Il semble évident que le facteur reconnaisse un motif structural commun à tous les ARNt élongateurs ; en particulier l'extrémité 3' doit jouer un rôle important dans cette interaction. En effet, différentes études montrent que EF-Tu interagit principalement avec le domaine hélicoïdal comprenant les bras accepteur et T ; le bras de l'anticodon étant exposé dans le complexe (pour revue, voir Johnson *et al.*, 1976). Des changements conformationnels ont été mis en évidence, tant au niveau de l'ARNt (par exemple, Wikman *et al.*, 1982 ; Riehl *et al.*, 1983), que de la protéine (Österberg *et al.*, 1986). Il a été montré que, lors de la fixation du complexe ternaire aminoacyl-ARNt/EF-Tu/GTP au niveau du ribosome, un second site d'interaction pour l'ARNt est induit permettant d'accomoder une interaction stable avec le peptidyl-ARNt, l'ARNt non aminoacylé et l'arminoacyl-ARNt (pour revue, voir Bosch *et al.*, 1986). A partir de données de diffraction des rayons X, un modèle de structure tertiaire du domaine d'interaction du GTP a été proposé (Jurnak, 1985 ; La Cour *et al.*, 1985). Il est intéressant de noter qu'une homologie étonnante a été observée entre EF-Tu et des protéines oncogènes de la famille *ras*, toutes ces protéines fixant le GTP (Lochrie *et al.*, 1985). Les résidus conservés ont été localisés dans le domaine fixant le GTP (Jurnak, 1985).

Interaction ARNt/ribosome. De nombreuses expériences de pontages ont permis d'obtenir des informations sur la localisation de l'ARNt sur le ribosome (pour revue, voir Ofengand *et al.*, 1986 ; Graifer *et al.*, 1989 ; Podkowinski et Gornicki, 1989). Ces travaux suggèrent fortement que la région de l'anticodon est en interaction avec la sous-unité 30S, alors que l'extrémité 3' de l'ARNt est dirigée vers la sous-unité 50S. Des changements conformationnels de l'ARNt lors de sa fixation au ribosome ont également été mis en évidence (Peattie et Herr, 1981 ; Jorgensen *et al.*, 1985). De même, il a été montré que la fixation de l'ARNt au ribosome induit des ajustements conformationnels dans l'ARNr 16S

(moazed et Noller, 1987 ; Gornicki *et al.*, 1989). Plusieurs modèles de l'agencement de deux ARNt sur le ribosome ont été proposés (Oakes *et al.*, 1986 ; Ofengand *et al.*, 1986). Plus récemment, deux modèles d'interaction de deux ARNt sur la sous-unité 30S ont été construits par modélisation graphique (Stern *et al.*, 1988). Ces modèles sont en partie basés sur la détermination de l'empreinte de l'ARNt sur l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S (Moazed et Noller, 1987) et sur des considérations stéréochimiques de l'orientation mutuelle de deux ARNt interagissant avec l'ARNm (pour revue, voir Nagano et Harel, 1987 ; Sundaralingam *et al.*, 1975 ; Spirin et Lim, 1986 ; Paulsen *et al.*, 1983 ; Mc Donald et Rein, 1987). En plus des sites A et P, il est maintenant admis l'existence d'un troisième site de fixation de l'ARNt au ribosome, appelé site E (Rheinberger *et al.*, 1981 ; Kirillov *et al.*, 1983 ; Lill *et al.*, 1984). C'est dans ce site que l'ARNt déacylé serait transférer du site P juste avant son éjection du ribosome (Rheinberger et Nierhaus, 1983 ; Robertson *et al.*, 1986 ; Robertson et Wintermeyer, 1987). Récemment, deux modèles moléculaires de la translocation ont été proposés basés, l'un sur une étude cinétique (Lill *et al.*, 1989), l'autre sur une étude conformationnelle des ARNr 16S et 23S en présence de l'ARNt dans les sites A, P et E (Moazed et Noller, 1989b). Dans le premier modèle, un changement conformationnel de l'extrémité 3' ACCA de l'ARNt dans le site P serait induit par la fixation du facteur de translocation EF-G, pour favoriser une interaction de l'extrémité 3' de l'ARNt avec l'ARNr 23S dans le site E. Cette interaction favoriserait le transfert de l'ARNt du site P vers le site E, catalysée par l'hydrolyse du GTP (Lill *et al.*, 1989). Dans le second modèle, la translocation s'effectuerait en deux étapes essentielles : après la formation de la liaison peptidique, l'extrémité 3' CCA de l'ARNt exercerait un mouvement par rapport à la sous-unité 50S et, en présence de EF-G, le bras anticodon se déplacerait le long de l'ARNm sur la sous-unité 30S (Moazed et Noller, 1989b).

Notre contribution.

L'ARNt^{Met} initiateur joue un rôle fondamental dans la biosynthèse des protéines puisqu'il est le seul utilisé dans l'initiation de la biosynthèse des protéines. Très peu de données expérimentales sont disponibles en ce qui concerne les motifs structuraux reconnus par les différents ligands de l'ARNt initiateur, tels que le ribosome ou encore les facteurs d'initiation. Afin de pouvoir établir la relation qui existe entre la structure et la fonction spécifique de l'ARNt initiateur, il devient impératif de pouvoir définir sa structure tertiaire. Il est maintenant bien établi que tous les ARNt doivent adopter une structure tertiaire en forme de "L". Malgré ces formes communes, chaque ARNt doit posséder son identité propre qui doit être reflétée dans leurs structures secondaire et tertiaire. La structure

de l'ARNt initiateur d'*E. coli* a été étudiée par cristallographie des rayons X (Woo *et al.*, 1980). Toutefois, la structure proposée ne représente qu'un modèle à basse résolution et ne permet pas de donner avec précision les différents types d'interactions tertiaires.

C'est dans ce cadre que nous avons abordé une étude détaillée de la conformation en solution de l'ARNt initiateur. Nous avons testé la réactivité ou l'accessibilité de chaque nucléotide à diverses sondes de structure. Cette technique s'est avérée être très sensible à de faibles changements de conformation (pour revue, voir Ehresmann *et al.*, 1987). Les quatre types de bases ont été testés à l'une de leur position Watson-Crick, la position N7 des purines impliquées dans des interactions tertiaires ont été définies et les phosphates impliqués dans des interactions tertiaires ou dans la coordination avec des cations ont été identifiés. Il est important de signaler que cette étude représente l'étude la plus exhaustive réalisée sur un ARNt. En effet, un nombre restreint de sondes de structure a déjà été utilisé pour l'étude de la conformation de l'ARNt initiateur (par exemple, Wrede *et al.*, 1979 ; Vlassov *et al.*, 1981 ; Pelka et Schulman, 1986) ; mais tous ces travaux ont été réalisés dans des conditions expérimentales différentes. Nous avons aussi suivi l'effet de l'aminacylation et de la formylation sur la conformation de l'ARN. Dans un deuxième temps, nous avons défini les motifs structuraux de l'ARNt reconnus par le facteur d'initiation IF2. Ce facteur d'initiation joue un rôle fondamental dans la sélection de l'ARNt au niveau des sous-unités 30S (pour revues, voir Grunberg-Manago, 1980 ; Gualerzi *et al.*, 1986). Pour aborder ce problème, nous avons utilisé deux types de techniques : l'une permet de définir le proche voisinage des deux macromolécules par pontage ARN-protéine, l'autre permet de définir l'empreinte de la protéine et de détecter les éventuels changements de conformation induits par la fixation d'IF2. Cette dernière étude a été réalisée sur le complexe [GTP/IF2/fMet-ARNt_f^{Met}] et sur le complexe d'initiation [GTP/IF2/fMet-ARNt_f^{Met}/AUG/30S].

II. ETUDE DE LA STRUCTURE EN SOLUTION DE L'ARNt^{Met} INITIATEUR.

ARTICLE 1

"The Solution Structure of the Escherichia coli Initiator tRNA and its Interactions with Initiation Factor IF2 and the Ribosomal 30S Subunit".

(1989) *J. Biol. Chem.*, sous presse.

Résumé : La conformation de l'ARNt initiateur d'*E. coli* a été étudiée au moyen de diverses sondes de structure. Cette étude a été réalisée sur l'ARNt au cours des différentes étapes qui conduisent à la formation du complexe d'initiation [30S/IF2/GTP/AUG/fMet-ARNt^{Met}]. Basé sur les résultats obtenus en solution, un modèle de structure tridimensionnelle a été construit par modélisation graphique. Ce modèle présente plusieurs différences par rapport à l'ARNt^{Phe} de levure : (i) le bras anticodon est plus rigide ; (ii) l'interaction entre les boucles D et T est affectée due à la présence d'un nucléotide supplémentaire dans la boucle D ; (iii) les nucléotides C1 et A72 peuvent former une interaction non canonique. L'aminoacylation et la formylation de l'ARNt initiateur induisent des ajustements conformationnels près de l'extrémité 3', le bras T et la boucle D. Le facteur d'initiation IF2 interagit avec une région limitée de l'ARNt qui couvre la boucle T, le petit sillon du bras T et induit une augmentation de la flexibilité du bras anticodon. Dans le complexe d'initiation [30S/IF2/GTP/AUG/fMet-ARNt^{Met}], des protections additionnelles sont observées dans les bras accepteur et anticodon, résultant d'un encombrement stérique et de l'interaction codon-anticodon au niveau du site de décodage de la sous-unité 30S.

**THE SOLUTION STRUCTURE OF THE *E. COLI* INITIATOR tRNA
AND ITS INTERACTIONS WITH INITIATION FACTOR IF-2 AND THE
RIBOSOMAL 30S SUBUNIT***

**Hiroshi Wakao, Pascale Romby, Eric Westhof, Soumaya Laalami⁺,
Marianne Grunberg-Manago⁺, Jean-Pierre Ebel, Chantal Ehresmann
and Bernard Ehresmann¹**

Laboratoire de Biochimie, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS,
15 rue R. Descartes, 67084-Strasbourg Cedex, France.

⁺Institut de Biologie Physicochimique, 13 rue P. et M. Curie, 75005-Paris Cedex,
France.

¹To whom correspondence should be sent.

*This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).
H. W. is supported by a grant from the French Government.

Running title: Conformation of the *E. coli* initiator tRNA

SUMMARY

The conformation of the *E. coli* initiator tRNA has been investigated, using enzymatic and chemical probes. This study was conducted on the naked tRNA and on the tRNA involved in the various steps leading to the formation of the [30S/IF-2/GTP/fMet-tRNA/AUG] complex. A three-dimensional model of the initiator tRNA is presented, which displays several differences with yeast tRNA^{Phe}: (i) the anticodon arm is more rigid; (ii) the presence of an additional nucleotide in the D loop results in specific features in both T and D loops; (iii) C1 and A72 might form a non-canonical base pair. Aminoacylation and formylation induce subtle conformational adjustments near the 3' end, the T arm and the D loop. Initiation factor IF-2 interacts with a rather limited portion of the tRNA, covering the T loop and the minor groove of the T stem, and induces an increased flexibility in the anticodon arm. The specific structural features observed in the T loop are probably recognized by IF-2. In the [30S/IF-2/GTP/fMet-tRNA/AUG] complex, additional protections are observed in the acceptor stem and in the anticodon arm, resulting from a strong steric hindrance and from the codon-anticodon interaction within the subunit decoding site.

In *Escherichia coli*, initiation of protein biosynthesis occurs through an intermediary complex composed of the ribosomal 30S subunit, the messenger RNA, GTP, the three initiation factors IF-1, IF-2 and IF-3 and fMet-tRNA^{fMet}. Initiation factor IF-2 is required for the binding of the initiator tRNA to the [30S/mRNA] complex at the ribosomal P site. However, it is not clear whether the formation of the ternary complex [fMet-tRNA^{fMet}/IF-2/GTP] precedes the binding of the tRNA on the [mRNA/30S] complex or whether the free initiator tRNA binds to the [30S/mRNA/GTP/initiation factors] complex. Despite a large body of work to elucidate the structure of the initiator tRNA, little is known about the structural basis that accounts for its specific function in translational initiation. The crystal structure of the *E. coli* initiator tRNA is known at 3.5 Å resolution (Woo *et al.*, 1980). It appears that its tertiary structure is overall similar to that of yeast tRNA^{Phe}, with nevertheless some local differences essentially located in the anticodon loop and in the acceptor stem. However, the tertiary contacts could not be given with certainty at that resolution and in absence of refinement; further, no coordinates are presently available.

The use of enzymatic and chemical probes combined with detection of cleavages or modifications by gel electrophoresis (either by detection on end-labeled molecules or by primer elongation), is a powerful approach to test the structure of RNAs in solution, to identify nucleotides in contact with proteins and to reveal subtle dynamic changes that may accompany the formation of functional complexes (for a review, see Ehresmann *et al.*, 1987). This approach has also been used to probe the conformation of the initiator tRNA involved or not in the complex with its cognate synthetase (e.g. Wrede *et al.*, 1979; Lockard & Kumar, 1981; Vlassov *et al.*, 1981; Yamashiro-Matsumura & Kawata, 1981; Pelka & Schulman, 1986). However, the published data are not complete since only a limited number of structure probes were used under the same buffer conditions. Several specific structural features for the initiator tRNA could be evidenced: (i) the 5' terminal nucleotide is not engaged in a Watson-Crick interaction with residue 72; (ii) the anticodon stem is rich in G-C base pairs; (iii) the anticodon arm is involved in discriminating the initiator tRNA from elongator tRNAs (Wrede *et al.*, 1979) and is required for the binding of the tRNA to the ribosome (Seong & RajBhandary, 1987a).

The goal of the present work is to investigate the detailed structure of the initiator tRNA when engaged in the various steps of formation of the 30S initiation complex: aminoacylation, formylation, interaction with IF-2, and with the 30S subunit in the presence of AUG as messenger, GTP and IF-2. A complete interpretation of these data requires a detailed knowledge of the tertiary structure of the naked tRNA probed at

nucleotide resolution under strictly the same buffer conditions. By combining the solution structure probing data with computer graphic modeling, we have constructed a three-dimensional model of the *E. coli* initiator tRNA. This model is compared to the crystal structure of yeast tRNA^{Phe} and is used to illustrate the structural implications of the initiator tRNA in the initiation process.

MATERIAL AND METHODS¹

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental strategy — The conformation of the initiator tRNA was probed at different steps involved in the formation of the translational initiation complex in order to follow possible conformational adjustments and to identify nucleotides in contact with IF-2 and the 30S subunit. All experiments were performed under conditions found to be optimal for the formation of the 30S initiation complex, according to Van der Hofstad *et al.* (1977) (native conditions). The naked tRNA was also probed in the absence of magnesium in order to test the stability of helices and tertiary interactions (semi-denaturing conditions). Single stranded regions were probed with nucleases T₁ and S₁, and structured regions with RNase V₁. The four bases were tested at one of their Watson-Crick position with DMS² at A(N-1) and C(N-3), and with CMCT² at G(N-1) and U(N-3). Position N-7 of purines was probed with DEPC² (adenines) and DMS (guanines), and phosphates with ENU². Enzymatic cuts were identified on both 5' and 3' end-labeled tRNA molecules in order to discriminate primary cleavages from secondary ones. Cleavages at phosphates and modifications at C(N-3), G(N-7) and A(N-7) were identified on 3' end labelled tRNA molecules after appropriate chemical treatment to induce cleavage at the modified bases. Modifications at A(N-1), G(N-1) and U(N-3) could only be identified by primer extension. Figure 1 shows representative autoradiographs of enzymatic and chemical probing experiments. Results are summarized in figure 2 on the cloverleaf structure of the initiator tRNA. Only a few positions could not be interpreted essentially due to: (i) spontaneous cleavages linked to proton-catalyzed hydrolysis, most often occurring at pyrimidine-adenosine sequences and reflecting an intrinsic fragility of the RNA molecule (see for reviews Brown, 1974; Dock-Bregeon & Moras, 1987); (ii) post-transcriptional modifications and some strong structural features responsible for stops or pauses of reverse transcription or for aniline-induced cleavage (for instance, see the strong cleavage at m⁷G46 in Fig. 1c). Appropriate control with

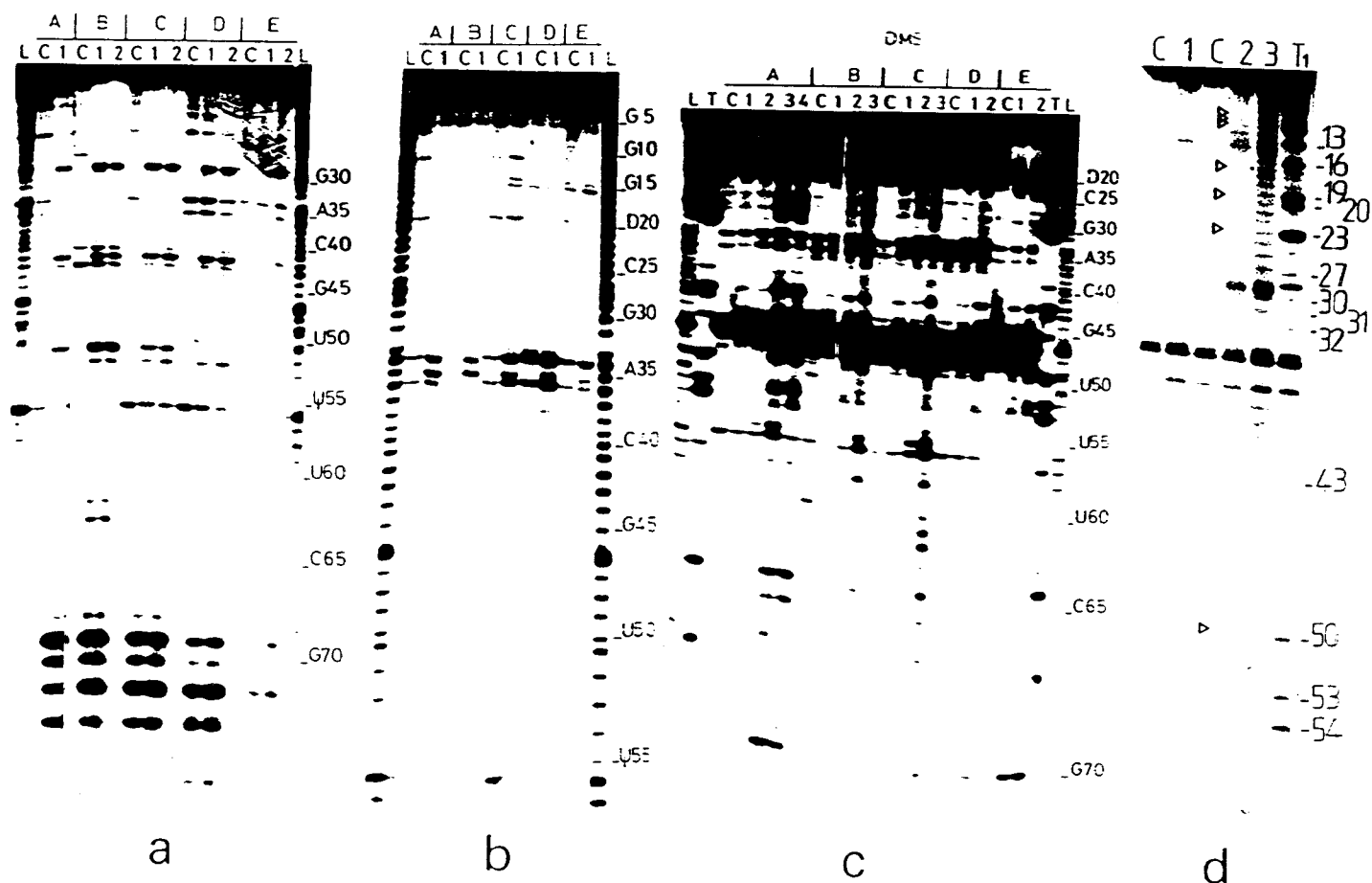


Figure 1: Gel electrophoretic fractionation of products resulting from enzymatic and chemical modification. tRNA^{Met} (A), Met-tRNA^{Met} (B), fMet-tRNA^{Met} (C), fMet-tRNA^{Met}/IF-2 (D) and fMet-tRNA^{Met}/IF-2/30S/AUG complexes (E). (a) RNase V₁ hydrolysis: (lane C) incubation control; (lanes 1, 2) 5 and 10 min with 0.05 U of enzyme, respectively; (lane L) formamide ladder. (b) nuclease S₁ hydrolysis: (lane C) incubation control; (lane 1) 5 min with 25 U of enzyme; (lane L) formamide ladder. (c) Reactivity of position N-7 of guanine towards DMS, native conditions: (lane C) incubation control; (lanes 1-2) 5 min and 10 min at 20°C, respectively; semi-denaturing conditions: (lane 3) 5 min at 20°C; denaturing conditions: (lane 4) 1 min at 90°C; (lanes T, L) RNase T₁ and formamide ladders, respectively. (d) Reactivity of phosphates towards ENU, native conditions: (lane C) incubation control; (lane 1) 2 h 30 at 20°C; (lane 2) 30 min at 37°C; denaturing conditions: (lane 3) 2 min at 80°C; (lane T₁) RNase T₁ ladder. The arrows point to protected phosphates.

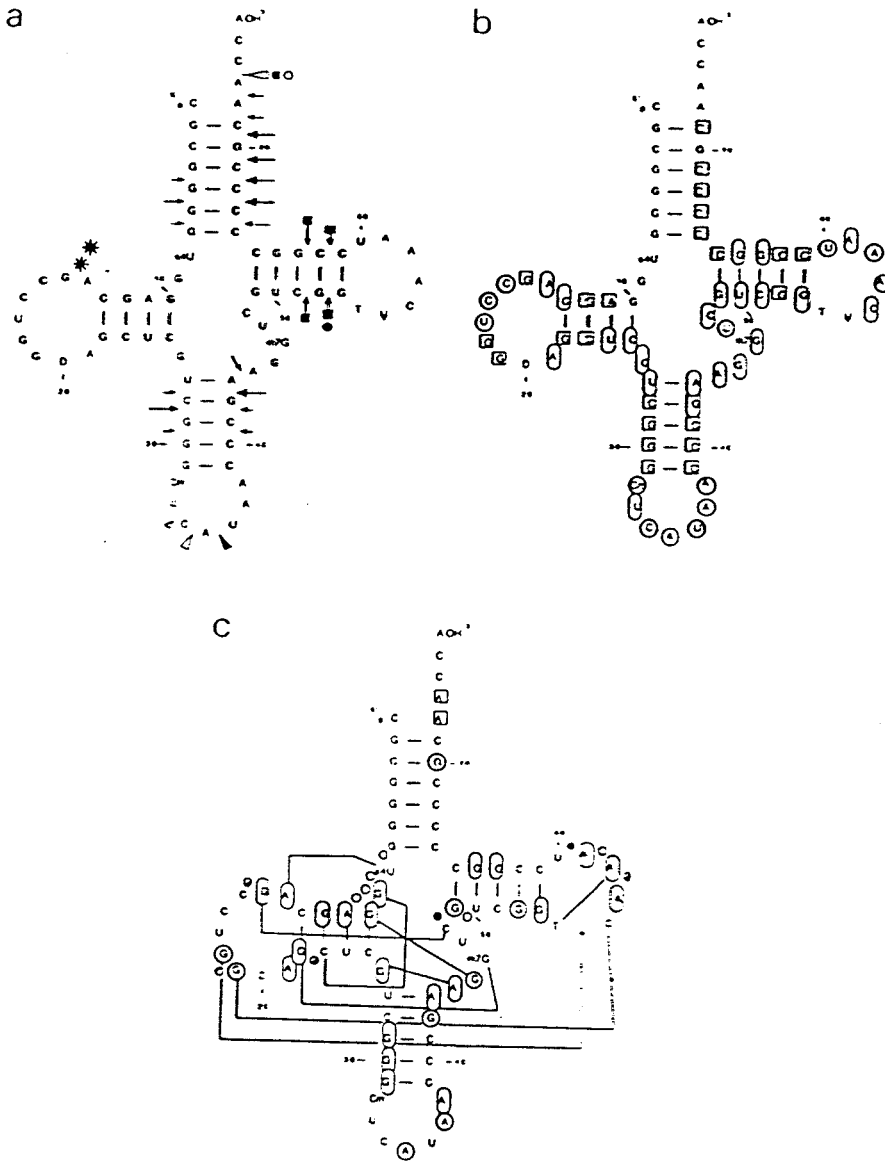


Figure 2: Reactivities of tRNA^{Met} to the different chemical and enzymatic probes. The numbering system of nucleotides is according to that of yeast tRNA^{Phe} (Sprinzl *et al.*, 1987). (a) Accessibility of tRNA^{Met}, Met-tRNA^{Met} and fMet-tRNA^{Met} towards enzymatic probes. RNase V₁ cuts are denoted by arrows, the size of the arrows reflects the rate of cleavage; RNase S₁ are denoted by (▶) for strong cut, (▷) for moderate cut and by (▷) for minor cut. Enhanced RNase cuts in aminoacylated tRNA as compared to free tRNA are indicated by (■); enhanced and decreased RNase cuts in formylated RNA are shown by (●, ○), respectively; (•) indicates a weak RNase V₁ cut appearing in both Met-tRNA and fMet-tRNA. (b) Reactivity of Watson-Crick positions in tRNA towards DMS and CMCT: native conditions: (○) strong reactivity; (◐) moderate reactivity; (◑) unreactive under native conditions and reactive under semi-denaturing conditions; (◒) unreactive under both native and semi-denaturing conditions. (c) Reactivity of position N-7 of purines towards DMS and DEPC (same symbols as in B) and reactivity of phosphate towards ENU. Reactivity at position N-7 of purines: same symbols as in (b). Protected phosphates are denoted by (●) for strong protection, by (◐) for moderate protection and by (◑) for low protection. The different tertiary interactions deduced from our data are indicated.

untreated material was run in parallel. Each experiment was repeated several times with reproducible results. RNase cleavages will be designated by the position in the sequence of the nucleotide located at the 3'-side of the cleavage.

We have used the present solution data to build a three-dimensional model of *E. coli* tRNA^{Met} by computer graphic modeling as described in the experimental section (Fig. 3). This model was constructed by taking the crystal structure of yeast tRNA^{Phe} as reference. The correlation between the model and the experimental data was checked by comparing the calculated surface accessibilities of the different atoms to the chemical reactivities of the different functional groups of tRNA^{Met}. Indeed, it has been previously shown that the reactivity of phosphates can be interpreted as a reflection of their geometrical accessibility (Lavery & Pullman, 1984; Furois-Corbin & Pullman, 1985). However, for base modifications both steric and electronic properties must be considered to explain a site reactivity (Lavery & Pullman, 1984). One limitation of such a method is that it does not take into account the flexibility of the RNA molecule, especially in loop regions. For instance, A35 and A37 in the anticodon loop are more reactive at N-7 than predicted by the model. Otherwise, there is a good correlation between the calculated accessibilities of phosphates and bases in the model, and the extent of chemical modifications in the tRNA (see Fig. 4 for phosphates).

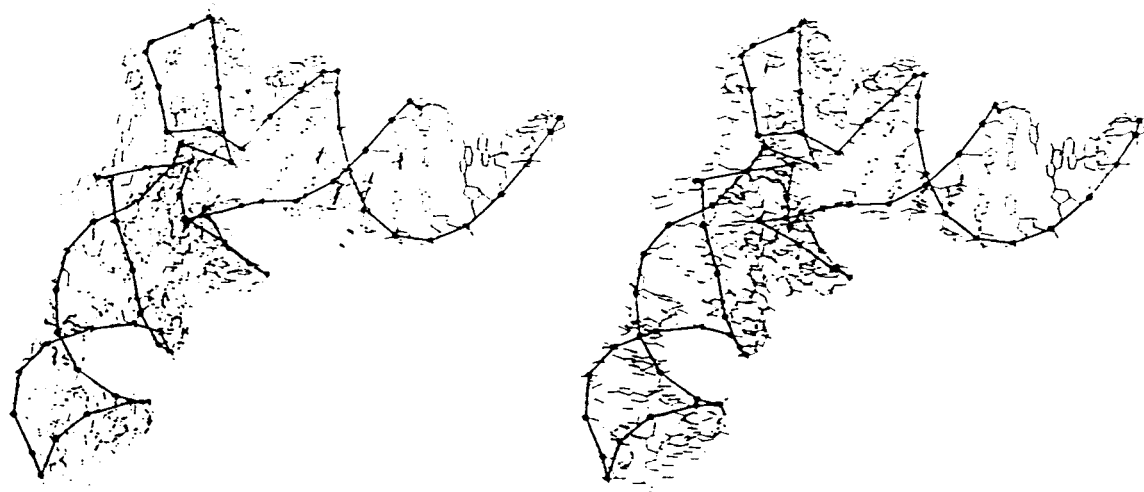


Figure 3: Three-dimensional model of initiator *E. coli* tRNA^{Met}. Stereoscopic views were drawn with the program PLUTO (S. Matherwell and P. Evans, MRC Cambridge). The phosphate backbone is shown in heavy lines.

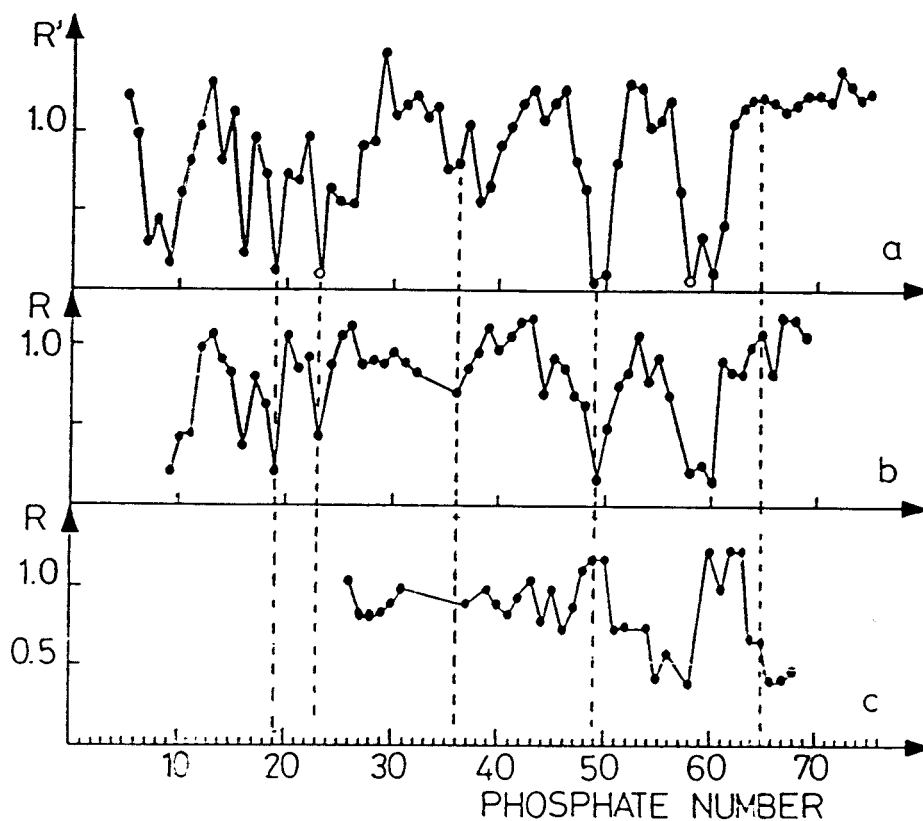
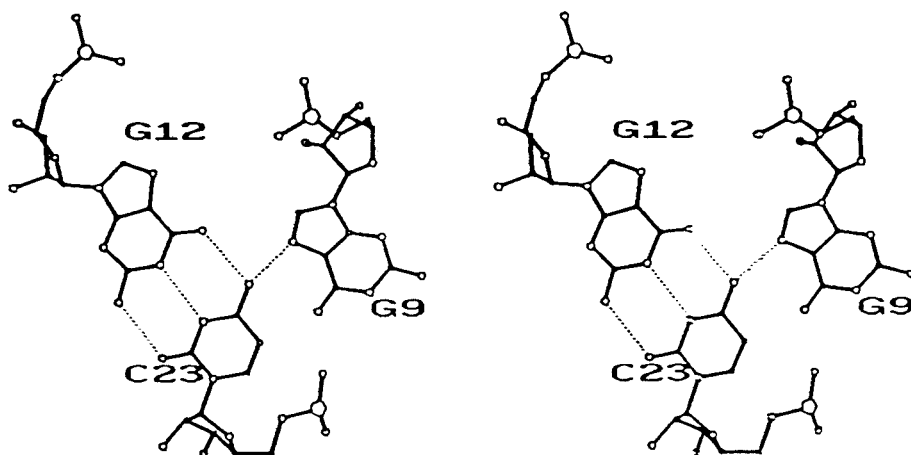


Figure 4: (a, b) Steric accessibility and experimental reactivities for the phosphates of *E. coli* tRNA^{Met} towards ENU. (a) R' values represent the average of the calculated accessibilities for the two anionic oxygens of each residue. For phosphates 23 and 58 (O), the values are given for one of the oxygen group of the phosphate. (b) R values are the ratios between the intensities at the corresponding electrophoretic bands of the alkylated folded and unfolded tRNA. A ratio $R < 1$ means that the alkylation of a given phosphate is lower in the folded tRNA. Due to some degradations, no information was obtained for phosphates 33 to 35 in the anticodon loop and phosphate 57 in the T loop. The phosphate numbering is according to yeast tRNA^{Phe} (Sprinzl *et al.*, 1987). Therefore phosphate 17.1 was omitted. (c) Pattern of phosphate reactivities in native fMet-tRNA^{Met} complexed with IF-2 as compared to native fMet-tRNA^{Met}. The different plots (b, c) represent mean values of two different experiments. The reactivity of the phosphate of fMet-tRNA^{Met} within the 30S initiation complex was estimated by visual inspection.

a



b

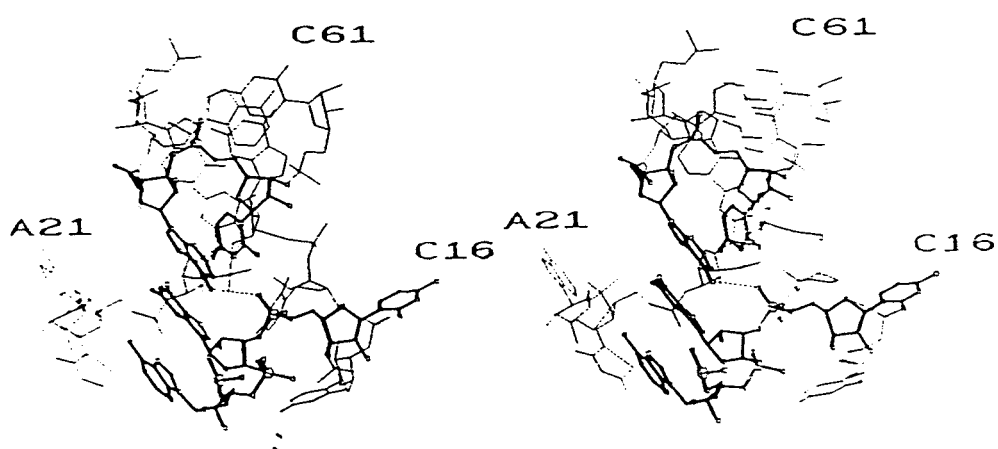


Figure 5: *Stereoscopic view of several specific structural features.* (a) Tertiary interaction involving residues 9 and 23: G9(N-7) interacts with C23(N-4). There is a possible C-H...O interaction between C23(C-5) and G9(O-6). (b) Structural environment of phosphate 16: the T and D loops are shown and the direct environment of phosphate 16 is represented in bold characters. The hydrogen bond between phosphate 16 and A56(N-6) is shown.

