

Le rayonnement synchrotron et le ribosome.

Rozenberg, H., and Yonath, A. (2011)
L'Actualité Chimique 356-357

Author's personal copy

Le rayonnement synchrotron et le ribosome

Haim Rozenberg et Ada Yonath

Résumé

Au tournant du siècle et après plusieurs décennies de progrès constants, le rayonnement synchrotron et la cristallographie du ribosome ont permis de produire des données de diffraction de haute résolution à partir de cristaux de ribosomes, complexes riboprotéiques cellulaires universels qui traduisent le code génétique en protéines. Ces structures ont révélé le mécanisme de décodage, le trajet de l'ARN messager et les positions clés des ARN de transfert dans le ribosome, et ont mis en évidence les interactions du ribosome avec les facteurs d'initiation, de dissociation et de recyclage. Elles ont également prouvé que les particules ribosomiques sont des ribozymes, qui fournissent la machinerie nécessaire pour la liaison peptidique et la polymérisation. Le rayonnement synchrotron a aussi permis la détermination de structures de ribosomes complexés à des antibiotiques, révélant les principes permettant une utilisation clinique ainsi que les mécanismes de résistance, exposant les bases de la discrimination entre cellules hôtes et pathogènes, fournissant ainsi d'importantes informations structurales pour l'amélioration des antibiotiques.

Mots-clés

Ribosomes, ARN, rayonnement synchrotron.

Abstract

The synchrotron radiation and the ribosome

After decades of steady progress, synchrotron radiation facilities and ribosomal crystallography yielded at the turn of the century high-resolution diffraction data from crystals of ribosomes, the universal cellular riboprotein assemblies that translate the genetic code into proteins. These structures revealed the decoding mechanism, localized the mRNA path and the positions of the tRNA molecules in the ribosome and illuminated the interactions of the ribosome with initiation, release and recycling factors. They also showed that the ribosomal particles are ribozymes, which provide the machinery required for peptide bond and polymerase activity. Synchrotron radiation also enabled the determination of structures of complexes of ribosomes with antibiotics targeting them, which revealed the principles allowing for their clinical use, revealed resistance mechanisms and showed the bases for discriminating pathogens from hosts, hence providing valuable structural information for antibiotics improvement.

Keywords

Ribosomes, RNA, synchrotron radiation.

C'est en 1955 que G.E. Palade, étudiant les différents organites de la cellule à l'aide du microscope électronique, réussit pour la première fois à isoler puis à observer des particules riches en acides ribonucléiques, apparemment associées au réticulum endoplasmique [1]. Les particules de Palade étaient nées, plus tard connues sous le nom de ribosomes.

Cinq décennies plus tard, grâce à l'émergence du rayonnement synchrotron et aux anneaux de stockage de deuxième et surtout de troisième génération, et grâce aux techniques, certaines révolutionnaires, développées spécifiquement pour la cristallographie des macromolécules et assemblages biologiques, la connaissance que nous avons des ribosomes, de leurs structures et de leurs fonctions a atteint le niveau atomique.

Dans cet article, après un rappel succinct des connaissances actuelles sur l'architecture et les fonctions des ribosomes, nous décrivons chronologiquement des événements choisis retraçant les progrès de la cristallographie du ribosome, les innovations techniques et le rôle crucial joué par les sources de rayonnement synchrotron (pour en savoir plus, voir [2-3]).

De la particule de Palade à la structure atomique du ribosome

Les ribosomes, complexes cellulaires universels, sont les nanomachines qui, par l'intermédiaire des acides ribonucléiques messagers (ARNm), traduisent dans le cytoplasme le code génétique en protéines. Ils fournissent le support au positionnement précis des différents participants à ce processus fondamental, permettant ainsi le décodage, la formation de la liaison peptidique et la protection de la chaîne protéique naissante. Les ribosomes travaillent rapidement et efficacement, produisant des protéines en continu au rythme de vingt liaisons peptidiques par seconde approximativement.

Ces organites géants dont la masse moléculaire varie de 2,5 MDa chez les bactéries à plus de 4 MDa chez les organismes supérieurs sont composés de différentes protéines ribosomiques (ou protéines-r) dont le nombre varie selon les espèces et de longues chaînes d'ARN ribosomique (ARNr). Ces dernières représentent les deux tiers de la masse totale des ribosomes, à l'exception des ribosomes mitochondriaux des mammifères dans lesquels protéines-r et ARNr existent en proportions quasi stœchiométriques.

