

THÈSES

[2002](#) [2003](#) [2004](#) [2005](#) [2006](#) [2007](#) [2008](#)

[BASTARD Karine](#)
[CUNI Aude](#)
[DAHMANE Tassadite](#)
[DURRIEU Marie-Pierre](#)
[ELQAIDI Samir](#)
[GOHON Yann](#)
[HAENTJENS Julie](#)
[HEBERHARD Stephan](#)
[HEDDI Brahim](#)
[HEUVINGH Julien](#)
[HUET Sébastien](#)
[LOISELAY Christelle](#)

[LOPEZ Ivan](#)
[MELQUIOND Adrien](#)
[NAVIZET Isabelle](#)
[OLIVEIRA MARUJO Paulo](#)
[Emanuel de](#)
[RODRIGUEZ Nicolas](#)
[SERVANT Géraldine](#)
[TODESCHINI Anne-Laure](#)
[TRAN Samuel](#)
[TRIBA Mohamed](#)
[WOJCIECH Majeran](#)
[WOSTRIKOFF Katia](#)
[zoonens Manuela](#)

2008



9 décembre 2008 à 14h00, Bibliothèque de l'IBPC
Samir ELQAIDI, [UPR 9073](#), Régulation de l'expression génétique
chez les microorganismes

**"Etude de la spécificité d'interaction des protéines
homologues Mlc et NagC avec l'ADN chez E. coli"**

Résumé

Les protéines NagC et Mlc sont des régulateurs transcriptionnels de l'expression des gènes d'utilisation des carbohydrates chez *Escherichia coli*. NagC est à la fois un répresseur et un activateur, elle réprime les opérons *nag* et *chb* et active les opérons *glmUS* et *fim*. Mlc est le répresseur des opérons *manXYZ*, *ptsHIcrr*, et des gènes *ptsG*, *mlc* et *malT*. Ces deux protéines présentent une forte homologie surtout au niveau de leur motif HTH. L'homologie concerne également leurs opérateurs respectifs. *In vitro*, chacune des deux protéines peut interagir avec l'opérateur spécifique de l'autre. Cependant, aucune régulation croisée n'a été détectée *in vivo*. L'analyse des sites spécifiques pour l'une ou l'autre protéine a montré que les bases CG aux positions ± 11 du centre de symétrie de l'opérateur sont caractéristiques des sites de fixation de NagC et que la succession des bases CG dans la région centrale est différente entre les sites Mlc et les sites NagC. L'implication de ces critères dans la spécificité d'interaction de Mlc et de NagC avec l'ADN a été confirmée par des expériences de mutagenèse des opérateurs Mlc du gène *ptsG*. Ainsi la substitution des bases A/T à ± 11 par des C/G et le remplacement du motif GCGC au centre des opérateurs *ptsG* par un motif CGCG, caractéristique des sites NagC, a permis de convertir la fusion *ptsG-lacZ*, normalement régulée par Mlc, en une fusion régulée par NagC. D'autre part, ces expériences ont confirmé que la répression par NagC nécessite sa fixation coopérative sur deux opérateurs, et que la fixation coopérative de Mlc sur deux opérateurs améliore la répression du gène *ptsG*.

Nous avons exploité ces données pour établir une séquence consensus dont l'utilité est de chercher d'éventuels gènes régulés par l'une ou l'autre protéine. La recherche informatique effectuée sur le génome d'*E. coli* a permis l'obtention d'une liste de candidats parmi lesquels le gène *galP* apparaît avec un très fort score. D'autre part, lors d'une étude de la souche MG1655, des travaux (Soupene *et al*, 2003) ont montré que cette souche pousse lentement dans le milieu galactose et que la vitesse de croissance augmente en présence de la mutation *nagC*. Par des expériences de protection à l'ADNase I ainsi que par la mesure de l'activité β -galactosidase d'une fusion *galP-lacZ*, nous avons montré que le gène *galP* est réprimé par NagC en coopération avec GalR et GalS, iso-répresseurs du régulon galactose. Donc la régulation de *galP* implique des régulateurs spécifiques de deux voies métaboliques différentes. Contrairement aux autres membres du régulon NagC, le gène *galP* est contrôlé à partir d'un site *nagC* unique. Deux sites de fixation de GalR dans la région régulatrice de *galP* ont été proposés par le laboratoire d'Adhya. Nous avons montré que le site dit "interne", n'est pas fonctionnel. Par contre, d'autres sites fixant GalR et/ou GalS ont été identifiés en amont du site "externe". Ensuite, en utilisant la technique de double hybride bactérien, ainsi que celle de l'anisotropie de fluorescence, nous avons montré que GalR interagit avec GalS aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Nous proposons que *galP* soit contrôlé d'une façon différente de celle observée dans l'opéron *galETK*.

■ 29 septembre à 14h30, bibliothèque de l'IBPC
Samuel TRAN, [CNRS UPR 1929](#), Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion
"Etude de la sécrétion régulée par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente"

Résumé

La sécrétion régulée d'hormones est un processus décomposable en plusieurs étapes : migration des granules de sécrétion (GS) vers la membrane plasmique (MP), accostage et arrimage des GS à la MP, exocytose ou fusion des GS avec la MP permettant la libération du contenu des GS dans le milieu extracellulaire.

Bien que très utiles, les méthodes électrophysiologiques et électrochimiques ne donnent d'informations ni sur la localisation ou les mouvements des GS avant fusion, ni sur le devenir de la membrane des GS après fusion. Plusieurs techniques d'imagerie *in vivo* cherchent à répondre à ces questions. La mieux adaptée est la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente (TIRFM) qui permet d'observer les mouvements de GS individuels à proximité immédiate de la MP. Nous avons appliqué cette approche à l'étude de la sécrétion des cellules BON (lignée dérivée d'un carcinome). Leur stimulation a été faite par la technique du Ca cagé, appliquée pour la première fois en microscopie TIRF.

Après exocytose, nous avons observé et quantifié le phénomène de persistance de la forme d'une partie des GS, ainsi que l'exocytose séquentielle de GS situés plus à distance de la MP. De manière surprenante, l'exocytose séquentielle représente ~25% des

événements d'exocytose. L'analyse détaillée des trajectoires en 3 dimensions des GS avant leur fusion nous a montré qu'environ 40% des GS effectuent une transition de 20 nm vers la MP, puis fusionnent dans un délai de ~3 s. Cette observation originale de la transition entre l'accostage et l'arrimage des GS pourrait être la traduction d'évènements moléculaires impliqués dans l'amorçage des GS, nécessaire à la fusion.

- 30 juin 2008 à 14h30, amphithéâtre Constant Burg, Institut Curie, 12 rue Lhomond
Géraldine SERVANT, [UPR 9073](#), Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes
"Activation du rétrotransposon Ty1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par la carence sévère en adénine"

Résumé

Entités génétiques capables de se déplacer dans les génomes eucaryotes, les rétrotransposons jouent un rôle majeur dans la structure, l'évolution et l'expression des génomes. Activés par des stress environnementaux, ces éléments sont associés à des maladies génétiques et à des cancers. Le rétrotransposon Ty1 de la levure *S. cerevisiae* est un modèle pour l'étude de la régulation et de l'impact des rétrotransposons. La transcription et la mobilité de Ty1 sont activées dans une souche privée d'adénine, déficiente dans la voie de biosynthèse de l'AMP, conditions nommées "carence sévère en adénine".