Conformation of tRNA^{fMet} — From our probing data, almost all the tertiary interactions found in yeast tRNA^{Phe} appear to be present in the initiator tRNA (the proposed interactions are presented in Table I and illustrated in Fig. 2c). This has already been shown in the crystallographic structure obtained at 3.5 Å resolution (Woo *et al.*, 1980). However, the existence of a guanine at position 9 (instead of an adenine as in the tRNA^{Phe}) and of a cytosine at position 23 (instead of an adenine) impairs the formation of the same tertiary interaction as in tRNA^{Phe} (A9(N-6, N-7)-A23(N-7, N-6)) (see a detailed representation in Fig. 5a). The non reactivity of G9(N-7) suggests the existence of a compensatory interaction, most likely involving G9(N-7) and C23(N-4). The low accessibility of phosphate 23 in yeast tRNA^{Phe} was attributed to the presence of an hydrogen bond between A9(N-6) and A23(O1-P). The same interaction cannot occur in tRNA^{fMet} but the protection of phosphate 23 is in favour of some compensatory contact. Despite a three-dimensional organization of the initiator tRNA closely similar to that of yeast tRNA^{Phe}, several structural details substantially differ and may represent specific features.

The anticodon stem is a highly stable helix, due to the presence of three consecutive G-C pairs closing the anticodon loop. It was shown that these G-C pairs are required for the specific binding of fMet-tRNA^{fMet} to the ribosomal P site (Seong & RajBhandary, 1987a). This helix appears to be very regular, as suggested by the non reactivity of all purines at position N7. To note in particular is the absence of reactivity of G30(N-7), which is reactive in all elongator tRNAs containing a guanine at that position, whatever the surrounding bases are (Peattie & Gilbert, 1980; Garret *et al.*, 1983; Romby *et al.*, 1987). This reactivity might be linked to some distortion of the helix at this level as shown in the tRNA^{Phe}, in which G30 is surrounded by two purines (Quigley *et al.*, 1975; Jack *et al.*, 1977; Stout *et al.*, 1978). This suggests that the anticodon stem is more regular and rigid in the initiator tRNA than in elongator tRNAs.

In the anticodon loop, most of the nucleotides are reactive except U33 the so-called "U-turn". The non reactivity or marginal reactivity of this uridine was already mentioned by others even under drastic reactivity conditions (Chang, 1973; Schulman & Pelka, 1976). This result is not in agreement with the crystal structure of *E. coli* tRNA^{fMet}, in which U33 was thrust away from the anticodon loop into the solvent region (Woo *et al.*, 1980). In such a conformation, U33 should be highly reactive toward CMCT. Our results are rather in favour of a conformation similar to that of yeast tRNA^{Phe}, in which U33(N-3) forms a hydrogen bond with phosphate 36, leading to a certain rigidity of the anticodon loop.

Met A	Phe B	N3-Py A B		N1-Pu A B		N7-Pu A B		P A B		COMMENTS ON tRNA _f ^{Met}
C1	G1	nd			nd		nd	nd		-C1(N4,N3)--A72(N7,N6)
s ⁴ U8	U8	nd	nd					2	2	-Mg ²⁺ site, U8(N3,O2)--A14(N7,N6)*
G9	A9			nd	nd	0-2	0-0	2	2	-Mg ²⁺ site, G9(N7)--C23(N4)
G10	G10			nd	nd	0-2	0-0	2	2	-Mg ²⁺ site, G10(O6)--G45(N-2)*
A14	A14			0-2	0	0-2	0-0			-A14(N7,N6)--s ⁴ U8(N3,O2)
G15	G15			0-0	0	0-2	0-0			-G15(N1,N2)--C48(O2,N3)
C16	D16	2-2	nd					1		-C16(O1P)--A59(N6)
G18	G18			0-0	0	2-2	2-2			-G18(N2)-ψ55(O4)*, steric effect
G19	G19			0-0	0	2-2	2-2	1	1	-WC pairing with C56, G19(O1P)-U17.1(O2')
A21	A21			0-2	0	0-2	0-2			-stacked between C48 and m ⁷ G46
G22	G22			0-0	0	0-2	0-0			-G22(N7,O6)--m ⁷ G46(N1,N2)
C23	A23	0-0			0		0-0	1	1	-C23(N4)--G9(N7), C23(O1P)--G45(N1)
G26	m ² G26			0-2	0	0-2	0-2			-G26(O6,N1)--A44(N6,N1)
G30	G30			0-0	0	0-2	2-2			-different stacking
U33	U33	0-1	1							-U turn
G42	G42			0-2	0	1-2	0-2			-different stacking
A44	A44			0-2	0	0-2	0-2			-A44(N6,N1)--G26(O6,N1)
G45	G45			0-2	0	2-2	2-2			-G45(N2)--G10(O6)*
m ⁷ G46	m ⁷ G46			0-2	0	nd	nd			-m ⁷ G46(N1,N2)--G22(N7,O6)
U47	U47	2-2	2							-bulging out of the variable loop
C48	C48	0-2	0-2							-C48(O2,N3)--G15(N1,N2)
G49	m ⁵ C49		nd	0-2		0-2		2	2	-steric effect
U50	U50	0-1	0					1	1	-steric effect
T54	T54	nd	nd							-T54(N3,O2)--A58(N7,N6)*
Ψ55	Ψ55	nd	nd							-Ψ55(N3)--A58(O1P)*, Ψ55(O2')--A57(N7)*
C56	C56	0-2	0-2							-WC pairing with G19
A57	G57			1-2	0	0-2	0-2	1		-A57(N7)--Ψ55(O2')
A58	m ¹ A58			2-2	nd	0-2	nd	2	2	-A58(N7,N6)--T54(N3,O2), A58(O1P)--Ψ55(N3), A58(O2')--U60(O2P)
A59	U59		0	0-2		0-2		2	2	-steric effect
U60	C60	2-2	0-2					3	3	-U60(O1P)--C61(N4), -U60(O2P)--A58(O2')
C61	C61	0-0	0-0							-C61(N4)--U60(O1P)*
A72	C72		2-2	nd		0-0				-stacking, A72(N7,N6)--C1(N4,N3)
A73	A73			nd	nd	0-0	0-0			-stacking effect

Table 1: Mapping of *E. coli* initiator tRNA by chemical probes. Comments are correlated with the three-dimensional model of the initiator tRNA based on the crystallographic structure of yeast tRNA^{Phe}. Only residues involved in the tertiary folding or displaying different reactivities are given: (A) tRNA_f^{Met}; (B) tRNA^{Phe}. Reactivities in yeast tRNA^{Phe} of C(N-3), G(N-7) toward DMS and of A(N-7) towards DEPC are from Peattie and Gilbert (1980) and from Romby *et al.* (1987), of A(N-1) toward acid monoperphthalic from Cramer *et al.* (1968) and of U(N-3) and G(N-1) toward CMCT from Rhodes (1975). For each experiment, the first number corresponds to native conditions and the second to semi-denaturing conditions. For modifications of A(N-1), U(N-3) and G(N-1) in yeast tRNA^{Phe}, results are only given for native conditions. The extent of reactivity of the bases is represented by (0) for no reactivity, (1) for low reactivity and (2) for moderate reactivity. For phosphates, numbers 1 to 3 correspond to low, moderate and strong protection, respectively. Only one number is given, corresponding to native conditions. (*) indicates that the interaction has been constructed as in tRNA^{Phe}, but in the absence of experimental evidence on the concerned residue; (nd) is not determined, WC is Watson-Crick pairing and P is phosphate.

Another difference between both tRNAs concerns the additional pyrimidine in the β region of the D loop. The high reactivity of C16, C17 and U17.1 suggests that these nucleotides are in a bulged out conformation. The particular protection of phosphate 16 observed in the initiator tRNA is most likely related to a specific conformation resulting from the presence of the additional residue. In the 3D-model, it was possible to construct a tertiary interaction between this phosphate and A59(N-6). Also in the T loop, U60(N-3) and A57(N-1) are moderately reactive toward DMS, whereas C60(N-3) and G57(N-1) in tRNA^{Phe} were found unreactive toward DMS and CMCT, respectively (see table I). This could be explained by a better accessibility of A57 and U60 due to the particular conformation of the D loop, via tertiary interactions (Fig. 5b).

One characteristic of prokaryotic initiator tRNAs is the absence of a Watson-Crick base pair between nucleotides 1 and 72. In the crystallographic structure of Woo *et al.* (1980), the last five nucleotides of the *E. coli* initiator tRNA do not continue the helical organization of the acceptor stem as in yeast tRNA^{Phe}, but curl back to the acceptor end. However, in the initiator tRNA the absence of reactivity of A72 and A73 at N-7 even under semi-denaturing conditions, suggests a stacked structure extending the helical conformation of the 3' strand, which is further confirmed by the presence of a RNase V₁ cut at position 72. This situation is reminiscent to that of tRNA^{Phe}, in which A73(N-7) is unreactive. Although no information could be obtained on position N-3 of C1, a non-canonical C1-A72 base pair can be postulated, involving C(N-3, N-4)--A(N-6, N-7), that would maintain the stacked conformation of A72 and A73 and contribute to the non reactivity of A72(N-7). Such a conformation should be further stabilized by the presence of A73 since it has been shown that 3'-dangling purines have a stabilizing effect (Romaniuk *et al.*, 1978; Sugimoto *et al.*, 1987). This proposed C-A pairing is apparently not supported by earlier chemical modification data which showed that C1(N-4) is reactive either toward bisulfite (Goddard & Schulman, 1972) or methoxamine (Chang, 1973). However, it should be stressed that these experiments were conducted at pH 5.5-6. at which protonation of C(N-3) occurs (Romby *et al.*, 1986); this should allow other types of base-pairing [such as C(O-2, N-3)--A(N-6, N-7)], that might leave position N-4 free. Otherwise, the -NH₂ group even involved in hydrogen bonding still contains another available hydrogen atom. It has been shown that the presence of a Watson-Crick pairing between residues 1 and 72 does not interfere with the initiation function but enhances the ability of the initiator tRNA to bind to *E. coli* elongation factor EF-Tu (Schulman *et al.*, 1974; Fischer *et al.*, 1985; Seong & RajBhandary, 1987b). Also, Schulman & Pelka (1975) have shown that the same feature accounts for the unique resistance of *E. coli*

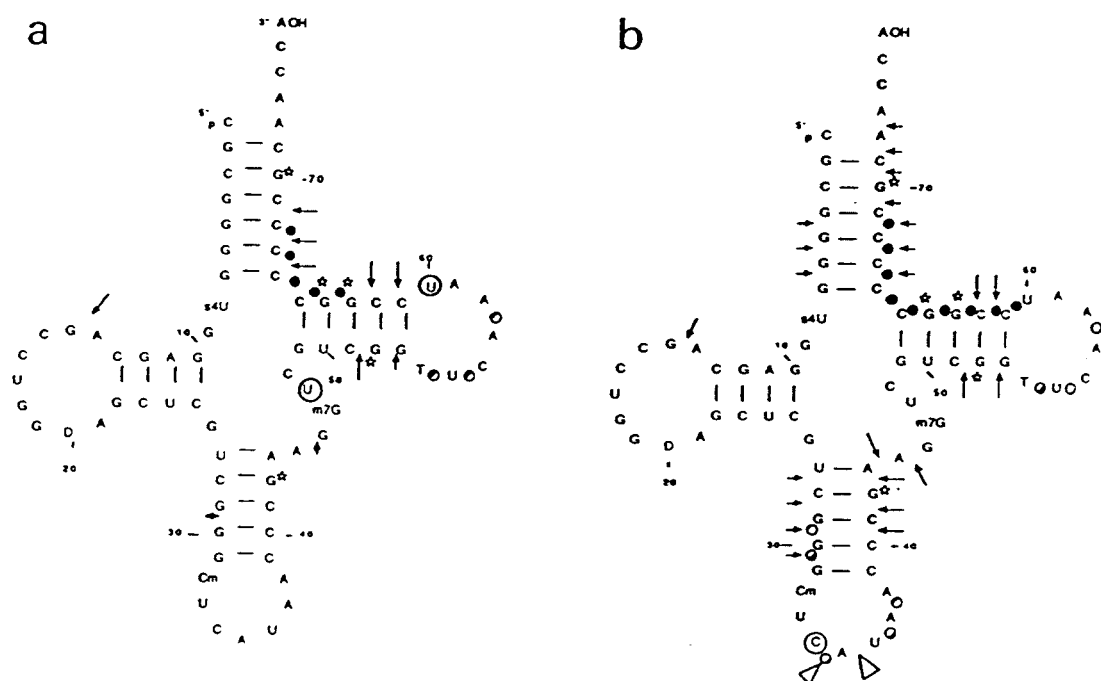


Figure 6: Cloverleaf structure of *fMet-tRNA^{Met}* with the regions protected by the initiator factor IF-2 (a) and by the 30S subunit and AUG triplet (b). The tRNA was probed with RNases V₁ and S₁, ENU (phosphates), DMS (C(N-3), G(N-7)) for both complexes and CMCT (U(N-3), G(N-1)) in the case of the [tRNA/IF-2] complex. Protected phosphates are indicated by circles, protected RNase V₁ cleavage sites by arrows and protected nuclease S₁ cleavage sites by empty triangles. Protected nucleotides are circled. Enhanced reactivities at G(N-7) are denoted by (*) and increased RNase V₁ cuts by (◆). No indication could be obtained regarding the 3' terminal three nucleotides.

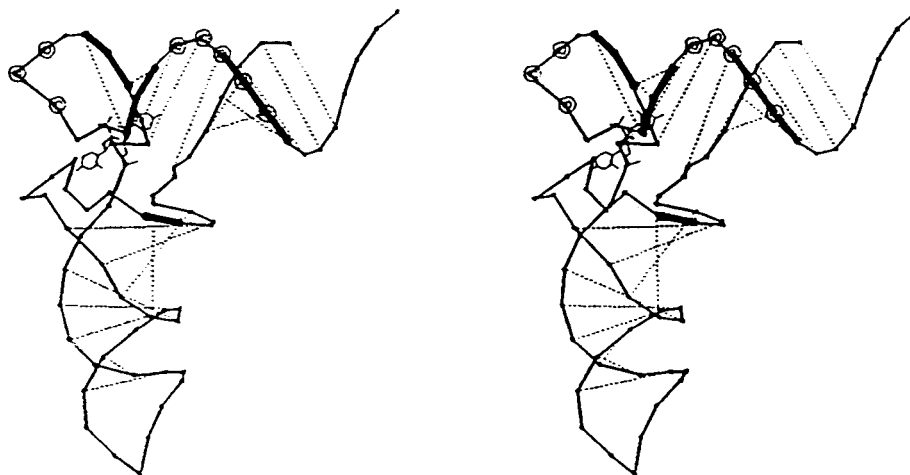
fMet-tRNA^{fMet} toward peptidyl-tRNA hydrolase.

Effect of aminoacylation and formylation — The effect of aminoacylation and formylation was studied by probing in parallel the conformation of tRNA^{fMet}, Met-tRNA^{fMet} and fMet-tRNA^{fMet}. The yields of aminoacylation and formylation were checked after the renaturation of the RNA and prior to the probing experiments as described in Materials and Methods. An average yield of 70% of tRNA molecules could be aminoacylated, which could all be formylated. Control experiments were also performed in which the initiator tRNA was subjected to the same aminoacylation and formylation procedure, but in the absence of aminoacid, in order to detect unspecific degradations which would be produced during the aminoacylation and the formylation steps. As shown in figure 2, the chemical reactivity pattern of the tRNA in the three different states is essentially unaffected. However, minor differences can be observed with enzymatic probes. After aminoacylation, nuclease S₁ cut at position 74 and RNase V₁ cuts at positions 52, 53, 62 and 63 are enhanced, and a weak cleavage appears at position 15 in the D loop. After formylation, RNase V₁ cleavages at position 15 and 53 are still enhanced, whereas the nuclease S₁ cleavage at the 3' end is decreased. Our results suggest that aminoacylation and formylation have no major effect on the conformation of the tRNA but cause subtle adjustments only detectable by RNase susceptibility. Minor structural rearrangements of tRNAs induced by the interaction with the cognate synthetase and by the aminoacylation have also been reported elsewhere (Kruse & Clark, 1978; Weygand-Durasevic *et al.*, 1981; Yamashiro-Matsumura & Kawata, 1981; Boutorin *et al.*, 1981). It has also been shown that the mischarged phenylalanyl-tRNA^{fMet} can be formylated in the presence of *E. coli* methionyl-tRNA formylase (Giegé *et al.*, 1973), suggesting that specific structural features of the initiator tRNA and not the nature of the aminoacid should be essential for the recognition by the formylase.

Contacts between fMet-tRNA^{fMet} and IF-2 — Binding of f[³H]Met-tRNA^{fMet} to IF-2 was tested by millipore filter binding assay in the presence of glutaraldehyde. Nearly 75% of the tRNA was bound to IF-2, in the presence of a 5 to 10 fold excess of IF-2. This result is very similar to that found by Van der Hofstad *et al.* (1977). We found that neither GTP nor GDP affects the binding of IF-2 to the initiator tRNA. When unformylated tRNA was used, only 20% of the tRNA could be bound to IF-2 (results not shown), indicating that the formation of the binary complex is specific.

The binding of IF-2 to fMet-tRNA^{fMet} induces changes of reactivity towards the structure probes used (Fig. 6a). Protections from RNase V₁ are observed in the acceptor stem at positions 67 to 69 (but not at positions 5-7 and 70-73), in the T stem (at positions

a



b

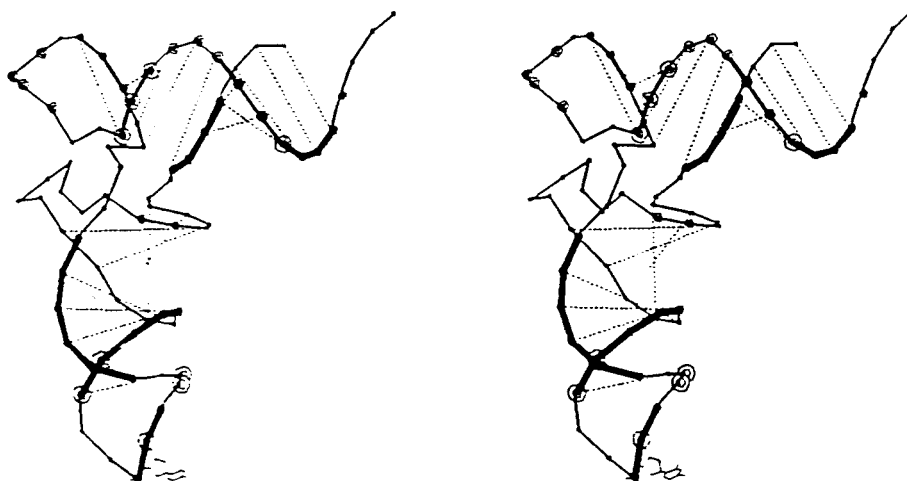


Figure 7: Three-dimensional structure (stereoscopic views) of $fMet-tRNA^{Met}$ with the regions protected by the initiator factor IF-2 (a) and by the 30S subunit and AUG triplet (b). Protected phosphates are represented by circles and protected RNase cleavage sites by heavy lines. Protected nucleotides are drawn. In (b) the small symbols (small circle and middle-thick lines) indicate the protections already caused by IF-2 and the large symbols (large circle and thick lines) those specifically observed in the presence of the 30S subunit.

52, 53 and 62, 63) and in the D loop (at position 15), while enhanced cleavages are produced in the anticodon stem (at positions 30 and 45). Several phosphates in the acceptor and T stems (at positions 64-68) and in the T loop (positions 55, 56, 58) present a reduced reactivity toward ENU, as well as the reactivity of U47(N-3) and U60(N-3) toward CMCT. No protection is observed in the anticodon and D arms. The binding of IF-2 also induces an enhanced reactivity of guanines 42, 52, 63, 64 and 70 at N-7. Note that several spontaneous cleavages are found enhanced, in particular in the anticodon loop (see Fig. 1a,b). The presence of GTP does not affect the conformation of the tRNA interacting with IF-2 (results not shown). These data complete earlier results of Petersen *et al.* (1979, 1981) who showed that IF-2 specifically protects fMet-tRNA^{fMet} from spontaneous hydrolysis of the aminoacyl ester bond and the 3' strand of the acceptor stem from RNase V₁.

Our results permit to define the footprint of IF-2 on the tRNA molecule. The contact surface between the tRNA and the protein is rather limited. Protections are essentially restricted to the T stem, the T loop and the first three residues of the 3' strand of the acceptor stem (Fig. 8a). Therefore, IF-2 should cover the top of the aminoacid arm of the L-shaped molecule near the elbow, sitting in the minor groove of the T stem (Fig. 7a). Residues U47 and U60 should represent the most extreme contacts with the protein, on both sides of the elbow. The protection of position 15 from RNase V₁ may reflect some steric hindrance or minor adjustment. It should be stressed that this cleavage is not observed on the naked RNA but is induced by aminoacylation and formylation (see above). The observed enhancements of reactivity towards chemicals and enzymes most likely reflect conformational adjustments induced by the protein. These enhancements are not only found juxtaposed with protections, such as in the T stem, but are also found in non protected regions. In this view, the increased susceptibility of the anticodon loop to spontaneous hydrolysis probably reflects an increased flexibility of this region. Such an "effect at distance" has been observed in tRNAs. It has been shown that the crystallographic structure of tRNA^{Asp} differs from that of tRNA^{Phe} as a consequence of the anticodon-anticodon interaction in the tRNA^{Asp} crystal (Weshof *et al.*, 1983). This anticodon association induces long-distance changes accompanied by a transfer of flexibility resulting in an increased self-hydrolysis of the tRNA (Moras *et al.*, 1986).

The localization of the binding site of IF-2 in the minor groove of the T stem and in the T loop can be correlated with the observation that residues 57 and 60 are particularly accessible in the initiator tRNA. Therefore, the characteristic structural features observed in the T loop may represent specific recognition signals for IF-2.

fMet-tRNA^{fMet} in the 30S initiation complex — The conformation of fMet-tRNA^{fMet} within the [fMet-tRNA^{fMet}/IF-2/AUG/30S subunit] complex in the presence of GTP was studied on end-labeled tRNA by using DMS, ENU and enzymatic probes. A typical experiment is shown in figure 1 and results are summarized in figures 6b and 7b. The stability of the complex during the chemical modification procedure was checked by filter binding assays. Even with the highest DMS concentration, less than 10% of the complex was dissociated. In control samples lacking AUG or IF-2, the association of tRNA to 30S subunits was less than 5%. The 30S initiation complex was formed in the presence of GTP, since it was shown that GTP stimulates the binding of fMet-tRNA^{fMet} to both 30S and 70S ribosomes and inhibits the binding of the unformylated tRNA (Petersen *et al.*, 1976; Van der Hofstad *et al.*, 1977; Petersen, 1984).

The formation of the 30S initiation complex results in new protections in addition to those already observed in the [IF-2/tRNA] complex. Note that the reactivity of guanines 42, 52, 63, 64 and 70 at N-7 which was found enhanced upon IF-2 binding is still high, suggesting that the conformation of the tRNA is essentially similar in the binary complex and in the 30S initiation complex. The entire molecule is protected from RNase V₁ hydrolysis and the accessibility of the anticodon loop to nuclease S₁ is strongly reduced. Additional phosphates are protected in the anticodon and T stems, then extending the protection observed in the [IF-2/tRNA] complex. Protected phosphates also appear in the anticodon stem (positions 30, 31) and loop (positions 35, 37, 38) and the reactivity of C34(N-3) is reduced. The additional protections observed in the acceptor arm of the L-shaped molecule is possibly due to the presence of the 30S subunit, but also may result from a stabilization of the interactions between the tRNA and IF-2. The protections induced in the anticodon arm probably reflect a close contact with the 30S subunit. Indeed, the wobble base of tRNAs in the P site could be directly crosslinked to 16S rRNA at C1400 (Prince *et al.*, 1982; Ehresmann *et al.*, 1984). The decoding site is now well localized on the 30S subunit in the cleft separating the head and the neck from the large protusion (Gornicki *et al.*, 1984; Ofengand *et al.*, 1986). Therefore, the loss of reactivity of C35(N-3) is most likely due to the anticodon-AUG triplet interaction and the lack of accessibility of both sides of the anticodon stem and loop can easily be explained by a steric hindrance effect.

CONCLUSION

The present work provides an exhaustive analysis of the tertiary structure of the *E. coli* initiator tRNA. Our results confirm that the three-dimensional folding is very similar to that of yeast tRNA^{Phe}. These structural similarities would explain mischarging experiments showing that the *E. coli* initiator tRNA could be charged with phenylalanine by yeast phenylalanyl-tRNA synthetase (Kern *et al.*, 1972). However, several specific differences have been noted, that may account for the specific recognition by IF-2. In particular, the T loop which displays characteristic features is recognized by IF-2. The factor protects a rather limited portion of RNA, located in the T stem and loop. This contrasts with aminoacyl-tRNA synthetases which have large contact areas with the tRNA molecules (for a review, see Schimmel, 1987). On the contrary, striking similarities exist between the [IF-2/fMet-tRNA^{fMet}] complex and the [aminoacyl-tRNA/EF-Tu/GTP] ternary complex. Indeed, it has been shown that the major binding site of EF-Tu is the acceptor and T helices of the tRNA (Boutorin *et al.*, 1981; Wikman *et al.*, 1982, 1987; Hansen *et al.*, 1986). Interestingly, EF-Tu and IF-2 share strong homologies in their GTP binding domain, suggesting that their genes derive from a common ancestor (Sacerdot *et al.*, 1984; Cenatiempo *et al.*, 1987). IF-2 appears to induce an increased flexibility in the anticodon arm of the initiator tRNA. Conformational adjustments induced by EF-Tu binding have also been described, essentially in the anticodon arm region (e.g. Boutorin *et al.*, 1981; Wikman *et al.*, 1982; Riehl *et al.*, 1983).

One particularity of the initiator tRNA is that it binds exclusively to the ribosomal P site. Our results suggest that the initiator tRNA interacts with IF-2 in the 30S initiation complex like in the binary [IF-2/tRNA] complex. The extensive protection of the tRNA in the 30S initiation complex fits with other data regarding the topography of the decoding site in the 30S subunit.

Further studies are in progress to identify RNA and peptides that can be crosslinked in the [tRNA/IF-2] complex and to determine the contact regions of IF-2 on 16S rRNA in the [30S/mRNA] complex, either in the absence or in the presence of the initiator tRNA.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to J. Colin for the synthesis of the oligodeoxyribonucleotide and to R. Giegé, A. Garcia, H. Moine and M. Mougél for helpful discussions. The graphic modeling has been done on the PS300 of the Laboratory of Molecular Crystallography (IBMC, Strasbourg). We thank Dr. D. Moras for making it available and for his constant interest.

FOOTNOTES:

¹ Portions of this paper (including Materials and Methods, Table 1 and figure 4) are presented in miniprint at the end of this paper.

² Abbreviations: DMS, dimethylsulfate; DEPC, diethylpyrocarbonate; ENU, ethylnitrosourea; CMCT, cyclohexyl-N'-(2-N-methylmorpholino)-ethyl)-carbodiimide-*p*-toluene sulfonate; MTH, N5-N10 methyltetrahydrofolate; RNase V₁, ribonuclease from cobra *Naja naja oxiana* venom.

REFERENCES

- Baudin, F., Ehresmann, C., Romby, P., Mougél, M., Colin, J., Lempereur, L., Bachellerie, J.P., Ebel, J.P. & Ehresmann, B. (1987) *Biochimie* **69**, 1081-1096.
- Boutorin, A.S., Clark, B.F.C., Ebel, J.P., Kruse, T.A., Petersen, H.V., Rémy, P. & Vassilenko, S. (1981) *J. Mol. Biol.* **152**, 593-608.
- Brown, D.M. (1974) In "Basic Principles in Nucleic Acids Chem." (Ts'O, P.O.P., ed.) Vol. 2, pp1-90.
- Chang, S.E. (1973), *J. Mol. Biol.* **75**, 533-547.
- Cenatiempo, Y., Deville, F., Dondon, J., Grunberg-Manago, M., Sacerdot, C., Hershey, J.W.B., Hansen, H.F., Petersen, H.U., Clark, B.F.C., Kjeldgaard, M., La Cour, T.F.M., Mortensen, K.K. & Nyborg, J. (1987) *Biochemistry*. **26**, 5070-5076.
- Cramer, F., Doepner, H., Van Der Haar, F., Schlimme, E. & Seidel, H. (1968) *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **61**, 1384-1391.
- Dock-Bregeon, A.C. & Moras, D. (1987) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* Vol. LII, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 113-121.
- Dondon, J., Plumbridge, J.A., Hershey, J.W.B. & Grunberg-Manago, M. (1985) *Biochimie* **67**, 643-649.
- Ehresmann, C., Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Ebel, J.P. & Ehresmann, B. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 6109-9128.
- Ehresmann, C., Millon, R., Ehresmann, B., Ebel, J.P., Nurse, K. & Ofengand, J. (1984) *Biochemistry* **23**, 429-437.
- Fischer, W., Doi, T., Ikehara, M., Ohtsuka, E. & Sprinzl, M. (1985) *FEBS Lett.* **192**, 151-154.
- Furois-Corbin, S. & Pullman, A. (1985) *Biophysical Chemistry* **22**, 1-10.
- Garret, M., Labouesse, B., Litvak, S., Romby, P., Ebel, J.P. & Giegé, R. (1983) *Eur. J. Biochem.* **138**, 67-75.
- Giegé, R., Ebel, J.P., Springer, M. & Grunberg-Manago, M. (1973) *FEBS Lett.* **37**, 166-169.
- Goddard, J.P. & Schulmann, L.H. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3864-3867.
- Gornicki, P., Nurse, K., Hellmann, W., Boublik, M. & Ofengand, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10493-10498.
- Hansen, P.K., Wikman, F., Clark, B.F.C., Hershey, J.W.B. & Petersen, H.U. (1986) *Biochimie* **68**, 697-703.

- Holbrook, S.R. & Kim, S.H. (1983) *Biopolymers* **22**, 1145-1166.
- Jack, A., Ladner, J.E., Rhodes, D., Brown, R.S. & Klug, A. (1977) *J. Mol. Biol.* **111**, 315-328.
- Jay, G. & Kampfer, R. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 3199-3203.
- Jones, A. (1978) *J. Appl. Cryst.* **11**, 268-278.
- Kern, D., Giegé, R. & Ebel, J.P. (1972) *Eur. J. Biochem.* **31**, 148-155.
- Konnert, J.H. & Hendrickson, W.A. (1980) *Acta Crystallogr.* **A36**, 344-349.
- Kruse, T.A. & Clark, B.F.C. (1978) *Nucleic Acids Res.* **5**, 879-892.
- Lavery, R. & Pullman, B. (1984) *Biophysical Chemistry* **19**, 171-181.
- Lockard, R. & Kumar, A. (1981) *Nucleic Acids Res.* **9**, 5125-5140.
- Moras, D., Dock, A.C., Dumas, P., Westhof, E., Romby, P., Ebel, J.P. & Giegé, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 932-936.
- Mougel, M., Eyermann, F., Westhof, E., Romby, P., Expert-Bezançon, A., Ebel, J.P., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1987) *J. Mol. Biol.* **198**, 91-107.
- Ofengand, J., Ciesiolka, J., Denman, R. & Nurse, K. (1986) *Structure, Function, and Genetic of the Ribosome* (Hardesty, B. & Kramer, G. eds.) Springer-Verlag, pp 473-4494.
- Peattie, D.A. & Gilbert, W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 4079-7682.
- Pelka, H. & Schulman, L.H. (1986), *Biochemistry* **25**, 4450-4456.
- Petersen, H.U. (1984) *Gene Expression*. The Translational step and its control (Clark, B.F.C. & Petersen, H.U., eds.), Munksgaard, Copenhagen, pp 41-55.
- Petersen, H.U., Danchin, A. & Grunberg-Manago, M. (1976) *Biochemistry* **15**, 1357-1361.
- Petersen, H.U., Kruse, T.A., Worm-Leonhard, G.E., Siboska, G.E., Clark, B.F.C., Bourtouin, A.S., Rémy, P., Ebel, J.P., Dondon, J. & Grunberg-Manago, M. (1981) *FEBS Lett.* **128**, 161-165.
- Petersen, H.U., Roll, T., Grunberg-Manago, M. & Clark, B.F.C. (1979) *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **91**, 1068-1074.
- Pflugrath, J.W., Saper, M.A. & Quirocho, F.A. (1983) *J. Mol. Graphics* **1**, 53-56.
- Prince, J.B., Taylor, B.H., Thurlow, D.L., Ofengand, J. & Zimmermann, R.A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5450-5454.
- Quigley, G.J., Wang, A., Seeman, N.C., Suddath, F.L., Rich, A., Sussman, J.L. & Kim, S.H. (1975) *Nucleic Acids Res.* **2**, 3289-3293.
- Rabinowitz, J.C. (1963) *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O, eds.), Vol. VI, Academic Press, New York, London, pp 814-815.