Tous les ribosomes sont constitués de deux sous-unités de taille inégale. Chez les procaryotes, la petite unité (appelé 30S d'après son coefficient de sédimentation) contient une chaîne d'ARN (16S) d'environ 1 500 nucléotides et 20 ou 21 protéines différentes, alors que la grande unité (50S) possède deux chaînes d'ARN (23S et 5S) d'environ 3 000 nucléotides au total et 31 à 35 protéines différentes.

Dans tous les organismes, les deux sous-unités existent indépendamment mais s'associent pour former des ribosomes fonctionnellement actifs. Dans chacun, les protéines-r sont profondément intégrées dans la structure formée par l'ARN, maintenant une architecture remarquablement dynamique et ingénieusement conçue pour les différentes fonctions du ribosome : un décodage précis, la formation de la liaison peptidique à partir d'un substrat et une activité de polymérisation efficace.

Les autres intervenants dans ce processus sont les ARN messagers (ARNm), qui transportent le code génétique dans le cytoplasme, et les ARN de transfert (ARNt), qui apportent au ribosome les acides aminés, blocs élémentaires à partir desquels sont construites les protéines.

Dans le but d'améliorer encore l'efficacité, un grand nombre de ribosomes, formant alors un polysome, agissent simultanément, chacun synthétisant une protéine en ajoutant un acide aminé à la fois à la chaîne peptidique en formation, se déplaçant de manière coopérative le long du brin d'ARNm. Ce processus dit d'amplification permet d'accroître rapidement le nombre de protéines disponibles.

Lors de l'élongation de la chaîne polypeptidique, les deux sous-unités agissent de manière coopérative. Préalablement, la petite sous-unité fixe l'ARNm et se positionne au niveau du codon de démarrage. Puis une fois les deux sous-unités assemblées, elle fournit le centre de décodage et le mécanisme contrôlant la fidélité de la traduction. La grande sous-unité contient le site catalytique responsable de la polymérisation des acides aminés et de la formation de la liaison peptidique (dénommé « peptidyl transferase center », PTC) et le tunnel de sortie de la chaîne protéique en cours de synthèse (figure 1). Enfin, trois sites essentiels pour la traduction ont été identifiés et localisés sur les deux sous-unités : le site P (site peptidyl) est occupé par un ARNt porteur d'un acide aminé lié à la chaîne polypeptidique naissante ; le site A (site aminoacyl) est occupé quant à lui par un ARNt

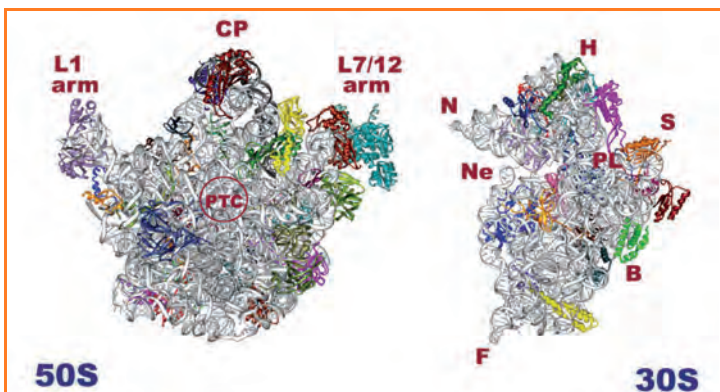


Figure 1 - Les interfaces des deux sous-unités ribosomiques des bactéries *T. thermophilus* et *D. radiodurans*.

L'ARN ribosomique est représenté en gris. Les protéines-r sont représentées chacune d'une couleur différente. On peut remarquer que cette interface est très riche en ARN. À droite : la petite sous-unité ressemble à un canard (H : la tête ; Ne : le coup ; F : la palme ; B : le corps ; S : l'épauule ; N : le bec). À gauche : la grande sous-unité. Les deux bras flexibles (ou protubérances) associés au site d'entrée de l'ARNt (L7/L12) et de sortie (L1) sont représentés ainsi que le centre catalytique PTC. CP représente la protubérance centrale.

porteur d'un acide aminé en attente d'être lié à la chaîne polypeptidique ; enfin le site E (site exit) permet la libération de l'ARNt désacétylé après avoir livré son acide aminé.

