





Dixièmes Entretiens de l'IBPC

Mardi 20 Mars 2012

PROGRAMME

- 09^h00 – 09^h10 **Message d'introduction par les délégués du personnel**
Message d'introduction par le directeur de la FRC
- 09^h10 – 10^h10 **Présentation des Unités**
- | | | |
|---|----------------|------------------------|
| 09 ^h 10 – 09 ^h 20 | FRC 550 | Bouchra Hammouche |
| 09 ^h 20 – 09 ^h 30 | UPR9073 | Valérie Heurgué-Hamard |
| 09 ^h 30 – 09 ^h 40 | UMR7099 | Edith Godard |
| 09 ^h 40 – 09 ^h 50 | FRE3354 | Stéphane Lemaire |
| 09 ^h 50 – 10 ^h 00 | UPR9080 | Antoine Taly |
| 10 ^h 00 – 10 ^h 10 | UMR7141 | Olivier Vallon |
- 10^h10 – 10^h50 **Session 1 : Protéines en mouvement (Modérateur : Samuel Murail)**
- | | |
|---|--|
| 10 ^h 10 – 10 ^h 30 | Alex Tek : Le laboratoire virtuel du LBT |
| 10 ^h 30 – 10 ^h 50 | Laurent Catoire : Conformational adaptation of agonists upon binding to their G protein-coupled receptors observed by NMR |
- 10^h50 – 11^h10 **Pause Café**
- 11^h10 – 12^h30 **Session 2 : Dégradation des macromolécules (Modérateurs : Harald Putzer et Julien Soudet)**
- | | |
|---|---|
| 11 ^h 10 – 11 ^h 30 | Jeremie Piton : Etudes structurales des voies de dégradation de l'ARN chez les microorganismes |
| 11 ^h 30 – 11 ^h 50 | Flore Sinturel : Importance du contrôle de l'activité d'une exoribonucléase pour la respiration chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| 11 ^h 50 – 12 ^h 10 | Catherine de Vitry : Rôle des protéases FtsH du thylacoïde |
| 12 ^h 10 – 12 ^h 30 | Zoi Erpapazoglou : Le système ubiquitine-protéasome fait partie intégrante du processus de fusion homotypique des membranes externes mitochondriales |
- 12^h30 – 14^h00 **Repas en commun à la cafétéria**

14 ^h 00 – 15 ^h 40	Session 3 : Acides Nucléiques (Modérateurs : Lionel Benard et Eliane Hajnsdorf)
14 ^h 00 – 14 ^h 20	Audrey Coornaert : Régulations traductionnelles chez les bactéries : une affaire de protéines et d'ARN
14 ^h 20 – 14 ^h 40	Stephan Eberhard : Piégeage et activation traductionnelle du transcrit chloroplastique <i>atpA</i> par la protéine d'origine nucléaire TDA1 chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
14 ^h 40 – 15 ^h 00	Meriem Senissar : Rôle des hélicases dans les processus impliquant l'ARN : Exemple de Ded1
15 ^h 00 – 15 ^h 20	Samuela Pasquali : Coarse-grained RNA
15 ^h 20 – 15 ^h 40	Emilie Fallet : Mécanismes du contrôle de la sénescence par le télomère le plus court
15 ^h 40 – 16 ^h 10	Pause café
16 ^h 10 – 17 ^h 30	Session 4 : Protéines membranaires (Modérateurs : Karine Moncoq et Olivier Vallon)
16 ^h 10 – 16 ^h 30	Emmanuelle Billon-Denis : Expression in vitro des protéines membranaires
16 ^h 30 – 16 ^h 50	Samuel Murail : Une structure de plus haute résolution combinée avec des études <i>in-silico</i> donne un nouvel aperçu sur la perméation des canaux pentamériques
16 ^h 50 – 17 ^h 10	Audrey Lebas : Le complexe cytochrome <i>b_{6f}</i> et son hème c _i : Etude du mutant F40L chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
17 ^h 10 – 17 ^h 30	Sophie Clowez : Régulation du transfert d'électrons cyclique chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
17 ^h 30 – 17 ^h 40	Conclusion des entretiens de l'IBPC
17 ^h 40 – 18 ^h 00	Pause
18 ^h 00 – 19 ^h 00	 Conférence "Edmond de Rothschild" 
	Eric Westhof : Les Modules Architecturaux de l'ARN
19 ^h 00 – 20 ^h 00	Apéritif autour du conférencier

