

# SIXIEMES ENTRETIENS DE L'IBPC

2 et 3 décembre 1999

## PROGRAMME

### 2 DECEMBRE

13h30 INTRODUCTION GENERALE : P. JOLIOT

#### « *Interactions macromoléculaires* »

1<sup>ère</sup> partie - modérateurs : H. PUTZER et S. CRIBIER

13h35-13h55 **Youri TIMSIT (CNRS UPR 9080)**  
“ Cristallographie à l'IBPC : Aspects méthodologiques et thématiques”

13h55-14h15 **Guillaume BERTUCAT (CNRS UPR 9080)**  
“ Modélisation de la reconnaissance de séquence et de l'échange de brins d'ADN induits par RecA”

La modélisation moléculaire est employée pour proposer un nouveau modèle du mécanisme d'action de la protéine RecA catalysant l'échange de brins entre une double hélice et un simple brin d'ADN. Ce modèle se distingue par la formation d'une triple hélice où le brin “envahisseur” se situe dans le petit sillon.

14h15-14h35 **Ingrid LAFONTAINE (CNRS UPR 9080)**  
“ Optimisation des séquences de l'ADN”

Mise au point d'une méthodologie théorique qui permet de déterminer rapidement la séquence de l'ADN la plus apte à subir une déformation (courbure, étirement...) ou à favoriser une interaction donnée (ADN-protéine, ADN-ligand...). Cette approche semble prometteuse dans le domaine de l'analyse des génomes pour accéder aux propriétés structurales et mécaniques d'une séquence.

14h35-14h55 **Joël. CAILLET (CNRS UPR 9073)**  
“ Mimétisme entre fonction enzymatique et régulation”

L'expression du gène *thrS* d'*E.coli*, codant la thréonyl-ARNt synthétase, est négativement autocontrôlée au niveau de la traduction. La TRS se fixe à son propre ARNm sur un site opérateur et en inhibe la traduction. Ce site est formé par quatre domaines dont deux tiges-boucles qui miment celle de l'anticodon de l'ARNtThr. La TRS, enzyme dimérique, est capable de fixer deux ARNt ou un ARNm opérateur. La ressemblance de deux domaines de l'opérateur à l'ARNtThr a été démontrée en utilisant les règles d'identité des ARNt.

La détermination récente de la structure cristallographique de la TRS a montré la présence d'un atome de Zinc au site catalytique et a permis d'identifier les résidus potentiellement responsables de la reconnaissance de l'ARNt. Nous avons muté les résidus responsables de ces contacts avec l'ARNt et étudié l'effet de ces changements sur l'aminoacylation et le contrôle. Nos résultats montrent que les changements des résidus impliqués dans l'interaction avec la tige-boucle anticodon de l'ARNt affectent le contrôle. Nos résultats indiquent donc que les tiges-boucles de l'opérateur sont reconnues par la synthétase à l'aide des mêmes résidus que la tige-boucle de l'anticodon de l'ARNt prouvant ainsi le mimétisme entre aminoacylation et contrôle.

14h55-15h15

**Valérie PINSON (CNRS UPR 9073)**

“HU sous ses trois formes”

La protéine HU, associée au nucléoïde bactérien joue un rôle pléiotropique dans la cellule. Cette petite protéine basique est un hétérodimère composé de deux sous-unités très homologues.

Le travail de Laurent Claret avait montré que la composition de la protéine HU n'est pas ce qu'on pensait (90%  $\alpha\beta$ ), mais qu'elle varie au cours des différentes phases de croissance. Par des études *in vitro*, nous avons montré que les interactions à l'ADN des trois dimères d'HU  $\alpha\beta$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta_2$  sont différentes. Les relations structure-fonction de ces trois formes d'HU très semblables seront discutées.



**PAUSE CAFE**

30 minutes

**2<sup>ème</sup> partie - modérateurs : G. HUI BON HOA et B. GASNIER**

15h45-16h05

**Dror WARSCHAWSKI (CNRS UPR 9052)**

“RMN des systèmes membranaires : entre solide et liquide”

La RMN connaît une popularité croissante chez les biologistes du fait de son succès dans la détermination de structures tridimensionnelles de certaines macromolécules biologiques telles que des protéines solubles. En revanche, pour l'étude des solides, les difficultés expérimentales ont jusqu'à récemment confiné la recherche en RMN à la physique des matériaux. Le cas des membranes biologiques est intermédiaire, puisqu'elles forment un cristal bidimensionnel mais que les lipides (et les protéines, dans une moindre mesure) diffusent rapidement autour d'un axe principal. Nous allons donc montrer que les techniques de RMN du solide, en particulier la rotation à l'angle magique, appliquées à de tels systèmes permettent parfois d'obtenir des informations comparables à celles de la RMN des solutions, mais aussi de mesurer l'orientation moyenne, l'organisation, l'ordre et la dynamique des molécules dans le plan de la membrane.