Longtemps sujet de débat, l'importance relative de l'ARNr dans les différentes fonctions ribosomiques est aujourd'hui prouvée. Cependant, il est maintenant clair que les protéines-r jouent un rôle crucial dans certaines de ces fonctions (figure 1). À titre d'exemple, nous citerons ici la protéine S12 de la petite sous-unité, qui est responsable du changement de conformation dans l'ARNr lors du décodage de l'ARNm et du contrôle de l'exactitude du décodage par le ribosome. Dans la grande sous-unité, il a été prouvé que des protéines-r jouent un rôle important dans les activités liées au PTC : les protéines L16 et L27 aident au positionnement correct du substrat ; la protéine L2 est quant à elle impliquée dans le processus d'élongation de la chaîne polypeptidique. Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive et s'allonge encore régulièrement au rythme des nouvelles structures [4 et réf. citées].

C'est en fait une moisson extraordinaire de données qu'ont apportée ces dizaines de structures cristallines de ribosomes et de leurs complexes déterminées au cours des dix dernières années. Non seulement nos connaissances sur l'architecture tridimensionnelle de ces particules se sont largement approfondies, mais de plus, nombre de mécanismes impliqués dans les fonctions du ribosome ont été élucidés.

Par manque de place, nous ne ferons ici que les rappeler : le mécanisme de décodage, le mode de progression de l'ARN, les positions relatives des ARNt-A, ARNt-P et ARNt-E, la modulation des processus d'initiation et d'arrêt par les facteurs d'initiation, le relargage, les facteurs de recyclage, l'organisation des éléments architecturaux et dynamiques nécessaires à la polymérisation des acides aminés [3-4 et réf. citées].

Simultanément, plusieurs dizaines de structures de complexes de ribosomes et d'antibiotiques liés de manière spécifique ont été déterminées. Ces structures revêtent une importance particulière dans la mesure où un grand nombre des antibiotiques utilisés en thérapeutique a pour cible le ribosome bactérien. Elles ont révélé les principes permettant une utilisation clinique, ont mis en évidence les mécanismes de la résistance acquise et exposé les bases de la discrimination entre cellules hôtes et pathogènes. Ce faisant, elles ont fourni les bases structurales pour l'amélioration des antibiotiques et une conception rationnelle de nouveaux agents thérapeutiques ciblant le ribosome (pour en savoir plus, voir [5-6]).

Enfin, dans le cadre du modèle d'un monde ancestral basé sur l'ARN, les recherches sur le « proto-ribosome » s'accroissent. Cet ancêtre du ribosome actuel est nécessairement antérieur à l'apparition des protéines et n'est donc formé lui-même que d'ARN. L'identification, autour du site actif du ribosome moderne, lui-même déjà considéré comme un ribozyme, d'une région d'ARN extrêmement conservée, symétrique et rassemblant les éléments structuraux nécessaires à la formation de liaisons peptidiques et à l'activité de polymérisation, semble prouver l'existence d'une machinerie ancestrale, dimère, capable de former des liens peptidiques et de produire des polypeptides non codés. La reconstitution d'un tel proto-ribosome actif reste cependant un défi [7-8].

Sans rayonnement synchrotron, pas de structure du ribosome

Pendant longtemps, les ribosomes furent considérés comme non cristallisables en raison de leur très haut degré

de mobilité interne, leur flexibilité, leur hétérogénéité fonctionnelle, leur complexité chimique, leur nature asymétrique et bien sûr leur taille. Cependant, en raison de l'importance des ribosomes dans la vie de la cellule, et après leur découverte et leur caractérisation chimique, diverses tentatives de cristallisation des particules ribosomiques ont été faites de par le monde pendant plus de deux décennies ; toutes se sont révélées infructueuses.

C'est en 1971 qu'à DESY-Hambourg eut lieu la première expérience sur du matériel biologique (des fibres musculaires) utilisant des rayons X produits par une source de rayonnement synchrotron [9]. Cinq ans plus tard, à SSRL (Stanford), Phillips *et coll.* prouvaient la faisabilité de l'application du rayonnement synchrotron à la cristallographie des protéines [10].

