

Neuvièmes Entretiens de l'IBPC 8 juin 2006

9h10- 17h00 - Bibliothèque de l'IBPC

9h10 - 9h30 Introduction de la journée et présentation de l'IBPC - *Jean-Pierre Henry*

9h30 - 10h45 Les différentes composantes de l'IBPC
Modérateur: *Jean-Pierre Henry*

- **Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion - UPR 1929 - *Raquel Ruivo***
- **Laboratoire de Régulation de l'Expression Génétique chez les Microorganismes - UPR 9073 - *Pascale Lesage***
- **Laboratoire de Biochimie Théorique - UPR 9080 - *Philippe Derreumaux***
- **Physico-Chimie Moléculaire des Membranes Biologiques - UMR 7099 - *Dror Warschawski***
- **Laboratoire de Physiologie Membranaire et Moléculaire Chloroplaste - UMR 7141 - *Fabrice Rappaport***

10h45 - 11h 5 Pause café

11h 5 - 12h30 Dynamique et interactions des macromolécules biologiques
Modérateurs: *François-André Wollman - Bruno Gasnier*

- **Reconnaissance et spécificité protéine/ADN - *Cyril Deremble***
- **Mimétisme moléculaire dans la régulation de l'expression des gènes procaryotes - *Nasslie Choone***
- **La terminaison de la synthèse protéique : Les différents acteurs - *Valérie Heurgué-Hamard***
- **Etude des propriétés dynamiques des cadhérines - *Fabien Caillez***

12h30 - 14h30 Buffet

14h30 - 15h30 Dynamique des membranes cellulaires
Modérateurs: *Jean-Luc Popot - Mathias Springer*

- **Flippase action visualized by shape changes of giant vesicles - *Stefanie Vehring***
- **Régulation par les acides gras complexés au coenzyme A de l'organisation structurale de protéines impliquées dans la dynamique membranaire - *Christine Anne***
- **Rôle de la myosine V dans le transport intracellulaire des granules de sécrétion - *Sébastien Huet***

15h30 - 16h00 Pause

16h00 - 17h00 Les protéines membranaires : de la synthèse à la fonction
Modérateurs: *Philippe Devaux - François Darchen*

- **Synthèse acellulaire de protéines membranaires - *Kyu-Ho Park***
- **La voie CCB : un quatrième système de fixation des hèmes de type c - *Denis Saint-Marcoux***
- **Projet inter-laboratoire autour du cytochrome b6f : de la biochimie structurale à la bioénergétique cellulaire - *Jean Alric***

17h00 - 17h15 Clôture de la journée - *Francis-André Wollman*

17h 15 Apéritif

Dynamique et interactions des macromolécules biologiques

Modérateurs: *François-André Wollman - Bruno Gasnier*

■ **Reconnaissance et spécificité protéine/ADN, Cyril Dereemble**

Certaines protéines se lient à l'ADN avec une grande spécificité de séquence. La caractérisation de cette sélectivité et les mécanismes de cette reconnaissance sont difficiles à mettre en évidence expérimentalement. De plus, la croissance exponentielle du nombre de séquences pouvant agir avec la protéine interdit toute approche exhaustive pour des longueurs supérieures à une dizaine de paire de bases. L'emploi d'une représentation multi-copie de l'ADN permet d'échapper à cette limite combinatoire, et d'étudier en modèle tout-atome l'ensemble des séquences possibles, sans limite de taille. Une approche inspirée de la physique statistique nous permet ensuite d'explorer entièrement l'espace énergétique des séquences d'ADN complexées à une protéine. A partir d'une structure tri-dimensionnelle détaillée d'un complexe, cette méthode est utilisée pour prédire et quantifier la spécificité de la reconnaissance protéine-ADN. De plus, un pas est accompli vers la compréhension des mécanismes de reconnaissance en utilisant de simples décompositions d'énergies, comme la déformation de l'ADN, ou son interaction avec des acides aminés clefs de la protéine.

■ **Mimétisme moléculaire dans la régulation de l'expression des gènes procaryotes, Nasslie Choone**

Chez *E. coli*, l'expression des protéines ribosomiques est souvent soumise à un autocontrôle qui agit au niveau de la traduction. La protéine ribosomique L20 réprime l'expression de son opéron en se liant à l'ARNm au niveau d'un site qui présente des similitudes structurales avec son site sur l'ARN 23S. Ce mimétisme moléculaire semble également impliqué dans le contrôle du même opéron chez les bactéries à Gram + mais dans le contexte d'une régulation par antitermination transcriptionnelle. Ceci suggère que le concept du mimétisme moléculaire est très versatile, capable d'être intégré dans des mécanismes de contrôle très variés.