16h05-16h25

**Mohammed TRIBA (CNRS UPR 9052)**

“Etude par RMN de phases micellaires et bicellaires”

Nos travaux ont pour objectifs d'améliorer ou de concevoir différents systèmes modèles de membranes biologiques capables d'accueillir des protéines membranaires et permettant leur étude structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par cristallographie. Ces systèmes sont constitués de molécules amphiphiles (lipides ou surfactants) qui forment en solution aqueuse des agrégats dont la structure dépend des caractéristiques physico-chimiques des molécules utilisées. L'exposé portera sur les possibilités d'étude par RMN de deux de ces systèmes :

- un mélange de deux détergents formant des micelles mixtes
- un mélange lipide/détergent formant des objets capables de s'orienter dans un champ magnétique : les bicelles

16h25-16h45

**Yann GOHON (CNRS UPR 9052)**

“Utilisation de nouveaux tensioactifs pour l'étude structurale des protéines membranaires”

Depuis plusieurs années le laboratoire a entrepris la mise au point de nouveaux outils pour l'étude structurale des protéines membranaires. Deux de ces outils ont été conçus pour tenter de contourner certaines des difficultés que présente leur manipulation en solution détergente : il s'agit 1) de tensioactifs perfluorés ou hémifluorés et 2) de polymères amphiphiles (amphipols).

Les problèmes suivants seront discutés :

- monodispersité des complexes formés entre ces molécules et les protéines membranaires
- stabilité des protéines dans ces nouveaux environnements
- interactions de ces complexes en solution

**16h45-17h05**

S. KOZIN (INRA 806)

“All prion proteins have a segment with dual  $\alpha/\beta$  propensity depending on species and folding pathway”

Benign "cellular" isoform of the prion protein (PrP<sup>C</sup>) is a host-encoded cell surface glycoprotein expressed in all vertebrates examined, mainly in the brain but also in many other tissues although at lower levels. According to the "protein only" hypothesis, a conformational conversion of PrP<sup>C</sup> into a pathogenic "scrapie" isoform (PrP<sup>Sc</sup>) is the fundamental event in prion diseases. The major structural feature of this conversion manifests itself as the increase in  $\beta$ -sheet contents in the pathogenic prion protein. In order to understand the molecular driving forces of prion conversion, conformational properties of some synthetic linear peptides derived from the globular core of sheep, mouse and chicken prion proteins have been studied by circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopies. In physiological buffers sheep and mouse peptides encompassing the human prion 142-166 region fold into highly stable monomeric  $\beta$ -hairpins, whereas in the benign proteins the peptides carry largely helical and coiled secondary structures. Despite of sequential homology, the corresponding chicken peptide demonstrates explicit helical characteristics. Based on these findings, a mechanism of prion conversion is proposed.

**17h05-17h25**

**Fabrice RAPPAPORT (CNRS UPR 1261)**

“La spectroscopie d’absorption appliquée à des cellules entières : contraintes techniques et intérêts scientifiques”

La multitude de cofacteurs enzymatiques présentant des spectres d’absorption caractéristiques fait de la spectroscopie d’absorption une technique répandue dans l’analyse des mécanismes enzymatiques et tout particulièrement des processus photosynthétiques. La technique spectroscopique développée au laboratoire allie une bonne résolution temporelle à une grande sensibilité, permettant l’étude de cinétiques dans les domaines de la nanoseconde à la minuta, et ceci sur des complexes enzymatiques purifiés, des cellules entières et même des feuilles entières. L’intérêt d’une telle approche sera illustré.

.....  
**3 DECEMBRE**

**« Régulation de l’expression génétique »**

modérateurs : D. PICOT et J. YANIV

**9h30-9h50**

**Jacqueline GIRARD-BASCOU (CNRS UPR 1261)**

“Combinaison d’approches de génétique classique et de génétique moléculaire : application à l’étude du complexe *b6/f* chez *Chlamydomonas reinhardtii*.”

La biogénèse des complexes multiprotéiques de l’appareil photosynthétique est gouvernée par les génomes nucléaire et chloroplastique. Des études de génétique classique et de transformation génétique ont mis en évidence d’une part, la diversité des facteurs codés par le noyau qui interviennent dans ces processus, et d’autre part la nature de leurs cibles. La combinaison des deux approches génétiques ainsi que les différentes classes de gènes seront présentées.