C'est au début des années 80 que les premiers microcristaux tridimensionnels de particules ribosomiques ont été obtenus [11]. Bien que diffractant à une résolution élevée (3,5 Å), nous étions encore bien loin d'un jeu de données exploitables.

La première percée significative fut le choix de ribosomes issus de bactéries se développant dans les milieux extrêmes. L'idée sous-jacente était que de telles particules ribosomiques, nécessairement robustes, seraient plus homogènes et mieux adaptées aux processus et aux conditions chimiques nécessaires à leur cristallisation.

C'est ainsi que les premiers cristaux de ribosomes furent obtenus en utilisant la grande sous-unité ribosomique de *Bacillus stearothermophilus* (B50S), une souche bactérienne alors considérée comme extrémophile.

Dans les années qui suivirent, des cristaux de la grande sous-unité ribosomique de *Halobacterium marismortui*, une bactérie hyperhalophile vivant dans la Mer Morte, étaient obtenus [12]. En 1987, fruits d'un effort commun, des cristaux de la petite sous-unité [13] et de la particule ribosomique complète étaient simultanément obtenus à partir de la bactérie hyperthermophile *Thermus thermophilus* [14].

À cette époque, le consensus était que la structure du ribosome ne pourrait pas être déterminée et qu'au-delà de l'amélioration de la qualité des cristaux, la cristallographie du ribosome avait un urgent besoin de développements technologiques et méthodologiques innovants. En effet, en raison du faible pouvoir de diffraction des cristaux de ribosomes bien que de grande taille (de l'ordre de 2 mm de long), même les générateurs de rayons X à anode tournante les plus avancés n'étaient pas suffisamment puissants pour produire des diagrammes de diffraction exploitables [15]. Le rayonnement synchrotron n'en était alors qu'à ses débuts (*figure 2a*).

Lorsque des sources de rayonnement synchrotron plus appropriées devinrent disponibles avec les anneaux de stockage de seconde génération, il apparut que la très grande sensibilité aux radiations des cristaux de ribosomes entraînait des dommages sévères extrêmement rapidement, ruinant les mesures. C'est le développement de la technique de refroidissement cryogénique ultra-rapide qui permit d'obtenir les premiers jeux de données interprétables et de haute résolution, même à partir de cristaux extrêmement fins (*figure 2b*) [16]. Pas moins de trois sources de rayonnement synchrotron de deuxième génération furent impliquées dans

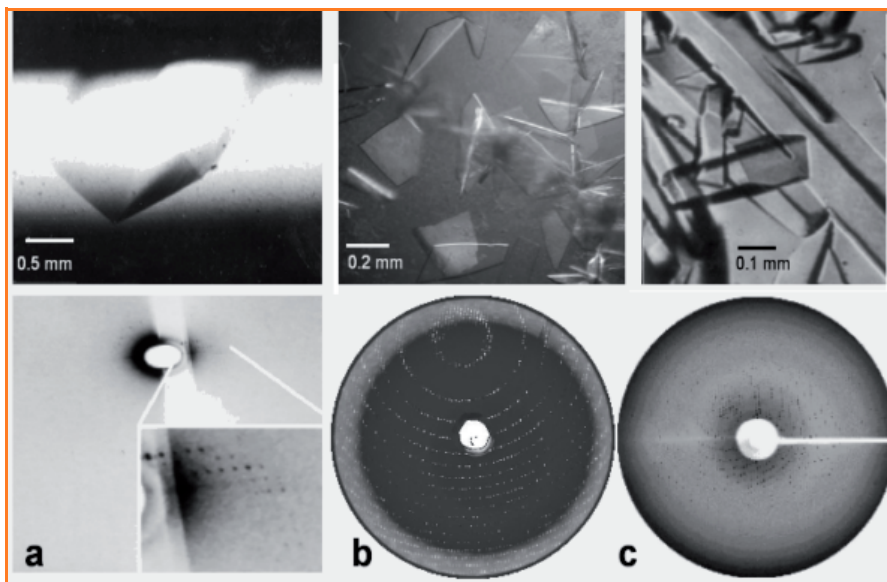


Figure 2 - De quelques taches de diffraction à un jeu de données complet.