L'objectif de ma thèse a été de comprendre l'activation de l'expression de Ty1 par cette carence et d'étudier l'impact de cette activation sur le génome de la levure. Nous avons montré que la région longue terminale (LTR) de Ty1, où démarre la transcription, est suffisante pour permettre la régulation. Nous avons aussi découvert que la carence modifie la transcription de gènes adjacents au promoteur de Ty1. Cette étude montre l'impact des rétrotransposons sur la régulation des génomes, en particulier dans les conditions de stress, et suggèrent que la carence active le démarrage de la transcription. Par l'étude de l'expression des gènes et des concentrations en nucléotides puriques dans les conditions de carence sévère en adénine, nous avons montré une corrélation entre l'activation de la transcription de Ty1 et la diminution de l'ATP cellulaire. De plus, un mutant qui crée directement un déficit en ATP, induit l'activation de la transcription de Ty1 et mime les conditions de carence sévère en adénine. Le déficit en ATP pourrait donc être le signal de l'activation de Ty1

- 3 avril 2008 à 14h30, amphithéâtre Jean Perrin, Laboratoire de Chimie Physique
Brahim HEDDI, [UPR 9080](#), Biochimie Théorique
"Propriétés structurales et dynamiques des ADN, implications dans les mécanismes de reconnaissance ADN/protéines"

Résumé

Dans cette thèse, nous avons exploré les propriétés structurales et dynamiques des ADN-B, en interfaçant techniques expérimentales et modélisation moléculaire. Nous avons d'abord mis en évidence par RMN en solution la mécanique intrinsèque des ADN-B, qui lie étroitement les conformations BI et BII des groupements phosphate ($\delta^{31}\text{P}$) aux paramètres hélicoïdaux de roll (courbure), de twist (enroulement) et de déplacement des bases dans les sillons (dimensions des sillons). Ayant traduit pour la première fois les $\delta^{31}\text{P}$ en termes de ratio BI/BII, nous avons pu quantifier la relation entre la séquence, la structure et la flexibilité dans l'ADN-B, en établissant une échelle expérimentale qui associe une probabilité de conformation à chacun des dix pas dinucléotidiques constituant l'ADN-B. En utilisant les $\delta^{31}\text{P}$ comme une sonde, nous avons ensuite démontré sans ambiguïté que la nature des cations affecte la structure et la dynamique de la double hélice. Enfin nous avons évalué la capacité de trois champs de force (Parm98, Parmbsc0 et CHARMM27) à prédire la conformation des ADN-B. Ayant montré qu'aucun de ces champs de force n'était en mesure de rendre compte des données expérimentales, nous proposons un nouveau protocole de raffinement des structures RMN. L'application de ce protocole à la séquence cible de la protéine JunFos souligne l'importance d'avoir une vision globale de la dynamique de l'ADN pour comprendre les mécanismes de reconnaissance ADN/protéines.



2 avril 2008, à 14h00, amphithéâtre Jean-Perrin, Laboratoire de Chimie Physique

Marie-Pierre DURRIEU, [UPR 9080](#), Biochimie Théorique
"Etude par modélisation moléculaire de la stabilité et de la dynamique du complexe SNARE impliqué dans la fusion membranaire"

Résumé

Le complexe SNARE est impliqué dans la fusion membranaire intracellulaire : sa formation entre des protéines liées aux vésicules (v-SNAREs) ou à la membrane cible (t-SNAREs) permettrait de surmonter la répulsion entre deux membranes. Des simulations atomiques par dynamique moléculaire ont été effectuées sur la tresse de quatre hélices qui constitue le coeur du domaine soluble du complexe SNARE neuronal. Ces simulations mettent en exergue l'extrême stabilité de la tresse. Une analyse structurale détaillée, prenant en compte la structuration en couches hydrophobes de la tresse, révèle un réseau dense de ponts salins et de liaisons hydrogène qui maintient le complexe. Nos résultats, en très bon accord avec des données structurales expérimentales, apportent également un éclairage nouveau. L'insertion de la v-SNARE dans la membrane vésiculaire a ensuite été étudiée par des simulations «gros-grain», dans le cadre du débat sur l'enfouissement de la région juxtamembranaire de la v-SNARE. Nos simulations indiquent trois topologies d'enfouissement, parmi lesquelles nous retrouvons les deux profils obtenus par Shin et coll. dans leurs expériences RPE.



■	<p>25 février 2008, à 14h00, ENSCP, Salle 1 (11 rue Pierre et Marie Curie)</p> <p>Agnès de LACROIX de LAVALETTE - UMR 7099, Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques</p> <p>"Etude des relations structure/fonction dans le complexe cytochrome b6f" -</p>	▲

2007		
■	<p>18 septembre 2007 à 14h00, Bibliothèque de l'IBPC</p> <p>Adrien MELQUIOND - UPR 9080, Biochimie Théorique</p> <p>"Agrégation de peptides amyloïdes par des simulations numériques"</p> <p>Résumé</p> <p>Les fibres amyloïdes insolubles sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer, le diabète de type II et les encéphalopathies spongiformes. La toxicité observée dans ces maladies n'est pas seulement le fait des fibres mais également des oligomères solubles formés très tôt dans le processus de fibrillogénèse. Cependant, la caractérisation structurale de ces intermédiaires oligomériques est complexe et seules des données parcellaires sont disponibles. Face à cet obstacle, les méthodes in silico offrent une approche alternative intéressante qui peut compléter efficacement les efforts expérimentaux. La simulation numérique d'agrégats ordonnés n'est pas accessible par dynamique moléculaire tout-atome avec une représentation explicite du solvant, nous présentons donc dans cette étude une approche originale associée à un modèle d'énergie simplifié pour échantillonner l'espace conformationnel.</p> <p>Cette présentation discute des simulations gros grains pour appréhender les premières étapes de l'agrégation. En utilisant la technique d'activation-relaxation et de dynamique moléculaire avec le modèle d'énergie OPEP, nous avons analysé les chemins d'agrégation pour différentes séquences amyloïdogéniques : KFFE et NFGAIL. Nos simulations mettent en évidence des assemblages en équilibre : ordonnés en croix-beta qui satisfont les données expérimentales génériques des fibres amyloïdes, des agrégats amorphes (dépourvus de beta) et des tonneaux beta. Par ailleurs, nous montrons qu'il existe un seuil critique du nombre de connexions entre les chaînes au-delà duquel la propension à explorer des agrégats amorphes est favorisée. Conjointement aux aspects thermodynamiques, nous discuterons la dynamique d'assemblage de peptides amyloïdes en présence d'un inhibiteur.</p>	▲
■	<p>26 septembre 2007 à 15 heures, Bibliothèque de l'IBPC</p> <p>Christelle LOISELAY - UMR 7141, Physiologie membranaire et</p>	▲

moléculaire du chloroplaste

"Importance des facteurs codés par le génome nucléaire pour l'expression du génome chloroplastique : l'exemple du gène chloroplastique *petA* chez *Chlamydomonas reinhardtii*"

Résumé

L'expression des gènes chloroplastiques dépend de nombreux facteurs codés par le génome nucléaire. Chez *C. reinhardtii*, l'analyse de mutants a révélé deux caractéristiques majeures de ces facteurs : ils sont généralement impliqués dans les étapes post-transcriptionnelles de l'expression d'un unique gène chloroplastique. Ainsi, MCA1 et TCA1 sont deux facteurs nucléaires respectivement impliqués dans la stabilisation et la traduction de l'ARNm chloroplastique *petA* codant le cytochrome f. Ces deux facteurs ont été clonés : TCA1 est une protéine pionnière tandis que MCA1 est une protéine PPR (Pentatricopeptide Repeats).

L'analyse de transformants exprimant des niveaux variés de MCA1 ou TCA1 a montré que ces facteurs sont limitants pour l'expression du gène *petA* et qu'ils peuvent jouer un rôle régulateur.

Parallèlement, le mode d'action de MCA1 et TCA1 a été analysé *in vivo* en modifiant la région 5' non traduite de *petA* par mutagenèse dirigée. Nous avons ainsi montré que MCA1 reconnaît une cible localisée à l'extrémité 5' de l'ARNm et protège le transcrit d'une dégradation ribonucléolytique 5'-3'. Contrairement aux autres facteurs de stabilisation analysés jusqu'ici, MCA1 n'est pas strictement requis pour la traduction. Néanmoins, il pourrait interagir avec TCA1, dont une cible putative a été identifiée à proximité de celle de MCA1.

Enfin, j'ai identifié le mutant nucléaire *crp4*, affecté dans la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNm *petA*. CRP4 pourrait être un composant de la machinerie générale de maturation/dégradation des ARN chloroplastiques car il semble impliqué dans la maturation de nombreux transcrits ainsi que dans une voie de dégradation des ARN liée à la traduction.



Expression of chloroplast genes is dependant on numerous nucleus-encoded factors. In *C. reinhardtii*, mutant analyses have enlightened two major characteristics of these factors: they are generally involved in the post-transcriptional expression of a unique chloroplast gene. For instance, MCA1 and TCA1 are two nucleus-encoded factors respectively involved in stabilisation and translation of the *petA* mRNA encoding cytochrome f. Both factors have been cloned: TCA1 is a pioneer protein whereas MCA1 belongs to the PPR (Pentatricopeptide Repeats) protein family.