- Richmond, T.J. (1984) *J. Mol. Biol.* **178**, 63-89.
- Riehl, N., Giegé, R., Ebel, J.P. & Ehresmann, B. (1983) *FEBS Lett.* **154**, 42-46.
- Rhodes, D. (1975) *J. Mol. Biol.* **94**, 449-460.
- Romaniuk, P.J., Hughes, D.W., Gregoire, R.J., Neilson, T. & Bell, R.A. (1978) *J. Amer. Chem. Soc.* **100**, 3971-3972.
- Romby, P., Moras, D., Dumas, P., Ebel, J.P. & Giegé, R. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 193-204.
- Romby, P., Westhof, E., Moras, D., Giegé, R., Houssier, C. & Grosjean, H. (1986), *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 193-203.
- Sacerdot, C., Dessen, P., Hershey, J.W.B., Plumbridge, J.A. & Grunberg-Manago, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 7787-7791.
- Schimmel, P. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 125-158.
- Schulman, L.H. & Pelka, H. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 542-547.
- Schulman, L.H. & Pelka, H. (1976), *Biochemistry* **15**, 5769-5775.
- Schulman, L.H., Pelka, H. & Sundari, R.M. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7102-7110.
- Seong, B.L. & RajBhandary, U.L. (1987a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 334-338.
- Seong, B.L. & RajBhandary, U.L. (1987b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 8859-8863.
- Silberklang, M., Gillum, A.M. & RajBhandary, U.L. (1977) *Nucleic Acids Res.* **4**, 4091-4108.
- Stout, C.D., Mizuno, M., Rao, S.T., Swaminathan, P., Rubin, J., Brennan, T. & Sundaralingam, M. (1978) *Acta Crystallogr.* **354**, 1529-1540.
- Sugimoto, N., Kierzek, R. & Turner, D. (1987) *Biochemistry* **26**, 4554-4558.
- Van Der Hofstad, G.A.J., Foekens, J.A., Bosch, L. & Voorma, H.O. (1977) *Eur. J. Biochem.* **77**, 69-75.
- Vlassov, V.V., Giegé, R. & Ebel, J.P. (1981) *Eur. J. Biochem.* **119**, 51-59.
- Westhof, E., Dumas, P. & Moras, D. (1983) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**, 337-355.
- Westhof, E., Dumas, P. & Moras, D. (1985) *J. Mol. Biol.* **184**, 119-145.
- Westhof, E. & Sundaralingam, M. (1986) *Biochemistry* **25**, 4868-4878.
- Weygand-Durasevic, I., Kruse, T.A. & Clark, B.F.C. (1981) *Eur. J. Biochem.* **116**, 59-65.
- Wikman, F.P., Siboska, G.E., Petersen, H.U. & Clark, B.F.C. (1982) *EMBO J.* **1**, 1095-1100.
- Wikman, F.P., Romby, P., Metz, M.H., Reinbolt, J., Clark, B.F.C., Ebel, J.P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 5787-5801.

- Woo, N.H., Roe, B.A. & Rich, A. (1980) *Nature* **286**, 346-351.
- Wrede, P., Woo, N.H. & Rich, A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 3289-3293.
- Yamashiro-Matsumura, S. & Kawata, M. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9308-9312.

SUPPLEMENT MATERIAL TO

THE STRUCTURE OF THE *E. COLI* INITIATOR tRNA AND ITS INTERACTIONS WITH THE INITIATION FACTOR IF-2 AND THE RIBOSOMAL 30S SUBUNIT

Hiroshi Wakao, Pascale Romby, Eric Westhof, Soumaya Laalami, Marianne Grunberg-Manago, Jean-Pierre Ebel, Chantal Ehresmann and Bernard Ehresmann

MATERIAL AND METHODS

Buffers. Buffer A: Hepes-KOH 25 mM pH 7.5, magnesium acetate 6 mM, DTT 16 mM. Buffer B: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, magnesium acetate 6 mM, ammonium chloride 50 mM, GTP 1 mM, 2-mercaptoethanol 16 mM. Buffer C: Buffer B with ZnCl₂ 1 mM. Buffer D: sodium cacodylate 50 mM pH 7.5, magnesium acetate 6 mM, ammonium chloride 50 mM, GTP 1 mM, 2-mercaptoethanol 16 mM; Buffer E: sodium cacodylate 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM; Buffer F: sodium borate 50 mM pH 8.0, magnesium acetate 6 mM, ammonium chloride 50 mM, GTP 1 mM, 2-mercaptoethanol 16 mM. Buffer G: sodium borate 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM.

Chemicals and enzymes. Aniline, sodium borohydride and CMCT² were from Merck. DMS was from Aldrich Chemicals Company. DEPC, hydrazine and ENU were from Sigma. Calf intestinal phosphatase, RNases T₁ and V₁, nuclease S₁, T₄ RNA ligase and T₄ polynucleotide kinase were from P.L. Biochemicals. Avian myeloblastosis reverse transcriptase was from Life Science. [γ -³²P]ATP (3,200 Ci/mmol), [α -³²P]ATP (410 Ci/mmol) were from Amersham. Acrylamide and N, N' methylene bis-acrylamide were from BDH Chemicals. *E. coli* tRNA^{fMet} was from Boehringer; MTH was from Serva.

Preparation of 30S subunits, IF-2 and crude *E. coli* aminoacyl-tRNA synthetases. 30S subunits were prepared according to Baudin *et al.* (1987). IF-2 was purified as described by Dondon *et al.* (1985). Crude *E. coli* protein extract was prepared from *E. coli* B cells according to Rabinowitz (1963). After cell grinding, the suspension was centrifuged at 25,000 g for 15 min to remove alumina and cell debris. The supernatant was then centrifuged at 100,000 g for 2 h, dialyzed against potassium phosphate 30 mM pH 7.2, EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoethanol 5 mM, glycerol 10%, and chromatographed on a DEAE-cellulose column previously equilibrated with potassium phosphate 20 mM pH 7.5, magnesium acetate 1 mM, 2-mercaptoethanol 20 mM, glycerol 10%. The aminoacyl-tRNA synthetases and the formylase were eluted with potassium phosphate 250 mM pH 6.9, magnesium acetate 1 mM, 2-mercaptoethanol 20 mM, glycerol 10%. The proteins were dialyzed against the same buffer containing 30% glycerol then against Tris-acetate 20 mM pH 7.5, magnesium acetate 1 mM, DTT 1 mM, glycerol 50%, and stored at -80°C.

Preparation of labeled fMet-tRNA^{fMet}. In order to label *E. coli* tRNA^{fMet} at the 3' end, the terminal CCA sequence was removed by snake venom phosphodiesterase and then reconstituted with unlabeled CTP, [α -³²P]ATP and tRNA nucleotidyl transferase (Vlassov *et al.*, 1981). The 5' end labeling was performed with [γ -³²P]ATP and T₄ polynucleotide kinase on the tRNA previously dephosphorylated with alkaline phosphatase (Silberklang *et al.*, 1977). Labeled tRNA was purified by gel electrophoresis.

Labeled tRNA^{fMet} was aminoacylated and formylated in 75 μ l Buffer A in the presence of ATP 4 mM, RNasin 2.4 U, methionine 0.26 mM, unlabeled initiator tRNA 40 μ g, MTH 0.34 mM and crude *E. coli* protein extract 0.25 mg. The reaction was stopped by phenol extraction. The excess of methionine and MTH was removed by the passage of the solution through a small Sephadex G25 column equilibrated with sodium acetate 50 mM pH 5.5, NaCl 0.3 M. The tRNA was then precipitated, washed twice with

80% ethanol and dissolved in sodium acetate 2 mM pH 6.0.

Before each probing experiment, the tRNA was renatured by incubation at 50°C in the appropriate buffer for 2 min and cooled down slowly (20 min) at room temperature. Aminoacylation and formylation were controlled in parallel experiments performed under the same above conditions on unlabeled tRNA aminoacylated with [³H]methionine: the yield of aminoacylation was checked by counting the acidoprecipitable [³H]Met-tRNA with 10% trichloroacetic acid retained on Whatman 3MM filter. Formylation was calculated by incubating an aliquote fraction of the incubation mixture in the presence of CuSO₄ 25 mM, Tris-HCl 200 mM pH7.5 for 3 min at 37°C. Under these conditions the unformylated [³H]Met-tRNA is hydrolysed and the formylated species were precipitated as above and counted.

Formation of the [fMet-tRNA^{Met}/IF-2] and the 30S initiation complexes. The binary [fMet-tRNA^{Met}/IF-2] complex and the 30S initiation complex were formed in Buffers B, C, D or F at 37°C for 10 min. The concentration of labeled fMet-tRNA^{Met} was 0.5 μM and a 5 to 10 fold excess of IF-2 was added. For the 30S initiation complex, a four fold excess of 30S subunits and a 100 fold excess of AUG triplet were added to the binary complex. Formation of the binary complex and of the initiation complex was verified by filter binding assay according to Van der Hofstad *et al.* (1977). The initiation complex formation was also measured by fractionation on a 10% to 30% linear sucrose gradient in Buffer B in the presence of gelatin 1 μg/ml according to Jay & Kampfer (1974).

Enzymatic probing. In each experiment, labeled tRNA was supplemented with 1 μg of total tRNA as carrier. Digestions with RNases T₁ (10⁻³ U) and V₁ (0.05 U) were at 37°C for 5 and 10 min in 20 μl of Buffer B. Digestion with nuclease S₁ (25 U) was at 37°C for 5 and 10 min in 20 μl of Buffer C.

Alkylation of phosphates with ethylnitrosourea. Phosphate alkylation was essentially as described by Vlassov *et al.* (1981). Labeled tRNA was supplemented with 1 μg of total tRNA. Native conditions: reaction was at 20°C and 37°C in 20 μl of Buffer D with 5 μl of an ENU-saturated ethanol solution, for 2h30 and 30 min, respectively. Denaturing conditions: same procedure as for native conditions but reaction was at 80°C for 2 min in Buffer E.

Chemical modification of the bases. In each experiment, the tRNA was supplemented with 2 μg of total tRNA. DMS modification, native reaction: reaction was at 37°C in 40 μl of Buffer D with 1 μl of DMS (diluted twice in ethanol) for 5 to 20 min; semi-denaturing conditions: same procedure as for native conditions but in Buffer E; denaturing conditions: reaction was at 90°C for 1 min in Buffer E. DEPC modification, native conditions: reaction was at 37°C in 40 μl of Buffer D with 2 μl of DEPC for 30 min; semi-denaturing conditions: same procedure as for native conditions but in Buffer E; denaturing conditions: reaction was at 90°C for 5 min in Buffer E with 1 μl of DEPC. CMCT modification, native conditions: reaction was at 37°C in 20 μl of Buffer F with 5 μl of CMCT (42 mg/ml) for 5 to 30 min. Semi-denaturing conditions: same procedure as for native conditions but in Buffer G. Denaturing conditions: reaction was at 90°C for 1 min in Buffer G.

All the reactions were stopped by precipitating the tRNA with 2.5 volumes of ethanol in the presence of sodium acetate 0.3 M pH 5.5. For experiments conducted in the presence of IF-2 or 30S subunits, phenol extraction in the presence of SDS 0.1% was performed prior to ethanol precipitation.

Detection and analysis of the modified positions. The end-labeled tRNA modified with ENU was cleaved at phosphotriester positions in 0.1 M Tris-HCl pH 9.0 at 50°C

according to Vlassov *et al.* (1981). Cleavage of the end-labeled tRNA at the modified base positions G(N-7) and C(N-3) with DMS, and A(N-7) with DEPC was as described by Peattie & Gilbert (1980). The liberated oligonucleotides were analyzed by electrophoresis on 15% polyacrylamide (0.75% bis):8 M urea slab gels. Nuclease cuts and modified phosphates were identified by running in parallel RNase T₁ and formamide ladders.

When primer extension was used, a DNA primer TGGTTGCGG complementary to the 3' end of the tRNA was synthesized with an Applied Biosystem apparatus using the phosphoramidite method, and labeled at the 5' end according to Silberklang *et al.* (1977). In order to minimize unspecific hybridization, partially purified yeast tRNA^{Phe} (deprived of the CCA end) was used as a carrier. Hybridization with the unlabeled tRNA, primer elongation and analysis of the generated DNA fragments were as described by Mougél *et al.* (1987).

Graphic modeling. Graphic modeling of the initiator tRNA was performed by taking the refined crystallographic structure of the monoclinic form of yeast tRNA^{Phe} as reference (Westhof & Sundaralingam, 1986). Regions encompassing C1-G15 and G18-A76 were constructed with the program FRAGMENT which inserts any base sequence on a substructure chosen in a data base. Nucleotides C16, C17 and U17.1 were constructed with the program NAHELIX. These two fragments were then hooked together interactively with the program FRODO (Jones, 1978) adapted for the Evans and Sutherland PS300 (Pflugrath *et al.*, 1983). Corrections and rough fitting of base pairing were done manually with the graphic program FRODO and with yeast tRNA^{Phe} as reference. To insure proper geometry for base pairing and correct stereochemistry, the output of FRODO was subjected to Hendrickson-Konnert restrained least squares (Konnert & Hendrickson, 1980) with the programs NUCLIN and NUCLSQ (Westhof *et al.*, 1985).

A quantitative measure of the steric accessibility of the different atoms within the three-dimensional model of the tRNA was performed with a program based on the algorithm and definition of Richmond (1984). The accessibility of each atom was calculated by using a spherical probe which rolls over the Van der Waals surface of the tRNA. The radius of the solvent sphere is adapted to the chemical probe (between 1.4 and 2.8 Å). Such a study has already been performed on tRNAs (Holbrook & Kim, 1983; Lavery & Pullman, 1984; Furois-Corbin & Pullman, 1985).

III. TOPOGRAPHIE DU COMPLEXE IF2/fMet-ARNt^{fMet}.

Le facteur d'initiation IF2 joue un rôle fondamental dans la sélection de l'ARNt initiateur et de sa fixation dans le site P du ribosome, en opposition à l'ARNt élongateur qui est reconnu par le facteur d'élongation EF-Tu pour être amené au site A du ribosome. Dans l'article 1, nous avons analysé l'effet de l'interaction de IF2 sur la conformation de l'ARNt initiateur. Afin d'apporter des évidences expérimentales supplémentaires concernant l'agencement des deux macromolécules dans le complexe, nous avons utilisé le *trans*-diaminodichloro platine (II) pour induire des pontages entre l'ARNt et IF2. Ce réactif présente l'avantage important d'induire des pontages réversibles à un taux relativement élevé. Celui-ci a été largement utilisé dans notre groupe pour l'étude de divers complexes ARN-protéines tels que les complexes : ARNt/EF-Tu (Wikman *et al.*, 1987 ; Metz-Boutigue *et al.*, 1989), ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase (Tukalo *et al.*, 1987), ARNr 5S/TFIIIA (Baudin *et al.*, 1990), ARNr 16S-protéines dans la sous-unité 30S (Tukalo *et al.*, 1987 ; Moine *et al.*, 1988a) et IF3-ARNr 16S dans la sous-unité 30S (Ehresmann *et al.*, 1986). Le mode d'action et la spécificité du *t*-DDP sont présentés dans la partie "Stratégie Expérimentale". Dans les complexes ribonucléoprotéiques, le *t*-DDP se coordine préférentiellement au niveau de l'ARN à la position N7 des guanines et à un moindre taux, aux positions N1 des adénines et N3 des cytosines. Au niveau des protéines, le *t*-DDP se coordine au soufre des cystéines et des méthionines ainsi qu'au noyau imidazole des histidines (Tukalo *et al.*, 1987).

1. Résultats.

1.1. Formation du complexe IF2/fMet-ARNt^{fMet} et pontage.

Les conditions expérimentales utilisées pour former le complexe IF2/fMet-ARNt^{fMet}, pour induire des pontages ARN-protéines par l'intermédiaire du *t*-DDP, pour isoler et séquencer les fragments de l'ARN contenant le ou les sites de pontage, sont décrites dans la partie "Matériel et Méthodes" et discutées dans la partie "Stratégie Expérimentale". Ces conditions dérivent de celles déterminées par Ehresmann *et al.* (1986) pour le pontage du facteur d'initiation IF3 à la sous-unité ribosomique 30S. Le pontage de IF2 sur l'ARNt initiateur a été réalisé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le pontage de IF2 à l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S en présence de GTP (voir Chapitre 2.III). Le facteur IF2 est préalablement traité IF2 par le *t*-DDP dans un

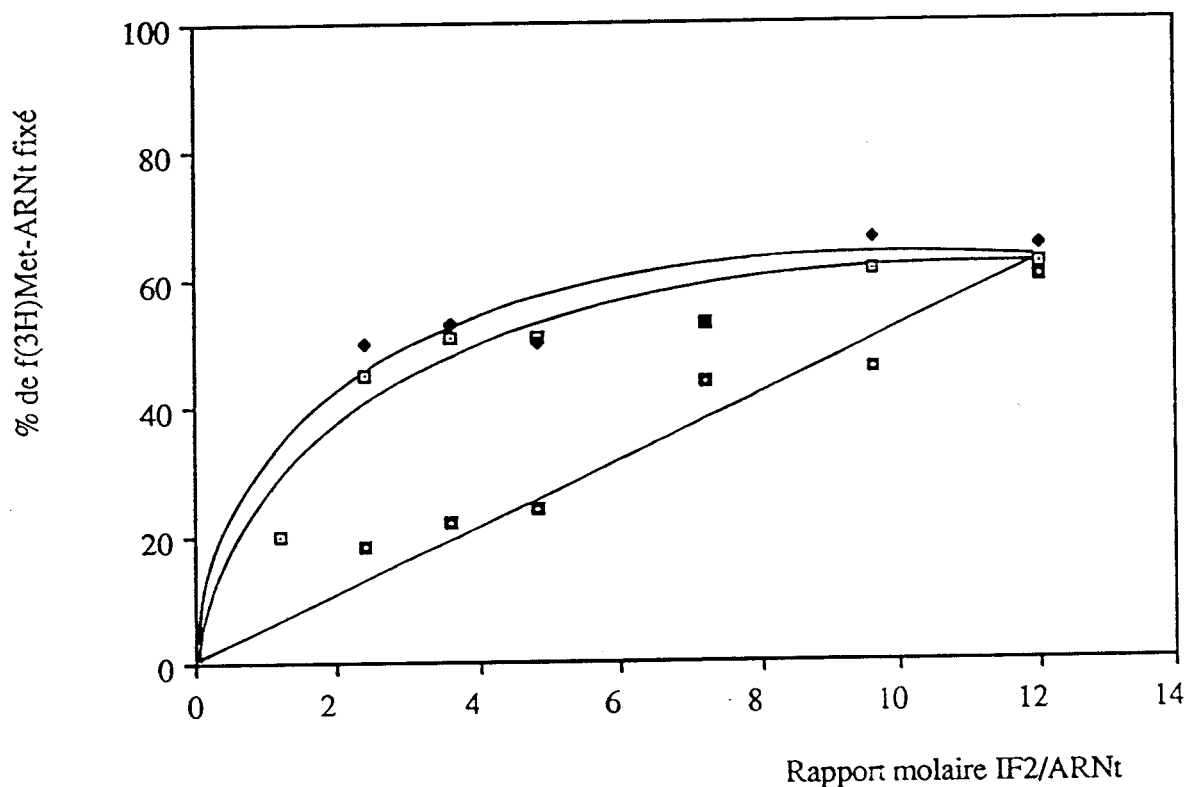


Figure 10 : Courbe de saturation du $f[^3H]Met-ARNt_f^{Met}$ en présence de concentrations croissantes de facteur d'initiation IF2. L'ARNt initiateur ($0,7 \mu M$) est incubé en présence de concentrations croissantes de IF2 non traité (♦) ou pré-traité au t -DDP pour un rapport t -DDP/IF2 de 400 (□) à $37^\circ C$ pendant 10 min dans les conditions optimales pour la formation du complexe (voir "Matériel et Méthodes"). (■) L'ARNt initiateur est incubé en présence de concentrations croissantes d'IF2 pré-traité au t -DDP à $37^\circ C$ pendant 10 min dans les conditions dissociantes (en présence de $0,4 M$ de NaCl).

rapport molaire *t*-DDP/IF2 de 400, avant d'ajouter l'ARNt au milieu. La fixation du *t*-DDP à la protéine par coordination de l'une des deux fonctions chlore nécessite une incubation très longue (1 h environ à température ambiante), alors que la formation simultanée du complexe ARNt/IF2 et la coordination de la deuxième fonction chlore (restée libre) à l'ARNt est très rapide (5 min). Dans ces conditions, l'excès de *t*-DDP est au contact de l'ARNt durant un temps extrêmement court, limitant ainsi au maximum les risques de former des pontages intra- ou inter-ARNt.

Le taux de pontage et la spécificité des complexes pontés ont été déterminés par des expériences de filtration sur membrane de nitrocellulose (voir figure 10). Le complexe IF2/fMet-ARNt_f^{Met} non ponté étant instable, la courbe de saturation de l'ARNt initiateur en présence de quantités croissantes de IF2 a été effectuée après traitement du complexe formé par la glutaraldéhyde juste avant la filtration, afin de stabiliser le complexe formé, comme décrit par Van der Hofstad *et al.* (1977).

La courbe de saturation de l'ARNt obtenue avec des quantités croissantes d'IF2 prétraitées au *t*-DDP est identique à celle réalisée avec la protéine IF2 non traitée (voir figure 10). Ce résultat indique qu'il n'y a pas de molécules d'IF2 pontées en-dehors de son site de fixation spécifique sur l'ARNt puisque la stoechiométrie du complexe n'est pas modifiée. Cette même expérience réalisée sur le complexe IF2-Pt/fMet-ARNt_f^{Met} filtré dans des conditions dissociantes (à forte force ionique), permet d'évaluer le taux de pontage. Il est intéressant de noter que nous tendons vers la même stoechiométrie du complexe mais avec des quantités beaucoup plus importantes d'IF2 par rapport à l'ARNt. Bien que l'on puisse obtenir jusqu'à 100% d'ARNt ponté avec un large excès de IF2-Pt, nous nous sommes volontairement placés dans des conditions où 20% de fMet-ARNt_f^{Met} seulement est ponté afin de limiter la quantité d'IF2 dans le milieu réactionnel.

1.2. Identification de la région de l'ARNt initiateur impliquée dans le pontage avec IF2.

Le complexe IF2-Pt/fMet-ARNt_f^{Met} formé a été soumis à une hydrolyse partielle à la RNase T₁. L'hydrolysate a ensuite été filtré sur membrane de nitrocellulose dans des conditions dissociantes. Dans ces conditions, les complexes pontés IF2/oligonucléotides sont retenus sur le filtre, alors que les fragments d'ARN libres sont éliminés après lavage à forte force ionique (voir "Matériel et Méthodes"). Deux types de contrôles ont été réalisés : le premier a été réalisé sur un complexe ARNt/IF2 non prétraité au *t*-DDP ; dans le deuxième, IF2 prétraité par le *t*-DDP a été filtré dans les mêmes conditions dissociantes en présence d'un hydrolysate d'ARNt obtenu dans les mêmes conditions d'hydrolyse que ci-

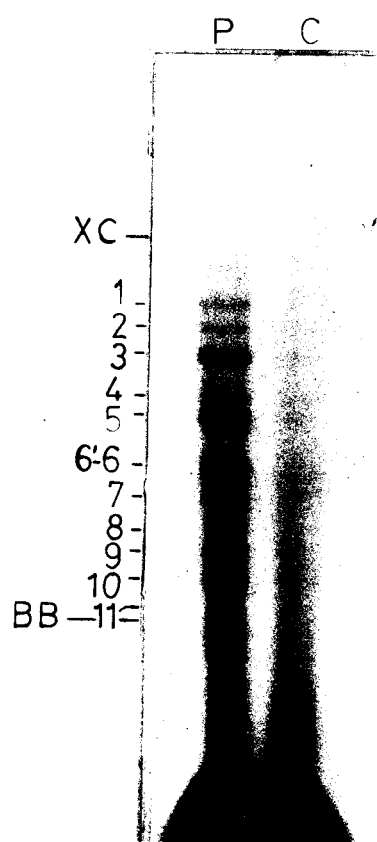


Figure 11 : Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide montrant le fractionnement des oligoribonucléotides T_1 marqués à leur extrémité 5' pontés à IF2. (C) Contrôle d'incubation en absence de t -DDP ; (P) fragments pontés à IF2 et libérés après réversion du pontage. Les marqueurs de migration utilisés sont le bleu de bromophénol et le xylène de cyanol.

dessus.

Après réversion du pontage par traitement des filtres par la thiourée, les oligonucléotides libérés ont été marqués à leur extrémité 5' terminale et fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dissociantes (figure 11). Ce type de fractionnement montre clairement qu'aucun fragment d'ARN n'a été détecté dans l'un ou l'autre des contrôles réalisés, confirmant que les oligonucléotides retenus sur les filtres correspondent uniquement à ceux qui étaient pontés à IF2.

Tous les fragments pontés ont été repurifiés par une deuxième électrophorèse sur gel de polyacrylamide, avant d'être séquencés au moyen de différentes RNases de spécificités différentes. Quelques exemples sont montrés dans la figure 12. Le nucléotide 5' terminal de chaque fragment a été identifié séparément, après hydrolyse totale à la RNase P₁, par chromatographie sur plaque de cellulose. Il est à noter que l'intensité de la radioactivité des fragments ne peut être directement corrélée à la quantité relative de chaque fragment isolé, puisque l'efficacité du marquage à l'extrémité 5' dépend de la séquence et de la structure spatiale du fragment.

Les différents fragments de l'ARNt initiateur trouvés pontés à IF2 sont représentés sous forme de diagramme (figure 13). Ces oligoribonucléotides pontés ont été retrouvés avec une bonne reproductibilité dans trois expériences différentes. Il apparaît de façon évidente que la grande majorité des fragments d'ARNt pontés à IF2 sont localisés dans la région 46-76. Ces fragments contiennent tous l'oligonucléotide T₁ 54-63, ce qui suggère fortement que le point de pontage majeur se situe dans cette région. Ces fragments sont plus ou moins longs aussi bien dans le sens 5' que 3', résultant de l'hydrolyse partielle effectuée. Certains fragments (8 et 11) sont générés par coupure non enzymatique. Ces coupures pouvant être produites après l'étape de filtration, les fragments correspondants ne seront pas pris en considération. Ce type de coupure non enzymatique a déjà été mis en évidence dans d'autres systèmes tels que les complexes ARNt/EF-Tu (Wikman *et al.*, 1987) et ARNr 5S/TFIIIA (Baudin *et al.*, 1990), reflétant une fragilité intrinsèque de la chaîne ribose-phosphate. Une deuxième région (nucléotides 27-42) a également été trouvée pontée mais à un taux beaucoup plus faible, puisque seuls trois fragments ont été isolés.

Nous ne pouvons pas exclure que certains des oligoribonucléotides retenus sur les filtres proviennent de pontages IF2-ARN-ARN. Cependant, le fait d'avoir limité le temps d'incubation de IF2 (prétraité par le *t*-DDP) en présence de l'ARNt et de l'excès de réactif à 5 min rend très peu probable de tels pontages.

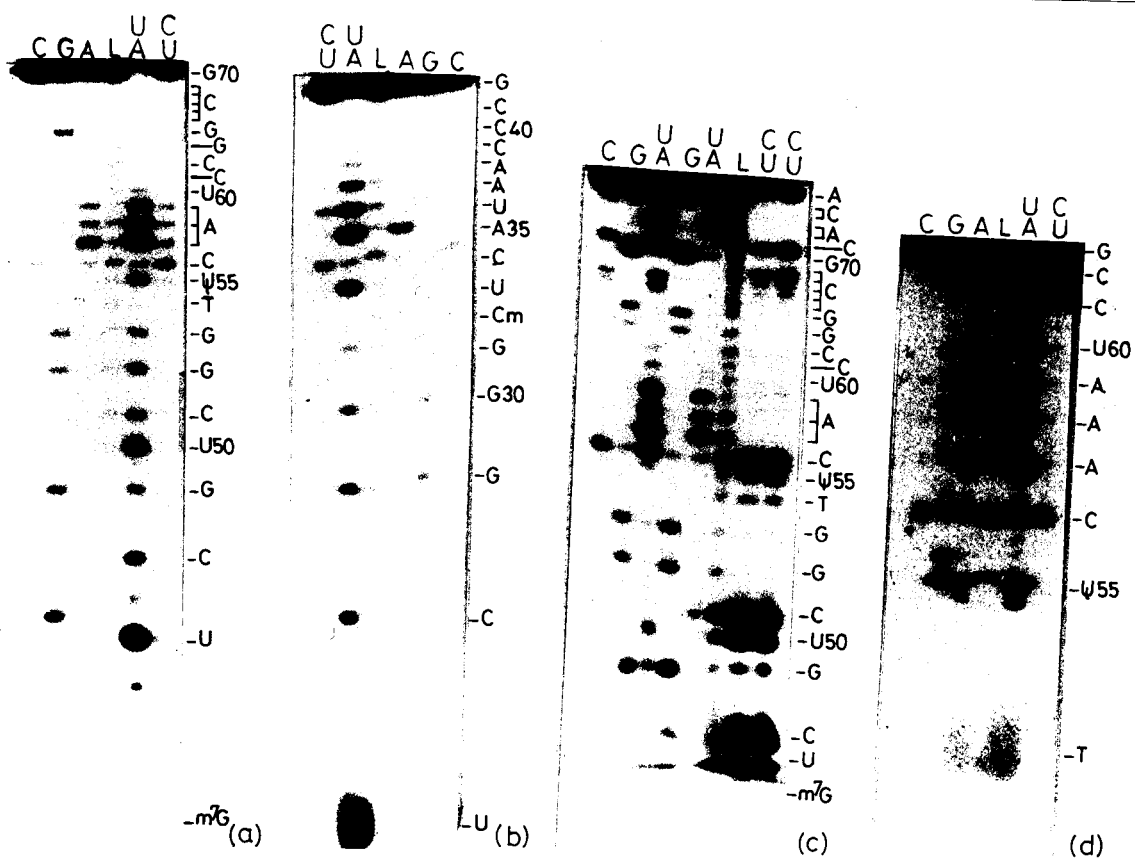


Figure 12 : Autoradiographies de gels de polyacrylamide montrant le fractionnement de divers oligoribonucléotides T_1 marqués à leur extrémité 5' et séquencés au moyen de diverses ribonucléases. (a, b, c, d) correspondent respectivement aux fragments 2, 6', 1 et 10. (C) Contrôle d'incubation en absence d'enzyme ; (G, A, AU, CU) correspondent respectivement aux hydrolyses enzymatiques par la RNase T_1 , U_2 , $PhyM$ et de *B. cereus* ; (L) hydrolyse partielle à la formamide. Les conditions d'hydrolyses enzymatiques sont données dans la partie "Matériel et Méthodes".

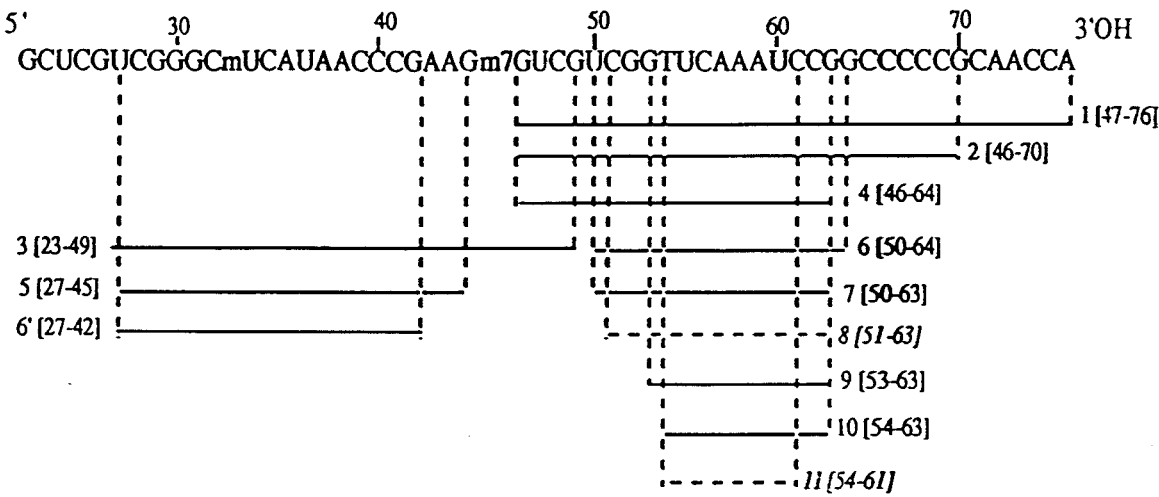


Figure 13 : Diagramme des fragments pontés au facteur d'initiation IF2. Les fragments sont numérotés comme dans la Figure 11. Le contenu en nucléotides est indiqué entre crochets. Les fragments générés par une hydrolyse non enzymatique sont indiqués en italique et sont représentés en pointillés.

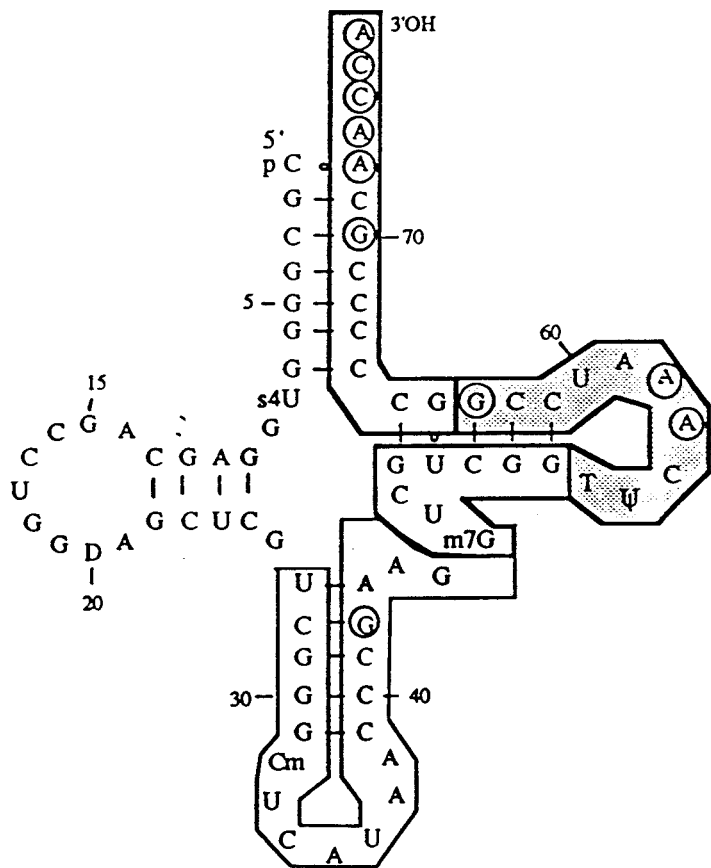


Figure 14 : Localisation des fragments d'ARN pontés sur la structure secondaire de l'ARNt initiateur d'E. coli. Les régions pontées majeures sont encadrées de traits gras et les régions pontées mineures sont encadrées de traits fins. La zone hachurée correspond au plus petit fragment trouvé ponté. Les sites potentiels sont cerclés.