a) La pointe d'un cristal de B50S de 2 mm de long et son diagramme de diffraction obtenu à 4 °C sur la ligne EMBL de DESY (Hambourg) en 1984. b) Cristaux de H50S et diagramme de diffraction enregistré à -180 °C sur la ligne ID13 de ESRF (Grenoble) en 1998. Des taches de diffraction sont visibles jusqu'à une résolution de 2,8 Å bien que les cristaux soient extrêmement fins. c) Diagramme de diffraction d'un cristal de T30S traité avec des clusters de tungstène obtenu à -180 °C sur la ligne 19ID de l'APS-ANL (Argonne) en 1998.

le développement de cette technique aujourd'hui utilisée par tous : SSRL (Stanford), DESY (Hambourg) et CHESS (Cornel).

Les années qui suivirent furent des années de course à la résolution, durant lesquelles petites et grandes sous-unités et ribosomes complets de différentes sources furent cristallisés et soumis aux rayons X de DESY, CHESS, SSRL, SRS (Daresbury) ou encore KEK (Tsukuba) [17].

L'étape suivante était le développement d'une méthode pour résoudre la structure, une fois des jeux de données exploitables disponibles. Pour ce faire, des clusters d'atomes lourds furent identifiés pour résoudre le problème de phase [18]. L'un de ces clusters, utilisé à l'origine pour son signal anormal, s'avéra jouer un double rôle dans la détermination de la structure de la petite sous-unité de *Thermus thermophilus* (T30S). En effet, il apparut que le traitement avec ces clusters de cristaux préalablement obtenus améliorerait la résolution de 7-9 à 3 Å (*figure 2c*), vraisemblablement en réduisant la flexibilité structurelle interne naturellement requise pour faciliter la liaison et la progression de l'ARNm à travers le ribosome.

Depuis l'arrivée des synchrotrons de troisième génération, dont l'ESRF (Grenoble) en 1994 et l'APS-ANL (Chicago) en 1996 furent les pionniers, l'utilisation systématique de la cryocristallographie, les progrès accomplis dans les domaines de la brillance et de la stabilité du faisceau, des éléments d'insertion (wigglers et onduleurs), de l'optique avec les miroirs multicouches, des détecteurs (passant du film aux plaques d'images, des capteurs CCD aux capteurs CMOS), dans la puissance de calcul disponible avec une informatique toujours plus fiable et beaucoup moins chère, et plus récemment dans le domaine de la microfocalisation, ont permis la détermination d'un nombre impressionnant de nouvelles structures de haute résolution venant continuellement enrichir nos connaissances.

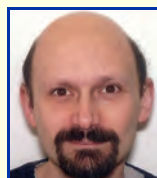
Les ribosomes n'ont bien entendu pas encore livré tous leurs secrets, ni sur leur architecture, ni sur leurs fonctions, ni sur leurs origines, mais le chemin parcouru depuis le premier cristal et la première tache de diffraction est impressionnant. Nul doute que les quelques quarante

sources de rayonnement synchrotron dédiées aujourd'hui et opérationnelles de par le monde nous réservent encore de formidables découvertes.

Les auteurs remercient tous les membres du groupe, présents et passés, qui durant ces années contribuèrent à l'avancement du projet, ainsi que tous ceux et celles qui, au sein des nombreux centres de rayonnement synchrotron qu'ils ont visités, leur ont apporté leur support.