Analyses of transformed strains expressing varying amounts of MCA1 or TCA1 demonstrated that these factors can be limiting for *petA* expression and may have a regulatory function.

In parallel, MCA1 and TCA1 functions have been investigated *in vivo* using modified *petA* genes introduced by transformation in the chloroplast. We demonstrated that MCA1 recognises a target located at the very 5' end of the mRNA and protect the transcript

from 5' to 3' ribonucleolytic degradation. Unlike the other stabilisation factors characterised up to now, MCA1 is not strictly required for translation. Yet, it could interact with TCA1 whose putative target has been identified close to that of MCA1.

I also identified a nuclear mutant, *crp4*, which is partially deficient for the maturation of *petA* 3' end. CRP4 could be a component of the general machinery of degradation/maturation of chloroplast transcripts. Indeed, it is involved in the maturation of several mRNA and also participates to a degradation pathway associated with translation.

■ 28 septembre 2007 à 14h00, Bibliothèque de l'IBPC
Tassadite DAHMANE - [UMR 7099](#), Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques

"Protéines membranaires et amphipols : stabilisation, fonction, renaturation, et développement d'amphipols sulfonates pour la RMN des solutions."

Résumé

Les amphipols (APols) sont de petits polymères amphiphiles destinés au maintien en solution aqueuse des protéines membranaires (PMs). Les APols augmentent la stabilité biochimique des PMs solubilisées par rapport à celle observée en présence de détergent. Cette propriété en fait un outil intéressant pour l'étude *in vitro* des PMs. Dans un premier temps, nous avons examiné l'influence de l'APol A8-35 sur la stabilité, la renaturation et la fonction des PMs. Notre travail est basé principalement sur l'étude d'une PM modèle, la bactériorhodopsine, extraite de la membrane pourpre de l'archéobactérie *Halobium salinarium*. La renaturation des PMs constitue une application particulièrement intéressante des APols, cette étape difficile étant souvent limitante pour l'étude *in vitro* des PMs. Nous avons pu montrer que les APols permettent la renaturation de plusieurs PMs modèles (BR, MscL, EmrE...), et nous avons entrepris d'étendre cette approche à la renaturation de PMs d'un très grand intérêt pharmacologique, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Nous nous sommes par ailleurs intéressés au développement d'un autre domaine d'application des APols, l'étude structurale des PMs par RMN des solutions. En vue de cette application, nous avons entrepris de développer une nouvelle famille d'APols, solubles à pH acide, les amphipols sulfonates (SAPols). Nous présentons les différentes molécules étudiées, ainsi que les critères nous ayant conduits à la sélection de SAPols optimisés pour l'étude des PMs par RMN des solutions.

Mots-clés : amphipols, protéines membranaires, bactériorhodopsine, stabilité, renaturation, fonction, amphipols sulfonates



Amphipols (APols) are small amphiphatic polymers designed to keep membrane proteins (MPs) water-soluble. APols improve the stability of solubilized MPs beyond that afforded by detergents. This property makes them very interesting tools for *in vitro* studies

of MPs. In a first part, we examine the influence of APols on the stability, renaturation and function of MPs. Our work is mainly based on the study of a model MP, bacteriorhodopsin, extracted from the purple membrane of the archaebacterium *Halobium salinarium*. Renaturation of MPs is a very interesting application of APols, since it represents a strongly limiting step to their study. We show that several model MPs (BR, MscL, EmrE...) can be renatured using APols, and we have undertaken to extend this approach to the renaturation of MPs of great pharmacologic interest, the G protein coupled receptors (GPCRs). In a second part, we describe some progress in the development of another application of APols, the structural study of MPs by solution-state NMR. We describe the design a new family of amphipols, the sulfonated amphipols (SAPols), which can be used at low pH. We present the different structures of SAPols studied and the tests that led us to the selection of optimized SAPols for MP solution-state NMR studies.

Keywords: amphipols, membrane proteins, bacteriorhodopsin, stability, renaturation, function, sulfonated amphip

■ 9 novembre 2007 à 14h45, Amphi Marie-Curie, Institut Curie, 11 rue P&M Curie ▲

Florence Lebaupain - [UMR 7099](#) Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques,
"Développement de l'utilisation des tensioactifs fluorés pour la biochimie des protéines membranaires".

■ 17 décembre 2007, à 14h30, Amphi Jean-Perrin, Laboratoire de Chimie Physique, 11 rue P&M Curie ▲

Julie HAENTJENS - [UPR 9073](#), Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes
"Régulation de l'expression du gène codant la protéine ribosomique L20 chez la bactérie E.coli."

Résumé

La protéine ribosomique L20 d'*Escherichia coli* est une protéine essentielle codée par le gène *rpIT* de l'opéron IF3. Elle a deux fonctions. Elle est, tout d'abord, indispensable à l'étape précoce de l'assemblage de la sous-unité ribosomique 50S. Ensuite, elle réprime, au niveau de la traduction, directement l'expression du gène *rpmI*, qui se trouve juste en amont de son propre gène, et indirectement, par couplage traductionnel, celle de son propre gène. La région de l'ARNm nécessaire à ce contrôle, l'opérateur traductionnel, s'étend sur plus de 400 nucléotides. Il a été montré que la protéine L20 pouvait se fixer à deux sites de cet opérateur: un pseudonud résultant d'une interaction par appariement Watson-Crick à longue distance et une structure en tige-boucle irrégulière. Les deux sites sont essentiels au contrôle. Le mécanisme de ce contrôle peut être divisé en deux étapes: la fixation de la protéine L20 à l'opérateur dans un premier temps et l'effet de cette fixation sur l'expression du gène dans un second. Nous avons montré qu'une seule molécule de protéine L20 se fixait à l'ARNm, et ce malgré la présence de deux sites de fixation. Cette

	<p>stoechiométrie 1: 1 nous a conduit à proposer différents modèles dans lesquels la protéine L20 se fixe à un site puis à l'autre, ou bien à un site hybride. Concernant la deuxième étape du contrôle, nous avons montré que celui-ci était basé sur un mécanisme de compétition entre la protéine L20 et la sous-unité ribosomique 30S pour la fixation à l'ARNm, à la différence des protéines ribosomiques-répresseurs S4 et S15 qui opèrent par un mécanisme de piège de la sous-unité sur l'ARNm. Nous nous sommes également intéressés au double rôle que joue la protéine dans l'assemblage et dans le contrôle en y introduisant des mutations afin d'en étudier l'effet sur la reconnaissance de l'ARNr et son ARNm.</p>	
--	---	--

2006		
■	<p>29 septembre 2006 à 13h30, bibliothèque de l'IBPC - Fabien CAILLEZ - UPR 9080, Biochimie Théorique "Étude des propriétés mécaniques des protéines par modélisation moléculaire".</p>	▲
■	<p>29 septembre 2006 à 14h00 dans l'amphithéâtre Marie Curie (institut Curie) Frédéric ALLEMAND - UPR 9073, Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes Biogénèse du ribosome et plus particulièrement étude de la protéine L20 d'<i>E. coli</i> et de la RNase M5 de <i>B. subtilis</i>.</p>	
■	<p>22 septembre 2006 à 9h30, salle de conférence de l'IBPC Cyrille DEREMBLE - UPR 9080, Biochimie Théorique</p>	
■	<p>30 juin 2006 à 10h30, bibliothèque de l'IBPC Sébastien HUET - UPR 1929, Biologie cellulaire et moléculaire de la sécrétion "Analyse des mouvements des granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente"</p> <p>Résumé</p> <p>La sécrétion régulée d'hormones est un processus décomposable en plusieurs étapes. Les granules de sécrétion (GS) contenant ces hormones sont formés au niveau du réseau <i>trans</i>-golgien puis migrent jusqu'à la périphérie de la cellule. Ces hormones sont libérées dans le milieu extérieur par exocytose en cas de stimulation de la cellule. Grâce à l'observation des GS situés dans la région</p>	▲

juxta-membranaire par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente, les mouvements de ces organites ont été étudiés à l'échelle du granule unique. Une méthode d'analyse permettant la mise en évidence de comportements transitoires au sein des trajectoires tridimensionnelles des GS a été mise au point. Grâce à son application à l'étude des effets de drogues du cytosquelette et à des observations en double marquage, nous avons pu associer chaque type de mouvements décrit par les GS à un environnement particulier (GS lié à la membrane plasmique, au cytosquelette d'actine ou de microtubules). Nous avons de plus étudié le rôle du complexe protéique Rab27A/MyRIP/Myosine Va lors de la capture des GS en périphérie de la cellule et leur accrochage aux filaments d'actine.