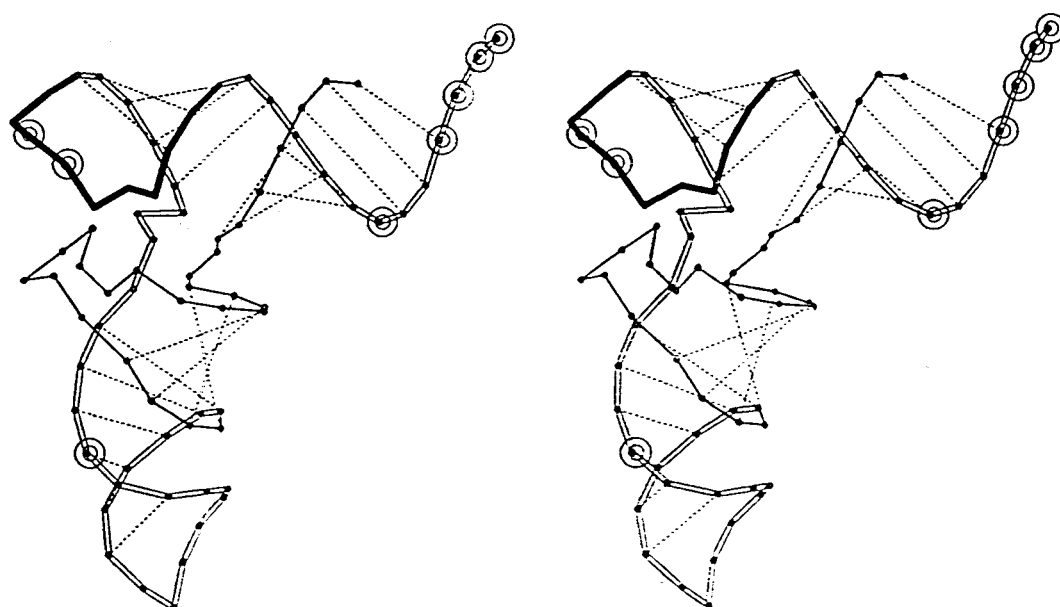


Figure 15 : Localisation des fragments d'ARN pontés sur le modèle de structure tridimensionnelle de l'ARNi initiateur d'*E. coli*. La région majeure pontée est représentée en trait gras et les régions mineures pontées sont entourées par deux traits fins. Les sites potentiels de pontage sont cerclés. La vue stéréoscopique a été représentée à l'aide du programme PLUTO (Motherwell et Evans, MRC Cambridge).

2. Discussion et conclusion.

Dans ce présent travail, nous avons utilisé la capacité du *t*-DDP à induire des pontages réversibles entre ARN et protéines pour définir les régions de proche voisinage de l'ARNt initiateur avec IF2 dans le complexe IF2/ARNt. Les conditions de pontage choisies permettent d'obtenir un taux de pontage relativement élevé (de l'ordre de 20%), facilitant l'isolement et l'identification des régions de l'ARN pontées. De façon remarquable, les fragments pontés ne sont pas distribués sur toute la molécule mais sont principalement localisées dans la moitié 3' de l'ARNt initiateur. A l'intérieur de cette région, le site de pontage majeur est contenu dans l'oligonucléotide T₁ 54-63 contenant la boucle T et la partie 3' de l'hélice T. La localisation de ces régions est représentée sur la structure secondaire de l'ARNt initiateur (figure 14).

Il est évident que le point de pontage ne peut être identifié avec précision puisque le pontage a été réversé avant le séquençage des oligoribonucléotides pontés. Toutefois, des candidats potentiels peuvent être déduits en combinant : (1) la spécificité de réaction du *t*-DDP vis à vis des bases nucléiques (essentiellement aux positions G(N7) et accessoirement aux positions A(N1) et C(N3), voir Tukalo *et al.*, 1987) ; (2) les résultats obtenus précédemment sur la réactivité des résidus de l'ARNt vis à vis des différentes sondes de structure utilisées (voir article 1) ; (3) la détermination des résidus impliqués dans la coordination de l'adduit du *t*-DDP dans des cristaux d'ARNt^{Phe} de levure aux positions N7 des guanines 18, 34, 43 et à la position N1 de l'adénine 73 (Jack *et al.*, 1977 ; Rubin *et al.*, 1983).

Le fragment 54-63 contenu dans la majorité des fragments isolés doit contenir le ou les points de pontages majeurs. Ainsi, les adénines 57-59, la cytosine 56 et la guanine 63 sont des candidats potentiels. Toutefois, la cytosine 56 non réactive au DMS en position N3 est engagée dans une interaction tertiaire avec la guanine 19 de la boucle D et l'adénine 59 non réactive au DMS en position N1 n'est pas exposée au solvant. Seules les adénines 57 et 58 présentent une forte réactivité en position N1 et la guanine 63 devient réactive en position N7 en présence de IF2. Ces trois nucléotides (A57(N1), A58(N1) et G63(N7)) restent ainsi des candidats potentiels. Cependant, il n'est pas à exclure que le fragment I (46 à 76) contienne un autre point de pontage (à un taux faible). Parmi les candidats potentiels dans cette région, il faut citer l'extrémité ACCA 3' terminale, y compris G70 et A72. En effet, l'analyse de la conformation de l'ARNt^{Met} en solution nous a permis de postuler un appariement non canonique C1(N4,N3)--A72(N7,N6) laissant ainsi le groupement N1 de l'adénine 72 libre, la guanine 70 est réactive en position N7 et les

résidus ACCA sont exposés au solvant (article 1). Ces résultats de pontage sont en parfait accord avec la détermination de l'empreinte de IF2 sur l'ARNt. En effet, il est remarquable de noter que la protéine protège exclusivement la région T et la partie 3' du bras accepteur (article 1).

Trois autres fragments ont été isolés, correspondant à des pontage obtenus à une fréquence beaucoup plus faible. Ces fragments couvrent le bras de l'anticodon. Parmi les sites de pontage potentiels dans cette région, il y aurait les positions N3 de la cytosine 34, N1 des adénines 35, 37-38 et N7 des guanines 42 et 45. Or, aucune protection n'a été observée dans la boucle de l'anticodon même contre l'action de la nucléase S_1 où l'encombrement stérique lié à la grande taille de la protéine aurait dû induire des protections. Ceci suggère que la boucle de l'anticodon n'est pas en proche contact avec IF2. En revanche, des augmentations de réactivité ont été observées dans la boucle variable et le bras de l'anticodon, en particulier la guanine 42 en position N7 devient réactive en présence de IF2, suggérant un proche voisinage de la protéine. De plus, dans la structure de l'ARNt^{Phe}, une liaison de coordination entre le τ -DDP et la guanine 43 en N7 a été montrée. Ainsi, la guanine 42 représenterait le candidat potentiel le plus probable dans cette région. Cependant, on ne peut pas exclure que ces fragments trouvés à faible fréquence aient été générés par une hydrolyse non enzymatique après la filtration d'un grand fragment d'ARN obtenu après hydrolyse partielle par la RNase T_1 .

Ces différents sites potentiels de pontage sont représentés sur le modèle de structure tertiaire de l'ARNt initiateur (figure 15). Ce modèle tient compte de la réactivité de chaque nucléotide à diverses sondes de structure et tient compte des contraintes stéréochimiques. Ces résultats mettent de nouveau en évidence le fait que IF2 interagirait principalement au niveau des bras T et accepteur avec des contacts extrêmes situés dans la boucle variable.

Une similitude frappante entre les complexes fMet-ARNt^{Met}/IF2/GTP et aminoacyl-ARNt/EF-Tu/GTP est observée. En effet, dans les deux cas, les protections induites par les facteurs sont essentiellement localisées dans les bras accepteur et T alors que des changements conformationnels ont lieu dans la région de l'anticodon (par exemple, pour IF2 : Petersen *et al.*, 1981 et article 1 de cette thèse, pour EF-Tu : Boutorin *et al.*, 1981 ; Wikman *et al.*, 1982 ; Hansen *et al.*, 1986). De même, dans le cas du complexe ARNt/EF-Tu, une région pontée majoritaire a été localisée dans le bras T (nucléotides 58 à 65) et une minoritaire dans le bras anticodon (nucléotides 31 à 42) (Wikman *et al.*, 1987). Ceci suggère fortement que la topographie des deux types de complexes aminoacyl-ARNt/EF-Tu et fMet-ARNt^{Met}/IF2 sont analogues.

CHAPITRE 2

Etude de la conformation de l'ARN ribosomique 16S lors de l'initiation de la synthèse protéique. Interaction avec l'ARNt initiateur et le facteur d'initiation IF2.

I. INTRODUCTION

Les ribosomes sont des particules multimoléculaires possédant un extraordinaire degré de complexité. La sous-unité 30S, particulièrement étudiée, est directement impliquée dans les premières étapes de l'initiation de la biosynthèse des protéines, et est le siège de l'interaction codon-anticodon. Elle exerce donc un rôle fondamental dans la fidélité de la traduction. Au cours de ces événements, la sous-unité ribosomique 30S doit interagir de manière coordonnée avec l'ARNm, l'ARNt initiateur, les facteurs d'initiation (IF1, IF2 et IF3) et la sous-unité ribosomique 50S. Pendant longtemps l'ARNr 16S a été considéré comme la colonne vertébrale de la sous-unité autour de laquelle se fixait les protéines lors de l'assemblage de la sous-unité. En fait, si l'ARNr 16S participe activement à l'assemblage des protéines et il joue un rôle important dans la fonction du ribosome, à savoir la traduction de l'ARNm en protéines. Ainsi, différents sites fonctionnels ont été mis en évidence (voir "Introduction Générale"). Nous citerons pour mémoire :

- la séquence anti-Shine et Dalgarno à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S qui interagit directement avec la séquence Shine-Dalgarno de l'ARNm au cours de l'initiation ;
- la région 1400 contenant le site de décodage, au niveau de laquelle s'effectue l'interaction codon-anticodon ;
- les domaines d'interaction de la protéine S1, S18 et du facteur d'initiation IF3 (tous deux intervenant dans la fixation de l'ARNm), localisés dans le domaine central de l'ARNr 16S ;
- les sites d'interaction de divers antibiotiques ;
- les nucléotides 1054 et 1199-1204 impliqués dans la reconnaissance du codon de terminaison UGA.

La compréhension du rôle fonctionnel du ribosome dans le mécanisme de la synthèse protéique nécessite une connaissance détaillée de la structure des différents ARN ribosomiques et des éventuels changements de conformation qui ponctuent ces différentes fonctions. Toutefois, contrairement à certains ARN qui possèdent une activité catalytique, l'ARN ribosomique isolé n'a aucune signification biologique (Burma *et al.*, 1985). Aussi, les protéines sont-elles indispensables à l'édification des sites fonctionnels, en induisant ou en stabilisant une conformation particulière de l'ARN (Stern *et al.*, 1989 ; Baudin *et al.*, 1989).

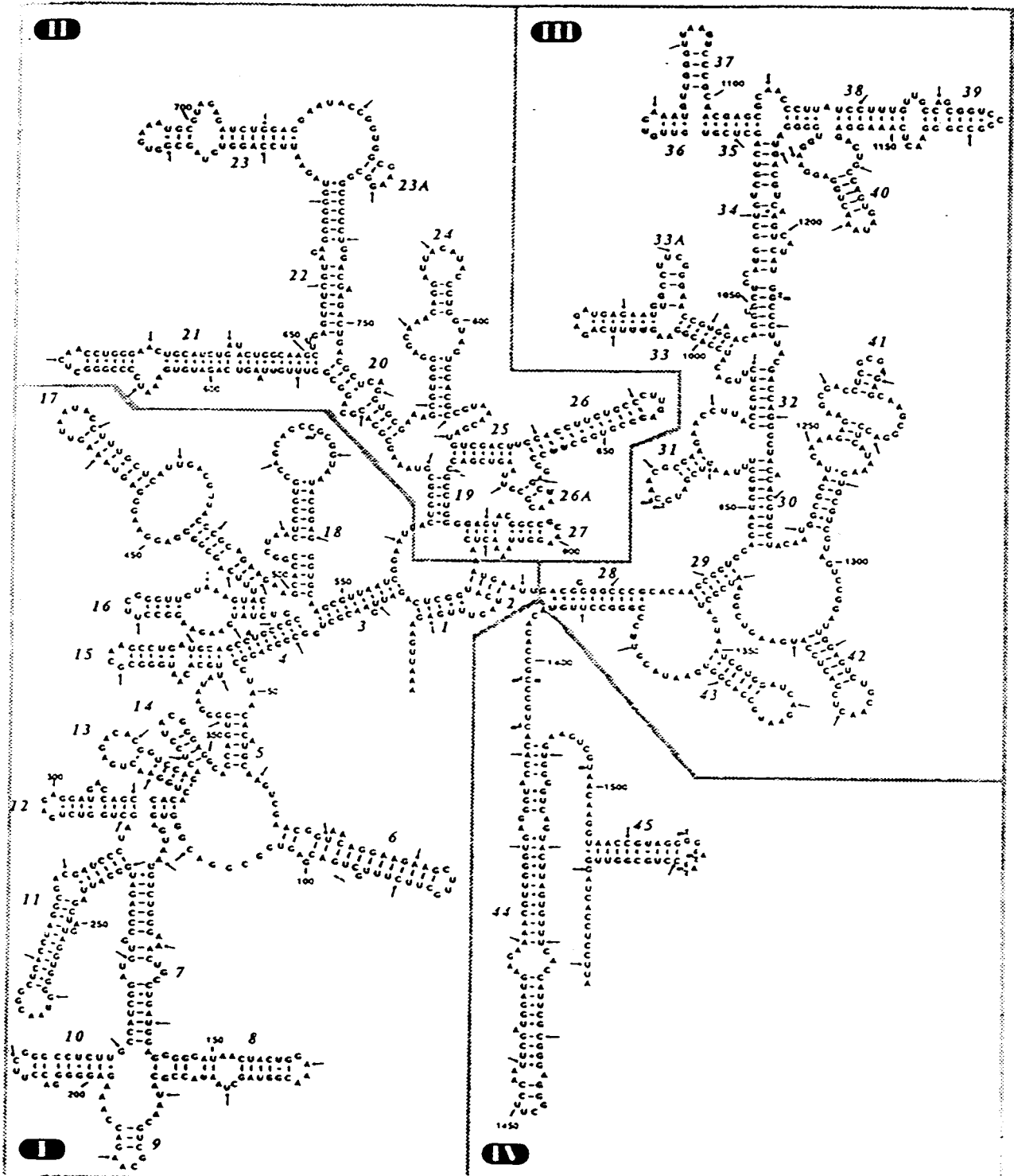


Figure 16 : Modèle de structure secondaire de l'ARNr 16S d'*E. coli* selon Moazed et al. (1986). Les hélices ont été numérotées selon Brimacombe et al. (1988).

Le modèle le plus récent de la structure secondaire de l'ARNr 16S d'*E. coli*, affiné par Moazed *et al.* (1986) par comparaison des nombreuses séquences disponibles est représenté dans la figure 16. Cette structure peut être repliée en quatre domaines délimités par des interactions à longue distance. On commence maintenant à avoir des informations sur le repliement de l'ARN à l'intérieur de la sous-unité 30S. Deux modèles de structure quaternaire ont été récemment proposés, donnant la position relative des différentes hélices par rapport aux protéines ribosomiques qui ont toutes été localisées à la surface de la sous-unité (Capel *et al.*, 1987). Le premier est basé sur la détermination des empreintes des différentes protéines sur l'ARN (Stern *et al.*, 1988), l'autre sur des expériences de pontage ARN-ARN et ARN-protéines (Brimacombe *et al.*, 1988). L'utilisation des différentes sondes de structure est devenue une méthode de choix pour définir les mécanismes de coopérativité de l'interaction entre les protéines ribosomiques et l'ARNr 16S lors du processus d'assemblage de la sous-unité 30S, et des relations structure-fonction de cet ARN (par exemple, Mougél *et al.*, 1987 ; Moazed et Noller, 1987 ; Baudin *et al.*, 1989 ; Gornicki *et al.*, 1989 ; Stern *et al.*, 1989).

L'effet de l'interaction de l'ARNt sur la conformation de l'ARNr 16S dans les sites A, P et E du ribosome a été récemment défini (Moazed et Noller, 1987 ; 1989a ; 1989b ; Gornicki *et al.*, 1989). La localisation des facteurs d'initiation a été déterminée par immunomicroscopie électronique (pour revue, voir Lake, 1985) et par l'introduction de pontages entre les protéines ribosomiques et les facteurs d'initiation (pour revue, voir Hershey, 1987). Cependant, très peu de données expérimentales concernant la conformation de l'ARNr 16S dans le complexe d'initiation, formé par la sous-unité 30S, les facteurs d'initiation, l'ARNm et l'ARNt initiateur, sont actuellement disponibles.

Dans ce travail, nous avons tout d'abord analysé l'influence de l'interaction du facteur d'initiation IF2 et du fMet-ARNt^{fMet} sur la conformation de l'ARNr 16S au moyen d'une sonde chimique de structure, l'éthylnitrosourée. Cette sonde alkyle préférentiellement les groupements oxygènes des phosphates et s'est avérée être très sensible aux changements de conformation. Afin de préciser la localisation de IF2 dans la sous-unité 30S, nous avons également déterminé le proche voisinage entre IF2 et l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S au moyen d'un réactif de pontage : le *trans*-diaminodichloro platine (II).

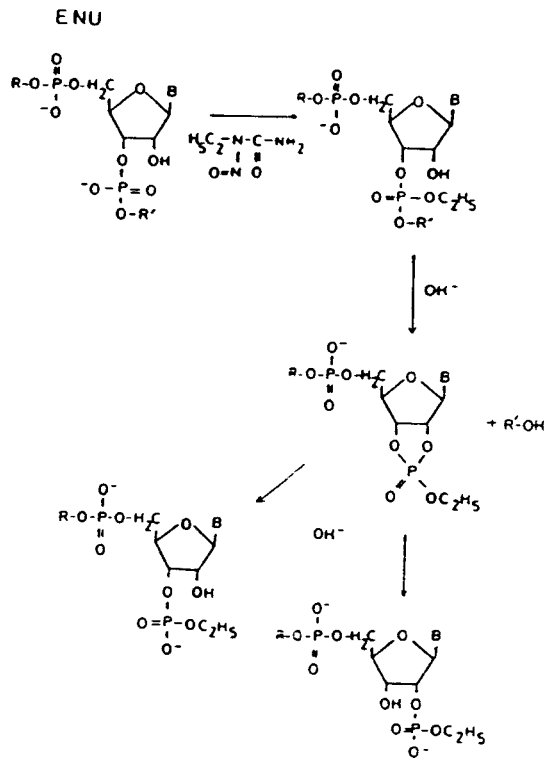


Figure 17 : Mécanisme de coupure de la chaîne ribose-phosphate des ARN par modification à l'éthylnitrosourée suivi d'un traitement alcalin.

II. ETUDE DE LA CONFORMATION DE L'ARNr 16S LORS DE LA FORMATION DU COMPLEXE D'INITIATION.

Afin de mieux comprendre les changements de réactivité des phosphates de l'ARNr 16S induits par la fixation de IF2 et de l'ARNt initiateur sur la sous-unité 30S, il est important de rappeler le mécanisme d'action de l'éthylnitrosourée (ENU) et de résumer l'étude préalable réalisée dans notre laboratoire permettant de définir la réactivité de chaque phosphate de l'ARNr 16S isolé et dans la sous-unité 30S (Baudin *et al.*, 1989).

1. Modification chimique des phosphates par l'ENU.

L'ENU est un réactif alkylant de la famille des N-nitrosoamides. La modification des ARN a lieu essentiellement au niveau de l'atome d'oxygène des phosphates (Singer, 1976 ; Jensen et Reid, 1978) (voir figure 17). Cette alkylation conduit à la formation de phosphotriesters induisant une fragilisation de la chaîne ribose-phosphate qui peut être facilement hydrolysée à pH alcalin (Kusmirek et Singer, 1976). D'autres sites potentiels d'alkylation sont les positions O6 et N7 des guanines, N1 et N7 des adénines, N3 des cytosines (Singer et Fraenkel-Conrat, 1975). Mais dans les conditions très douces de modification par l'ENU utilisées dans ce travail (statistiquement moins d'une modification et coupure par molécule), seule l'alkylation des phosphates a lieu. Dans une hélice régulière, tous les phosphates sont orientés vers le solvant et sont par conséquent susceptibles d'être alkylés par l'ENU, excepté ceux qui sont impliqués dans une interaction du type tertiaire, ou dans la coordination de cations tel que le magnésium.

2. Rappel de l'analyse conformationnelle de l'ARNr 16S isolé et dans la sous-unité 30S à l'aide de l'ENU (d'après Baudin *et al.*, 1989).

Les résultats sont résumés sur la figure 18. Dans l'ARNr 16S natif, à peine 7% des phosphates présentent une diminution de réactivité par rapport à leur réactivité dans l'ARN dénaturé. Ces phosphates sont distribués aussi bien dans les boucles et les régions inter-hélicoïdales que les hélices, contrairement à l'ARNt où les phosphates protégés se trouvent essentiellement localisés dans les régions non appariées (par exemple, Garret *et al.*, 1984 ; Romby *et al.*, 1985 ; Dock-Brégeon *et al.*, 1989). Dans le cas des ARNt^{Asp} et ARNt^{Phe} de levure, où une corrélation cristal-solution a pu être réalisée, les diminutions de réactivité ont été attribuées à des interactions de type tertiaire ou à des sites de fixation d'ions tels que le magnésium (Vlassov *et al.*, 1983 ; Romby *et al.*, 1985). Dans l'ARNr 16S, les phosphates trouvés protégés dans les boucles sont vraisemblablement impliqués dans des

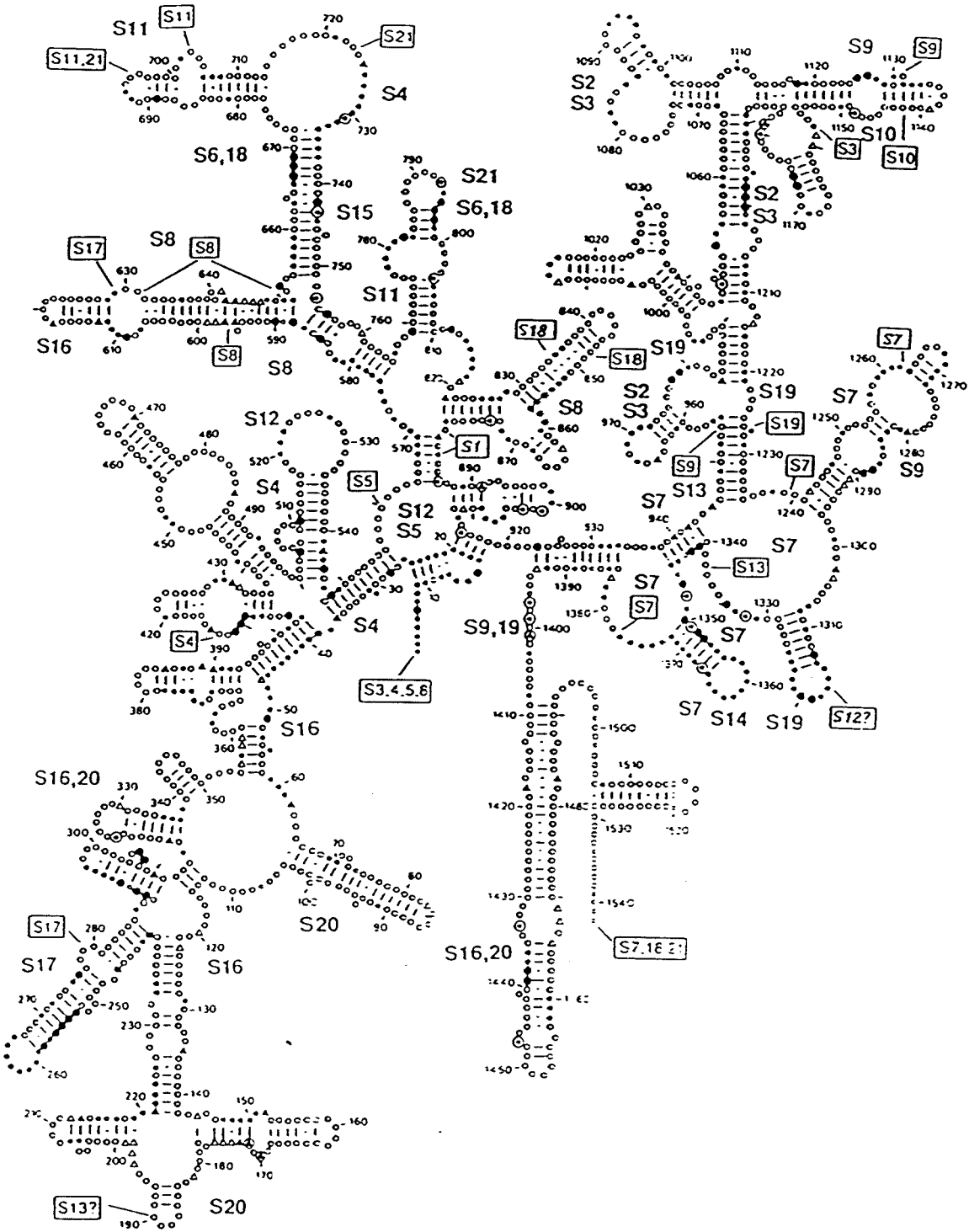


Figure 18 : Représentation schématique de la structure secondaire de l'ARNr 16S montrant la réactivité des phosphates dans l'ARNr 16S et dans la sous-unité 30S, d'après Baudin *et al.* (1989). Les appariements Watson-Crick sont représentés par des tirets et les appariements non canoniques par des points. La réactivité des phosphates est représentée par : (▲) protégé dans l'ARNr 16S isolé et dans la sous-unité 30S ; (⊙) protégé faiblement dans l'ARNr isolé et fortement dans la sous-unité 30S ; (⊗) protégé dans l'ARNr isolé et réactif dans la sous-unité 30S ; (●) réactif dans l'ARNr isolé et protégé dans la sous-unité 30S ; (*) réactif dans l'ARNr isolé et augmenté dans la sous-unité 30S ; (○) réactivité non déterminée ; (◆) coupure non spécifique augmentée. Les protéines encadrées ont été pontées à l'ARNr 16S : S7 (Ehresmann *et al.*, 1980), pour S1 (Golinska *et al.*, 1981), S18 (Moine *et al.*, 1988), S12 (Chiarutini *et al.*, 1982) et les autres protéines (Brimacombe *et al.*, 1988). Les protéines pour lesquelles l'empreinte sur l'ARNr a été localisée sont notées en lettres majuscules et grasses (d'après Stern *et al.* (1989) pour les protéines S2 à S21 et Mougel *et al.* (1987, 1988) pour les protéines S8 et S15).

interactions tertiaires locales générant une conformation intrinsèque, ou dans des interactions à longue distance. Dans les régions hélicoïdales, les phosphates protégés sont souvent localisés à proximité d'appariements non canoniques. Dans ce cas, la protection peut résulter de la fixation d'ion tel que le magnésium, permettant de stabiliser une conformation particulière de l'ARNr 16S.

Dans la sous-unité 30S, l'ARNr 16S n'est pas uniformément engagé dans des interactions avec des protéines. Alors que le domaine 3' terminal et une partie du domaine 5' terminal sont exposés, les régions 1-51, 250-310, 567-612, 650-670 et 1307-1380 sont particulièrement protégées. Ces baisses de réactivités sont probablement liées à un effet de protection directe par les protéines ribosomiques. Il n'est cependant pas à exclure que certaines de ces protections proviennent d'un ajustement conformationnel, en particulier lorsqu'une protection trouvée dans l'ARNr 16S isolé est renforcée dans la sous-unité 30S (région 1400). Des augmentations de réactivités ont été localisées à divers endroits stratégiques de l'ARNr 16S, près du site d'interaction de IF3 (autour du résidu 855) et près du site de décodage (autour du résidu 1400). Ces augmentations de réactivité résultent vraisemblablement de remaniements conformationnels ou d'un départ de cations induits par la fixation des protéines. Ces résultats sont en bon accord avec les travaux réalisés sur la détermination des divers sites de fixation des protéines (voir figure 18 et par exemple, Mougel *et al.*, 1987, 1988 ; Stern *et al.*, 1989).

Bien que les conditions ioniques utilisées dans le présent travail pour la formation du complexe d'initiation diffèrent quelque peu des conditions utilisées par Baudin *et al.* (1989), il est à noter que les réactivités des phosphates dans la sous-unité 30S sont strictement superposables dans les deux séries d'expériences.

3. Etude de la conformation de l'ARNr 16S dans le complexe d'initiation.

ARTICLE 2

"The binding of initiation factor 2 and initiator tRNA to the *E. coli* 30S ribosomal subunit induces allosteric transitions in 16S rRNA."

soumis à *Biochemistry*

Résumé : L'effet spécifique induit par la fixation du facteur d'initiation IF2 et de l'ARNt initiateur sur la conformation de l'ARNr 16S a été testé par la modification des phosphates à l'éthylnitrosourée. Le facteur d'initiation IF2 induit des diminutions mais aussi des augmentations de réactivités de phosphates dans divers domaines de l'ARNr 16S. Certains d'entre eux sont localisés dans une région comprenant le sillon, la protubérance latérale et une partie de la tête qui fait face à la protubérance (phosphates 694, 771, 791, 1225, 1268, 1398, 1401, 1504) et d'autres sont localisés à divers endroits de la sous-unité (positions 61, 101, 299, 301, 302, 360, 407, 408, 492 and 1428). Quelques uns des phosphates présentant une réactivité augmentée (phosphates 407-408 et 1268) sont localisés dans des régions impliquées dans l'interaction avec des protéines ribosomiques. L'effet induit par la fixation de IF2 n'est pas affecté en présence de l'ARNt initiateur et du triplet AUG. Les changements de réactivité additionnels induits par la fixation de l'ARNt initiateur sont centrés autour de la région de la sous-unité 30S comprenant le sillon, la protubérance latérale et une partie de la tête. La plupart de ces changements correspondent à des diminutions de réactivités (phosphates 791, 1222, 1263, 1393, 1395, 1430, 1431, 1504, 1528 and 1529) et quelques augmentations de réactivités sont observées en position 708, 709 et 1398. Des implications fonctionnelles mettant en évidence les propriétés dynamiques du ribosome sont discutées.

**THE BINDING OF INITIATION FACTOR 2 AND INITIATOR tRNA TO
THE *E. COLI* 30S RIBOSOMAL SUBUNIT INDUCES
ALLOSTERIC TRANSITIONS IN 16S rRNA.**

**Hiroshi Wakao, Pascale Romby, Soumaya Laalami*, Jean-Pierre Ebel,
Chantal Ehresmann & Bernard Ehresmann⁺.**

Laboratoire de Biochimie, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15, rue
R. Descartes, 67084-Strasbourg Cedex, France. *Institut de Biologie Physicochimique, 13
rue P. et M. Curie, 75005 Paris Cedex, France.

+ To whom correspondence should be addressed.

:

Running title: Binding of IF2 and initiator tRNA to *E. coli* 30S subunit.

“

Summary

The specific effect of the binding of IF2 and initiator fMet-tRNA^{fMet} on *E. coli* 16S rRNA has been probed by phosphate alkylation with ethylnitrosourea. The results show that IF-2 does not significantly shield portions of 16S rRNA but induces both reductions and enhancements of reactivity scattered in the entire molecule. Some of them are topographically constrained in a region corresponding to the cleft, the lateral protrusion and the part of the head facing the protrusion (positions 694, 771, 791, 1225, 1268, 1398, 1401, 1504), and others are in distant parts of the subunit (positions 61, 101, 299, 301, 302, 360, 407, 408, 492 and 1428). Some of the enhanced reactivities (i.e. 407-408 and 1268) are observed at sites involved in RNA/protein interactions. All the reactivity changes induced by the binding of IF2 are still observed in the presence of the initiator tRNA and AUG as message. The additional changes induced by the tRNA are mostly centered around the cleft-head-lateral protrusion region, near positions affected by IF2 binding. Most of the changes correspond to reduced reactivities (positions 791, 1222, 1263, 1393, 1395, 1430, 1431, 1504, 1528 and 1529), while enhanced reactivities are observed at positions 708, 709 and 1398. Functional implications are discussed, that stress the dynamic properties of the ribosome.

Initiation of protein synthesis in *Escherichia coli* proceeds via the formation of a preinitiation complex involving fMet-tRNA^{fMet}, the 30S subunit, the messenger RNA and GTP. Three initiation factors (IF1, IF2 and IF3) promote this complex formation. Initiation factor 2 (IF2) is implicated in fMet-tRNA binding to the 30S subunit and possesses a ribosome dependent GTPase activity (for reviews see Maitra *et al.*, 1982; Gualerzi *et al.*, 1986; Hershey, 1987). IF2 is a large acidic protein which exists in two forms IF2a (889 residues) and IF2b (732 residues) (Miller & Wahba, 1973). These two forms are expressed from the same gene by two independent translational initiation sites (Plumbridge *et al.*, 1985). The primary structure of IF-2 has been elucidated and a tertiary structure model of the G-binding domain has been predicted (Cenatiempo *et al.*, 1987). The role devoted to IF2 is to promote the binding of fMet-tRNA^{fMet} in the ribosomal P site. The formation of a [IF2/fMet-tRNA] complex has been detected but its stability is very weak (*e.g.* Majumbar *et al.*, 1976; Sundari *et al.*, 1976; Van der Hofstad *et al.*, 1977). Recently, it has been shown that IF2 shields the T loop and the minor groove of the stem, and induces an increased flexibility in the anticodon arm of the initiator tRNA (Wakao *et al.*, 1989). The initiator tRNA may either bind to the 30S subunit through a binary complex or bind to the trifactor-30S ribosomal complex. From recent data, it appears that IF2 probably acts on the 30S subunit by kinetically favoring the binding of fMet-tRNA^{fMet} to the 30S subunit (Gualerzi and Wintermeyer, 1986; Canonaco *et al.*, 1986). Also, it was shown that IF2 binds weakly to the 30S subunit, but that one molecule of each of the three factors binds tightly when added together to the 30S ribosomal subunit (*e.g.* Benne *et al.*, 1973; Weiel and Hershey, 1982; Wintermeyer and Gualerzi, 1983), and that both IF2 and IF3 exert an allosteric effect on the 30S ribosomal subunit (Wintermeyer and Gualerzi, 1983).