**9h50-10h10**

**Katia WOSTRIKOFF (CNRS UPR 1261)**

“Régulation traductionnelle du cytochrome *f* dans les chloroplastes de *Chlamydomonas reinhardtii*”

Le processus CES (Contrôle par Epistasie de Synthèse) décrit la régulation de synthèse de certains polypeptides chloroplastiques par la présence de leurs partenaires d’assemblage. Dans le cas du cytochrome *f*, une des sous-unités du complexe cytochrome *b6/f*, il s’agit d’une auto-régulation négative de sa propre traduction exercée par le domaine carboxy-terminal de la protéine non assemblée. Un activateur de traduction, se liant de manière compétitive au domaine C-ter du site *f* ou à la région 5’ non traduit du transcrit *petA*, pourrait être impliqué. Plusieurs mutants affectés dans la traduction du site *f* ont été isolés,

définissant le locus nucléaire *TCA1*. L'utilisation de gènes chimères montre que la région *petA* 5' non traduite est la cible du facteur TCA1 du processus CES. Une recherche de suppresseur chloroplastique de la mutation *tca1* a été menée afin de permettre la caractérisation moléculaire de cette cible.

**10h10-10h30**      **Anne-Charlotte JARRIGE (CNRS UPR 9073)**  
"Domaines fonctionnels d'une nucléase"

**10h30-10h50**      **Paulo MARUJO (CNRS UPR 9073)**  
"Dégradation des ARN messagers"

La stabilité des ARN messagers contribue à la régulation de l'expression génétique dans tous les organismes. Le mécanisme de dégradation est bien connu chez les procaryotes. Alors que les ribosomes et les structures secondaires participent à la protection des ARN messagers chez *E. coli*, les exoribonucléases, les endoribonucléases et la poly(A)-polymérase I coopèrent pour les dégrader. Les queues poly(A) facilitent la dégradation exonucléolytique des ARN messagers. Un complexe multienzymatique, le dégradosome, a été caractérisé.

**10h50-11h10**      **Jeanne MENEZ (CNRS UPR 9073)**  
"Inhibition de la synthèse protéique due à la terminaison précoce"



**PAUSE CAFE**      30 minutes

### « *Trafic intracellulaire* »

modérateurs : O. VALLON et R. BUCKINGHAM

**11h40-12h00**      Nathalie BEAUJEAN (INRA 806)  
"Dynamique nucléo-cytoplasmique dans les embryons précoces de souris : effet de la protéine HMG-I sur la transcription"

In the mouse embryo, zygotic polymerase II-dependent transcription begins at the end of the first cell cycle, upon completion of the first DNA replication. This transcriptional activation is initiated in a non regulated manner: it does not require trans-activators and the need for specific transcriptional enhancers appears only at the two-cell stage. We have shown that the non histone chromosomal protein HMG-I, which binds without sequence specificity to the minor groove of AT-rich double-stranded DNA, acts as a positive regulator of the transcriptional activation. Indeed, we demonstrate that (1) HMG-I is detected in 100% of one-cell embryo pronuclei only 3 hours before transcriptional activation although it is present in oocytes germinal vesicles; (2) upon microinjection of HMG-I in one-cell embryos the onset of transcription is advanced from at least 2 hours and (3) transcriptional activity of transferred somatic nuclei into activated oocytes is also characterized by an HMG-I relocalization.

In addition, we tested the hypothesis that HMG-I might exert this activating effect through a remodeling of chromatin, since it has been shown to displace *in vitro* histone H1. Analysis of the overall sensitivity of chromatin to limited *in situ* digestion by DNaseI shows that it is significantly enhanced after HMG-I microinjection in one-cell embryos.

Taken together, these results suggest that HMG-I may be involved in the remodeling of chromatin into a transcriptionally permissive structure in normal or reconstituted mouse embryos.

**12h00-12h20**      Cécile BEDET (CNRS UPR 1929)  
"Remplissage en neuromédiateur des vésicules synaptiques"

La transmission entre les neurones se fait par sécrétion de neuromédiateurs. Ces derniers sont stockés dans des vésicules des terminaisons nerveuses, les vésicules synaptiques. Sous l'effet d'un influx nerveux, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique de la terminaison (exocytose); le neuromédiateur ainsi libéré dans la fente synaptique se fixe sur des récepteurs situés sur le neurone postsynaptique, ce qui permet la transmission et la transformation de l'influx nerveux. Le laboratoire de

Jean-Pierre Henry étudie les mécanismes présynaptiques de cette neurotransmission; dans ce cadre, notre équipe s'intéresse à l'étape de remplissage des vésicules en neuromédiateur.