Regulated hormone secretion is a multi-step process. Secretory granules (SG), which contain hormones, are formed by budding from the *trans*-golgi network and then migrate towards the cell periphery. Hormones are released by exocytosis when cells are stimulated. We applied total internal reflection fluorescence microscopy to study the dynamics of SG located in the subplasmalemmal region. We developed a motion analysis method to highlight transient behaviours along three-dimensional SG trajectories. The application of this method to the study of the effects of cytoskeletal drugs on SG dynamics and double labelling observations allowed us to associate each type of movement with a particular environment (SG linked to the plasma membrane, the actin filaments or the microtubules). We also studied the role of the complex formed by the proteins Rab27A, MyRIP and Myosin Va during the capture of SG in the cell periphery and their attachment to actin filaments.



9 mai 2006 à 10h45, salle de conférence de l'IBPC
Nicolas RODRIGUEZ - [UMR 7099](#), Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques
"Pores transitoires dans les membranes de vésicules géantes"

Résumé

Un premier volet porte sur la caractérisation de la fabrication des vésicules géantes. Nous avons étudié quantitativement, par microscopie de fluorescence, la formation de défauts lors de la pousse des vésicules : vésicules multilamellaires, contenant des petites vésicules ou des filaments. Nous avons déterminé la distribution statistique des différents défauts en fonction de la composition lipidique et de la méthode de fabrication (hydratation douce ou électroformation). Nous avons notamment recherché l'influence des lipides chargés, systématiquement négative par électroformation mais positive à faible concentration par hydratation douce. L'identité entre les compositions du film de pousse et des vésicules est aussi discutée. Un second volet a été l'étude de l'insertion de phospholipides à une chaîne courte portant un marqueur fluorescent NBD injectés au voisinage de GUV constituées de DOPC. Les lipides insérés peuvent représenter jusqu'à 10% des lipides de la GUV. Nous avons modélisé la formation de défauts dans la membrane favorisant le passage de lipides du feuillet externe



	<p>vers le feuillet interne. En ajoutant de la dithionite et en éclairant les GUV avec une lampe à mercure, une solubilisation rapide de la membrane est induite. Elle conduit à l'ouverture de pores transitoires dont la taille atteint quelques micromètres et le temps d'ouverture quelques minutes. A un pore de longue durée succède généralement une cascade de pores transitoires de grande taille et de temps de vie plus courts. A la lumière des modèles existants [Karatekin, Bioph. J., 2003], la formation de pores à longue durée de vie en milieu aqueux est inattendue. Nous avons modifié ces modèles et réalisé des simulations pour montrer notamment que l'entretien de la tension de surface par la solubilisation explique nos observations. Enfin, nous avons conduit des expériences de fusion entre GUV et LUV contenant de la PS et en présence de Ca²⁺ : elles montrent une adhésion significative sans fusion.</p>	
■	<p>13 février 2006 à 10h00, bibliothèque de l'IBPC Ivan LOPEZ - UMR 7099, Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques "Translocation de lipides non marqués mesurée par changements de forme de vésicules géantes. Le cas de la céramide"</p> <p>Résumé</p> <p>Une asymétrie de surface de 0.1 % entre les deux monocouches des vésicules géantes (GUVs) suffit pour déclencher un changement de leur forme. L'incorporation des molécules exogènes dans le feuillet externe d'une vésicule prolate produit la formation d'un bourgeonnement. La redistribution par diffusion transversale (flip-flop) des molécules dans les deux feuillets induit la récupération de la forme prolate. Le temps moyen de flip-flop spontané des molécules non marquées incorporées peut être calculé à partir des temps mesurés des deux transitions de forme. Un temps de flip-flop inférieur à une minute à 37 °C a été mesuré pour la céramide naturelle (C6-Cer, C10-Cer, C16-Cer). La méthode a été validée par des mesures spectroscopiques (RPE) du flip-flop d'analogues de céramide dans des LUVs. Les changements de forme des vésicules permettent également la détection du flip-flop de lipides endogènes par des protéines possédant une fonction de translocation lipidique (flippases). Nous avons reconstitué la P-gP (purifiée) et l'aminophospholipide translocase (à partir de membrane de globule rouge humain) dans des GUVs. L'activation de ces protéines par l'ajout d'ATP à l'extérieur des vésicules produit des changements des formes en accord avec un transport lipidique actif.</p>	▲

2005		
■	<p>23 septembre 2005 à 14h30, salle de conférence de l'IBPC Marc FOLICHON - UPR 9073, Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes "Implication de la protéine chaperon d'ARN Hfq dans le métabolisme des ARN polyadénylés chez <i>Escherichia coli</i>"</p>	▲

■	<p>14 septembre 2005 à 10h00, Karine BASTARD - UPR 9080, Biochimie Théorique "Assemblage flexible de macromolécules: la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques"</p> <p>Résumé</p> <p>Les méthodes d'amarrage (ou "docking") ont pour but de prédire la structure d'un complexe macromoléculaire à partir des coordonnées atomiques des composants individuels. La majorité de ces méthodes ne considère pas les possibles déformations internes des protéines durant leur association. Nous proposons un nouvel algorithme permettant d'introduire la flexibilité des boucles protéiques de surface dans les méthodes d'amarrage. Dans cet algorithme, chaque boucle flexible est représentée par un ensemble de conformations rigides générées au préalable. Suivant le principe de la théorie du champ moyen, chaque conformation est caractérisée par un poids qui correspond grossièrement à la probabilité que la boucle adopte une telle conformation pour une position donnée du partenaire. Nous avons introduit cette stratégie dans deux programmes d'amarrage en couplant, dans chaque cas, la théorie du champ moyen avec les techniques exploratoires utilisées. Le premier programme effectue une recherche exhaustive, par minimisations énergétiques, de toutes les possibilités de combinaison des partenaires grâce à une représentation simplifiée des protéines. Le second permet de prédire le détail des interactions entre deux macromolécules en effectuant une recherche en Monte-Carlo du positionnement du partenaire dans un espace restreint. Nous présentons des résultats préliminaires et prometteurs de l'application de notre méthode à la construction d'un système complexe : le filament nucléo-protéique de RecA.</p>	▲
■	<p>17 juin 2005 à 14h30, salle de conférence de l'IBPC Anne-Laure TODESCHINI - UPR 9073, Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes "Activation du rétrotransposon Ty1 lors d'une carence sévère en adénine".</p> <p>Résumé</p> <p>Les rétrotransposons sont des éléments génétiques mobiles qui jouent un rôle important dans l'évolution et la plasticité des génomes. La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contient 5 familles de rétrotransposons à LTR, Ty1 étant la plus abondante avec 32 copies entières. La rétrotransposition de Ty1 est activée lors de stress ou lors de changements environnementaux. Mon travail de thèse porte sur l'étude d'un nouveau stress : la carence en adénine. Ce type de carence active fortement la transcription du rétrotransposon Ty1 (facteur 5 à 9). Etonnement, cette activation ne passe pas par l'activateur transcriptionnel Bas1, normalement responsable de l'induction des gènes <i>ADE</i> en absence d'adénine, permettant ainsi de synthétiser de l'adénine. Ce résultat indique qu'il existe un mécanisme de régulation propre à Ty1 lors d'une carence en</p>	▲