The initiator factor IF2 has been located by immune-electron microscopy and by cross-linking experiments in the cleft between the head and the lateral protrusion of the 30S subunit (for review see Lake, 1985; and Hershey, 1987). Although these data give topographical information on the localization of IF2 on the 30S subunit, little information is available about the nucleotides of the 16S rRNA which may interact with this factor and about possible conformational adjustments induced by IF2 binding. During these last years, the conformation of the 16S rRNA, in its naked form, in interaction with individual ribosomal proteins or within the 30S subunit, have been extensively investigated by the use of several structure-specific probes (*e.g.* Douthwaite *et al.*, 1983; Moazed *et al.*, 1986; Stern *et al.*, 1989; Baudin *et al.*, 1987, 1989; Mougél *et al.*, 1987, 1988) and by RNA-RNA and RNA-protein cross-linking (for a review see Brimacombe *et al.*, 1988). Compilation of these data together with the topographical localization of proteins (Capel *et al.*, 1987) led to

the construction of two three-dimensional models of 16S rRNA which give a relative spatial orientation of the helices within the subunit (Brimacombe *et al.*, 1988; Stern *et al.*, 1988). Among the different structure-specific probes, ethylnitrosourea has a high affinity for the phosphate oxygen groups in nucleic acids (Vlassov *et al.*, 1981). This reagent has the advantage to be not selective since its reactivity is sequence and secondary structure independent. Recently, ethylnitrosourea was used to probe the conformation of 16S rRNA, in its naked form, within the 30S subunit and in the 70S ribosome (Baudin *et al.*, 1989). It allowed to gain precise information on the accessibility of each phosphate group in the 16S rRNA and provides evidence for conformational adjustments induced by the subunit assembly and ribosome association.

The study presented here was designed to provide the 16S rRNA sites that are shielded or conformationally perturbed as a consequence of IF2 or fMet-tRNA^{fMet} binding within the 30S subunit. We have followed the reactivity of each phosphate group of the 16S rRNA within the [30S/IF2/GTP] complex, and within the [30S/IF2/AUG/fMet-tRNA^{fMet}/GTP] initiation complex. The results are discussed in the light of the knowledge of the higher-order structure of 16S rRNA and of the 30S subunit topography. Functional implications for the initiation process are also discussed.

Experimental procedure

Buffers. Buffer A: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM NH₄Cl; 6 mM magnesium acetate; 6 mM β-mercaptoethanol. Buffer B: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM NH₄Cl; 6 mM magnesium acetate; 6 mM β-mercaptoethanol; 400 mM NaCl. Buffer C: 50 mM sodium cacodylate pH 7,6; 50 mM NH₄Cl; 5 mM magnesium acetate; 16 mM β-mercaptoethanol. Buffer D: 50 mM sodium cacodylate pH 7,6; 1 mM EDTA. Buffer E: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM LiCl; 1 mM EDTA; 0,5% SDS.

Chemicals and enzymes. Ethylnitrosourea was from Sigma. RNases T₁, U₂, T₄ RNA polynucleotide kinase, and T₄ RNA ligase were from Pharmacia. RAV-2 reverse transcriptase, [5'-³²P]-pCp (3000 Ci/mmol), [γ-³²P]-ATP (5000 Ci/mmol) were from Amersham and [3H]-methionine (25 Ci/mmol) from CEA. *E. coli* tRNA^{fMet} was from Boehringer Mannheim.

Preparation of 30S subunits, IF2 and fMet-tRNA^{fMet}. The 30S subunits were prepared from *Escherichia coli* MRE 600 according to Baudin *et al.* (1987). The 70S tight couples

were isolated on a 10-30% linear sucrose gradient in buffer A, and the 30S subunits were obtained by centrifugation through a sucrose gradient in buffer B. Naked 16S rRNA was obtained by deproteinization of the 30S subunits through a 5-25% sucrose gradient (for 20 h at 10°C at 25000 revs/min) in buffer E. The fractions containing the 16S rRNA were pooled and precipitated three times with three volumes of ethanol, washed with 80% ethanol, dissolved in 2 mM sodium acetate pH 5,8, and stored in small fractions at -20°C. The 30S subunits and the 16S rRNA were renatured by incubation at 40°C for 20 min in Buffer C and cooled on ice prior ethylnitrosourea alkylation.

Aminoacylation and formylation of the *E. coli* initiator tRNA were performed according to Wakao *et al.* (1989). IF2 was purified according to Dondon *et al.* (1985).

3' end labeling of 16S rRNA. The 3' end labeling of 16S rRNA was done within the 30S subunit according to Gornicki *et al.* (1989), by using [5'-³²P]-pCp and T₄ RNA ligase. The labeled 30S subunits were incubated in buffer A at 37°C for 10 min prior to be incubated with a 3 to 5 fold excess of renatured 50S subunits at 37°C for 30 min. A fraction of the labeled 70S ribosome was dissociated and the subunits fractionated by centrifugation on a 10-25% sucrose gradient. The 3' end-labeled 16S rRNA was isolated by phenol extraction of the 30S subunit in buffer E, and the aqueous phase was precipitated twice with ethanol. The ribosomal particles and the RNA were renatured by incubation at 40°C for 20 min in buffer C, and then cooled on ice prior to alkylation.

Formation of [30S/IF2/GTP] and [30S/IF2/fMet-tRNA^{fMet}/AUG/GTP] complexes. The binding of IF2 to the 30S subunits was performed by incubating 20 pmol of 30S subunits with 140 pmol of IF-2 in the presence of 1 mM GTP, in 40 µl of buffer C at 37°C for 10 min. For the 30S initiation complex, 120 pmol of fMet-tRNA^{fMet} and 900 pmol of AUG triplet were added. Formation of the initiation complex and its stability after ethylnitrosourea alkylation were tested either by nitrocellulose filter binding assay or by sucrose gradient centrifugation using f[³H]Met-tRNA^{fMet}.

Alkylation of phosphate groups by ethylnitrosourea. Phosphate alkylation was essentially as described by Vlassov *et al.* (1981) and Baudin *et al.* (1989). Reactions were performed on the free 30S subunits, on the [30S/IF2/GTP] and on the [30S/IF2/GTP/fMet-tRNA^{fMet}] complexes, in 40 µl of buffer C. Incubation was at 37°C for 45 min, 1 h 30 and 2 h 30 with 8 µl of an ethylnitrosourea-saturated ethanol solution. An incubation control was performed on the free and complexed subunits in the absence of

ENU. Naked 16S rRNA (12,5 pmol) was incubated under denaturing conditions, in 15 μ l of buffer D for 30 sec and 1 min at 80°C. When the 3' end labeled RNA was used, 2 μ g of total tRNA was added as carrier. The reactions were stopped by ethanol precipitation of the RNA. The pellets were then resuspended in 60 μ l of buffer E and extracted twice with phenol-chloroforme saturated with a solution of 50 mM sodium acetate pH 5,8. After precipitation of the RNA, the alkylated RNA was cleaved at phosphotriester positions by incubation at 50°C for 10 min in 0,1 M Tris-HCl pH 9,0. The resulting RNA fragments were then ethanol precipitated and washed twice with 80% ethanol.

Detection and analysis of the alkylated positions. Cleavage positions were detected by the primer extension method using reverse transcriptase as described by Mougél *et al.* (1987). Fourteen synthetic oligodeoxyribonucleotides complementary to nucleotides 110-124, 220-234, 330-344, 441-454, 550-564, 660-674, 761-777, 865-879, 986-1000, 1101-1116, 1220-1240, 1330-1347, 1435-1449 and 1498-1509 were synthesized with an applied biosystem apparatus. These oligomers were labeled at their 5' end with [g-³²P]-ATP and T₄ polynucleotide kinase according to Silberklang *et al.* (1977). The generated cDNA fragments were sized at nucleotide resolution by electrophoresis on 8 or 10% acrylamide (1/20 bis-)/8 M urea slab gels at 1500 V for 2 to 4 h. Unmodified 16S rRNA was used as a template for the dideoxy sequencing reactions (Sanger *et al.*, 1977). When using 3' end labeled 16S rRNA, the resulting RNA fragments were sized by gel electrophoresis in parallel with RNases T₁ et U₂ and formamide ladders to identify the cleavage positions.

Results and Discussion

In this study, we have used ENU to map phosphate groups of 16S rRNA which undergo reactivity changes as a result of IF2 binding, either in the absence or in the presence of fMet-tRNA^{fMet} and AUG as messenger. Alkylation experiments were achieved under conditions in which more than 80% of the initiator tRNA was found bound to the 30S subunit in the presence of IF2 and AUG. Probing experiments were repeated several times with a good reproducibility. Cleavage positions were detected by the primer extension method for the largest part of the molecule (nucleotides 1-1498). The 3'-terminal region was probed directly from 3'-end labeled 16S rRNA, since primer extension could not be used due to the presence of two 2,6-dimethyladenines at positions 1518-1519 and of a 2-methylguanine at position 1516 which block the progress of reverse transcriptase. Control experiments were done in parallel in order to detect stops or pauses of reverse transcriptase.

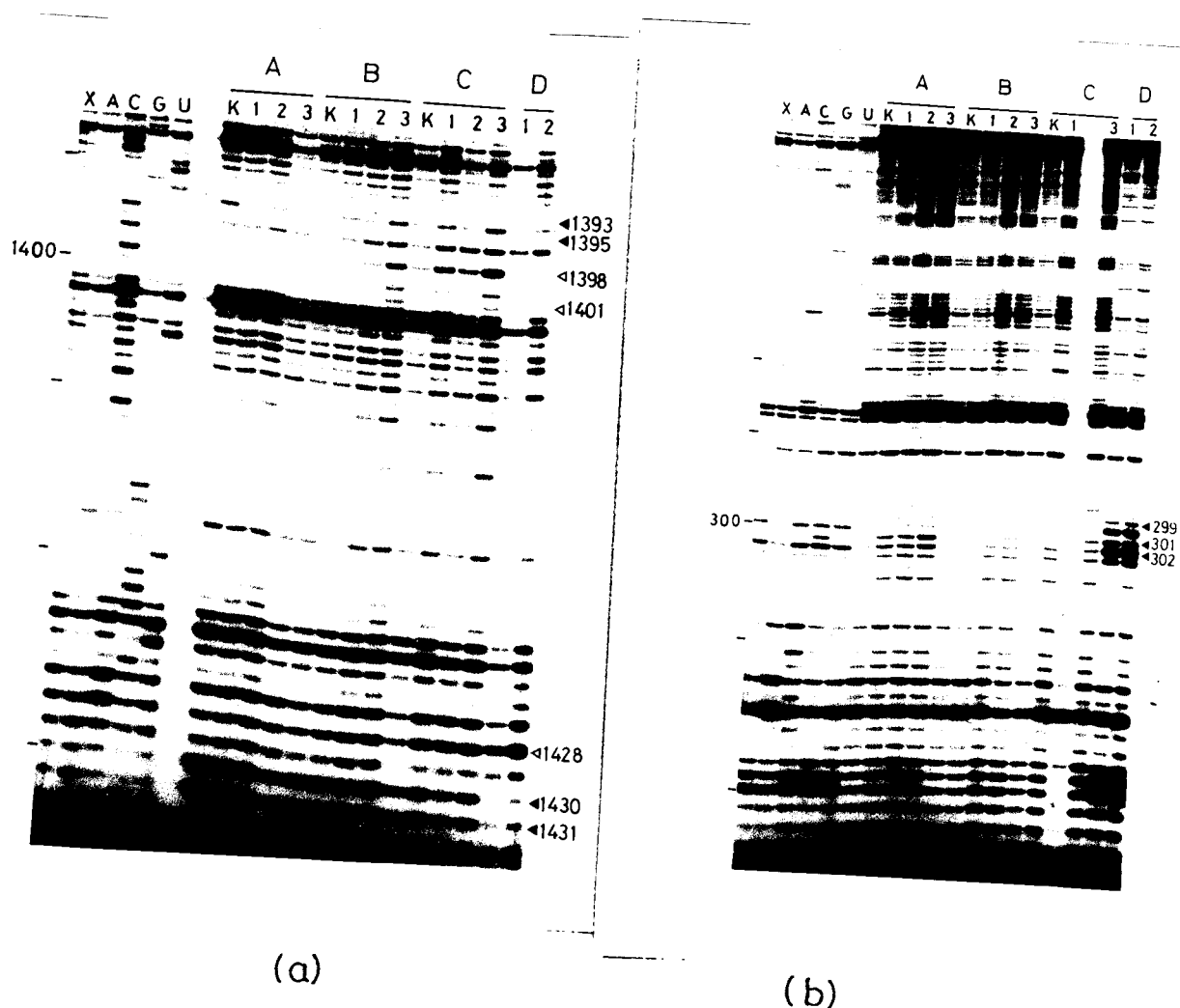


Figure 1: Autoradiograms showing the altered reactivity of phosphate groups in 16S rRNA induced by IF-2 and initiator tRNA binding to 30S subunits. Elongation reactions were from primers 1435-1449 (a) and 330-344 (b). Alkylation with ENU was on the 30S subunit (A), on the [30S/IF-2] complex (B) and on the [30S/IF-2/GTP/fMet-tRNA^{fMet}/AUG] complex (C). Incubation control (lane K); alkylation for 45 min (lane 1), 1 h 30 (lane 2) and 2 h 30 (lane 3); alkylation of 16S rRNA under denaturing conditions (D), incubation time was 30 s (lane 1) and 1 min (lane 2) at 80°C. Lanes A, C, G and U are sequencing products generated in the presence of ddTTP, ddCTP, ddGTP et ddATP, respectively. Lane X is a sequencing incubation control. Arrow heads point to reactivity changes (▲ reduced reactivity; Δ enhanced reactivity).

Some of these stops result from the methylation of certain residues, or to proton catalyzed hydrolysis which reflects an intrinsic fragility and flexibility of the RNA molecule (Dock-Bregeon and Moras, 1987). Other pauses could also reflect the difficulty of the reverse transcriptase to melt a stable secondary structure. The relative reactivity of the phosphate groups was estimated by visual inspection, taking the reactivity of the 16S rRNA within the 30S subunit as a reference. Although the ionic conditions slightly differ from those used by Baudin *et al.* (1989), the reactivity of phosphate groups within the 30S subunit remains strictly identical to those reported by these authors. In summary, regions 1-51, 250-310, 567-612, 650-670, and 1307-1382 are particularly buried, whereas the 3' terminal and the 5' proximal regions (region 53-218) are exposed. Furthermore, the present results confirm the observations of Baudin *et al.* (1989) regarding the defined enhancement of reactivity specifically induced by the binding of ribosomal proteins. Thus, the same reactivity pattern was observed, especially in those regions in which conformational adjustments have been described. Two representative autoradiograms are shown in Figure 1 and the results are summarized in Table 1. The reactivity changes induced by the binding of IF2 and by subsequent addition of fMet-tRNA^{fMet} and AUG are reported on a schematic representation of the secondary structure of 16S rRNA (Figure 2a and 2b, respectively).

Effect of IF2 binding. The binding of IF-2 on the 30S subunits causes significant reactivity changes in the 16S rRNA (see table 1 and Figure 2a). These changes are rather limited and are not restricted to a defined part of the molecule but scattered throughout the four domains of the RNA. A reduction of reactivity is observed at several positions in the 5' domain (phosphates 299, 301, 302, 360 and 492), in the central domain (phosphates 694, 771 and 791) and in the 3'-terminal domain (at position 1504). The binding of IF2 also causes enhanced reactivity of several phosphate groups located in the 3' terminal domain (at positions 1398, 1401 and 1428), in the 3' major domain (at positions 1225 and 1268) and in the 5' terminal domain (at positions 61, 101, 407 and 408). Another consequence of the initiation factor binding is the appearance of new reverse transcriptase stops at defined positions in the central domain (at positions 606, 607, 693, 789, and 790). Note the absence of any reactivity changes in the 3' upper major domain.

One of the first conclusions that emerges from the failure of IF2 (which is a large protein) to protect large and defined areas is that the factor does not tightly interact with RNA. More likely, the binding of IF2 slightly perturbs the conformation of the RNA in several defined regions. This is further confirmed by the fact that IF2 affects the phosphates by enhancing as much as reducing their reactivity toward ENU. Enhanced reactivity is most

Position	(a)16S rRNA	30S	30S/IF2	30S/IF2/GTP/fMet-tRNA ^{fMet}
61	+	(+)	+	+
101	+	+	++	++
299	+	+	(+)	(+)
301	+	+	(+)	(+)
302	+	+	(+)	(+)
360	+	+	(+)	(+)
407	+	(+)	++	++
408	+	(+)	+	+
492	+	+	(+)	(+)
694	+	+	(+)	(+)
708	+	(+)	(+)	+
709	+	+	+	++
771	+	+	(+)	(+)
791	+	+	(+)	0
1222	+	+	+	(+)
1225	+	+	++	++
1263	+	++++	++++	++
1268	+	(+)	+	+
1393	(+)	(+)	(+)	0
1395	+	+	+	0
1398	(+)	-	+	++
1401	(+)	+	++	++
1428	+	+	++	++
1430	+	+	+	(+)
1431	+	+	+	0
1504	++	++	+	0
1528	+	+	+	0
1529	+	+	+	0

Table1: *Effect of IF2 and fMet-tRNA^{fMet} binding on 30S subunits.* The reactivity of phosphate groups to ENU was checked by visual inspection: from marginally reactive (+) to highly reactive +++. (a)The reactivity of phosphate groups in naked 16S rRNA is from Baudin *et al.* 1989).

likely related to subtle conformational adjustment of the RNA or to ion release. Alternatively, it may reflect some modification in protein/RNA interaction, especially when enhancement affects phosphate groups shown to display protein-induced protection (phosphates 61, 407-408 and 1268). This might be the case of phosphates 407, 408, and 1268 which are located in a cluster of phosphate groups showing a protein-induced protection (Baudin *et al.*, 1989). It should be noted that these regions fall in the S4 and S9-S19 binding regions, respectively (Stern *et al.*, 1989). On the opposite, phosphate 61 is one of these isolated phosphates which display a reduced reactivity in the 30S subunit, that can be attributed to conformational adjustment rather than to a direct protein shielding (Baudin *et al.*, 1989). The case of phosphate 1401 is particularly interesting, since its reactivity is reduced in the naked RNA, enhanced by subunit assembly and further enhanced as a consequence of IF2 binding. This strategic region has already been shown to display dynamic properties and protein-induced structural adjustments (Moazed *et al.*, 1986; Baudin *et al.*, 1987; Gornicki *et al.*, 1989). Our results indicate that IF2 also affects the local conformation in this region.

The appearance of new reverse transcriptase pauses or stops induced by the binding of IF2 can probably be explained as the result of spontaneous degradations reflecting an increased flexibility of the RNA backbone induced by protein binding. Remarkably, they are all found in the central domain of the molecule (at positions 606-607, 693, 789-790). Such a phenomenon was also observed by Baudin *et al.* (1989) as a consequence of subunit assembly and association. Strickingly, several of these cleavages (at nucleotides 693 and 789-790) are observed near phosphates displaying a reduced reactivity. To note is that IF2 induces also several spontaneous cleavages in the anticodon loop of the fMet-tRNA^{fMet} which do not occur when the tRNA is bound to the 30S subunit (Wakao *et al.*, 1989).

Reduced reactivity could be interpreted either by a direct shielding effect or by a conformational adjustment leading to a stabilization of a particular conformation of the RNA. The fact that these reduced reactivities are in most cases isolated and not clustered strongly suggests that they reflect conformational perturbations rather than true protections.

As mentioned above, the IF2-induced reactivity changes appear to be distributed in the entire RNA molecule. However, these changes might be restricted in defined areas, if the three-dimensional folding of the RNA is considered. Thus, we compared our results to the three-dimensional map of 30S ribosomal proteins (Capel *et al.*, 1987), and to the recent quaternary structure models of the 30S subunit proposed by Brimacombe *et al.* (1988) and Stern *et al.* (1988). They are presented on a schematic representation of the 30S subunit in Figure 3. From these models, it appears that phosphates 694, 771, 791, 1504, 1398 and

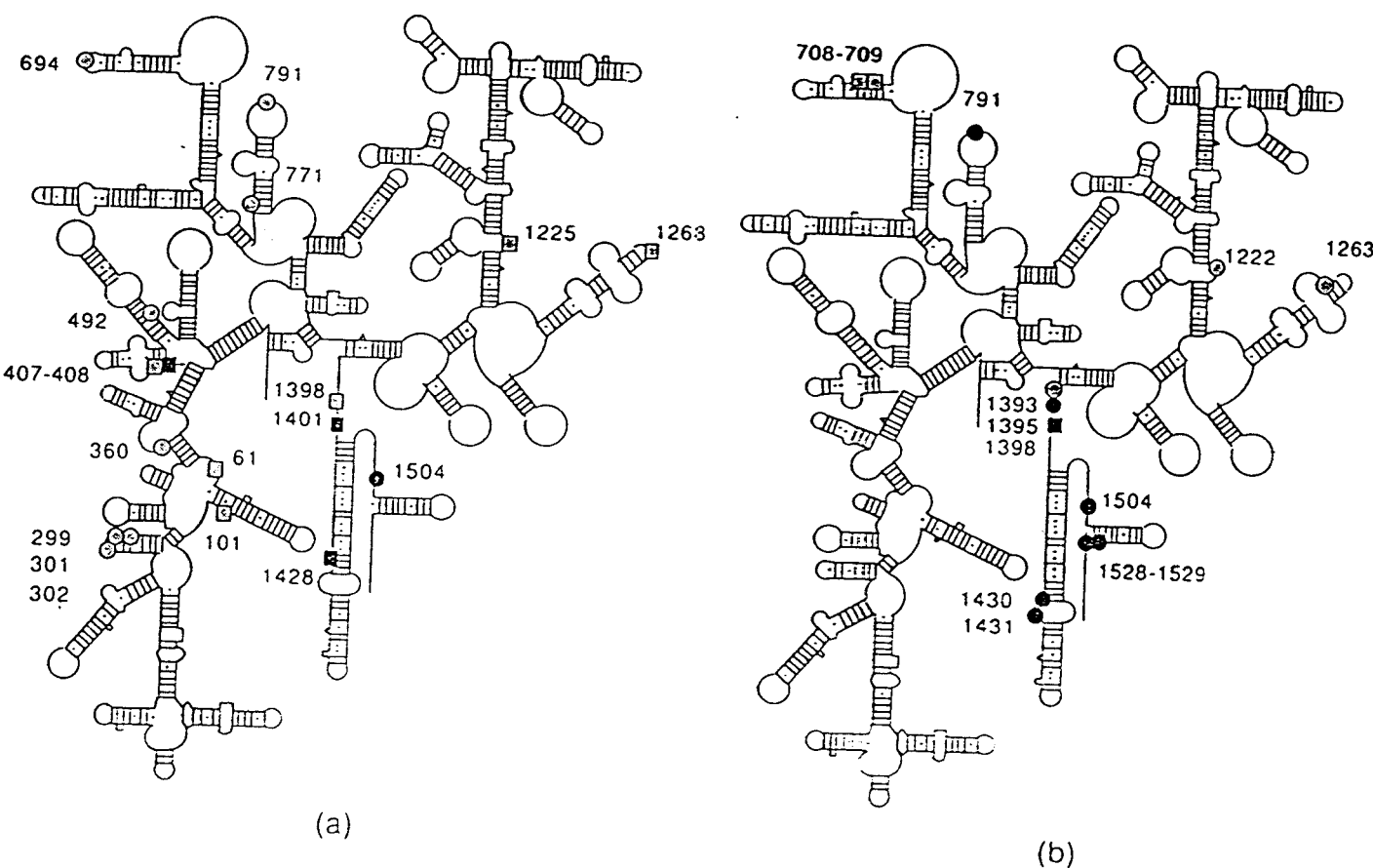


Figure 2: A schematic diagram of the *E. coli* 16S rRNA secondary structure summarizing the results of ENU probing experiments. Reactivity changes induced by (a) the binding of IF-2 to the 30S relative to 30S; (b) by the binding of the fMet-tRNA^{Met} and the AUG triplet relative to the 30S/IF2 complex. Canonical base pairs are represented by bars and non canonical base pairs (U-U, A-G, U-G) by dots. Moderately and strongly reduced reactivity (⊙, ●); moderately and strongly enhanced reactivity (⊠, ■).

1401 are all located in the lateral protrusion or in the cleft of the 30S subunit, while positions 1225 and 1268 are located in the head of the subunit facing the lateral protrusion. This precisely coincides with the localization of the factor by immune-electron microscopy (Lake *et al.*, 1985) and with the group of proteins found to be crosslinked to IF2: S1, S2, S11, S12, S13, S14, and S19 (Bollen *et al.*, 1975; Boileau *et al.*, 1983). This group of phosphates is directly located in the area covered by IF2, and some of the observed protections possibly result from a direct contact with the factor. Another group of phosphates (61, 101, 299, 301, 302, 360) appears to be located in the central part of the subunit, in the neighborhood of protein S16. The exact position of these groups is difficult to assign, since there are some discrepancies between the two models. Phosphates 407, 408, and 492, are in the binding region of protein S4 (Stern *et al.*, 1986). They are located, according to Brimacombe's model, not far from the 5' end of the RNA, on the solvent side. This localization is consistent with the fact that S4 is situated close to the 5' end of the RNA (Capel *et al.*, 1987). These reactivity changes, occurring at a distance from the IF2 binding domain, most likely reflect allosteric transitions induced by IF2 binding. Such an effect at distance probably also accounts for the increased reactivity of phosphate 1428 in the penultimate stem, which appears to traverse the subunit from the cleft to the bottom.

The binding of IF2 causes conformational adjustments in topographically defined regions. One of these regions fits with the known binding area of the factor (the lateral protrusion and the part of the head facing this protrusion). However, allosteric transitions are also induced in the center of the particle (not very far from the cleft) and on distant parts of the subunit. Also, the binding of IF2 may affect some specific interactions between the RNA and certain proteins. Thus, the enhanced reactivity of phosphates 407-408 and 1268 might result from an altered interaction with proteins S4 and S9/S19 (e.g. the loss of some contacts with the proteins). It is not yet clear whether the observed allosteric transitions are propagated through RNA or proteins, via RNA/protein interactions.

Effect of fMet-tRNA^{fMet} and AUG triplet binding. The stoichiometry of the [30S/IF2/GTP/fMet-tRNA^{fMet}] initiation complex was checked by nitrocellulose filter binding assay or sucrose gradient centrifugation, using f[H³]-Met-tRNA^{fMet}. Under the conditions used, 70 to 80 % of the 30S subunits were found to bind one molecule of tRNA. All the IF2-induced reactivity changes are still observed in the presence of the [30S/IF2/GTP/fMet-tRNA^{fMet}] complex, including both enhanced and reduced reactivities. However, a specific subset of phosphates show additional reactivity changes as the result of fMet-tRNA^{fMet} and AUG binding (see Table 1 and Figure 2b). The tRNA-induced

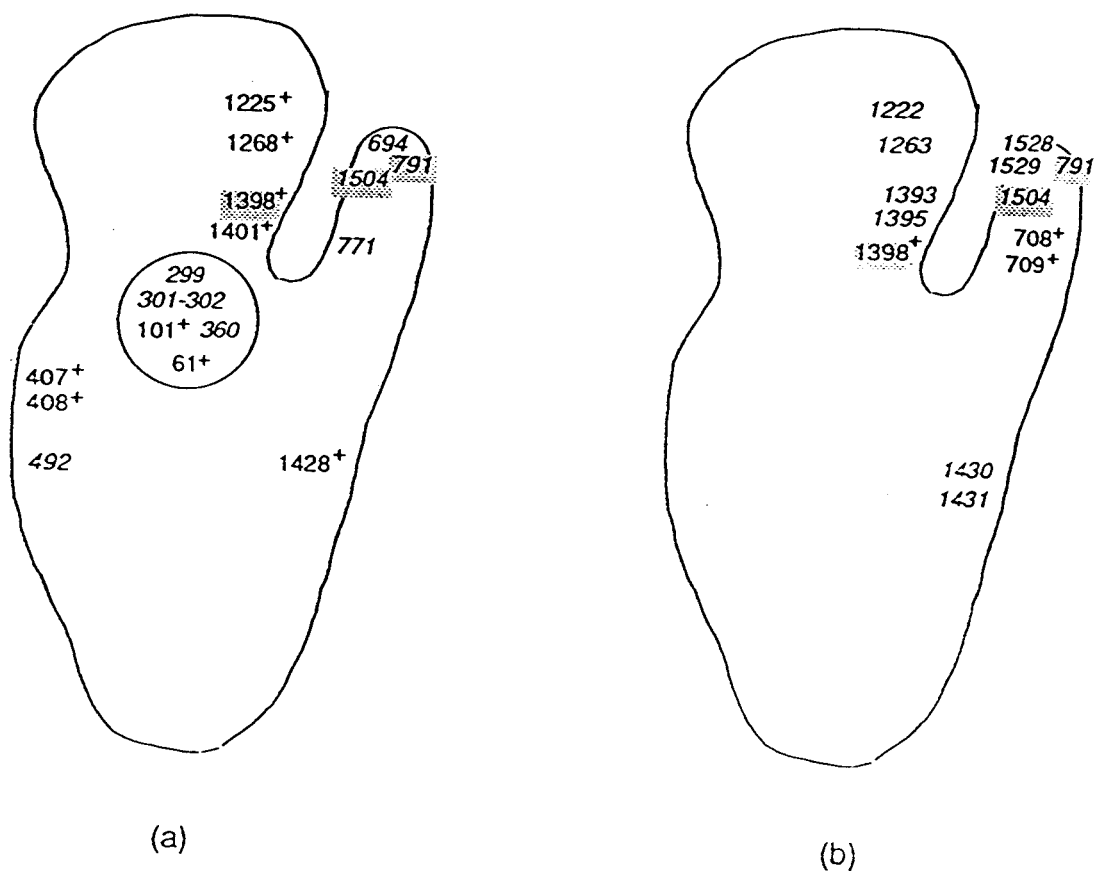


Figure 3: Results of probing experiments represented on a schematic representation of the 30S subunit. (a) IF2-induced reactivity changes; (b) initiator tRNA-induced reactivity changes. The approximate localization of the phosphate groups is deduced from the three-dimensional models of Stern *et al.* (1988) and Brimacombe *et al.* (1988); the location of encircled positions is ambiguous. Italic refers to reduced reactivity; + to enhanced reactivity; shadowing to reinforced effect in the presence of tRNA.

modifications appear to be clustered in the 3' terminal domain, the 3' lower major domain and the central domain. They mostly correspond to reduction of reactivity. Most striking are the sharply reduced reactivity of phosphates 1395, 1430, 1431, 1504, 1528, and 1529, located in the 3' terminal domain, and of phosphate 791, in the central domain. Other significant reduced reactivities are found at positions 1222, 1263, 1393. Otherwise, the reactivity of phosphates 708, 709 and 1398 is enhanced. Remarkably, the reactivity changes are mainly observed at or near positions that are already affected by IF2 binding (Table 1). Thus, the reduction of reactivity at positions 791 and 1504 and the enhancement of reactivity at position 1398 are even more pronounced in the presence of the initiator tRNA. Also, protection often occurs near positions displaying IF2-induced enhancement (1222 near 1225, 1263 near 1268, 1430, 1431 near 1428, and 1393, 1395 near 1398, 1401). Another consequence of tRNA binding is the appearance of additional pauses or stops of reverse transcriptase at several defined positions, especially in loop regions (at positions 214, 424-426, 702, 1034-1035).

The initiator tRNA-induced reactivity changes are remarkably centered around a region comprising the lateral protrusion and the cleft of the subunit (Figure 3). Our results are in complete agreement with the localization of the decoding site deep in the cleft between the head and the lateral protrusion of the small subunit (Gornicki *et al.*, 1984; Ofengand *et al.*, 1986). The reduced reactivity of phosphates 1393 and 1395 is most likely related to the anticodon-codon interaction that takes place in the close vicinity of C1400, since this nucleotide has been directly cross-linked to the 5' base of the anticodon of a tRNA bound in the P site (Prince *et al.*, 1982; Ehresmann *et al.*, 1984). It should be noted that C(N3)1399, C(N3)1400, and G(N7)1401 have been reported to be protected by P site bound tRNA from chemical modification (Moazed and Noller, 1986; 1989). Also, a tRNA in the P site has been found to protect position 1397 from lead(II)-induced hydrolysis (Gornicki *et al.*, 1989). Our results, together with other results obtained with different probes, provide a strong support for an intimate contact between the phylogenetically conserved 1400 region in 16S rRNA and a P site bound tRNA. Otherwise, it was shown that the 30S subunit essentially protects the anticodon stem-loop of the initiator tRNA within the [30S/IF-2/GTP/fMet-tRNA^{fMet}/AUG] complex (Wakao *et al.*, 1989). However, the binding of the initiator tRNA also causes an enhanced reactivity at phosphate 1398, which was already found to be enhanced by IF2 alone. Note that an increased reactivity was reported by Moazed and Noller (1986) to be induced at C(N3)1400 by the binding of yeast tRNA^{Phe}. This enhancement, together with the increased protection at positions 791 and 1504, may reflect a stabilization of the IF2/30S subunit interaction in the presence of the

initiator tRNA, or a mutual adjustment between the factor and the tRNA. Interestingly, nucleotides 793 and 795 (close to position 791) were found to be protected by edeine (Moazed and Noller, 1987), an oligopeptide antibiotic which blocks the P site binding of the tRNA (Szer *et al.*, 1970).

The enhancement observed at phosphates 708-709, located in the lateral protrusion (as position 1504), most likely reflects conformational adjustments in 16S rRNA. However, it is difficult to ascertain whether the protection of phosphates 1528-1529, located on the superior part of the lateral protrusion is the result of direct shielding or of a structural transition. It should be noted that no protection from base-specific probes have been detected in this region (Moazed and Noller, 1986). Remarkably, phosphates 1222 and 1263 located in the head of the subunit in the binding area of proteins S9/S19, found protected in the presence of the initiator tRNA, are located near phosphates 1225 and 1268 which show a IF2-induced enhancement. In this case again, the exact cause of the protection is ambiguous. It should be noted that the reactivity of phosphate 1263 is strongly enhanced as the result of subunit assembly (table 1). However, the reduced reactivity observed at positions 1430 and 1431, located rather far from the decoding site in the penultimate helix, more likely reflects a conformational transition. The enhanced stops of elongation, interpreted as increased spontaneous cleavages, also reflect such transitions. They are particularly important at positions 424-426 in the 5' domain, at the proximity of the S4 binding domain. It might be relevant that they occur not far from positions 529-532 in which A and P site tRNA-induced protections have been reported (Moazed and Noller, 1986). Thus, our data, together with other studies (Moazed and Noller, 1986; Gornicki *et al.*, 1989), provide further evidence for the existence of allosteric transitions induced by tRNA binding.