■ **La terminaison de la synthèse protéique : Les différents acteurs, Valérie Heurgué-Hamard**

Le décodage des codons de terminaison présents sur l'ARNm fait intervenir le ribosome ainsi que des protéines appelées facteurs de terminaison (RF pour Release Factors) de classe I. Les différentes études structurales menées afin de mieux comprendre le mode d'action des RF seront présentées. Le mimétisme entre RF et ARN de transfert ainsi que l'hypothèse d'un changement majeur de conformation des RF après la reconnaissance du codon stop seront discutés.

■ **Etude des propriétés dynamiques des cadhérines, Fabien Caillez**

Les E-cadhérines appartiennent à une famille de molécules impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaire et dont l'activité est régulée par la présence d'ions calcium. Leur rôle est primordial dans les étapes d'embryogenèse et de maintien des tissus, et une déficience dans leur activité peut entraîner l'apparition et le développement de métastases. Les propriétés adhésives de ces molécules sont principalement dues aux deux domaines situés à l'extrémité N-terminale (notés EC1-2) et la perte de leur activité en l'absence de Ca^{2+} est imputée à un effondrement de la structure de la molécule, qui présente une forme de bâtonnet lorsqu'elle est complexée aux ions Ca^{2+} . Malgré les nombreuses données expérimentales accumulées, les détails des interactions moléculaires responsables des propriétés des cadhérines ne sont pas encore connus.

Nous avons réalisé une série de simulations de dynamique moléculaire à l'échelle de la nanoseconde du fragment EC1-2 dans différents états de complexation. Les résultats montrent une augmentation de la flexibilité de la molécule lorsque les ions calcium sont retirés. Les changements structuraux observés pour la cadhérine libre sont en accord avec les observations expérimentales et s'accompagnent d'une déformation des trois sites de fixation des ions Ca^{2+} situés à la jonction des deux domaines. Par ailleurs, en l'absence de calcium, on

observe la fixation spontanée mais temporaire d'ions potassium qui n'est cependant pas suffisante pour rigidifier la région charnière entre les deux domaines. Au contraire, le retrait de l'ion Ca^{2+} le plus exposé au solvant ne perturbe pas significativement le comportement dynamique des fragments de cadhérine. Nous avons étendu notre travail aux dimères de E-cadhérine. Trois différentes formes dimériques du fragment EC1-2 ont été observées expérimentalement, et leur rôle dans les mécanismes d'adhésion cellulaire est toujours en question. Ces trois dimères ont été soumis à des simulations de dynamique moléculaire afin d'observer leurs stabilités relatives et leurs différents comportements dynamiques, dans le but d'apporter de nouvelles informations sur leur potentielle implication dans les phénomènes adhésifs engendrés par les cadhérines.

Dynamique des membranes cellulaires

Modérateurs: Jean-Luc Popot - Mathias Springer

■ Flippase action visualized by shape changes of giant vesicles, Stefanie Vehring

Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) serve as a model membrane system providing for visibility in light microscopy. The observable shapes are governed by composition of both membrane leaflets, which can be utilised as a novel tool for visualising transbilayer distribution and hence movement of lipids. The general approach will be introduced and illustrated by recent examples of assessing protein mediated lipid dynamics.

■ Régulation par les acides gras complexés au coenzyme A de l'organisation structurale de protéines impliquées dans la dynamique membranaire, Christine Anne

The BAR domain is a lipid-binding module involved in sensing the curvature of biological membranes that is present in a great number of cytosolic proteins with membrane-deforming activities. We have investigated the lipid-binding properties of BAR domain-containing proteins, including endophilins and amphiphysins. We focused our attention on their interaction with long chain fatty acyl-CoAs (FACoAs).

We found that endophilin binds to oleoyl-CoA. This property is conserved between the BAR domains of several proteins. We pursued the characterization of the lipid-protein complex using mass spectrometry. We observed that a major proportion of the monomers that constitute the BAR domain of either endophilin A2 or amphiphysin 1 is associated to a component whose mass corresponds to oleoyl-CoA. Albeit to minor proportions, BAR domains were also found in complexes with oleoyl or the CoA moiety, showing that the lipid and the nucleotide part of FACoAs are probably both involved in binding.

This binding could have diverse roles. This interaction could be an intermediate step in an enzymatic reaction mediating the transfer of the acyl chain on a protein or another lipid. This binding could also induce a modification of the curvature of the target membrane either by extraction of the lipid from the membrane or by insertion. Lastly, this interaction could trigger a structural modification of the BAR domain.