	<p>adénine.</p> <p>Les éléments Ty1, classés en deux catégories d'expression (fortement ou faiblement exprimés) ne réagissent pas de la même façon lors d'une carence en adénine : les faiblement exprimés sont plus activés que les fortement exprimés. Plusieurs régions du promoteur de Ty1 semblent impliquées dans la régulation par l'adénine. L'activation par la carence en adénine est perdue dans des mutants modifiant la stoechiométrie des histones. Ces deux observations suggèrent que d'une part, l'intégrité du promoteur est nécessaire et d'autre part, que cette activation passe vraisemblablement par un remodelage de la chromatine au niveau des promoteurs Ty1.</p> <p>En parallèle, nous avons déterminé l'impact de la forte activation transcriptionnelle de Ty1 sur la rétrotransposition à l'aide d'un nouvel outil permettant de mesurer la rétrotransposition. Nous avons introduit le système rapporteur <i>his3AI</i> aux loci endogènes de 6 éléments Ty1 : trois faiblement et trois fortement transcrits puis mesuré leur fréquence de rétrotransposition lors d'une carence en adénine. Nous avons ainsi pu montrer que la mobilité des éléments faiblement exprimés est plus activée que celle des éléments fortement exprimés. Ce résultat suggère que l'activation transcriptionnelle de Ty1 par la carence en adénine est suivie par une activation proportionnelle de la rétrotransposition.</p>	
■	<p>10 mars 2005 à 10h30, Dragana DJURANOVIC - UPR 9080, Biochimie Théorique 'Structure et Dynamique des Acides Nucleiques : Application l'Elucidation du Mecanisme de la Reconnaissance entre E2 et ses Cibles'</p>	▲
■	<p>31 janvier 2005 à 14h30, salle de conférence de l'IBPC Guillaume PAILLARD - UPR 9080, Biochimie Théorique "Comment lire la séquence de la double hélice ? Le développement et l'application d'un outil pour analyser quantitativement les interactions spécifiques entre protéines et ADN."</p>	▲

2004		
■	<p>14 décembre 2004 à 14h, Salle de conférence de l'IBPC David STROEBEL - UMR 7099, Physico-chimie moléculaire des membranes biologique «Détermination de la structure du complexe cytochrome <i>b6f</i> par radiocristallographie»</p>	▲

■	<p>9 décembre 2004 à 14h, Salle de conférence de l'IBPC Aude CUNI - UPR 1261, Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste "Effets électrostatiques sur les potentiels rédox des cofacteurs et leurs conséquences sur les transferts d'électron dans les centres réactionnels photosynthétiques. Exemples dans les centres réactionnels des bactéries pourpres et dans le photosystème II".</p> <p>Résumé</p> <p>Les potentiels rédox des cofacteurs font partie des paramètres fondamentaux contrôlant les transferts d'électron intraprotéiques. La valeur de ces potentiels est fortement influencée par l'environnement protéique, et notamment par les interactions électrostatiques entre cofacteurs. L'importance de ces interactions a été mise en évidence à travers l'étude de deux situations dans les centres réactionnels photosynthétiques : 1- Chez les bactéries pourpres, l'existence d'une interaction électrostatique entre P et c559 a été démontrée. Elle a été estimée à 50 mV d'une part expérimentalement par titration électrochimique, d'autre part par des calculs d'électrostatique continue. L'influence du champ électrique transmembranaire a également été étudiée. 2- Dans le photosystème II, la recombinaison de charges a été caractérisée chez des mutants dans lesquels le potentiel de la phéophytine est modifié, conduisant d'une part à une révision du potentiel de P, d'autre part à une nouvelle modélisation de la thermoluminescence.</p>	▲
■	<p>30 Septembre 2004 à 10h, Salle de conférence de l'IBPC Manuela ZONENS - UMR 7099, Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques "Caractérisation des complexes formés entre le domaine transmembranaire de la protéine OmpA et des polymères amphiphiles, les amphipols. Application à l'étude structurale des protéines membranaires par RMN à haute résolution."</p> <p>Résumé</p> <p>Les protéines membranaires sont habituellement maintenues solubles, en milieu aqueux, à l'aide de détergent. Or, le caractère dissociant de ces derniers, combiné à la nécessité de les employer en large excès, entraîne souvent une inactivation de la protéine étudiée. Depuis plusieurs années, nous développons au laboratoire de nouvelles familles de tensioactifs, dont les amphipols. Ces polymères amphiphiles s'associent aux protéines membranaires par un attachement multipoint non covalent. Les complexes formés sont solubles en l'absence de détergent, et les protéines ainsi complexées sont généralement plus stables qu'en solution détergente. Parmi les nombreux domaines d'application des amphipols, l'un des plus intéressants concerne l'étude structurale des protéines membranaires par spectroscopie RMN des solutions. Pour développer cette application, nous avons choisi comme modèle une protéine de structure connue, le domaine transmembranaire de</p>	▲

OmpA, une protéine de la membrane externe d'*Escherichia coli*. Ce domaine (tOmpA) forme un tonneau β composé de huit brins antiparallèles. Nous présenterons tout d'abord l'aspect biochimique de ce travail, *i.e.* la caractérisation des complexes tOmpA/détergent et tOmpA/amphipol et la mise au point des conditions permettant le maintien en solution de ces complexes aux concentrations élevées requises pour la RMN. Nous examinerons ensuite, par une étude de transfert d'énergie de fluorescence entre la protéine et un amphipol marqué, la stabilité de la couche de polymère associée à la protéine. Enfin, nous présenterons et analyserons des cartes RMN de corrélation proton-azote des complexes tOmpA/détergent et tOmpA/amphipol. La comparaison de ces cartes permet de valider l'emploi des amphipols pour l'étude des protéines membranaires par spectroscopie RMN à haute résolution.



Membrane proteins usually are kept soluble in aqueous solutions using detergents. However, the dissociating character of detergents, combined with the frequent need to maintain an excess of them, generally results in the more or less rapid inactivation of the protein under study. Over the past few years, our laboratory has undertaken the development of a novel family of surfactants called "amphipols". These amphiphilic polymers bind to the transmembrane surface of proteins by noncovalent, multiple attachment points. The proteins thus complexed remain soluble in the absence of detergent. They are generally more stable than in detergent solutions. Among the many application domains of amphipols, one of the most interesting is their use in the structural investigation of membrane proteins by solution NMR spectroscopy. To develop this application, we have chosen as a model a small membrane protein of known structure, the transmembrane domain of OmpA, a protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. This domain (tOmpA) is folded into an eight-strand transmembrane β -barrel. We first describe the biochemical aspect of this work, namely the characterisation of tOmpA/detergent and tOmpA/amphipol complexes and the development of conditions allowing one to obtain well-behaved solutions of these complexes at the high concentrations required by NMR. We then study, using fluorescence energy transfer between the protein and a labelled amphipol, the stability of the polymer layer bound to the protein. Finally, we present and discuss proton-nitrogen NMR correlation spectra of tOmpA/detergent and tOmpA/amphipol complexes. Comparison of these spectra leads to validating the use of amphipols for membrane protein studies by high resolution NMR spectroscopy.



Lundi 21 juin 2004, 14h00, Salle de conférence de l'IBPC
Paulo Emanuel de Oliveira Marujo - [UPR 9073](#), Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes
"Polyadenylation et contrôle de la dégradation de l'ARN messager rpsO chez *Escherichia coli*"

Résumé

Il y a de plus en plus d'évidences que la stabilité de l'ARNm est un des paramètres qui module l'expression des gènes. Le travail

présenté dans cette thèse est une contribution à l'étude des mécanismes de la dégradation de l'ARN dans *Escherichia coli*.

Le modèle expérimental utilisé est l'ARNm *rpsO* codant la protéine ribosomale S15 dont nous savons déjà qu'il peut être dégradé par deux mécanismes. La voie dominante est déclenchée par une coupure endonucléolytique au site M_2 situé entre le codon stop et la tige-boucle du terminateur transcriptionnel localisée à l'extrémité 3' de l'ARNm. En absence de la RNase E qui catalyse cette réaction et des exoribonucléases qui dégradent l'ARN mûr (la polynucléotide phosphorylase et la RNase II) l'ARNm *rpsO* est dégradé par un mécanisme qui dépend de sa polyadénylation.

De manière inattendue, des mutations du site reconnu par la RNase E, M_2 , qui empêchent le coupure initiale de la voie majeure de dégradation stabilisent très peu le transcrit *rpsO*. Nous démontrons que ceci est dû au fait que les ARN dépourvus de site M_2 deviennent plus sensibles à la voie de dégradation poly(A) dépendante. Il apparaît de plus que l'ARNm est coupé par la RNase E à d'autres sites localisés dans la phase de lecture. La dégradation très lente d'un ARN délété à proximité du site M_2 nous a conduit à faire l'hypothèse que cette région est le site reconnu par la RNase E et le dégradosome.