Concluding Remarks

The present study yields precise and new information on the regions of 16S rRNA affected by the binding of IF2 and of the initiator tRNA to the 30S subunit. One of the main conclusion is that IF2 does not tightly interact with 16S rRNA but induces allosteric transitions. IF2 does not only affect the region corresponding to the recognition site mapped from immune electron microscopy (i.e. the lateral protrusion, the cleft and the head facing the protrusion), but alters distant regions scattered in different parts of the particle, thus reflecting dynamic changes of the internal structure of the subunit. Possible alterations of RNA-protein interactions (presumably involving S4 and S9/S19) can also be postulated. The effect of IF2 binding remains strictly identical in the presence of the initiator tRNA and

the AUG triplet, some of the reactivity changes being even reinforced. Remarkably, the additional tRNA-induced reactivity changes are most often localized at the close proximity of positions that are affected by IF2. This appears to be consistent with the proposal that the binding of initiation factors precedes tRNA and mRNA binding (Gualerzi *et al.*, 1986). In this view, IF2 would induce specific allosteric transitions that should stimulate the binding of the initiator tRNA. The tRNA-induced additional changes are mostly centered around the cleft, the lateral protrusion and the head region. On the other hand, other independent experiments imply that only the anticodon stem-loop region of the tRNA makes significant contacts with the 30S subunit (*e.g.* Rose *et al.*, 1983; Moazed and Noller, 1986; Wakao *et al.*, 1989). Our study provides additional support for a close contact between the anticodon region of the tRNA with residues of the 16S rRNA in the cleft of the subunit (around position 1400). If some of the changes induced by the tRNA binding most likely result from a direct shielding, others clearly reflect conformational transitions. It is probably significant that both IF2 and tRNA binding often affect positions which are sensitive to subunit assembly, either as directly involved in RNA/protein interactions or in protein-induced conformational adjustments. This stresses the crucial role of ribosomal proteins in stabilizing particular conformation of 16S rRNA. Our results also emphasize the remarkable property of the ribosome to undergo dynamic adjustments accompanying the initiation steps.

Acknowledgements.

We thank M. Grunberg-Manago for helpful discussions and constant interest. We are indebted to J. Colin and A. Hoeft for the synthesis of the oligodeoxyribonucleotides. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (LP6201 and UA1139), from the Fondation de la Recherche Médicale and E. I. du Pont de Nemours (S.L.). H. Wakao was granted by the French Government.

References.

- Baudin, F., Ehresmann, C., Romby, P., Mougél, M., Colin, J., Lempereur, L., Bachellerie, J.P., Ebel, J.P. and Ehresmann, B. (1987) *Biochimie* **69**, 1081-1096.
- Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Eyermann, F., Ebel, J.P., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1989) *Biochemistry* **28**, 5847-5855.
- Benne, R., Naaktgeboren, N., Gubbens, J. and Voorma, H.O. (1973) *Eur. J. Biochem.* **32**, 372-380.
- Boileau, G., Butler, P., Hershey, J.W.B. and Traut, R.R. (1983) *Biochemistry* **22**, 3162-3170.
- Bollen, A., Heimark, R.L., Cozzzone, A., Traut, R.R., Hershey, J.W.B. and Kahan, L. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4310-4314.
- Brimacombe, R., Atmajda, J., Stiege, W. and Schüler, D. (1988) *J. Mol. Biol.* **199**, 115-136.
- Canonaco, M.A., Calogero, R.A. and Gualerzi, C.O. (1986) *FEBS Lett.* **207**, 198-204.
- Capel, M.S., Engelman, D.M., Freeborn, B.R., Kjeldgaard, M., Langer, J.A., Ramakrishnan, V., Schnidler, D.G., Schoenborn, B.P., Yabuki, S. and Moore, P.B. (1987) *Science* **238**, 1403-1406.
- Cenatiempo, Y., Deville, F., Dondon, J., Grunberg-Manago, M., Sacerdot, C., Hershey, J.W.B., Hansen, H.F., Petersen, H.U., Clark, B.F.C., Kjeldgaard, M., La Cour, T.F.M., Mortensen, K.K. and Nyborg, J. (1987) *Biochemistry* **26**, 5070-5076.
- Dock-Brégeon, A.C. and Moras, D. (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 113-121.
- Dondon, J., Plumbridge, J.A., Hershey, J.W.B. and Grunberg-Manago, M. (1985) *Biochimie* **67**, 643-649.
- Douthwaite, S., Christensen, A. and Garrett, A. (1983) *J. Mol. Biol.* **169**, 249-279.
- Ehresmann, C., Millon, R., Ehresmann, B., Ebel, J.P., Nurse, K. and Ofengand, J. (1984) *Biochemistry* **23**, 429-437.
- Gornicki, P., Baudin, F., Romby, P., Wiewiorowski, M., Kryzosiak, W., Ebel, J.P., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1989) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 971-984.
- Gornicki, P., Nurse, K., Hellman, W., Boublik, M. and Ofengand (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 10493-10498.
- Gualerzi, C.O., Pon, C.L., Pawlik, R.T., Canonaco, M.A., Paci, M. and Wintermeyer, W. (1986) in "Structure, Function, and Genetic of Ribosomes" (B. Hardesty, and G. Kramer, eds) Springer Verlag New York, pp 621-641.
- Gualerzi, C.O. and Wintermeyer, W. (1986) *FEBS Lett.* **202**, 1-6.

- Hershey, J.W.B. (1987) In "*Escherichia Coli and Salmonella Typhymurium*", Vol. 1 (F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger, eds), American Soc. for Microbiology, Washington B.C., pp 613-647.
- Lake, J.A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 507-530.
- Maitra, U., Stringer, E.A. and Chaudhuri, A. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 869-900.
- Majumbar, A., Bose, K.K., Gupta, N.K. and Wabha, A.J. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 137-140.
- Miller, M.J. and Wahba, A.J. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 1084-1090
- Moazed, D. and Noller, H.F. (1986) *Cell* **47**, 985-994.
- Moazed, D. and Noller, H.F. (1987) *Nature* **327**, 389-394.
- Moazed, D., Stern, S. and Noller, H.F. (1986) *J. Mol. Biol.* **187**, 399-417.
- Mougel, M., Eyermann, F., Westhof, E., Romby, P., Expert-Bezançon, A., Ebel, J.P., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1987) *J. Mol. Biol.* **198**, 91-107.
- Mougel, M., Philippe, C., Ebel, J.P., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 2825-2839.
- Ofengand, J., Ciesolka, J., Denman, R. and Nurse, K. (1986) In "*Structure, Function and Genetics of Ribosomes*", (B. Hardesty and G. Kramer, eds), Springer Verlag, New York, pp 473-494.
- Plumbridge, A.J., Deville, F., Sacerdot, C., Petersen, H.U., Cenatiempo, Y., Cozzone, A., Grunberg-Manago, M. and Hershey, J.W.B. (1985) *EMBO J.* **4**, 223-229.
- Prince, J.B., Taylor, B.H., Thurlow, D.L., Ofengand, J. and Zimmermann, R.A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5450-5454.
- Rose, S.J., Lowary, P.T. and Uhlenbeck, O.C. (1983) *J. Mol. Biol.* **167**, 103-117.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Silberklang, M., Gillam, A.M. and RajBhandary, U.L. (1977) *Nucleic Acids Res.* **4**, 4091-4108.
- Stern, S., Wilson, R.C. and Noller, H.F. (1986) *J. Mol. Biol.* **192**, 101-110.
- Stern, S., Weiser, B. and Noller, H.F. (1988) *J. Mol. Biol.* **204**, 447-481.
- Sundari, R.M., Stringer, F.A., Schulmann, L.H. and Maitra, U. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 3338-3345.
- Szer, W. and Kurylo-Borowska, Z. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.* **224**, 477-486.
- Van der Hofstad, G.A.J., Foekens, J.A., Bosch, L. and Voorma, H.O. (1977) *Eur. J. Biochem.* **77**, 69-75.
- Vlassov, V.V., Giegé, R. and Ebel, J.P. (1981) *Eur. J. Biochem.* **119**, 51-59.

- Wakao, H., Romby, P., Westhof, E., Laalami, S., Grunberg-Manago, M., Ebel, J.P., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1989) *J. Biol. Chem.* in press.
- Weiel, J. and Hershey, J.W.B. (1982) *J.Biol. Chem.* **257**, 1215-1220.
- Wintermeyer, W. and Gualerzi, C.O. (1983) *Biochem.* **22**, 690-694.

III. TOPOGRAPHIE DU COMPLEXE IF2/30S.

Dans l'article 2, nous avons défini l'effet induit par la fixation de IF2 sur la conformation de l'ARN 16S. Afin d'apporter des arguments supplémentaires sur le proche voisinage de l'ARNr 16S à IF2, nous avons utilisé le *trans*-diaminodichloro platine (II) pour induire des pontages réversibles entre IF2 et l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S. D'autres expériences de pontage protéine-protéine par l'intermédiaire de dimethylsubérimidate et d'iminitiolane avaient déjà permis d'identifier les protéines situées au proche voisinage d'IF2 dans la sous-unité 30S (Bollen *et al.*, 1975 ; Boileau *et al.*, 1983). Ces deux études complémentaires permettront ainsi de mieux définir la topographie de IF2 sur la sous-unité 30S. Le mécanisme et la spécificité du *t*-DDP sont décrits dans la partie "Stratégie Expérimentale".

1. Résultats.

1.1. Formation du complexe ponté IF2/30S/GTP et isolement des oligonucléotides pontés.

Les conditions expérimentales utilisées sont strictement identiques à celles utilisées pour le pontage de IF2 à l'ARNt initiateur dans le complexe [fMet-ARNt^{fMet}/IF2/GTP] (voir "Matériel et Méthodes" et chapitre 1). Dans les deux cas, IF2 a été prétraité par le *t*-DDP avant la formation des complexes ribonucléoprotéiques correspondants afin de minimiser les pontages entre l'ARNr 16S et les protéines ribosomiques. Le facteur d'initiation IF2 a été préincubé pendant 1 h à l'obscurité et à température ambiante, avec un excès molaire de 400 fois de *t*-DDP. Le complexe [IF2-Pt/30S/GTP] a ensuite été formé en incubant IF2-Pt et les sous-unités 30S 5 min à 37°C, dans un rapport molaire IF2/30S = 4,5. Après déprotéinisation, le complexe ponté a été isolé par centrifugation sur gradient de saccharose en conditions dissociantes (en présence de SDS et de LiCl). Dans ces conditions, IF2 non ponté se retrouve dans le haut du gradient ; mais le pic correspondant à l'ARNr 16S ponté à IF2 apparaît plus étalé et déplacé par rapport au pic de l'ARNr 16S libre. Ne disposant pas de protéine marquée ni d'anticorps, la stoechiométrie et le taux du complexe n'ont pas été vérifiées. Toutefois, il a été montré qu'en présence d'un excès de IF2 par rapport aux sous-unités 30S, une molécule d'IF2 se fixe par sous-unité 30S et active la fixation d'une molécule de fMet-ARNt^{fMet} (Fakunding et Hershey, 1973a ; Weiel et Hershey, 1982). Nous avons aussi montré que l'effet induit par la fixation de IF2 sur la conformation de l'ARNr 16S n'est pas perturbé en présence de l'ARNt initiateur, suggérant

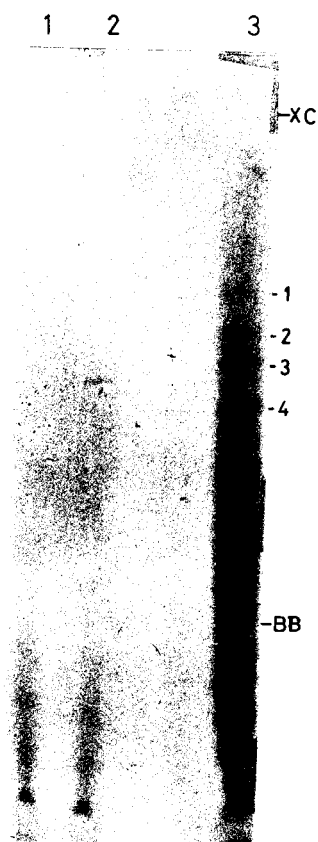


Figure 19 : Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide montrant le fractionnement des oligoribonucléotides T_1 marqués à leur extrémité 5' pontés à IF2. (1) Dans ce contrôle, la sous-unité 30S a été traitée avec le t -DDP pendant 5 min à 37°C, (2) contrôle d'incubation réalisé en absence de t -DDP, IF2 est ajouté au milieu réactionnel juste avant la filtration des fragments d'ARNr 16S obtenus après hydrolyse à la RNase T_1 ; (3) fragments d'ARNr 16S pontés à IF2 et libérés après réversion du pontage. Les marqueurs de migration utilisés sont le bleu de bromophénol (BB) et le xylène de cyanol (XC).

que l'interaction de IF2 en présence ou en absence de l'ARNt est identique (article 2). De plus, les conditions expérimentales utilisées sont très proches de celles du pontage réalisé sur le complexe IF3-Pt/30S où la spécificité du pontage a été clairement démontrée dans notre laboratoire (Ehresmann *et al.*, 1986). Dans ces conditions, le taux de pontage de IF3 aux sous-unités 30S a été estimé à 60%.

Le complexe ponté [IF2-Pt/30S/GTP] a ensuite été soumis à une hydrolyse partielle par la RNase T₁ et les fragments d'ARN pontés au facteur IF2 ont été séparés des fragments non pontés par filtration sur membrane de nitrocellulose comme décrit dans la partie "Matériel et Méthodes". Le pontage a ensuite été réversé par addition de thiourée 2 M et les fragments ainsi libérés ont été marqués à leur extrémité 5' et purifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Un exemple d'un fractionnement de fragments d'ARN marqués et pontés est représenté sur la figure 19. Le nombre de bandes et la distribution relative de la radioactivité parmi les produits marqués varient d'une expérience à l'autre selon les conditions d'hydrolyses enzymatiques utilisées. La spécificité du pontage a été vérifiée par deux contrôles différents. Dans un tel travail, deux sources principales d'erreurs sont à envisager : (1) la rétention aspécifique sur IF2 de fragments d'ARNr non pontés ; (2) le pontage ou la rétention de fragments d'ARNr 16S à des protéines ribosomiques de la sous-unité 30S. En effet, des pontages entre protéines ribosomiques et l'ARNr 16S pourraient avoir lieu puisque les sous-unités 30S sont incubées pendant 5 min en présence de l'excès de *t*-DDP qui est toujours présent dans le milieu réactionnel lors de la formation du complexe [IF2-Pt/30S/GTP]. Toutefois, il a été montré que dans les conditions utilisées, seules des traces de protéines sont pontées à l'ARNr 16S (Tukalo *et al.*, 1987). Afin de contrôler l'absence de telles rétentions aspécifiques, deux types de contrôles ont été effectués. Dans le premier contrôle, l'ARNr 16S a été hydrolysé par la RNase T₁, incubé en présence du facteur IF2 et filtré sur membrane de nitrocellulose. Dans le second contrôle, les sous-unités 30S ont été incubées pendant 5 min avec le *t*-DDP en absence du facteur IF2, puis soumises au même protocole expérimental. L'absence de fragments radioactifs dans les deux contrôles indique que les fragments trouvés sont spécifiquement pontés à IF2 (figure 19).

1.2. Identification des fragments d'ARN pontés.

Après réversion du pontage, chaque fragment libéré est marqué, fractionné par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et repurifié par une deuxième électrophorèse sur gel de polyacrylamide, avant d'être séquencé. Le nucléotide 5' terminal de chacun des

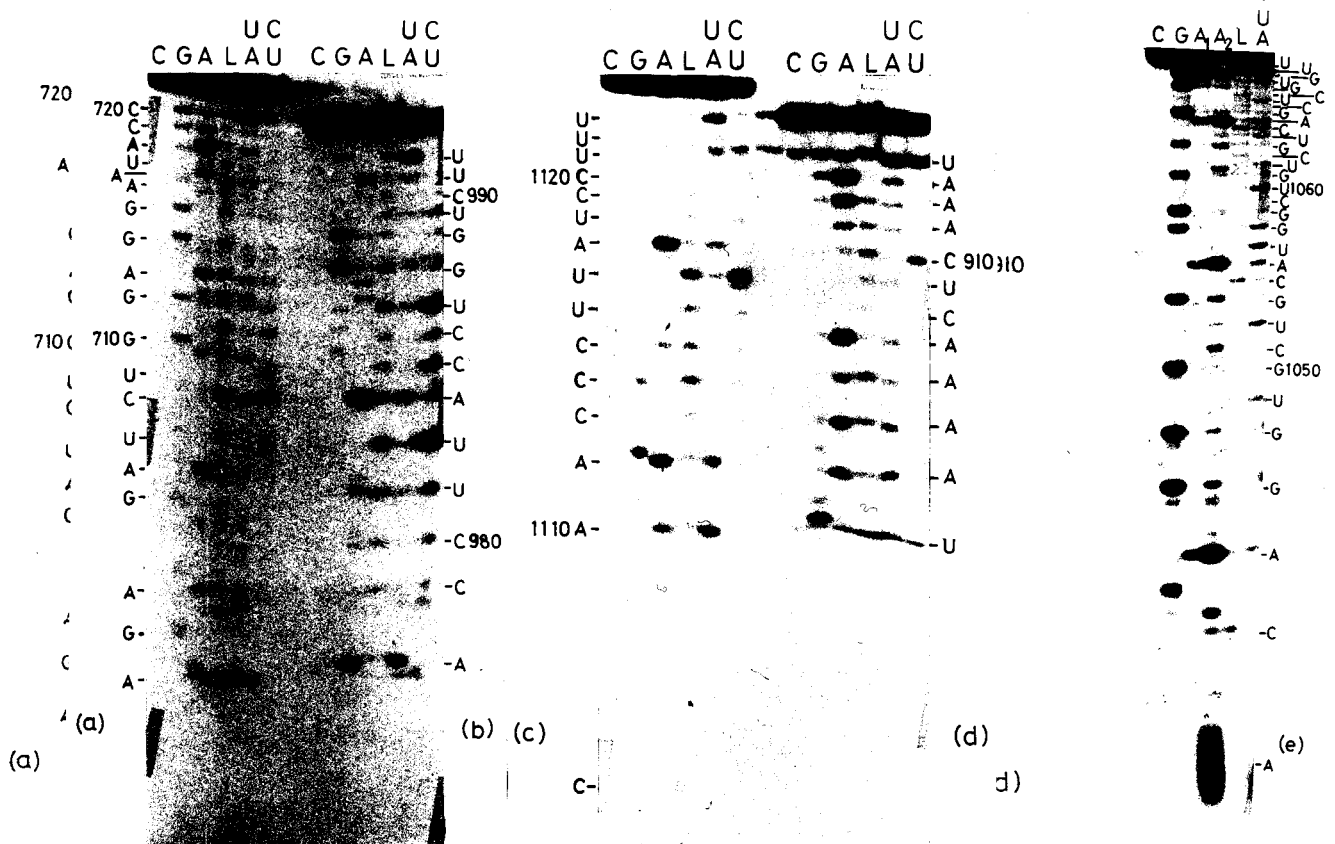


Figure 20 : Autoradiographies de gels de polyacrylamide montrant le fractionnement de divers oligoribonucléotides T₁ marqués à leur extrémité 5' et séquencés au moyen de diverses ribonucléases. (C) Contrôle d'incubation en absence d'enzyme ; (G, A, AU, CU) correspondent respectivement aux hydrolyses enzymatiques par la RNase T₁, U₂, PhyM et de *B. cereus* ; (L) hydrolyse partielle à la formamide. Les conditions d'hydrolyses enzymatiques sont données dans la partie "Matériel et Méthodes".

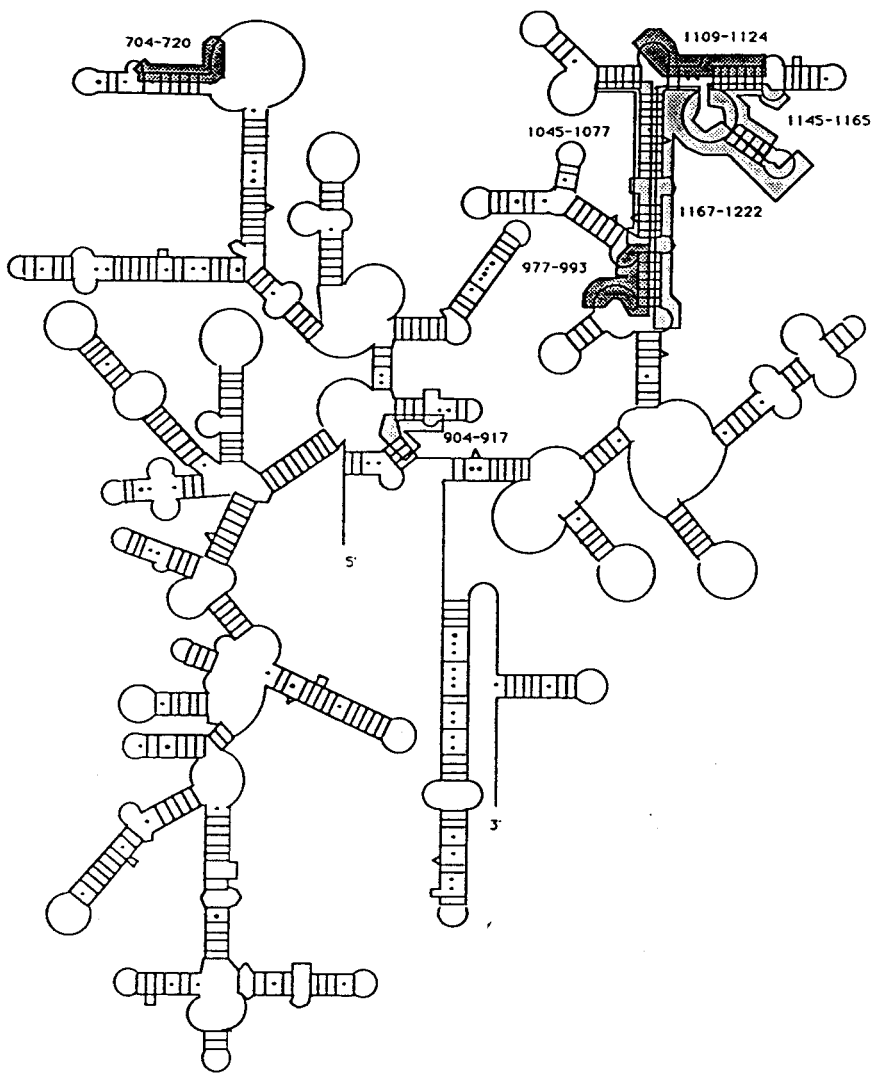


Figure 21 : Localisation des fragments d'ARNr pontés au facteur d'initiation IF2 dans le modèle de structure secondaire de l'ARNr 16S d'*E. coli*. Les fragments pontés sont grisés (foncé pour les fragments majeurs, clair pour les fragments mineurs).

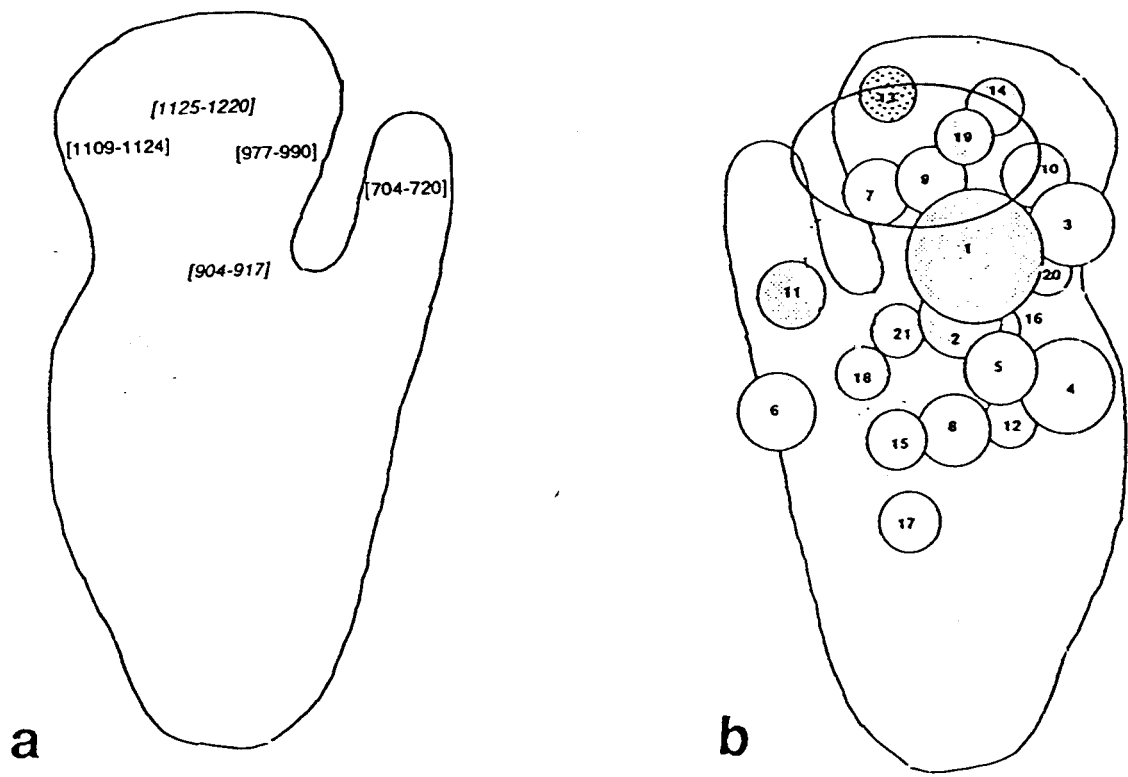


Figure 22 : Localisation des fragments d'ARNr 16S pontés au facteur d'initiation IF2 dans la sous-unité 30S d'*E. coli* (a) et localisation présumée du facteur IF2 (b). Les fragments trouvés pontés à un taux variable sont représentés en italique. Dans la vue (b) la sous-unité est représentée du côté du solvant, les protéines trouvées pontées à IF2 par Bollen *et al.* (1975) sont grisées et la protéine S13, trouvée pontée par Bollen *et al.* (1975) et Boileau *et al.* (1983), est pointillée. Le facteur IF2 est représenté par une ellipse.

fragments a été déterminé séparément après une hydrolyse totale par la RNase P₁. Divers exemples de détermination de séquences de fragments sont montrés dans la figure 20. A partir de quatre expériences indépendantes, quatre fragments majeurs ont été isolés de façon reproductible. Ceux-ci couvrent les nucléotides 704-720, 904-917, 977-993 et 1109-1124, le fragment 977-993 n'étant pas identifié dans toutes les expériences réalisées. Dans des conditions d'hydrolyse enzymatique (par la RNase T₁) plus douce, un certain nombre de fragments ont été trouvés à un taux faible, localisés entre les nucléotides 704-724 et dans le domaine comprenant les nucléotides 1045-1077 et 1145-1222. Il n'est pas à exclure que certains de ces fragments proviennent de pontages IF2-ARN-ARN. Toutefois, le fait d'avoir pré-traité IF2 au *t*-DDP doit en principe minimiser ce phénomène. Ce type de fragment, s'il existe, doit être présent à un taux faible. Ainsi, les fragments englobant la région 1150-1220 pourraient résulter d'un tel pontage IF2-ARN-ARN (par exemple, entre les fragments 977-993 et 1167-1221 et entre 1109-1124 et 1145-1165). La localisation des divers fragments pontés est représentée sur la structure secondaire de l'ARNr 16S dans la figure 21.

2. Discussion et conclusion.

Ce travail apporte de nouvelles informations sur le proche voisinage de IF2 par rapport à l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S en présence de GTP. Nous avons ainsi identifié sans ambiguïté quatre fragments : 704-720, 904-917, 977-993 et 1109-1124. Leur localisation dans la sous-unité 30S est représentée sur la figure 22a et est basée sur les deux modèles de repliement de l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S proposés par Stern *et al.* (1988) et Brimacombe *et al.* (1988). Il apparaît que les fragments pontés englobent la tête, la protubérance latérale avec un point de pontage extrême situé près du sillon. En effet, le fragment 704-720 est situé dans la protubérance latérale proche, à proximité du site de fixation de la protéine S11 (Stern *et al.* 1989). Cette protéine a d'ailleurs été pontée dans cette région de l'ARNr 16S (Brimacombe *et al.*, 1988). Les fragments 1109-1124 et 977-993 sont tous deux localisés dans le domaine III, entièrement contenu dans la tête de la sous-unité 30S. Les nucléotides 1109-1124 sont proches des protéines S3 et S10 (du côté du solvant) alors que les nucléotides 977-993 sont localisés près des protéines S7 et S9 face à la protubérance latérale et proche du site de décodage (autour du nucléotide C1400). Les fragments mineurs se trouvent tous localisés dans la tête de la sous-unité autour des protéines S3, S9, S10, S14 et S19. Enfin, le fragment 904-917 est situé dans la partie centrale de la sous-unité proche du sillon où a été positionné les nucléotides m⁶2A, près de

l'extrémité 3' de l'ARNr 16S et à proximité des protéines S1, S2 et S21. Ce dernier fragment n'a pas été identifié dans toutes les expériences de pontage, il doit sans doute correspondre à un point de pontage extrême de la protéine IF2. Dans ces expériences, il n'a pas été possible de déterminer les sites de pontage, mais quelques candidats potentiels peuvent être postulés sur la base de la spécificité du *t*-DDP (A(N1) G(N7), C(N3)) et de la réactivité de ces résidus dans la sous-unité 30S à diverses sondes de structure (Moazed *et al.*, 1986 ; Baudin *et al.*, 1987). En effet, les adénines 913-915, 977-978 et 1110, réactives au DMS à leur position N1 dans la sous-unité 30S, représentent des sites potentiels de pontage. Il est à noter que certains de ces résidus présentent des réactivités augmentées (en position 915, 1110) dans la sous-unité 30S ou se trouvent à proximité de nucléotides présentant des augmentations de réactivité (en position 977-978) (Baudin *et al.*, 1987). Ces augmentations reflètent des ajustements conformationnels induits par les protéines ribosomiques. Il est remarquable que ces résidus se trouvent dans des régions relativement exposées dans la sous-unité 30S (Baudin *et al.*, 1987, 1989).

Ces résultats sont en accord avec la localisation des protéines trouvées pontées à IF2, c'est-à-dire S1, S2, S11, S12, S13, S14 et S19 localisées principalement vers le côté du solvant dans la sous-unité 30S (Bollen *et al.*, 1975). Cependant, en présence des deux autres facteurs (IF1 et IF3), seule la protéine S13 est pontée à IF2, alors que IF2 peut être ponté à chacun des deux autres facteurs (Boileau *et al.*, 1983). Par ailleurs, IF2 a également été ponté aux protéines L7/L12 dans le ribosome 70S (Heimark *et al.*, 1976) et il a été montré que les sous-unités 50S dépourvues des protéines L7/L12 ne sont plus capables de stimuler l'hydrolyse du GTP catalysée par IF2 (Fakunding *et al.*, 1973b ; Lockwood *et al.*, 1974). De plus, IF2 est le seul facteur qui reste fixé au ribosome 70S. Ces différents résultats suggèrent que la protéine interagit plutôt du côté du solvant de la sous-unité 30S et sont en bon accord avec nos présents résultats. Une localisation d'IF2 en accord avec nos résultats et ces différentes observations est présentée dans la figure 22b.

Dans l'article précédent, nous avons vu que les changements de réactivité induits au niveau de l'ARNr 16S par la fixation d'IF2 à la sous-unité 30S sont localisés dans une région correspondant plus ou moins au domaine d'interaction présumé du facteur (la protubérance latérale et la partie de la tête en face de cette protubérance), mais aussi dans des régions éloignées dispersées dans plusieurs parties de la sous-unité. En revanche, les fragments d'ARNr trouvés pontés sont principalement localisés dans la tête de la sous-unité, du côté du solvant. Il est remarquable qu'à l'exception de fragment 704-720, situé dans la protubérance latérale, il n'y a pratiquement pas de corrélation topographique entre les fragments d'ARNr pontés et les régions d'ARNr affectées par la fixation d'IF2. Ces

résultats confirment que les changements de réactivité observés (en particulier les diminutions) reflètent principalement des transitions allostériques plutôt que des protections directes. Les deux approches utilisées apportent donc des informations complémentaires, l'une sur les effets allostériques induits par IF2, l'autre sur la topographie du complexe IF2-30S.

Il est aussi intéressant de noter que la région 904-917 pontée à IF2 est proche de régions trouvées pontées aux protéines S1 (Golinska *et al.*, 1981), S18 (Moine *et al.*, 1988a) et au facteur d'initiation IF3 (Ehresmann *et al.*, 1986), tous trois impliqués dans la fixation de l'ARN messenger. De plus, des pontages entre les deux facteurs IF2 et IF3 ont été identifiés (Boileau *et al.*, 1983), suggérant que leurs domaines d'interaction sont très proches. Récemment, il a été montré que IF3 induit des diminution de réactivité au niveau du domaine central de l'ARN (autour des résidus 660-870) ainsi que des ajustements conformationnels dans la région 830-850 (Muralikrishna et Wickström, 1989). Il se trouve que certains de ces résidus sont proches des phosphates 694, 771 et 791 dont la réactivité à l'ENU est réduite en présence de IF2. De plus, il a été proposé récemment que la sélection de l'ARNt initiateur se ferait par l'action conjointe des deux facteurs IF2 et IF3, IF2 en reconnaissant le bras accepteur de l'ARNt, et IF3 en positionnant correctement le bras anticodon de l'ARNt initiateur (Hartz *et al.*, 1989). Ces résultats sont en accord avec le fait que le domaine d'interaction de IF2 à l'ARNt initiateur est principalement localisé dans le domaine comprenant le bras accepteur et la région T (article 1). L'ensemble de ces résultats indique que IF2 coiffe la tête et la partie supérieure de la protubérance latérale avec des contacts extrêmes proche du sillon (face au solvant) alors que IF3 serait localisé dans la région comprenant le sillon de la sous-unité entre la protubérance latérale et la plateforme (face à la sous-unité 50S). Tous ces résultats apportent des contraintes supplémentaires pour le positionnement des différents ligands du ribosome dans le complexe d'initiation.

CONCLUSION GENERALE

Les acides ribonucléiques possèdent l'extraordinaire capacité de se replier en des structures tridimensionnelles complexes qui sont les supports de la plupart des réactions biologiques impliquées dans le décodage de l'information génétique. L'élucidation de la structure de l'ARN représente l'étape clé pour la compréhension de leur rôle biologique. Ainsi, le ribosome est un matériel de choix en raison des nombreuses interactions ARN-protéines qui interviennent dans son architecture et dans son fonctionnement. Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'étape de l'initiation de la biosynthèse des protéines. Au cours de ce processus, de nombreuses macromolécules (ARN et protéines) doivent interagir de manière coordonnée et spécifique pour former le complexe d'initiation [70S/IF2/GTP/fMet-ARN_t^{Met}/ARN_m]. Nous avons choisi de suivre la conformation de deux ARN impliqués dans ce processus, l'ARN_t initiateur et l'ARN_r 16S, au cours des diverses étapes de la formation d'un complexe d'initiation simplifié [30S/IF2/GTP/fMet-ARN_t^{Met}/AUG]. Pour réaliser une telle étude, nous avons utilisé deux approches différentes mais complémentaires : la première permet de donner une information sur l'accessibilité ou la réactivité de chaque nucléotide à diverses sondes de structure dans l'ARN isolé ou engagé dans un complexe, la seconde approche a pour but d'introduire des pontages entre deux macromolécules interagissant et ainsi de définir la topographie du complexe.