We have explored the latter possibility and addressed the influence of FACoAs on one of the structural properties of the BAR domain, *i.e.* its dimerization. We observed that incubation with oleoyl-CoA triggered a reduction in the proportion of dimers versus monomers. This effect was specific regarding the length and unsaturation of acyl chains. We suggest that the binding of FACoAs could regulate the assembly of BAR domain containing proteins by competing with hydrophobic interactions stabilizing the dimeric form, hence reducing their activity.

■ Rôle de la myosine V dans le transport intracellulaire des granules de sécrétion, Sébastien Huet

The function of myosin Va (MyoVa) in secretory granule (SG) trafficking in neuroendocrine cells was investigated using wide field and total internal reflection fluorescence microscopy. A MyoVa construct lacking the motordomain (MyoVa tail) was used to block MyoVa function. It was addressed to SG, induced SG clustering, reduced the density of SG at the cell periphery, and further prevented the docking and fusion of these peripheral granules. The effect on docking was mainly responsible for the effect on exocytosis. Lowering MyoVa levels by RNA interference also severely reduced the density of SG in the actin-rich cortex and prevented the

formation of SG-rich areas. MyRIP, which is associated with SG and interacts with MyoVa, controls SG recruitment at the cell periphery and thus probably serves as a receptor for MyoVa on SG. These data suggest that MyRIP and MyoVa mediate the peripheral capture of SG and their transport through the actin-rich cortex toward docking sites, thereby controlling secretion.

Les protéines membranaires : de la synthèse à la fonction

Modérateurs: *Philippe Devaux - François Darchen*

■ Synthèse acellulaire de protéines membranaires, *Kyu-Ho Park*

In vitro protein synthesis has been developed in the 1960's and it has become a powerful expression method for soluble proteins due to recent advancements mainly the energy source regeneration method (Spirin, 1988). The in vitro synthesis of proteins has a variety of applications, including the rapid identification of gene products (e.g., proteomics), protein folding studies. Also, the use of in vitro systems can have advantages over in vivo gene expression when the overexpressed product is either toxic to the host cell, or when the produced protein undergoes rapid proteolytic degradation by intracellular proteases. Moreover, the cell-free protein expression is an "open" system so that any additional compound can be added in the synthesis medium, such as labeled or unnatural aminoacids, co-factors... Recently, different groups have reported successful in vitro expression of eight different membrane proteins with mg-yields (per ml of lysate). Some of these proteins were expressed in the presence of detergents belonging to different classes and in some cases activities were preserved for tested proteins. Detergents are used to maintain membrane proteins in solution, but can be too "aggressive" to preserve also their activity in time. Thus, we widened the study to non-detergent surfactants such as currently used in our laboratory. We show that these molecules are compatible with functional in vitro protein expression.

Thus, cell-free expression opens a "new" route to express membrane proteins for functional studies, but also for structural investigations.

■ La voie CCB : un quatrième système de fixation des hèmes de type c, *Denis Saint-Marcoux*

La fixation de l'hème c*i* du cytochrome b6 requiert au moins 4 protéines codées par le génome nucléaire de *C. reinhardtii*. Ces protéines ne renvoient à aucune fonction connue et sont conservées dans les organismes photosynthétiques. A l'heure actuelle, nous avons montré que 2 des CCB étaient adressées au chloroplaste, et membranaires. Des premiers résultats de mutagenèse dirigée indiquent l'importance probable de résidus tryptophanes strictement conservés.

■ Projet inter-laboratoire autour du cytochrome b6f : de la biochimie structurale à la bioénergétique cellulaire, *Jean Alric*

L'obtention récente de la structure cristallographique d'un complexe photosynthétique membranaire, le cytochrome b6f, a suivi de peu la création, à l'IBPC, du plateau technique de cristallographie. Cette avancée a permis de renforcer une collaboration déjà ancienne et fructueuse entre deux laboratoires de l'Institut, le Laboratoire de Physico-Chimie des Membranes Biologiques et le Laboratoire de Physiologie Membranaire et du Chloroplaste. Une telle collaboration, renouant avec " l'esprit de la maison ", donne tout son sens aux relations structure/fonction dans l'étude des protéines, dans la mesure où des compétences complémentaires, réunies localement permettent de construire une histoire scientifique où la structure cristallographique d'une protéine ouvre de nouvelles pistes pour l'étude de son rôle dans la bioénergétique cellulaire.

Comité d'organisation

Christine Anne
Laurent Catoire
Stephan Eberhard
Jean Christophe Gelly
Valérie Heurgué-Hamard