Le dégradosome est un complexe multienzymatique contenant la RNase E, la polynucléotide phosphorylase, l'ARN hélicase RhlB et l'énolase. L'impossibilité de former ce complexe dans une souche synthétisant une RNase E tronquée, dépourvue de la région terminale à laquelle s'associent les composants du dégradosome, provoque une stabilisation très importante (8 fois) de l'ARNm *rpsO* (cette souche porte la mutation *rne131*). Nous montrons d'une part que cette mutation n'empêche pas la maturation de l'ARNm *rpsO* à M_2 et d'autre part que cette stabilisation est corrélée avec une inhibition de l'efficacité de la dégradation poly(A) dépendante.

Nous avons également analysé le rôle de la traduction dans la dégradation de l'ARNm *rpsO*. Nos résultats indiquent que la fixation des ribosomes au site de démarrage de la traduction protège l'ARN de la voie poly(A)-dépendante et que leur progression le long de la phase codante le met sous la dépendance de la voie de dégradation médiée par la RNase E. Nous concluons de ces expériences que la voie poly(A) dépendante prendrait en charge la dégradation des ARNm non traduits.

L'ARNm *rpsO* est adénylé par la poly(A) polymérase I et les queues poly(A) sont éliminées par la RNase II et la polynucléotide phosphorylase. Nous avons étudié le rôle de ces deux enzymes dans le métabolisme du poly(A). Nous montrons que la transcription se termine principalement *in vivo* à deux sites localisés 7 et 8 nucléotides en aval de la tige-boucle riche en G+C du terminateur transcriptionnel; à la même distance que les sites de terminaison identifiés *in vitro* et que les transcrits primaires peuvent être soit grignotés par la RNase II soit allongés par la poly(A) polymérase. De plus, la RNase II peut complètement retirer les queues poly(A). Au contraire, la PNPase n'enlève que partiellement le poly(A); elle génère des molécules qui ont encore 3 à 4 A à leur extrémité 3'. Enfin la PNPase peut également passer au travers de la structure secondaire terminale du terminateur et dégrader le corps du message. Un modèle est présenté dans lequel la RNase II élimine les queues poly(A) qui déstabilisent l'ARNm.



Gene expression can be regulated at different levels. In recent

years there has been more and more evidence produced showing that degradation of mRNA is an important step in the control of gene expression. This thesis focuses on mRNA stability and on mechanisms of RNA degradation.

I have investigated mRNA decay in the bacteria *Escherichia coli*. The experimental model used was basically the *rpsO* transcript coding for ribosomal protein S15. This mRNA can be degraded by two distinct mechanisms. The predominant one is initiated by an endonucleolytic cleavage by RNase E at the M₂ site located between the stop codon and the hairpin structure of the Rho-independent terminator. In the absence of RNase E and of the two exoribonucleases RNase II and PNPase this messenger is degraded by a mechanism dependent on polyadenylation by PAP I at its 3' end.

Unexpectedly, we observed that mutations at the M₂ site which prevent the rate limiting RNase E cleavage do not significantly stabilise the *rpsO* transcript. We demonstrated that this is due, in part, to an activation of the poly(A) dependent route of decay which suggests that the two mechanisms of decay are coordinated. In addition, RNase E slowly cleaves the mutated mRNAs at other sites located in the coding sequence. Moreover, the dramatic stabilisation resulting from the deletion of nucleotides surrounding the M₂ processing site led us to propose that the M₂ region contains a direct entry site for RNase E or for the degradosome.

The degradosome is a multienzyme complex whose main components are RNase E, PNPase, the RNA helicase RhlB and enolase. Disruption of this complex in a strain synthesising a truncated RNase E (these cells harbour the *rne131* allele) lacking the C-terminal scaffold region responsible for association of the degradosome components causes an 8-fold stabilisation of the *rpsO* transcript but does not abolish the rate limiting cleavage at the M₂ site. We present data suggesting that this stabilisation resulting from lack of degradosome formation, is due, at least in part, to an inhibition of the poly(A) dependent route of decay.

We also analysed the role of translation on *rpsO* mRNA decay. We showed that ribosome binding protects the *rpsO* transcript from poly(A) dependent degradation and that the movement of ribosomes along the transcript puts the RNA molecule under the control of the RNase E dependent route of decay initiated at M₂. We conclude that the poly(A) dependent mode of decay preferentially eliminates non functional messengers.

The *rpsO* mRNA is adenylated by PAP I and 3' terminal tails are degraded by RNase II and polynucleotide phosphorylase (PNPase). We have investigated the roles of these two exoribonucleases. We show that transcription primarily terminates *in vivo* at two sites located 7 and 8 nucleotides downstream of the GC-rich hairpin of the intrinsic terminator and the same positions were identified as transcription termination sites *in vitro*. The primary transcripts can be either nibbled by RNase II or oligoadenylated by PAP I *in vivo*. Moreover RNase II can completely remove the oligo(A) tails. In contrast, degradation of poly(A) by PNPase stops when the RNA still harbours tails of 3 - 4 As. PNPase can also degrade through the hairpin of the Rho-independent terminator and degrade the body of the message. A model is presented in which RNase II removal of the oligo(A) tails stabilises the mRNA.

■	<p>Vendredi 5 mars 2004, 14h30, Salle de conférence de l'IBPC Isabelle NAVIZET UPR 9080, Biochimie Théorique "Modélisation et analyse des propriétés mécaniques des protéines"</p> <p>Résumé</p> <p>Nous avons utilisé des outils de la modélisation moléculaire, et développé de nouvelles approches, pour l'étude des propriétés mécaniques des protéines. La première étude présentée concerne la mécanique de la myosine par l'analyse des modes normaux d'un modèle granulaire (GNM), où la protéine est représentée par un réseau de ressorts gaussiens. La comparaison des matrices de distance entre différentes structures cristallographiques permet une meilleure compréhension de sa structuration en domaine. La deuxième approche utilise une représentation en coordonnées internes pour étudier la réponse des protéines à des contraintes mécaniques globales, induisant un dépliement, et locales, permettant de définir l'élasticité à l'échelle du résidu. La contrainte locale développée permet aussi de donner des informations sur le couplage mécanique entre les résidus et de définir des domaines mécaniques. Cette approche avec un modèle granulaire permet une étude systématique de plusieurs protéines.</p>	▲
■	<p>Jeudi 26 Février 2004, 15 h, Salle de conférence de l'IBPC Aziz El HAGE - UPR 9073, Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes "Protéines chaperons intervenant dans l'assemblage des ribosomes chez Escherichia coli".</p>	▲

2003		
■	<p>Lundi 8 décembre 2003, 9h30, Salle de conférence de l'IBPC Mohamed TRIBA - UMR 7099, Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques "Etude Physico-Chimique de Bicelles par RMN du Phosphore-31"</p> <p>Résumé</p> <p>La première partie de cette thèse, consacrée à l'étude d'un mélange de détergents (en collaboration avec la société L'ORÉAL), a montré que la technique de rotation à l'angle magique (MAS) permettait d'étudier par RMN du proton des suspensions très concentrées de détergents. J'ai ensuite développé en détail des travaux sur les bicelles par RMN du phosphore (31P). Afin d'interpréter les résultats de cette étude physico-chimique, je les ai analysés dans le cadre des différents modèles structuraux qui étaient alors proposés dans la littérature (bicelles discoïdales idéales, lamelles trouées). En comparant les structures proposées et les observations expérimentales, cette analyse m'a conduit à développer un nouveau modèle structural (les bicelles mixtes). La validation expérimentale</p>	▲


de ce modèle ainsi que la détermination du diagramme de phase des bicelles constitueront la partie centrale de ce manuscrit. J'ai également entamé la mise au point des bicelles dont la composition lipidique de la bicouche s'approchait le plus possible de la composition d'une membrane biologique, tout en conservant la capacité de ces structures discoïdales à s'orienter dans un champ magnétique. J'espère que de telles études physico-chimiques de micelles de détergents et de bicelles lipidiques permettront ainsi d'obtenir des bases utiles pour étudier des protéines membranaires reconstituées, soit par RMN des liquides (en micelles), soit par RMN des solides (en MAS ou en bicelles).