L'ARN_t initiateur dans le complexe d'initiation. L'étude structurale réalisée sur l'ARN_t initiateur nous a permis de proposer un modèle de structure tertiaire qui intègre la réactivité de chaque nucléotide à diverses sondes de structure. Bien que la structure de l'ARN_t initiateur soit proche de celle de l'ARN_t^{Phe}, nous avons mis en évidence certaines caractéristiques structurales : (1) l'extrémité 3' adopte une conformation particulière faisant intervenir un appariement non canonique C1-A72 avec un empilement de l'adénine A73. (2) Le bras anticodon présente une conformation particulièrement rigide due à la présence des trois paires de bases consécutives G-C. Certains de nos résultats ne sont pas corrélés à la structure cristallographique déterminée à faible résolution (Woo *et al.*, 1980), en particulier en ce qui concerne la conformation de l'extrémité 3' et celle de la boucle de l'anticodon. Dans cette structure, l'uridine 33 a été placée à l'extérieur de la boucle et l'extrémité 3' de l'ARN_t adopte une structure désorganisée avec les résidus C1 et A72 non appariés. En solution, l'uridine 33 adopte plutôt une conformation de type "U-turn",

puisque son groupement N3 n'est pas exposé au solvant, et l'extrémité 3' possède une conformation analogue à celle de l'ARNt^{Phe}. Ces différences sont localisées dans deux régions de l'ARNt qui présentent une certaine flexibilité et peuvent ainsi refléter divers états conformationnels de la molécule.

L'ARNt initiateur possède une autre caractéristique structurale importante au niveau de son anticodon. En effet, le codon de démarrage de la synthèse protéique chez les procaryotes peut être soit AUG, GUG ou plus rarement UUG. En général, la troisième base du codon est une base "flottante" (wobble). Seule la complémentarité stricte des deux premières bases codon-anticodon est exigée. Pour la troisième base, un certain jeu d'appariements est toléré. Dans le cas du codon d'initiation, la première base du codon est dite "flottante". Ce fait reste encore inexplicable. Toutefois, une des caractéristique de l'ARNt initiateur est la présence d'une adénine non modifiée en position 37. Il a été montré que des modifications de nucléotides dans la boucle de l'anticodon ont une influence sur l'interaction codon-anticodon (Houssier et Grosjean, 1985 ; Yokoyama *et al.*, 1985 ; Muramatsu *et al.*, 1988). En particulier, il a été montré que la base modifiée en position 37 stabilise l'interaction codon-anticodon par des phénomènes d'empilement (par exemple, Houssier et Grosjean, 1985). L'absence de modification de l'adénine 37 pourrait ainsi favoriser l'interaction de l'ARNt initiateur au codon GUG ou UUG. De plus, la question fondamentale suivante reste toujours ouverte : pourquoi dans tous les organismes, la méthionine a-t-elle été choisie comme le premier acide aminé dans la synthèse protéique ? Dans la plupart des cas, le groupement formyl et la méthionine sont hydrolysés avant même la maturation de la protéine. Il semblerait donc que la raison d'être de cette méthionine consisterait en un signal de l'initiation assurant la traduction correcte. De plus, la méthionine doit jouer un rôle très important dans le métabolisme cellulaire (Danchin, 1973). Toutefois, la raison pour laquelle la méthionine a été choisie comme signal d'initiation demeure inconnue.

Une autre particularité de l'ARNt^{Met} est que celui-ci est formylé de façon spécifique. La formylation du Met-ARNt^{Met} est requise pour une initiation efficace chez *E. coli*. Nous avons montré que l'aminoacylation et la formylation de l'ARNt^{Met} induit des ajustements conformationnels de l'ARNt essentiellement dans le bras T et l'extrémité 3'. Divers travaux ont montré que des souches mutantes capables d'initier la synthèse protéique *in vivo* en absence de formylation, possèdent une substitution de la thymine 54 en uridine dans la boucle T de l'ARNt initiateur (Delk et Rabinowitz, 1975 ; Baumstark *et al.*, 1977). Ces résultats suggèrent qu'un dérivé de l'acide folique est utilisé comme donneur du groupement méthyle pour la modification de l'uridine 54 dans l'ARNt initiateur

(Delk et Rabinowitz, 1975). Il est intéressant de noter que cet ARNt non formylé est toujours reconnu par IF2 (Baumstark *et al.*, 1977), suggérant que d'autres déterminants structuraux sont importants pour la reconnaissance du facteur IF2.

Nous avons déterminé le domaine d'interaction du facteur d'initiation IF2 à l'ARNt initiateur comme étant la boucle T, le petit sillon du bras T et le bras accepteur. Il est intéressant de rappeler que l'une des différences entre l'ARNt initiateur et l'ARNt^{Phe} se trouve au niveau du type d'interaction entre les boucles T et D (article 1). Cette particularité pourrait être un des signaux de reconnaissance de la protéine. Il serait très intéressant de déterminer les résidus de l'ensemble de ce domaine d'interaction responsables de la reconnaissance spécifique par le facteur d'initiation IF2, par les techniques de mutagenèse dirigée. Une similitude frappante est observée avec le complexe aminoacyl-ARNt élongateur/EF-Tu/GTP. En effet, le domaine d'interaction de l'ARNt à EF-Tu se trouve principalement localisé dans les bras T et accepteur. De plus, ces deux protéines possèdent une très forte homologie dans leur domaine d'interaction du GTP (Sacerdot *et al.*, 1984 ; Cenatiempo *et al.*, 1987). Ceci suggère que ces deux protéines pourraient provenir du même ancêtre et qu'elles se seraient différenciées au cours de l'évolution.

Dans le complexe d'initiation, la topographie du complexe ARNt/IF2 n'est pas perturbée. En revanche, la région anticodon est protégée par la sous-unité 30S. Les trois paires de bases consécutives G-C jouent un rôle fondamental pour la fixation à la sous-unité 30S. En effet, des mutations dans cette région, particulièrement stable, affecte la fixation de l'ARNt au ribosome (Seong et RajBhandary, 1987a).

L'ARNr 16S dans le complexe d'initiation. Notre travail apporte des informations plus précises sur les régions de l'ARNr 16S (dans la sous-unité 30S) affectées par la fixation de IF2 et de l'ARNt initiateur. Il apparaît que le facteur IF2 n'a pas de contacts importants avec l'ARNr 16S mais induit des ajustements conformationnels dans différentes régions de l'ARNr, non seulement dans le domaine d'interaction défini par microscopie électronique (dans la plateforme et la tête de la sous-unité 30S) mais aussi dans diverses régions de la particule. Ces changements de conformation peuvent résulter de perturbations au niveau des sites d'interaction entre certaines protéines ribosomiques et l'ARNr 16S. Les zones de l'ARNr 16S en proche voisinage avec le facteur ont été identifiées et sont réparties dans un domaine plus vaste que celui qui a été défini par microscopie électronique. En effet, le domaine d'interaction de IF2 englobe la tête, la protubérance latérale avec des points de contacts extrêmes proche du sillon de la sous-unité 30S. En présence de l'ARNt_f^{Met}, l'effet induit par IF2 n'est pas modifié. Ces résultats montrent que la fixation

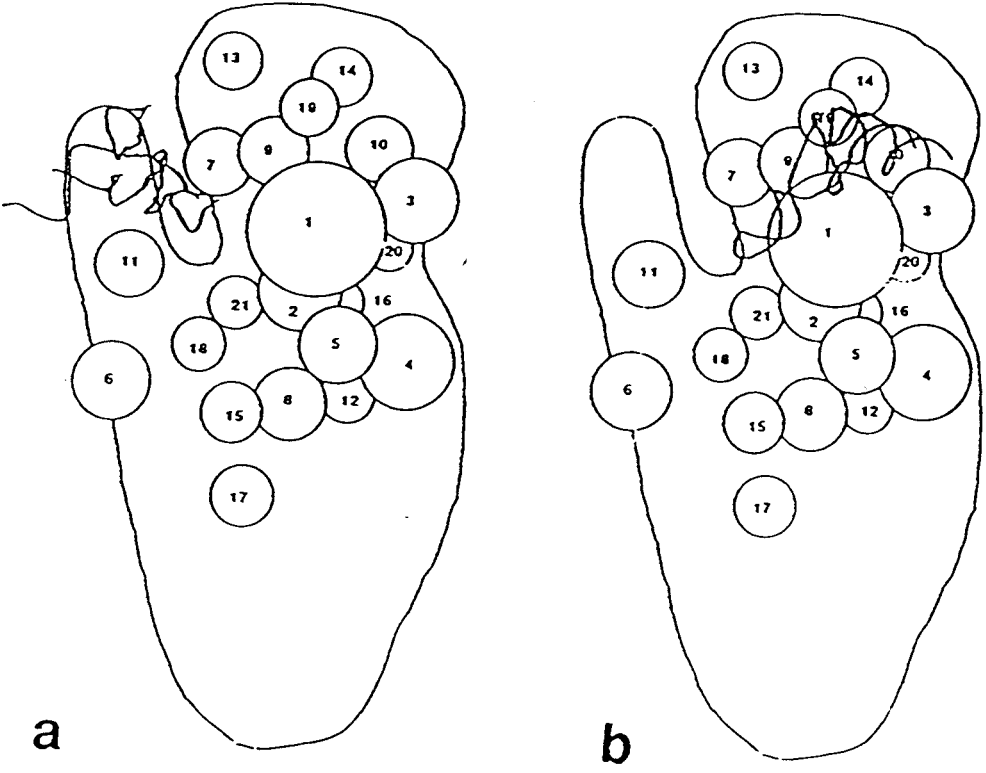


Figure 23 : Localisation de l'ARNt dans le site P sur la sous-unité 30S d'E. coli. La sous-unité 30S est vue du côté du solvant. La position des protéines ribosomiques est d'après Capel et al. (1986). L'orientation de l'ARNt dans les deux modèles (a et b) est de Stern et al. (1988).

de l'ARNt induit des changements de réactivité principalement dans la protubérance latérale, le sillon et la tête de la sous-unité 30S. Ils apportent des arguments supplémentaires en faveur de la proximité du bras de l'anticodon de l'ARNt initiateur et du site de décodage autour du résidu C1400. Il est intéressant de noter que l'insertion ou la délétion de résidus autour de la cytosine C1400 abolit l'initiation de synthèse protéique (Denman *et al.*, 1989a). De même, la délétion de G1401 inhibe toutes les fonctions ribosomiques, ce résidu a aussi été décrit comme un des déterminant structural du site P de la sous-unité 30S (Denman *et al.*, 1989a ; 1989b). Il apparaît que le résidu G1401 et l'environnement structural de ce résidu joue un rôle crucial pour la fixation correcte de l'ARNt dans le site P (Denman *et al.*, 1989a). Il faut souligner que la fixation de l'ARNt initiateur induit des changements souvent situés à proximité de ceux induits par la fixation de IF2, ou bien renforce certains effets produits par IF2 seul. Nos résultats indiquent que le facteur d'initiation provoque des ajustements conformationnels qui doivent stimuler la fixation de l'ARNt initiateur. Ceci est en parfait accord avec les travaux du groupe de Gualerzi qui ont montré que la fixation des facteurs précède la fixation de l'ARNt initiateur et de l'ARN messenger (pour revue, voir Gualerzi *et al.*, 1986).

Ainsi, l'ensemble de nos résultats apportent des contraintes supplémentaires qui permettent de déterminer une topographie du complexe d'initiation [30S/IF2/GTP/fMet-ARNt^{Met}/AUG].

Modèle d'interaction de l'ARNt au site P du ribosome. Une des particularités de l'ARNt initiateur est de se fixer au site P du ribosome. Nos résultats permettent de placer le facteur d'initiation IF2 dans la région de la sous-unité 30S comprenant la partie supérieure de la protubérance latérale, le sillon et la tête du côté du solvant (figure 22b). Ceci permet d'expliquer que seul le facteur IF2 reste fixé lors de la fixation de la sous-unité 50S. De plus, nous avons montré que le domaine hélicoïdal comprenant le bras accepteur et la région T de l'ARNt initiateur représente le site d'interaction de IF2, alors que le bras anticodon est en contact avec la sous-unité 30S. Récemment, il a été montré que le facteur d'initiation IF3 serait responsable de la fixation correcte de l'ARNt^{Met} au niveau du site P du ribosome en présence de l'ARNm. Cette sélection se ferait par une reconnaissance spécifique du bras anticodon de l'ARNt (Hartz *et al.*, 1989). Le domaine d'interaction de IF3 est maintenant bien défini. Des études de microscopie électronique (Lake, 1985), d'empreinte de la protéine (Muralikrishna et Wickström, 1989) et des pontages (par exemple, Mc Keen *et al.*, 1980 ; Coopermann *et al.*, 1980 ; Ehresmann *et al.*, 1986) permettent de le localiser près de la protubérance latérale et le bas du sillon.

Récemment, deux modèles de l'agencement de deux ARNt dans le site A et P du ribosome ont été proposés (Stern *et al.*, 1988). Dans la figure 23, nous avons représenté ces deux orientations de l'ARNt dans le site P du ribosome. Dans les deux cas, le bras anticodon est localisé dans le site de décodage (près du résidu C1400). Dans le premier modèle, proche de celui proposé par Ofengand *et al.* (1986), l'extrémité 3' de l'ARNt est orientée vers la sous-unité 50S (du côté de la protéine L1). En revanche, dans le deuxième modèle proposé par Spirin (1983), l'extrémité 3' de l'ARNt est orientée du côté du solvant, le corps de l'ARNt situé dans la concavité entre la tête et le corps de la sous-unité 30S. Il existe des arguments expérimentaux en faveur de chacun de ces deux modèles, qui sont parfois difficilement conciliables. Nos résultats indiquant qu'IF2 couvre la partie de la tête exposée au solvant et coiffe le bras T et le bras accepteur de l'ARNt initiateur seraient plutôt en faveur du deuxième modèle. Cet arrangement semble également confirmé par le pontage de l'ARNt dans le site P à la protéine S10 (Riehl *et al.*, 1982) et aux protéines S5, S9, S13 et S19 (Graifer *et al.*, 1989). Toutefois, nous ne disposons pas encore de toutes les informations nécessaires pour définir l'orientation exacte de l'ARNt initiateur. De plus, les structures formant les sites P et A du ribosome ne sont pas rigides et des ajustements conformationnels de l'ARNr et des protéines sont sans doute requis de façon conjointe.

Ce présent travail apporte des informations précieuses pour la compréhension des mécanismes moléculaires qui conduisent à la formation du complexe d'initiation. L'utilisation de différents types d'approches telles que l'analyse structurale en solution, l'introduction de pontages, la mutagenèse dirigée et l'analyse cinétique du système sont nécessaires pour obtenir une vision complète du processus. Il serait intéressant de suivre la conformation de l'ARNr 16S en présence des deux facteurs IF2 et IF3, de l'ARNt initiateur et d'un ARN messenger naturel. Par ailleurs, très peu d'informations sont encore disponibles en ce qui concerne la structure des facteurs d'initiation. Ainsi, les techniques de pontages couplées à des études de mutagenèse dirigée seraient très utiles pour définir les domaines d'interaction du facteur IF2 à l'ARNt initiateur, au GTP, à la sous-unité 30S et au ribosome 70S.

REFERENCES

- Baksht, E., De Groot, M., Sprinzl, M. & Cramer, F. (1975). *FEBS Lett.* **55**, 105-108.
The behaviour of phenylalanine transfer ribonucleic acid with 3'-terminal formycin in protein biosynthesis using a rabbit reticulocyte cell-free system.
- Barta, A., Steiner, G., Brosius, J., Noller, H. F. & Kuechler, E. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3607- 3611.
Identification of a site on 23S ribosomal RNA located at the peptidyl transferase center.
- Baudin, F., Ehresmann, C., Romby, P., Mougél, M., Colin, J., Lempereur, L., Bachellerie, J. P., Ebel, J. P. & Ehresmann, B. (1987). *Biochimie* **69**, 1081-1096.
Higher-order structure of domain III in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA, 30S subunit and 70S ribosome.
- Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Eyermann, F., Ebel, J. P., Ehresmann, B & Ehresmann, C. (1989). *Biochemistry* **28**, 5847-5855.
Probing the phosphates of the *Escherichia coli* ribosomal 16S rRNA in its naked form, in the 30S subunit, and in the 70S ribosome.
- Baudin, F., Romby, P., Romaniuk, P. J., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1990). *Nucleic Acids Res.* sous presse.
Cross-linking of transcription factor TFIIIA to ribosomal 5S RNA from *X. laevis* by *trans*-diamminedichloroplatinum (II).
- Baumstark, B. R., Spremulli, L. L., RajBhandary, U. L. & Brown, G. M. (1977). *J. Bacteriol.* **129**, 457-471.
Initiation of protein synthesis without formylation in a mutant of *Escherichia coli* that grows in the absence of tetrahydrofolate.
- Boileau, G., Butler, P., Hershey, J. W. B. & Traut, R. R. (1983). *Biochemistry* **22**, 3162-3170.
Direct cross-links between initiation factors 1, 2, and 3 and ribosomal proteins promoted by 2-iminothiolane.
- Bollen, A., Heimark, R. L., Cozzzone, A., Traut, R. R., Hershey, J. W. B. & Kahan, L. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 4310-4314.
Cross-linking of initiation factor IF2 to *Escherichia coli* 30S ribosomal proteins with dimethylsuberimidate.
- Bosch, L., Kraal, B., Van Moort, J. M., Vijgenboom, J. H. M. Van Delft. & Talens, A. (1986). *Dans Structure, function and genetic of ribosomes.* (Herdesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 658-671.
Novel functions of EF-Tu during polypeptide synthesis and *tuf* gene expression.
- Boutorin, A. S., Clark, B. F. C., Ebel, J. P., Kruse, T. A., Petersen, H. U., Remy, P. & Vassilenko, S. (1981). *J. Mol. Biol.* **152**, 593-608.
A study of the interaction of *Escherichia coli* elongation factor-Tu with aminoacyl-tRNAs by Cobra venom ribonuclease.
- Branlant, C., Krol, A., Machatt, M. A., Pouyet, J., Ebel, J. P., Edwards, K. & Kössel, H. (1981). *Nucleic Acids Res.* **9**, 4303-4324.
Primary and secondary structure of *E. coli* MRE 600 23S ribosomal RNA. Comparison with models of secondary structure of maize chloroplast 23S rRNA and for large portion of mouse and human 16S mitochondrial rRNAs.

Brauer, D. & Wittmann-Liebold, B. (1977). *FEBS Letts.* **79**, 269-275.

The primary structure of the initiation factor IF-3 from *E. coli*

Brimacombe, R., Maly, P. & Zweib, C. (1983). *Prog. Nucleic Acids Res.* **28**, 1-48.

The structure of ribosomal RNA and its organization relative to ribosomal proteins.

Brimacombe, R., Atmadja, J., Kyriatsoulis, A. & Stiege, W. (1986). *Dans Structure, function and genetic of ribosomes.* (Herdesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 184-202.

RNA structure and RNA-protein neighborhoods in the ribosome.

Brimacombe, R., Atmadja, J., Stiege, W. & Schüler, D. (1988). *J. Mol. Biol.* **199**, 115-136.

A detailed model of the three-dimensional structure of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA *in situ* in the 30S subunit.

Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. L. & Noller, H. F. (1978).

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **75**, 4801-4805.

Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*.

Brosius, J., Ullrich, A., Raker, M. A., Gray, A., Dull, T. J., Gutell, R. R. & Noller, H. F. (1981). *Plasmid* **6**, 112-118.

Construction and fine mapping of recombinant plasmid containing the *rrn B* ribosomal RNA operon of *E. coli*.

Brownlee, G. G., Sanger, F. & Barrel, B. G. (1967). *Nature (London)* **215**, 735-737.

Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from *Escherichia coli*.

Burma, D. P., Tewari, D. S. & Srivastava, A. K. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 427-435.

Ribosomal activity of the 16S-23S RNA complex.

Capel, M. S., Engelman, D. M., Freeborn, B. R., Kjeldgaard, M., Langer, J. A., Ramakrishnan, V., Schnidler, D. G., Schoenborn, B. P., Yabuki, S. & Moore, P. B. (1987). *Science* **238**, 1403-1406.

A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*.

Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B. & Ebel J. P. (1978). *FEBS Lett.* **94**, 152-156.

The complete nucleotide sequence of the ribosomal 16S RNA from *Escherichia coli*. Experimental details and cistron heterogeneities.

Cech, T. R., Zaug, A. J. & Grabowski, P. J. (1981). *Cell* **27**, 487-496.

In Vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence.

Cech, T. R. & Bass, B. L. (1986). *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 599-629.

Biological catalysis by RNA.

Cenatiempo, Y., Deville, F., Dondon, J., Grunberg-Manago, M., Sacerdot, C., Hershey, J. W. B., Hansen, H. F., Petersen, H. U., Clark, B. F. C., Kjeldgaard, M., La Cour, T. F. M., Mortensen, K. K. & Nyborg, J. (1987). *Biochemistry* **26**, 5070-5076.

The protein synthesis initiation factor 2 G-domain. Study of a functionally active C-terminal 65-kilodalton fragment of IF2 from *Escherichia coli*.

Chaires, J. B., Pande, C. & Wishina, A. (1981). *J. Biol. Chem.* **256**, 6600-6607.

The effect of initiation factor IF-3 on *Escherichia coli* ribosomal subunit association kinetics.

- Chapeville, F. & Haenni, A. L. (1982). *Dans Biosynthèse des protéines - traduction génétique*, Hermann, Paris.
- Cole, J. R., Olsson, C. L., Hershey, J. W. B., Grunberg-Manago, M. & Nomura, M. (1987). *J. Mol. Biol.* **198**, 383-392.
Feedback regulation of rRNA synthesis in *Escherichia coli*. Requirement for initiation factor IF2.
- Crick, F. H. C. (1955). *Dans The nucleic acids*. (Chargraff & Davidson, ed.), Acad. Press. New York. **3**, 349.
A note for the RNA tie club, cité par Hoagland, M. B.
- Dahlberg, A. E. (1989). *Cell* **57**, 525-529.
The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis.
- Danchin, A. (1973). *FEBS Lett.* **34**, 327-332.
Does formylation of initiator tRNA act as a regulatory signal in *E. coli* ?
- De Bruijn, M. H. & Klug, A. (1983). *EMBO J.* **2**, 1309-1321.
A model for the tertiary structure of mammalian mitochondrial transfer RNA lacking the entire "dihydrouridine" loop and stem.
- Dehihas, N., Andersen, J. & Singhal, R. P. (1984). *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **31**, 161-190.
Structure, function and evolution of 5S ribosomal RNAs.
- Delk, A. S. & Rabinowitz, J. C. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 528-530.
Biosynthesis of ribosylthymine in the transfer RNA of *Streptococcus faecalis*: A folate-dependent methylation not involving S-adenocylmethionine.
- Denman, R., Weitzmann, C., Cunningham, P. R., Nègre, D., Nurse, K., Colgan, J., Pan, Y., Miedel, M. & Ofengand, J. (1989a). *Biochemistry* **28**, 1002-1011.
In vitro assembly of 30S and 70S bacterial ribosomes from 16S RNA containing single base substitutions, insertions, and deletions around the decoding site (C1400).
- Denman, R., Nègre, D., Cunningham, P. R., Nurse, K., Colgan, J., Weitzmann, C. & Ofengand, J. (1989b). *Biochemistry* **28**, 1012-1019.
Effect of point mutations in the decoding site (C1400) region of 16S ribosomal RNA on the ability of ribosomes to carry out individual steps of protein synthesis.
- Dickerman, H. W., Steers, E. Jr., Redfield, B. G. & Weissbach, H. (1967). *J. Biol. Chem.* **242**, 1522-1525.
Methionyl soluble RNA transformylase. I. Purification and partial, characterization.
- Dock-Brégon, A. C. & Moras, D. (1987). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantative Biology*, Vol. LII Cold Spring Harbor Laboratory.
Conformational changes and dynamics of tRNA : evidence from hydrolysis pattern.
- Dock-Brégon, A. C., Westhof, E., Giegé, R. & Moras, D. (1989). *J. Mol. Biol.* **207**, 707-722.
Solution structure of a tRNA with a large variable region : yeast tRNA^{Ser}.
- Dondon, J., Plumbridge, J. A., Hershey, J. W. B. & Grunberg-Manago, M. (1985). *Biochimie* **67**, 643-649.
Overproduction and purification of initiation factor IF2 and pNUSA proteins from a recombinant plasmid bearing strain

- Doubnof, J. S., Lockwood, A. H. & Maitra, U. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 2884-2894.
Studies on the role of guanosine triphosphate in polypeptide chain initiation in *E. coli*.
- Douthwaite, S., Christensen, A. & Garrett, R. A. (1983). *J. Mol. Biol.* **169**, 249-279.
Higher order structure in the 3'-minor domain of small subunit ribosomal RNAs from a gram negative bacterium, a gram positive bacterium and a eukaryote.
- Draper, D. E. (1987). *Dans* Translational regulation of gene expression. (Ilan, J. ed.), Plenum Press. New York. pp. 1-26.
Translational regulation of ribosomal proteins in *Escherichia coli*.
- Draper, D. E. (1989). *TIBS* **14**, 335-338.
How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autoregulated ribosomal proteins.
- Dreyfus, M. (1988). *J. Mol. Biol.* **204**, 79-94.
What constitutes the signal for the initiation of protein synthesis on *Escherichia coli* mRNA?
- Dube, S. K., Macker, K. A., Clark, B. F. C. & Cory, S. (1968). *Nature* (London) **218**, 231-233.
- Dumas, P., Moras, D., Florentz, C., Giegé, R., Verlaan, P., Van Belkum, A. & Pleij, C. W. A. (1987). *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 707-728.
3-D graphics modelling of the tRNA-like 3'-end of turnip yellow mosaic virus RNA : Structural and functional implications.
- Ebel, J. P., Renaud, M., Dietrich, A., Fasiolo, F., Keith, G., Favorova, O., Vassilenko, S., Baltzinger, M., Ehrlich, R., Remy, P., Bonnet, J. & Giegé, R. (1979). *Dans* Transfer RNA : structure, properties, and recognition (eds. Schimmel, P., Söll, D. & Abelson, J. N.), pp. 325-343.
Interaction between tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase in the valine and phenylalanine systems from yeast.
- Ehresmann, B., Backendorf, C., Ehresmann, C., Millon, R. & Ebel J. P. (1980). *Eur. J. Biochem.* **104**, 255-262.
Effect of UV irradiation on 30S ribosomal subunits. Identification of the RNA region cross-linked to proteins S7.
- Ehresmann, C., Millon, R., Ehresmann, B., Ebel, J. P., Nurse, K. & Ofengand, J. (1984). *Biochemistry* **23**, 429-437.
Crosslinking of the anticodon of *Escherichia coli* and *B. subtilis* acetylvalyl-tRNA to the ribosomal P site. Characterization of a unique crosslinking site in both *E. coli* and yeast ribosomal RNA.
- Ehresmann, C., Moine, H., Mougél, M., Dondon, J., Grunberg-Manago, M., Ebel, J. P. & Ehresmann, B. (1986). *Nucleic Acids Res.* **14**, 4803-4821.
Cross-linking of initiation factor IF3 to *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit by *trans*-diamminedichloroplatinum (II) : characterization of two cross-linking sites in 16S rRNA; A possible way of functioning for IF3.
- Ehresmann, C., Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Ebel, J. P. & Ehresmann, B. (1987). *Nucleic Acids Res.* **15**, 9109-9128.
Probing of the structure of RNAs in solution.
- England, T. E. & Ulenbeck, O. C. (1978). *Nature* **275**, 560-561.
3'-terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase.

- Eskin, B., Treadwell, B., Redfield, B., Sppears, C., Kung, H. & Weissbach, H. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* **189**, 531-534.
Activity of different forms of initiation factor 2 in the *In Vitro* synthesis of β -galactosidase.
- Fakunding, J. L. & Hershey, J. W. B. (1973a). *J. Biol. Chem.* **248**, 4206-4212.
The interaction of radioactive initiation factor IF2 with ribosomes during initiation of protein synthesis.
- Fakunding, J. L., Traut, R. R. & Hershey, J. W. B. (1973b). *J. Biol. Chem.* **248**, 8555-8559.
Dependence of initiation factor IF2 activity on proteins L7 and L12 from *E. coli* 50S ribosomes.
- Fellner, P. (1969). *Eur. J. Biochem.* **11**, 12-27.
- Fox, G. F. & Woese, C. R. (1975). *Nature* (London) **256**, 505-507.
5S secondary structure.
- Furois-Corbin, S. & Pullman, A. (1985). *Biophys. Chem.* **22**, 1-10.
A theoretical study of the effect of structural variations on the biochemical reactivity of yeast tRNA^{Phe} and yeast tRNA^{ASP}.
- Garret, M., Labousse, B., Litvak, S., Romby, P., Ebel, J. P. & Giegé, R. (1984). *Eur. J. Biochem.* **138**, 67-75.
Tertiary structure of animal tRNA^{Trp} in solution and interaction of tRNA^{Trp} with tryptophanyl-tRNA synthetase.
- Giri, L., Hill, W. E., Wittmann, H. G. & Wittmann-Liebold, B. (1984). *Adv. Proc. Chem.* **36**, 1-78.
Ribosomal proteins: their structure and spacial arrangement in prokaryotic ribosomes.
- Glitz, C. & Brimacombe, R. (1980). *Nucleic Acids Res.* **8**, 2377-2395.
An experimentally-derived model for the secondary structure of the 16S ribosomal RNA from *Escherichia coli*.
- Godefroy-Colburn, T., Wolfe, A. D., Dondon, J., Grunberg-Manago, M., Dessen, P. & Pantaloni, D. (1975). *J. Mol. Biol.* **95**, 461-478.
Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of *E. coli* ribosomes.
- Gold, L. (1988). *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 199-233.
Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*.
- Golinska, B., Millon, R., Backendorf, C., Olomucki, M., Ebel, J. P. & Ehresmann, B. (1981). *Eur. J. Biochem.* **115**, 479-484.
Identification of a 16-S RNA fragment crosslinked to protein S1 within *Escherichia coli* ribosomal 30-S subunits by the use of a crosslinking reagent: Ethyl 4-Azidobenzoylaminoacetimidate.
- Gornicki, P., Baudin, F., Romby, P., Wiewiorowski, M., Kryzosiak, W., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1989). *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 971-984.
Use of lead(II) to probe the structure of large RNA's. Conformation of the 3' terminal domain of *E. coli* 16S rRNA and its involvement in building the tRNA binding sites.
- Goss, D. L., Parkhurst, L. P. & Wahba, A. J. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 10119-10127.
Kinetic studies on the interaction of chain initiation factor 3 with 70S *E. coli* ribosomes and subunits.

Gottlieb, M. & Davis, B. D. (1975). *Biochemistry* 14, 1047-1051.

Irreversible step in the formation of initiation complexes of *E. coli*.

Graifer, D. M., Babkina, G. T., Matasova, N. B., Vladimirov, S. N., Karpova, G. G. & Vlassov, V. V. (1989). *Biokhim. Biophys. Acta* 1008, 146-156.

Structural arrangement of tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes, as revealed from data on affinity labelling with photoactivatable tRNA derivatives.

Gregory, R. J., Zeller, M. L., Thurlow, D. L., Gourse, R. L., Stark, M. J. R., Dahlberg, A. E. & Zimmermann, R. A. (1984). *J. Mol. Biol.* 178, 287-302.

Interaction of ribosomal proteins S6, S8, S15 and S18 with the central domain of 16S ribosomal RNA from *Escherichia coli*.

Grosjean, H., Cedergreen, R. J. & Mc Kay, W. (1982). *Biochimie* 64, 387-397.

Structure in tRNA data.

Grunberg-Manago, M. (1980). *Dans* Ribosomes: structure, function and genetics. (Chambliss, G., Craven, G. R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L. & Nomura, M., ed.), University Park Presse. Baltimore. pp. 445-477.

Initiation of protein synthesis as seen in 1979.

Gualerzi, C., Risuelo, G. & Pon, C. (1977). *Biochemistry* 16, 1684-1689.

Initial rate kinetic analysis of the mechanism of initiation complex formation and the role of IF3.

Gualerzi, C., Risuelo, G. & Pon, C. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 44-49.

Mechanism of spontaneous and IF3-induced dissociation of 30S/aminoacyl-tRNA/polynucleotide ternary complexes.

Gualerzi, C. & Pon, C. L. (1981). *Dans* Structural aspects of recognition and assembly in biological macromolecules. (M. Balaben, ed.), vol. II. ISS, Rehovot, Israel. pp. 805-826.

Protein biosynthesis in prokaryotic cells: mechanism of 30S initiation complex formation in *E. coli*.

Gualerzi, C. O., Pon, C. L., Pinolik, R. T., Canonaco, M. A., Paci, M. & Wintermeyer, W. (1986). *Dans* Structure, function and genetic of ribosomes. (Herdesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 621-641.

Role of the initiation factors in *Escherichia coli* translational initiation.

Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R. & Noller, H. F. (1985). *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 32, 156-214.

Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA.

Hansen, P. K., Wikman, F., Clark, B. F. C., Hershey, J. W. B. & Petersen, H. U. (1986).

Biochimie 68, 697-703.

Interaction between initiator Met-tRNA^{Met} and elongation factor EF-Tu from *E. coli*.

Hartz, D., McPheeters, D. S. & Gold, L. (1989). *Gene and development*. sous presse.

Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors.

Heimark, R. L., Hershey, J. W. B. & Traut, R. R. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 7779-7784.

Cross-linking of initiation factor IF2 to proteins L7/L12 in 70S ribosomes of *Escherichia coli*.