Références

- [1] Palade G.E., A small particulate component of the cytoplasm, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1955**, 1, p. 59.
- [2] Gluehmann M. et al, Ribosomal crystallography: from poorly diffracting microcrystals to high-resolution structures, *Methods*, **2001**, 25, p. 292.
- [3] Yonath A., Large facilities and the evolving ribosome, the cellular machine for genetic-code translation, *J.R. Soc. Interface*, **2009**, 6, p. S575.
- [4] Wekselman I. et al., Ribosome's mode of function: myths, facts and recent results, *J. Pept. Sci.*, **2009**, 15, p. 122.
- [5] Auerbach T., Bashan A., Yonath A., Ribosomal antibiotics: structural basis for resistance, synergism and selectivity, *Trends Biotechnol.*, **2004**, 22, p. 570.
- [6] Tenson T., Mankin A., Antibiotics and the ribosome, *Mol. Microbiol.*, **2006**, 59, p. 1664.
- [7] Davidovich C. et al., The proto-ribosome: an ancient nano-machine for peptide bond formation, *Isr. J. Chem.*, **2010**, 50, p. 29.
- [8] Belousoff M.J. et al., Ancient machinery embedded in the contemporary ribosome, *Biochem. Soc. Trans.*, **2010**, 38, p. 422.
- [9] Rosenbaum G., Holmes K.C., Witz J., Synchrotron radiation as a source for X-ray diffraction, *Nature*, **1971**, 230, p. 434.
- [10] Phillips J.C., Wlodawer A., Yetitz M.M., Hodgson K.O., Applications of the synchrotron radiation to protein crystallography: preliminary results, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1976**, 73, p. 128.
- [11] Yonath A., Muessig J., Tesche B., Lorenz S., Erdmann V.A., Wittmann H.G., Crystallization of the large ribosomal subunit from *B. stearothermophilus*, *Biochem. Int.*, **1980**, 1, p. 315.
- [12] Shevack A., Gewitz H.S., Henemann B., Yonath A., Wittmann H.G., Characterization and crystallization of ribosomal particles from *Halobacterium marismortui*, *FEBS Lett.*, **1985**, 184, p. 68.
- [13] Yusupov M.M. et al., Crystallization of the 30S subunits of *Thermus thermophilus* ribosomes, *Dokl. Akad. Nauk (URSS)*, **1987**, 292, p. 1271.
- [14] Trakhanov S.D., Yusupov M.M., Agalarov S.C., Garber M.B., Ryazantsev S.N., Tischenko S.V., Shirokov V.A., Crystallization of 70S ribosome and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*, *FEBS Lett.*, **1987**, 220, p. 319.
- [15] Yonath A., Bartunik H.D., Bartels K.S., Wittmann H.G., Some X-ray diffraction patterns from single crystals of the large ribosomal subunit from *B. stearothermophilus*, *J. Mol. Biol.*, **1984**, 177, p. 201.
- [16] Hope H. et al., Cryocrystallography of ribosomal particles, *Acta Crystallogr. B*, **1989**, 45, p. 190.
- [17] Yonath A., Approaching atomic resolution in crystallography of ribosomes, *Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1992**, 21, p. 77.
- [18] Thygesen J., Weinstein S., Franceschi F., Yonath A., The suitability of multi-metal clusters for phasing in crystallography of large macromolecular assemblies, *Structure*, **1996**, 4, p. 513.



H. Rozenberg

Cristallographe spécialiste des protéines et des acides nucléiques, **Haim Rozenberg** travaille dans l'équipe d'**Ada Yonath**, professeur de biologie structurale à l'Institut Weizmann des Sciences (Israël) et pionnière de la cristallographie du ribosome*. Directrice du « Helen



A. Yonath

and Milton A. Kimmelman Center for Biomolecular Structure and Assembly », membre de plusieurs Académies des sciences (Israël, Europe et États-Unis), Ada Yonath a reçu le prix Nobel de chimie en 2009 (voir *L'Act. Chim.*, **2010**, 337, p. 8).

* Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot (Israël).

Courriels : haim.rozenberg@weizmann.ac.il ; ada.yonath@weizmann.ac.il



INSTITUT PASTEUR

Affiliée à l'URA 2185 du CNRS (directeur Muriel Delepierre) et au Département de Biologie Structurale et Chimie de l'Institut Pasteur

Les recherches de notre unité sont centrées sur la compréhension des processus biologiques via l'étude de la structure de la dynamique et des interactions des molécules biologiques. Les approches sont celles de la biophysique, la biochimie et la RMN. Nous nous intéressons plus spécifiquement aux systèmes de transport bactériens des nutriments, à la transcription virale, à l'utilisation des carbohydrates dans les approches vaccinales mais aussi pour comprendre les mécanismes de biosynthèse des parois des cellules fongiques enfin aux chemins de signalisation chez les humains.

Unité de RMN des Biomolécules (responsable Muriel Delepierre)
Institut Pasteur - 28 rue du Dr Roux - 75 724 Paris cedex 15



Coordonnées : Tél. 01 45 68 88 71 • Fax 01 45 68 89 29
muriel.delepierre@pasteur.fr

Secrétariat : Laurence Gangloff • Tél. 01 40 61 37 02

Site web : <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Lrmn>