■ Vendredi 21 novembre 2003, 14h00, Bibliothèque de l'IBPC
Maude GUILLIER - [UPR 9073](#), Régulation de l'expression génétique chez les microorganismes
"Contrôle traductionnel de la synthèse des protéines ribosomiques et assemblage des ribosomes chez *E.coli* : interaction de la protéine L20 avec ses ARN-cibles"

■ Vendredi 07 novembre 2003, 14h00, Bibliothèque de l'IBPC
Stephan EBERHARD - [UPR 1261](#), Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste
"Contribution à l'étude des étapes post-transcriptionnelles de l'expression des gènes chloroplastiques chez *Chlamydomonas reinhardtii*"

Résumé

Les sous-unités des complexes protéiques de la chaîne photosynthétique thylakoïdale présentent une origine génétique double, certaines étant codées par le noyau, alors que d'autres sont codées par le génome chloroplastique. Ce dernier étant fortement polyploïde par opposition au génome nucléaire, des mécanismes de régulations doivent exister pour permettre une synthèse en quantité stoechiométrique des différents partenaires d'assemblage. Cherchant les facteurs limitant dans l'expression du génome chloroplastique chez *Chlamydomonas reinhardtii*, nous avons montré qu'il n'existe généralement pas de corrélations entre la ploïdie de ce génome, son taux de transcription, le niveau d'accumulation des transcrits et leur taux de traduction. Ceci suggère que seul un sous-ensemble des messagers chloroplastiques est dirigé vers la traduction à chaque instant, l'activation traductionnelle de ceux-ci passant par l'action de nombreux facteurs protéiques d'origine nucléaire. Nous avons caractérisé deux de ces facteurs, intervenant spécifiquement dans la traduction du messenger chloroplastique *atpA*. L'analyse plus détaillée de l'un d'entre eux (TDA1) a montré que sa cible moléculaire était située dans la région 5' du messenger *atpA* et qu'il intervenait dans le démarrage de la traduction de ce transcrit. Le large excès de messagers chloroplastiques par rapport à la quantité requise pour assurer des taux de synthèses protéiques physiologiques soulève également la question du devenir des transcrits non-traduits. Par l'étude de la distribution du messenger chloroplastique *atpA* en gradients de

	<p>saccharose pour des souches affectées différemment pour sa traduction, nous montrons qu'il existe dans le chloroplaste des complexes ribonucléoprotéiques non-polysomiques de haute densité, pouvant intervenir dans la séquestration des messagers non engagés dans la traduction.</p> <p> Proteins of the photosynthetic apparatus are encoded either by the nuclear or the chloroplast genome. The latter being highly polyploid, control mechanisms must exist that ensure production of chloroplast-encoded subunits in a well-defined stoichiometry with regard to their nuclear assembly partners. In the search for limiting steps in the expression of the chloroplast genome of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>, we show that there is generally no correlation between the ploidy of the genome, its transcription rate, mRNA accumulation levels and protein synthesis rates, but rather that only a subset of available chloroplast transcripts are directed towards translation at any moment. The translational activation of this subset of chloroplast transcripts relies on the action of numerous nuclear-encoded factors. We have characterized two of them, that are specifically required for the translation of the chloroplast <i>atpA</i> transcript. The more detailed analysis of one of them (TDA1) shows that its molecular target lies in the 5' region of the <i>atpA</i> mRNA and that it is required for the translational initiation of this transcript. The large excess of chloroplast mRNAs with regards to the quantity needed to maintain wild-type levels of protein synthesis rates also raises the question of the form of existence of non-translated transcripts. The analysis of the distribution of the chloroplast <i>atpA</i> transcript in sucrose gradients for various mutants differentially affected for its translation shows that non-polysomal ribonucleoproteic complexes exist in the organelle and may function as storage particles of untranslated mRNAs.</p>	
■	<p>Vendredi 19 septembre 2003, 14h30, Salle de Conférences de l'IBPC Jean-sébastien SCHONN - UPR 1929, Biologie cellulaire et moléculaire de la sécrétion "Mécanismes de la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs ; rôle des GTPases Rab3 et Rab27"</p>	▲
■	<p>Vendredi 31 janvier 2003 à 14h30, Salle de Conférences de l'IBPC Emmanuel GIUDICE - UPR 9080, Biochimie Théorique</p>	▲

2002		
■	<p>Mardi 19 novembre 2002 à 15h sur le campus d'Orsay (bâtiment 510, amphi moyen). Julien HEUVINGH - UMR 7099, Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques "L'hémifusion des vésicules géantes : caractérisation d'un état intermédiaire vers la fusion en présence de forces spécifiques"</p> <p>Résumé</p>	▲

Nous avons étudié l'interaction entre deux vésicules géantes pour modéliser la fusion membranaire, un processus biologique impliqué entre autres dans l'infection virale et la communication intra- et extracellulaire. La fusion dans la cellule est déclenchée par l'action de protéines fusogènes qui, dans une des étapes, rapprochent deux membranes opposées jusqu'à une faible distance intermembranaire. Dans notre système, le rapprochement des membranes est induit par l'attraction spécifique entre lipides portant des nucléotides adénine et thymine sur leur tête. Nous avons estimé numériquement la distance d'équilibre entre deux bicouches, elle décroît de 2,6 nm sans forces spécifiques à 1,4 nm en présence de forces spécifiques.

Deux vésicules sont micromanipulées afin d'être placées en contact. Un mélange partiel des lipides et une indépendance des milieux internes sont observés en microscopie de fluorescence. Le mélange partiel des lipides est quantifié ; il correspond à un mélange complet des monocouches externes avec une indépendance des monocouches internes. Ces observations caractérisent un état intermédiaire vers la fusion : l'hémifusion.

La cinétique de redistribution des lipides entre les deux vésicules est mesurée ; elle est indépendante de la proportion de lipides fonctionnalisés, mais s'accorde bien dans la plupart des cas à un modèle de diffusion sur une " cacahouète ". Cet accord est compatible avec la présence d'au moins quelques pédoncules à l'interface entre les vésicules. Des événements de fusion complète sont parfois observés, ce qui nous ouvre des perspectives pour obtenir une fusion complète de manière reproductible.

■ Lundi 30 septembre 2002 à 10 h, Salle de Conférences de l'IBPC
Yann GOHON - [UMR 7099](#), Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques
"Etude structurale et fonctionnelle de deux protéines membranaires, la bactériorhodopsine et le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, maintenues en solution aqueuse non détergente par des polymères amphiphiles"

Résumé

Les amphipols, des polymères amphiphiles, permettent de maintenir en solution aqueuse non détergente les protéines membranaires (PMs) sous forme de complexes hydrosolubles. Afin d'étudier et de caractériser la couche de polymère liée aux PMs, nous avons utilisé la diffusion de neutrons aux petits angles. La bactériorhodopsine (BR), très bien caractérisée tant du point de vue structural que fonctionnel, a été choisie comme PM modèle. Nous avons préparé et caractérisé les amphipols (APols) anionique en solution, ainsi que les complexes BR/détergent et BR/APol. Pour ce faire, nous avons utilisé l'ultracentrifugation analytique et la chromatographie d'exclusion de taille comme techniques d'appoint à la diffusion de neutrons aux petits angles. Deux difficultés toutefois sont apparues : la présence de lipides endogènes et une légère hétérogénéité, non détectée par les techniques précédemment utilisées : les solutions de BR en détergent contiennent de 15 à 20 % de dimère de BR, voire de trimères (5%), qui sont piégés en APol en même temps que le monomère. Ces deux problèmes ont rendu l'étude de l'extension dans l'espace de la couche d'amphipol

délicate. De cette étude il ressort que la BR lie environ deux fois moins d'APols que de détergent, mais que l'hydratation des complexes BR/APol, qui est élevée, compense la différence de masse entre ces deux types complexes. Une deuxième étude a porté sur les équilibres conformationnels du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Elle a montré que cette PM, dont les équilibres sont fortement perturbés en solution détergente, retrouvait, après piégeage en APol et élimination du détergent, des équilibres conformationnels identiques à ceux de la protéine dans son environnement membranaire. La dernière partie de ce travail a été l'étude d'APols neutres. Cette étude a montré que ces nouveaux polymères étaient eux aussi capables de maintenir les PMs solubles en solution aqueuse en absence de détergent.