- Hershey, J. W. B. (1987). Dans "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology", Vol. I, American society for microbiology, Washington, D.C. pp. 613-640.
Protein synthesis.
- Holbrook, S. R., Sussman, J. L., Warrant, R. W., Church, G. M. & Kim, S. H. (1977).
Nucleic Acids Res. **4**, 2811-2820.
RNA-ligand interactions: (I) Magnesium binding sites in yeast tRNA^{Phe}.
- Holbrook, S. R. & Kim, S. H. (1983). *Biopolymers* **22**, 1145-1166.
Correlation between chemical modification and surface accessibility in yeast phenylalanine transfer RNA.
- Holly, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquise, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R. & Zamir, R. (1965). *Science* **147**, 1462-1465.
Structure of a ribonucleic acid.
- Hou, Y. M. & Schimmel, P. (1988). *Nature* (London) **333**, 140-145.
A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA.
- Hou, Y. M., Francklyn, C. & Schimmel, P. (1989). *TIBS* **14**, 233-237.
Molecular dissection of a transfer RNA and the basis for its identity.
- Houssier, C. & Grosjean, H. (1985). *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3**, 387-408.
Temperature jump relaxation studies on the interaction between transfer RNAs with complementary anticodon. The effect of modified bases adjacent to anticodon triplet.
- Howe, J. G. & Hershey, J. W. C. (1981). *J. Biol. Chem.* **256**, 12836-12839.
A sensitive immunoblotting method for measuring protein synthesis initiation factor level in lysates of *E. coli*.
- Huang, K., Fairclough, R. H. & Cantor, C. R. (1975). *J. Mol. Biol.* **97**, 443-470.
Single energy transfer of the arrangement of proteins in the 30S *Escherichia coli* ribosome.
- Hui, A. S., Eaton, H. D. & A. de Boer, H. (1988). *EMBO J.* **7**, 4383-4388.
Mutagenesis at the mRNA decoding site in the 16S ribosomal RNA using the specialized ribosome system in *Escherichia coli*.
- Jack, A., Ladner, J. E. & Klug, A. (1976). *J. Mol. Biol.* **108**, 619-649.
Crystallographic refinement of Yeast phenylalanine transfer RNA at 2,5 Å resolution.
- Jack, A., Ladner, J. E., Rhodes, D., Brown, R. S. & Klug, A. (1977). *J. Mol. Biol.* **111**, 315-328.
A crystallographic study of metal binding to yeast phenylalanine transfer RNA.
- Jay, G. & Kaempfer, R. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 5742-5748.
Initiation of protein synthesis. Binding of mRNA.
- Jensen, R. E. & Reid, D. J. (1978). *Biochemistry* **17**, 5098-5107.
Reaction of DNA with alkylating reagents.
- Johnson, A. E., Janiak, F., Dell, V. A. & Abrahamson, J. K. (1986). Dans Structure, function and genetic of ribosomes. (Herdesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 541-555.
The aminoacyl-tRNA/elongation factor Tu/GTP ternary complex and its role in aminoacyl-tRNA selection at the ribosome.

- Jones, T. A. (1978). *J. Appl. Cryst.* **11**, 268.
A graphic model building and refinement system for macromolecule.
- Jorgensen, T., Siboska, G. E., Wikman, F. P. & Clark, B. F. (1985). *Eur. J. Biochem.* **153**, 203-209.
Different conformation of tRNA in the ribosomal P site and A site.
- Jurnak, F. (1985). *Science* **230**, 32-36.
Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to *ras* oncogene proteins.
- Kay, A., Sander, G. & Grunberg-Manago, M. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**, 979-986.
Effect of ribosomal protein L12 upon initiation factor IF-2 activities.
- Kaempfer, R. (1974). *Dans Ribosomes*. (Nomura, M., Tissieres, A. & Lengyel, P., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp. 679-704.
The ribosome cycle.
- Kikuchi, Y., Ando, Y. & Shiba, T. (1986) *Nature* (London) **323**, 824-826.
Unusual priming mechanism of RNA-directed DNA synthesis in *copia* retrovirus-like particles of *Drosophila*.
- Kirillev, S. V., Makarov, E. M. & Semenov, Y. P. (1983). *FEBS Lett.* **157**, 91-94.
Quantitative study of interaction of deacylated tRNA with *Escherichia coli* ribosomes.
- Kisselev, L. L. (1985). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **32**, 237-266.
The role of the anticodon in recognition of tRNA by aminoacyl-tRNA synthetase.
- Konnert, J. T. & Hendrickson, W. (1980). *Acta Cryst.* **A36**, 344-.
- Kossel, H. & RajBhandary, U. L. (1968). *J. Mol. Biol.* **35**, 539-560.
- Kozak, M. (1983). *Microbiol. Rev.* **47**, 1-45.
Comparison of initiation of protein synthesis in Procaryotes, Eucaryotes, and Organelles.
- Kusmirek, J. T. & Singer, B. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **442**, 420-431.
Sites of alkylation of poly U by agents of varying carcinogenicity and stability of products.
- La Cour, F. M., Nyborg, J., Thirup, S. & Clark, B. F. C. (1985). *EMBO J.* **4**, 2385-2388.
Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography.
- Lake, J. A. (1985). *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 507-530.
Evolving ribosome structure: Domains in archaeobacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes.
- La Rossa, R. & Söll, D. (1980). *Dans Transfer RNA* (ed. Altman), Cell Monograph Series, MIT Press, pp 136-167.
Other roles of tRNA.
- Lavery, R. & Pulman, A. (1984). *Biophys. Chem.* **19**, 171-181.
A new theoretical index of biochemical reactivity combining steric and electrostatic factors: An application to yeast tRNA^{Phe}.

- Lempereur, L., Nicoloso, M., Riehl, N., Ehresmann, C., Ehresmann, B. & Bachellerie, J. P. (1985). *Nucleic Acids Res.* **13**, 8339-8357.
Conformation of *Yeast* 18S rRNA. Direct chemical probing of the 5' domain in ribosomal subunits and in deprotonized RNA by reverse transcriptase mapping of dimethylsulfate-accessible sites.
- Leon, O. & Schulman, L. H. (1987). *Biochemistry* **26**, 5416-5422.
tRNA recognition site of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase.
- Lill, R., Robertson, J. M. & Wintermeyer, W. (1984). *Biochemistry* **23**, 6710-6717.
tRNA binding sites of ribosomes from *Escherichia coli*.
- Lill, R., Robertson, J. M. & Wintermeyer, W. (1989). *EMBO J.* **8**, 3933-3938.
Binding of the 3' terminus of tRNA to 23S RNA in the ribosomal exit site actively promotes translocation.
- Lochrie, M. A., Hurley, J. B. & Simon, M. I. (1985). *Science* **228**, 96-99.
Sequence of the alpha subunit of photoreceptor G protein: Homologies between transducin, *ras*, and elongation factors.
- Lockwood, A. H., Maitra, U., Brot, N. & Weissbach, H. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**, 1213-1218.
The role of ribosomal proteins L7 and L12 in polypeptide chain initiation in *E. coli*.
- Lotti, M., Noah, M., Stöffler-Meilick, M. & Stöffler, G. (1989). *Mol. Gen. Genet.* **216**, 245-253.
Localization of protein L4, L5, L20 and L25 on the ribosomal surface by immuno electron microscopy.
- Maitra, U., Stringer, E. A. & Chaudhuri, A. (1982). *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 869-900.
Initiation factors in protein biosynthesis.
- McClain, W. H. & Foss, K. (1988). *Science* **240**, 793-796.
Changing the identity of a tRNA by introducing a G-U wobble pair near the 3' acceptor end.
- McDonald, J. J. & Rein, R. (1987). *J. Biol. Struct. Dynam.* **4**, 729-744.
A stereochemical model of the transpeptidation complex.
- Metz-Boutigue, M. H., Reinbolt, J., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1989). *FEBS Lett.* **245**, 194-200.
Crosslinking of elongation factor Tu to tRNA^{Phe} by *trans*-diamminedichloroplatinum (II).
- Moazed, D. & Noller, H. F. (1986). *Cell* **47**, 985-994.
Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes.
- Moazed, D. & Noller, H. F. (1987). *Nature (London)* **327**, 389-394.
Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA.
- Moazed, D., Robertson, J. M. & Noller, H. F. (1988). *Nature (London)* **334**, 362-364.
Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA.
- Moazed, D. & Noller, H. F. (1989a). *Cell* **57**, 585-597.
Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites.
- Moazed, D. & Noller, H. F. (1989b). *Nature (London)* **342**, 142-148.
Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome.

- Moine, H., Bienaimé, C., Mougél, M., Reinbolt, J., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1988a). *FEBS Lett.* **228**, 1-6.
Cross-linking of ribosomal protein S18 to 16S rRNA in *E. coli* ribosomal subunit by use of reversible cross-linking agent: *trans*-diamminedichloroplatinum (II).
- Moine, H., Romby, P., Springer, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1988b). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7892-7896.
Messenger RNA structure and gene regulation at the translational level in *Escherichia coli*: The case of threonine: tRNA^{Thr} ligase.
- Moine, H., Romby, P., Springer, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1990). soumis à *Cell*
tRNA^{Thr} acts as antirepressor for the synthesis of threonyl-tRNA synthetase.
- Moldave, K. (1985). *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1109-1149.
Eukaryotic protein synthesis.
- Moras, D., Dock, A. C., Dumas, P., Westhof, E., Romby, P., Ebel, J. P. & Giegé, R. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 932-936.
Anticodon-anticodon interaction induces conformational changes in tRNA: Yeast tRNA, a model for tRNA-mRNA recognition.
- Mougél, M., Eyermann, F., Westhof, E., Romby, P., Expert-Bezançon, A., Ebel, J. P., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1987). *J. Mol. Biol.* **198**, 91-107.
Binding of *Escherichia coli* ribosomal protein S8 to 16S rRNA.
- Mougél, M., Philippe, C., Ebel, J. P., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 2825-2839.
The *E. coli* 16S rRNA binding site of ribosomal protein S15: higher-order structure in the absence and in the presence of the protein.
- Muralikrishna, P. & Wickstrom, E. (1989). *Biochemistry* **28**, 7505-7510.
Escherichia coli initiation factor 3 protein binding to 30S ribosomal subunits alters the accessibility of nucleotides within the conserved central region of 16S rRNA.
- Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T. & Yokoyama, S. (1988). *Nature (London)* **336**, 179-181.
Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification.
- Murgola, E. J., Hijazi, K. A., Göringer, H. U. & Dahlberg, A. E. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4162-4165.
Mutant 16S ribosomal RNA: A codon-specific translational suppressor.
- Nagano, K. & Harel, M. (1987). *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Pergamon Press, **48**, pp. 67-101.
Approaches to a three-dimensional model of *E. coli* ribosome.
- Nierenberg, M. & Leder, P. (1964). *Science* **145**, 1399-1407.
- Noll, M., Hapke, B. & Noll, H. (1973). *J. Mol. Biol.* **80**, 519-530.
Structural dynamics of bacterial ribosomes. II. Preparation and characterization of ribosomes and subunits active in the translation of natural mRNA.

- Noll, M. & Noll, H. (1976). *J. Mol. Biol.* **105**, 111-127.
Structural dynamics of bacterial ribosomes. V. Magnesium-dependent dissociation of tight couples into subunits: measurements of dissociation constants and exchange rates.
- Noller, H. F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R. R., Kopylov, A. M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D. A., Gupta, R. & Woese, C. R. (1981). *Nucleic Acids Res.* **9**, 6167-6189.
Secondary structure model for 23S ribosomal RNA.
- Noller, H. F. (1984). *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 119-1162.
Structure of ribosomal RNA.
- Nomura, M., Gourse, R. & Baughman, G. (1984). *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 75-117.
Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components.
- Normanly, J., Ogden, R. C., Horvath, S. J. & Abelson, J. (1986). *Nature (London)*. **330**, 221-219.
Changing the identity of a transfer RNA.
- Nowotny, V., May, R. P. & Nierhaus, K. H. (1986). *Dans Structure, function and genetic of ribosomes.* (Herdesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 101-111.
Neutron-scattering analysis of structural and functional aspects of the ribosome: The strategy of the glassy ribosome.
- Nowotny, V., Nowotny, P., Voss, H., Fehner, U., Nierhaus, K. H. & May, R. P. (1989). Poster presentation dans *ASM conference on ribosomes*. Glacier Park, Montana, U. S. A.
Shapes and distances of components within the ribosome measured with neutron-small-angle-scattering.
- Oakes, M., Henderson, E., Scheinman, A., Clark, M. & Lake, J. A. (1986). *Dans Structure, function and genetic of ribosomes.* (Hardesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 47-67.
Ribosome structure, function, and evolution: Mapping ribosomal RNA, proteins, and functional sites in three dimensions.
- Ofengand, J. & Chen, C. M. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 2049-2058.
Inactivation of Tu factor-guanosine triphosphate recognition and ribosome-binding ability by terminal oxidation-reduction of yeast phenylalanine tRNA.
- Ofengand, J. (1980). *Dans Ribosomes: structure, function and genetics.* (Chambliss, G., Craven, G. R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L. & Nomura, M., ed.), University Park Press, Baltimore. pp. 497-529.
The topography of tRNA binding sites on ribosome.
- Ofengand, J. (1982). *Dans Protein synthesis in eukaryotes*, (ed. Perez-Bercoff). pp. 1-67.
Structure and function of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase in eukaryotes.
- Ofengand, J., Ciesilka, J., Denman, R. & Nurse, K. (1986). *Dans Hardesty, B. & Kramer, G. (ed.), Structure, function and genetic of ribosomes.* Springer-Verlag, New York. pp. 473-494.
Ribosomal RNA at the decoding site of the tRNA-ribosome complex.
- Österberg, R., Elias, P., Kjems, J. & Bauer, R. (1986). *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3** 1111-1120.
A neutron scattering study of the ternary complex EF-Tu-GTP-valyl-tRNA^{Val}_{1A}.
- Paci, M., Pon, C., Lammi, M. & Gualerzi, C. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 9628-9634.
Characterization of IF3 by high resolution ¹H-NMR spectroscopy.

- Park, S. J. & Schimmel, P. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 16527-16530.
Evidence for interaction of an aminoacyl transfer RNA synthetase with a region important for the identity of its cognate transfer RNA.
- Paulsen, H., Robertson, J. M. & Wintermeyer, W. (1983). *J. Mol. Biol.* **167**, 411-426.
Topological arrangement of two tRNAs on the ribosome. Fluorescence energy transfer measurements between A and P site-bound tRNA^{Phe}.
- Pawlik, R. T., Littlechild, J., Pon, C. & Gualerzi, C. (1981). *Biochem. Internat.* **2**, 421-428.
Purification and properties of *E. coli* translational initiation factors.
- Peattie, D. A. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **76**, 1760-1764.
Direct chemical method for sequencing RNA.
- Peattie, D. A. & Herr, W. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **78**, 2273-2277.
Chemical probing of the tRNA-ribosome complex.
- Pelka, H. & Schulman, L. H. (1986). *Biochemistry* **25**, 4450-4456.
Study of the interaction of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase with tRNA^{fMet} using chemical and enzymatic probes.
- Perona, J. J., Steitz, T. A. & Söll, D. (1987). Affiche présentée au congrès *Crystal growth of biological macromolecules*. (Le Bischoff, France).
Crystallization of a transfer RNA-aminoacyl-tRNA synthetase complex.
- Petersen, H. U., Roll, T., Grunberg-Manago, M. & Clark, B. F. C. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1068-1074.
Specific interaction of IF2 of *E. coli* with fMet-tRNA^{fMet}.
- Petersen, H. U., Kruse, T. A., Lenhard-Worm, H., Siboska, G. E., Clark, B. F. C., Boutorin, A. S., Remy, P., Ebel, J. P., Dondon, J. & Grunberg-Manago, M. (1981). *FEBS Lett.* **128**, 161-165.
A study of the interaction of *Escherichia coli* initiation factor IF2 with formylmethionyl-tRNA^{fMet} by partial digestion with cobra venom ribonuclease.
- Petersen H. U., Wikman, F. P., Siboska, G. E., Worm-Leonhard, H & Clark, B. F. C. (1983).
Alfred Benzon Symposium 19. Munksgaard, Copenhagen. *Dans Gene expression*. (Clark, B. F. C. & Petersen, H. U. ed.), pp. 41-57.
Interaction between methionine-accepting tRNAs and proteins during initiation of prokaryotic translation.
- Petzko, G. A. (1985). *Methods in Enzymology* **114**, 147-157.
Preparation of isomorphous heavy-atom derivatives.
- Philippe, C., Portier, C., Mougél, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1990). *J. Mol. Biol.* sous presse.
The target site of *E. coli* ribosomal protein S15 on its messenger RNA. Conformation and interaction with the protein.
- Philipps, G. R. & Chiemparsert, T. (1975). *Hoppe Seyler's Physiology Chemistry* **356** 1097-1104.
Limited hydrolysis of tRNA by phosphodiesterase.

- Plumbridge, A. J., Deville, F., Sacerdot, C., Petersen, H. U., Cenatiempo, Y., Cozzzone, A., Grunberg-Manago, M. & Hershey, J. W. B. (1985). *EMBO J.* **4**, 223-229.
Two translational initiation sites in the *infB* gene are used to express initiation factor IF2 α and IF2 β in *E. coli*.
- Podkownski, J. & Gornicki, P. (1989). *Nucleic Acids Res.* **17**, 8767-8781.
Ribosomal proteins S7 and L1 are located close to the decoding site of *E. coli* ribosome - affinity labeling studies with modified tRNAs carrying photoreactive probes attached adjacent to the 3'-end of the anticodon.
- Pon, C. L., Wittmann-Liebold, B. & Gualerzi, C. (1979). *FEBS Lett.* **101**, 157-160.
Elucidation of the primary structure of initiation factor IF1. Structure-function relationship in *E. coli* initiation factors.
- Pon, C. L., Paci, M., Pawlik, R.T. & Gualerzi, C. O. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 8918-8924.
Biochemical and biophysical characterization of the interaction between IF2 and guanosine nucleotides.
- Portier, C., Dondon, J. & Grunberg-Manago, M. (1990). *J. Mol. Biol.* sous presse
Translational autocontrol of the *Escherichia coli* ribosomal protein S15.
- Prince, J. B., Taylor, B. H., Thurlow, D. L., Ofengand, J. & Zimmermann, R. A. (1982).
Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. **79**, 5450-5454.
Covalent cross-linking of tRNA^{Val} to 16S rRNA at ribosomal P site: Identification of cross-linked residues.
- Quigley, G. J., Wang, A., Seeman, N. C., Suddath, F. L., Rich, A., Sussman, J. L. & Kim, S. H. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **72**, 4866-4870.
Hydrogen bonding in yeast tRNA^{Phe}.
- Quigley, G. J., Teeter, M. M. & Rich, A. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **75**, 64-68.
Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA.
- Rabinowitz, J. C. (1963). *Methods in Enzymology* **6**, 814-815.
Preparation and properties of 5, 10-methenyltetrahydrofolic acid and 10-formyltetrahydrofolic acid.
- Ravel, J. M., Shore, R. L. & Shive, V. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 68-73.
Evidence for a guanosine nucleotide-aminoacyl-RNA complex as an intermediate in the enzymatic transfer of an aminoacyl-RNA to ribosome.
- Rheinberger, H. J., Sternbach, H. & Nierhaus, K. H. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **78**, 5310-5314.
Three tRNA binding sites on *E. coli* ribosomes.
- Rheinberger, H. J. & Nierhaus, K. H. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4213-4217.
Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle.
- Richmond, T. J. (1984). *J. Mol. Biol.* **178**, 63-89.
Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins.
- Riel, N., Remy, P., Ebel, J. P. & Ehresmann B. (1982). *Eur. J. Biochem.* **128**, 427-433.
Crosslinking of N-Acetyl-phenylalanyl-[S⁴U]tRNA^{Phe} to protein S10 in the ribosomal P site.
- Riel, N., Giegé, R., Ebel, J. P. & Ehresmann B. (1983). *FEBS Lett.* **145**, 42-46.
Effect of elongation factor Tu on the conformation of phenylalanyl-tRNA^{Phe}.

- Roberts, J. J. & Thomson, A. J. (1979). *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **22**, 71-133.
The mechanism of action of antitumor platinum compounds.
- Robertson, J. M., Paulsen, H. & Wintermeyer, W. (1986). *J. Mol. Biol.* **192**, 351-360.
Pre-steady-state kinetics of ribosomal translocation.
- Robertson, J. M. & Wintermeyer, W. (1987). *J. Mol. Biol.* **196**, 525-540.
Mechanism of ribosomal translocation. tRNA binds transiently to an exit site before leaving the ribosome during translocation.
- Rogers, M. J. & Söll, D. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6627-6631.
Discrimination between glutamyl-tRNA synthetase and seryl-tRNA synthetase involves nucleotides in the acceptor helix of tRNA.
- Romby, P., Moras, D., Bergdoll, M., Dumas, P., Vlassov, V. V., Westhof, E., Ebel, J. P. & Giegé, R. (1985). *J. Mol. Biol.* **184**, 455-471.
Yeast tRNA^{Asp} tertiary structure in solution and areas of interaction of the tRNA with aspartyl-tRNA synthetase.
- Romby, P., Moras, D., Dumas, P., Ebel, J. P. & Giegé, R. (1987). *J. Mol. Biol.* **195**, 193-204.
Comparison of the tertiary structure of yeast tRNA^{Asp} and tRNA^{Phe} in solution. Chemical modification study of the bases.
- Rould, M. A., Perona, J. J., Söll, D. & Steitz, T. A. (1989). *Science* **246**, 1135-1142.
Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8 Å resolution.
- Rubin, J. R., Sabat, M. & Sundaralingam, M. (1983). *Nucleic Acids Res.* **11**, 6571-6586.
Similar binding of the carcinostatic drugs *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] and [Ru(NH₃)₅Cl]Cl₂ to tRNA^{Phe} and a comparison with the binding of the inactive *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] complex - reduction in binding to Watson-Crick base pairs within double helix.
- Ruff, M., Cavarelli, J., Mikol, V., Lorber, B., Mitschler, A., Giegé, R., Thierry, J. C. & Moras, D. (1988). *J. Mol. Biol.* **210**, 235-236.
A high resolution diffracting crystal form of the complex between yeast tRNA^{Asp} and aspartyl-tRNA synthetase.
- Sacerdot, C., Dessen, P., Hershey, J. W. B., Plumbridge, J. A. & Grunberg-Manago, M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **81**, 7787-7791.
Sequence of the initiation factor IF2 gene: unusual protein features and homologies with elongation factors.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463-5467.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
- Schevitz, R. W., Podjarny, A. D., Kirchnamachari, N., Hughes, J. J., Sigler, P. B. & Sussman, J. L. (1979). *Nature (London)* **278**, 188-190.
Crystal structure of an eukaryotic initiator tRNA.
- Schimmel, P. & Söll, D. (1979). *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 601-648.
Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs.
- Schimmel, P. & Redfield, A. G. (1980). *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.* **9**, 181-221.
Transfer tRNA in solution: selected topics.

- Schimmel, P. (1987). *Annu. Rev. Biochem.* 56, 125-158.
Aminoacyl tRNA synthetases: General scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs.
- Schimmel, P. (1989). *Biochemistry* 28, 2747-2759.
Parameters for the molecular recognition of transfer RNAs.
- Schleich, T., Wickstrom, E., Twombly, K., Schmidt, B. & Tyson, R. W. (1980). *Biochemistry* 19, 4486-4492.
Circular dichroism study of *E. coli* IF3 binding to nucleic acids.
- Schön, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, G. & Söll, D. (1986). *Nature* (London). 322, 281-284.
The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA.
- Schulmann, L. H. & Pelka, H. (1977). *Biochemistry* 16, 4256-4265.
Structural requirements for aminoacylation of *E. coli* tRNA^{Met}.
- Schulmann, L. H. & Pelka, H. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6755-6759.
Anticodon loop size and sequence requirements for recognition of formylmethionine tRNA by methionyl-tRNA synthetase.
- Seong, B. L. & RajBhandary U. L. (1987a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 334-338.
Escherichia coli formylmethionine tRNA: Mutations in GGG_{CCC} sequence conserved in anticodon stem of initiator tRNAs affect initiation of protein synthesis and conformation of anticodon loop.
- Seong, B. L. & RajBhandary U. L. (1987b). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8859-8863.
Mutants of *Escherichia coli* formylmethionine tRNA: A single base change enables initiator tRNA to act as an elongator *in vitro*.
- Shinagawa, M. & Padmanabhan, R. (1979). *Anal. Biochem.* 95, 458-464.
Inhibition of a nuclease contaminant in the commercial preparation of *E. coli* alkaline phosphatase.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1342-1346.
The 3' terminal sequence of *E. coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosomal binding sites.
- Shooter, et al., (1972). *Chem. Biol. Inter.* 5, 289-
- Sigmund, C., Ettayebi, M. & Morgan, E. (1984). *Nucleic Acids Res.* 12, 4653-4663.
Antibiotic resistance mutations in the 16S and 23S ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*.
- Silberklang, M., Gillum, A. M. & RajBhandary, C. L. (1977). *Nucleic Acids Res.* 4, 4091-4108.
The use of P₁ nuclease in sequence analysis of end-group labeled RNA.
- Singer, B. (1976). *Nature* (London) 264, 333-339.
All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents.
- Singer, B. & Fraenkel-Conrat, H. (1975). *Biochemistry* 14, 772-782.
The specificity of different classes of ethylating agents toward various sites in RNA.

- Sinha, N. D., Biernat, J., McManus, J. M. & Köster, H. (1984). *Nucleic Acids Res.* **12**, 4539-4557.
Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of β -cyanoethyl-N, N-dialkylamino-/N-morpholinophosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product.
- Spirin, A. S. (1983). *FEBS Lett.* **156**, 217-221.
Location of tRNA on the ribosome.
- Spirin, A. S. & Lim, V. I. (1986). *Dans Structure, function and genetic of ribosomes.* (Herdesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 556-572.
Stereochemical analysis of ribosomal transpeptidation, translocation, and nascent peptide folding.
- Springer, M., Plumbridge, J. A., Botler, J. S., Graffe, M., Dondon, J., Mayaux, J. F., Fayat, G., Lestienne, P., Blanquet, S. & Grunberg-Manago, M. (1985). *J. Mol. Biol.* **185**, 93-104.
Autogenous control of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase expression *in vivo*.
- Sprinzi, M., Hartmann, T., Weber, J., Blank, J. & Zeidler, R. (1989). *Nucleic Acids Res.* **17**, r1-r172.
Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes.
- Spitnik-Elson, P., Elson, D., Avital, S. & Abramowitz, R. (1985). *Nucleic Acids Res.* **13**, 4719-4738.
Long range RNA-RNA interactions in the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli*.
- Stern, S., Weiser, B. & Noller, H. F. (1988). *J. Mol. Biol.* **204**, 447-481.
Model for the three-dimensional folding of 16S ribosomal RNA.
- Stern, S., Powers, T., Changchien, L. & Noller, H. F. (1989). *Science* **244**, 783-790.
RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunits: Folding and function of 16S rRNA.
- Stiegler, P., Carbon, P., Zuker, M., Ebel, J. P. & Ehresmann, C. (1981). *Nucleic Acids Res.* **9**, 2153-2172.
Structural organization of the 16S ribosomal RNA from *E. coli*. Topography and secondary structure.
- Stöffler, G. & Stöffler-Meilicke, M. (1986). *Dans Structure, function, and genetics of ribosomes.* (Hardesty, B. & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 28-46.
Immuno electron microscopy of *Escherichia coli* ribosomes.
- Sundaralingam, M., Brennen, T., Yathindra, M. & Ichikawa, T. (1975). *Dans Structure and conformation of nucleic acids and protein interaction*, (eds. Sundaralingam, M. & Rao, S. M.) University Park Press, Baltimore, pp. 101-115.
Stereochemistry of mRNA (codon)-tRNA (anticodon) interaction on the ribosome.
- Sussman, J. L., Holbrook, S. R., Warrant, W. R., Church, G. M. & Kim, S. H. (1978). *J. Mol. Biol.* **123**, 607-630.
Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA I. Crystallographic refinement.
- Suttle, D. P. & Ravel, J. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 386-393.
The effects of initiation factor 3 on the formation of 30S initiation complexes with synthetic and natural messengers.
- Thompson, J. F. & Hearst, J. E. (1983). *Cell* **32**, 1355-1365.
Structure-function relations in *E. coli* 16S rRNA.

- Thurlow, D. L., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1983). *Nucleic Acids Res.* **11**, 6787-6802.
Nucleotides in 16S rRNA that are required in unmodified form for features recognized by ribosomal protein S8.
- Trakahanov, S., Yusupov, M., Shirokov, V., Garver, M., Mitschler, A., Ruff, M., Thierry, J. C. & Moras, D. (1989). *J. Mol. Biol.* **209**, 327-328.
Preliminary X-ray investigation of 70S ribosome crystals from *Thermus thermophilus*.
- Traverse, A. A., Debenham, P. G. & Pongs, O. (1980). *Biochemistry* **19**, 1651-1656.
Translational initiation factor 2 alters transcriptional selectivity of *E. coli* ribonucleic acid polymerase.
- Tremp, M. R., Ohgi, K. & Glitz, D. G. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 9822-9829.
- Traut, R. P., Lambert, J. M., Boileau, G. & Kenny, J. W. (1980). *Dans Ribosomes, Structure, function and genetics.* (Chambliss, G., Craven, C. R., Davis, J. D., Kahan, L. & Nomura, M., ed.), University Park Press, Baltimore. pp. 89-110.
Protein topography of *Escherichia coli* ribosomal subunits as inferred from protein crosslinking.
- Tukalo, M. A., Kubler, M. D., Kern, D., Mougél, M., Ehresmann, C., Ebel, J. P., Ehresmann, B. & Giegé, R. (1987). *Biochemistry* **26**, 5200-5208.
Trans-diamminedichloroplatinum (II), a reversible RNA-protein cross-linking agent. Application to the ribosome and to an aminoacyl-tRNA synthetase/tRNA complex.
- Van der Hofstad, G. A. J. M., Foekens, J. A., Bosch, L. & Voorma, H. O. (1977). *Eur. J. Biochem.* **77**, 69-75.
The involvement of a complex between formylmethionyl-tRNA and initiation factor IF2 in prokaryotic initiation.
- Van Stolk, B. J. & Noller H. F. (1984). *J. Mol. Biol.* **180**, 151-177.
Chemical probing of conformation in large RNA molecules. Analysis of 16S ribosomal RNA using diethylpyrocarbonate.
- Vassilenko, S. K., Carbon, P., Ebel, J. P. & Ehresmann, C. (1981). *J. Mol. Biol.* **119**, 51-59.
Topography of 16S rRNA in 30S subunit and 70S ribosomes. Accessibility to cobra venom ribonuclease.
- Vlassov, V. V., Giegé, R. & Ebel, J. P. (1981). *Eur. J. Biochem.* **119**, 51-59.
Tertiary structure of tRNAs in solution monitored by phosphodiester modification with ethylnitrosourea.
- Vlassov, V. V., Kern, D., Romby, P., Giegé, R. & Ebel, J. P. (1983). *Eur. J. Biochem.* **132**, 537-544.
Interaction of tRNA^{Val} with aminoacyl-tRNA synthetases: a chemical modification study.
- Wagenknecht, T., Frank, J., Boublik, M., Nurse, K. & Ofengand, J. (1988). *J. Mol. Biol.* **203**, 753-760.
Direct localization of the tRNA-anticodon interaction site on the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit by electron microscopy and computerized image averaging.
- Wahba, A. J., Iwasaki, K., Miller, M. J., Sabol, S., Sillero, M. A. G. & Vasquez, C. (1969). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**, 291-299.
Initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*, II. Role of the initiation factors in polypeptide synthesis.
- Walleczek, J., Schüler, D., Stöffler-Meilicke, M., Brimacombe, R. & Stöffler, G. (1989a). *EMBO J.* **7**, 3571-3576.
A model for the spatial arrangement of the proteins in the large subunit of the *Escherichia coli* ribosome.

- Walleczek, J., Martin, T., Redl, B., Stöffler-Meilick, M. & Stöffler, G. (1989b). *Biochemistry* 28, 4099-4105.
Comparative cross-linking study on the ribosomal subunit from *Escherichia coli*.
- Weiel, J. & Hershey, J. W. B. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 1215-1220.
The binding of fluorescein-labeled protein synthesis initiation factor 2 to *E. coli* 30S ribosomal subunits determined by fluorescence polarization.
- Weiss, R. B., Dunn, D. M., Dahlberg, A. E., Atkins, J. F. & Gesteland, R. F. (1988). *EMBO J.* 7, 1503-1507.
Reading frame switch caused by base-pair formation between the 3' end of 16S rRNA and the mRNA during elongation of protein synthesis in *Escherichia coli*.
- Westhof, E., Dumas, P. & Moras, D. (1985). *J. Mol. Biol.* 184, 119-145.
Crystallographic refinement of Yeast aspartic acid transfer RNA.
- Westhof, E. & Sundaralingam, M. (1986). *Biochimie*, 25, 4868-4878.
Restrained refinement of the monoclinic form of yeast phenylalanine transfer RNA. Temperature factors and dynamics, coordinated waters and base-pair propeller twist angle.
- Westhof, E. (1988). *Dans* Computer aided molecular design (I. B. C. technical service Ltd. London).
Computer-aided structural biochemistry of nucleic acid.
- Westhof, E., Romby, P., Roumaniuk, P. J., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1989). *J. Mol. Biol.* 207, 417-431.
Computer modeling from solution data of *spinach* chloroplast and *Xenopus laevis* somatic and oocyte 5S rRNAs.
- Wikman, F. P., Siboska, G. E., Petersen, H. U. & Clark, B. F. C. (1982). *EMBO J.* 1, 1095-1100.
The site of interaction of aminoacyl-tRNA with elongation factor Tu.
- Wikman, F. P., Romby, P., Reinbolt, J., Clark, B. F. C., Ebel, J. P., Ehresmann, C. & Ehresmann, B. (1987). *Nucleic Acids Res.* 15, 5787-5801.
Cross-linking of elongation factor Tu to tRNA^{Phe} by *trans*-diamminedichloroplatinum (II). Characterization of two cross-linking sites in the tRNA.
- Wintermeyer, W. & Gualerzi, C. (1983). *Biochemistry* 22, 690-694.
Effect of *E. coli* initiation factors on the kinetics of N-Acphe-tRNA binding to 30S ribosomal subunits. A fluorescence stopped flow study.
- Wishnia, A., Bousset, A., Graffe, M., Dessen, P. & Grunberg-Manago, M. (1975). *J. Mol. Biol.* 93, 499-515.
Kinetics of the reversible association of ribosomal subunits: stopped-flow studies of the rate law and of the effect of Mg²⁺.
- Wittmann, H. G. (1982). *Annu. Rev. Biochem.* 51, 155-183.
Components of bacterial ribosome.
- Wittmann-Liebold, B. (1986). *Dans* Structure, function, and genetics of ribosomes. (Hardesty, B & Kramer, G., ed.), Springer-Verlag, New York. pp. 326-361.
Ribosomal proteins and their structure and evolution.