Ce remplissage est assuré par l'activité conjuguée de deux protéines: une ATPase pompe à protons, qui acidifie et charge positivement l'intérieur des vésicules synaptiques, et un transporteur vésiculaire qui échange des protons contre les neuromédiateurs. En 1997, notre équipe et un groupe américain ont identifié par clonage le transporteur vésiculaire des acides aminés inhibiteurs (en anglais, VIAAT). Récemment, nous avons montré, en collaboration avec le laboratoire d'Antoine Triller (ENS, Paris), que VIAAT est présent dans les terminaisons inhibitrices à GABA et/ou à glycine. Ce transporteur vésiculaire semble donc bien être commun à deux neuromédiateurs, le GABA et la glycine, comme nous l'avions proposé. Nous avons également observé que VIAAT est phosphorylé de manière constitutive dans le cerveau et nous étudions actuellement le rôle de cette phosphorylation.

**12h20-12h40**

Aude CLABECQ (CNRS UPR 1929)

“ Sécration des hormones et des neurotransmetteurs : rôle de Rab3 et Rab-Gap”

La stimulation d'une cellule neuroendocrine provoque l'entrée de calcium dans la cellule, puis par une série d'étapes encore mal comprises, la libération des neurotransmetteurs ou des hormones. Depuis quelques années, plusieurs protéines participant au processus de la sécrétion régulée ont été identifiées. Parmi celles-ci, on compte notamment Rab3, une protéine G monomérique de la famille des protéines Rab, apparentées au protooncogène p21Ras. Rab3 est considéré comme un interrupteur moléculaire capable d'osciller entre 2 formes: une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Nous avons tout d'abord montré que l'hydrolyse du GTP par Rab3 était une étape vitesse limitante de l'exocytose. De plus, nos résultats indiquent que la dépendance de l'exocytose à l'égard du calcium et certains phénomènes de plasticité synaptique dépendent de l'activité de Rab3. Afin de comprendre cet aspect important de la fonction de Rab3, nous avons entrepris de caractériser les propriétés de la protéine GAP (GTPase Activating Protein) qui catalyse l'hydrolyse du GTP par Rab3 et de chercher les facteurs qui régulent son activité.

**12h40-13h00**

Jean-Sébastien SCHONN (CNRS UPR 1929)

“Caractérisation de l'activité sécrétrice au niveau unicellulaire : ampérométrie à fibre de carbone et microscopie de fluorescence à onde évanescence”

L'activité sécrétrice d'une population de cellules peut être mesurée par le biais de tests biochimiques, comme le dosage des produits sécrétés. Par ce type d'approche, les mesures cinétiques sont difficiles, et la technique s'applique à des populations entières, ce qui ne permet pas d'aborder les profils sécrétoires des différentes cellules constituant la population. La technique de l'ampérométrie à fibre de carbone (AFC) permet de caractériser l'activité sécrétrice de cellules uniques isolées, à condition que les substances libérées soient oxydables. La résolution temporelle (< 1 ms) et la sensibilité de la méthode (quelques centaines de molécules) permettent de détecter non seulement l'activité d'une cellule mais aussi des événements unitaires d'exocytose, c'est à dire la libération du contenu d'une vésicule unique de sécrétion. La méthode permet ainsi d'accéder à des paramètres complexes de la sécrétion (répartition de taille des événements, fréquence, cinétique fine...). Une autre technique, actuellement en développement au laboratoire, la microscopie de fluorescence dite " à onde évanescence ", permet de visualiser les granules de sécrétion de grande taille (~200 nm), présents au voisinage immédiat de la membrane plasmique. Cette méthode autorise ainsi l'étude des mouvements des grains de sécrétion et des cinétiques des phases ultimes du processus sécrétoire

**CONCLUSION GENERALE : P. DEBEY**



BUFFET

# **Institut de Biologie Physico-Chimique (CNRS IFR 550)**

- ⌘ Laboratoire de Physiologie Membranaire et Moléculaire du Chloroplaste  
(CNRS UPR 1261) F.-A. WOLLMAN
  
- ⌘ Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire des Membranes Biologiques  
(CNRS UPR 9052) J.-L. POPOT
  
- ⌘ Laboratoire de Régulation de l'Expression Génétique chez les Microorganismes  
(CNRS UPR 9073) R. BUCKINGHAM
  
- ⌘ Laboratoire de Biochimie Théorique  
(CNRS UPR 9080) R. LAVERY
  
- ⌘ Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion  
(CNRS UPR 1929) J.-P. HENRY
  
- ⌘ Laboratoire de Dynamique Nucléaire et Développement  
(INRA 806) P. DEBEY