Amphipols (APols) are amphiphilic polymers that bind to membrane proteins (MPs) and keep them soluble in detergent-free aqueous solutions. We have used small angle neutrons scattering (SANS) to study and characterize the layer of MP-bound anionic APols. Bacteriorhodopsin (BR), whose function and structure are well characterized, was chosen as model MP. We have prepared and characterized the solution properties of APols alone as well as BR/detergent and BR/APol complexes. Analytical ultracentrifugation and size exclusion chromatography were used to complement SANS data. Two problems were identified : *i*) BR was found to retain large amounts of endogenous lipids ; *ii*) a slight heterogeneity, undetectable by the techniques used before this study and representing 15-20 % dimeric and ~5 % trimeric BR, was observed both in detergent solutions and in the preparations of BR/APol complexes derived from them. These two difficulties made a detailed analysis of the thickness of the MP-adsorbed APol layer problematical. The amount of polymer bound to BR is about half that of detergent. However, the higher hydration of the polymer probably makes up for the mass difference between BR/APol and BR/detergent complexes. A second study bears on the functional properties of APol-trapped nicotinic acetylcholine receptor. This MP, whose allosteric equilibria are altered in detergent solutions, regain membrane-like conformational equilibria after trapping with APols and dilution under the critical micellar concentration of the detergent. The last part of this work deals with the study of novel, non-ionic amphipols. These polymers were found to be able to keep MPs soluble in detergent-free aqueous solutions as efficiently as classical, anionic APols.



Vendredi 20 Septembre 2002 à 15 h, Salle de Conférences de l'IBPC

Katia Wostrikoff - [UPR 1261](#), Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste

"Régulation de la traduction chloroplastique chez *Chlamydomonas reinhardtii*, cytochrome *f* et autres protéines CES"

Résumé

La biogenèse de l'appareil photosynthétique nécessite l'action concertée des génomes nucléaires et chloroplastiques pour produire en quantité stœchiométrique les sous-unités des complexes de la membrane photosynthétique, d'origine génétique double.



Au cours de ce travail effectué sur l'organisme modèle *Chlamydomonas reinhardtii*, nous caractérisons un mécanisme original traduisant cette concertation : le processus CES (**C**ontrôle par **E**pistasie de **S**ynthèse), processus qui repose sur une régulation de la traduction. En prenant l'exemple du gène chloroplastique *petA* codant le cytochrome *f*, une protéine majeure du complexe cytochrome *b₆f*, nous montrons que la traduction de ce gène dépend de l'assemblage de la protéine au sein du complexe. En absence de ses partenaires d'assemblage, la synthèse du cytochrome *f* - mais pas sa stabilité - est réduite. Nous présentons une caractérisation du mécanisme impliqué qui repose sur :

1. une régulation de l'initiation de la traduction
2. un domaine régulateur porté par la protéine CES, qui exerce une action inhibitrice en absence d'assemblage
3. un effecteur ternaire, plutôt qu'une interaction directe entre le motif régulateur et la région 5' non-traduite du gène CES. Ce facteur ternaire pourrait être un activateur traductionnel, qui piégé par la sous-unité non-assemblée, ne serait plus disponible pour initier la traduction.

Nous avons caractérisé un activateur traductionnel, requis spécifiquement pour l'initiation de la traduction du gène *petA*, le gène TCA1, qui pourrait être l'effecteur du processus CES.

Enfin, nous avons démontré l'existence d'autres protéines CES au sein des complexes de la membrane photosynthétique de *C. reinhardtii*. Le contrôle de la traduction par l'assemblage des sous-unités PsaA et PsaC du photosystème I, et des sous-unités D1 et P5 du photosystème II repose sur le même mécanisme : une autorégulation négative de l'initiation de la traduction par la sous-unité CES non-assemblée. Ces observations posent la question d'une éventuelle généralisation du processus CES et de son mécanisme aux plantes supérieures, et à un autre organite, la mitochondrie.

■ Mardi 25 juin 2002 à 10h30, à l'INA-PG, 16 rue Claude-Bernard Paris 5^e - Amphi Tisserand ▲

Majeran WOJCIECH - [UPR 1261](#), Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste

"La protéolyse dans le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii*, rôle et organisation structurale de la protéase ClpP"

Résumé

Ce travail est centré sur l'étude du complexe protéolytique ClpP et de son rôle dans la protéolyse chloroplastique chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Le génome chloroplastique de *C. reinhardtii* contient un unique (et essentiel) gène *clpP1*. Les banques d'EST de *C. reinhardtii*, contiennent les ADNC de 7 gènes nucléaires codants pour des protéines similaires à ClpP1. Deux produits de ces gènes sont putativement actifs (ClpP3 et ClpP5), les 5 autres, à cause de l'absence dans leur séquence des résidus catalytiques des protéases à sérine, sont supposés inactifs (ClpR1, -R2, -R3, R4, et R5). Les

gels natifs en deux dimensions (CN-PAGE et SDS-PAGE) et l'analyse par spectroscopie de masse ont montré la présence des produits de ces gènes (à l'exception de ClpR2) dans le complexe chloroplastique contenant ClpP1. Ce complexe possède un poids moléculaire plus important (540 kDa) que les complexes ClpP décrits dans d'autres organismes. Cela est dû à la présence de la sous-unité HMW-ClpP1 de haut poids moléculaire (59,5 kDa), produit du gène *clpP1*. Des indications existent qu'une protéine de bas poids moléculaire (LMW-ClpP1), également codée par le gène *clpP1*, serait produite par un processus d'épissage protéique d'un type nouveau impliquant l'élimination d'une séquence d'insertion protéique (IS1) de HMW-ClpP1. HMW-ClpP1 pourrait également avoir un rôle structural dans l'interaction entre le complexe ClpP et les chaperonnes HSP100.

Le gène *clpP1* est essentiel chez *C. reinhardtii*. Nous avons perturbé sa fonction en atténuant son expression par une mutation de son codon d'initiation (AUGAUU). Dans le mutant, l'accumulation des formes HMW-ClpP1 et LMW-ClpP1 est réduite de 60 à 75 % par rapport à la souche sauvage. Nous avons pu suivre *in vivo* les effets de la réduction de l'expression de ClpP1, soit en conditions de stress, soit en introduisant la mutation *clpP1-AUU* dans différents contextes génétiques où des dégradations accrues des protéines chloroplastiques ont été décrites. Nous avons pu montrer l'implication de ClpP dans la dégradation des complexes protéiques membranaires (cytochrome *b₆f*, ou le PSII) ou soluble (Rubisco), lors d'un stress nutritionnel (induit par l'absence de soufre ou d'azote) ou d'un stress lumineux (PSII dans les mutants de l'ATP-synthétase). ClpP est également impliquée dans la dégradation d'un complexe cytochrome *b₆f* partiellement assemblé (mutants de la protéine de Rieske) ou des sous-unités non-assemblées (protéine de Rieske mutée, sous-unités - et -CF₁ de l'ATP-synthétase). Quand RbcL, une protéine très abondante, est mutée, il n'est pas possible d'atténuer ClpP sans tuer la cellule.

[BASTARD Karine](#)

[CUNI Aude](#)

[DAHMANE Tassadite](#)

[DURRIEU Marie-Pierre](#)

[ELQAIDI Samir](#)

[GOHON Yann](#)

[HAENTJENS Julie](#)

[HEBERHARD Stephan](#)

[HEDDI Brahim](#)

[HEUVINGH Julien](#)

[HUET Sébastien](#)

[LOISELAY Christelle](#)

[LOPEZ Ivan](#)

[MELQUIOND Adrien](#)

[NAVIZET Isabelle](#)

[OLIVEIRA MARUJO Paulo](#)

[Emanuel de](#)

[RODRIGUEZ Nicolas](#)

[SERVANT Géraldine](#)

[TODESCHINI Anne-Laure](#)

[TRIBA Mohamed](#)

[WOJCIECH Majeran](#)

[WOSTRIKOFF Katia](#)

[zoonens Manuela](#)