**Alex Tek****Le laboratoire virtuel du LBT**

Les progrès technologiques permettent aux scientifiques de produire des données toujours plus précises et nombreuses. En conséquence, le traitement de ces informations devient de plus en plus difficile et dans certains cas les méthodes automatiques ne sont plus assez efficaces. Le but est de proposer des outils informatiques pour cerner les informations pertinentes en faisant intervenir les connaissances et l'intuition du scientifique, par son raisonnement mais aussi ses capacités sensorielles. C'est dans cette optique qu'au Laboratoire de Biochimie Théorique nous explorons de nouvelles approches pour visualiser efficacement les structures tridimensionnelles et leurs propriétés, construire plus simplement des modèles complexes et explorer de façon intuitive des systèmes dynamiques.

Une première étape a été de modifier et d'optimiser des programmes existants pour intégrer des éléments d'interaction dans les simulations. Un nouveau programme de simulation a déjà été utilisé avec succès pour étudier des positionnements d'ions grâce à un bras à retour d'effort ou encore réaliser l'arrimage interactif d'une molécule d'ADN sur une protéine de recombinaison. Enfin, nous nous efforçons également de rendre accessibles ces outils en utilisant des équipements à faible coût.

Laurent Catoire**Conformational adaptation of agonists upon binding to their G protein-coupled receptors observed by NMR**

The mechanism of signal transduction mediated by G protein-coupled receptors is a subject of intense research in pharmacological and structural biology. Ligand association to the receptor constitutes a critical event in the activation process. Solution-state NMR can be amenable to high-resolution structure determination of agonist molecules in their receptor-bound state. This is illustrated here with two fatty acid molecules in interaction with the leukotriene BLT2 receptor.

Jeremie Piton**Etudes structurales des voies de dégradation de l'ARN chez les microorganismes**

Pour comprendre les modes d'action et les spécificités des enzymes intervenant dans la dégradation de l'ARN, la caractérisation structurale par cristallographie est essentielle. Pour illustrer cela, nous vous parlerons plus précisément des études structurales réalisées sur les enzymes de la voie de dégradation 5'-3' de l'ARN chez *Bacillus subtilis*. L'acteur principal de cette voie est l'exonucléase 5'-3', la RNase J1. La structure d'un homologue de cette enzyme chez *T. thermophilus* en complexe avec l'ARN, permettant d'expliquer le mécanisme de dégradation de l'ARN et en particulier la polarité de la RNase J1, sera présentée. La RNase J1 est cependant inhibée par les extrémités d'ARN 5'-triphosphorylées générées par l'ARN polymérase. Chez *B. subtilis*, l'enzyme BsRppH a été identifiée comme l'enzyme qui agit en amont de la voie 5'-3', par sa faculté à hydrolyser l'ARN 5'-triphosphate et à produire un ARN 5'-monophosphate, substrat de la RNase J1. La structure de BsRppH nouvellement résolue sera également présentée.

Flore Sinturel**Importance du contrôle de l'activité d'une exoribonucléase pour la respiration chez *Saccharomyces cerevisiae***

La dégradation 5'-3' des ARNm cytoplasmiques est réalisée par Xrn1, une exoribonucléase dont l'activité est influencée par l'enzyme de clivage de la coiffe Dcs1. Contrairement aux modèles établis, nous avons montré que Dcs1 est un cofacteur de Xrn1 et que l'activation de Xrn1 par Dcs1 est importante pour la croissance sur une source de carbone non fermentescible comme le glycérol. Un mutant catalytique de Xrn1 est incapable de croître sur ce milieu. Par ailleurs, l'homologue nucléaire de Xrn1, Rat1, peut corriger le défaut de croissance du mutant xrn1 lorsque Rat1 est exprimé dans le cytoplasme. En

conclusion, l'activité de dégradation cytoplasmique des ARN dans le sens 5'-3' est essentielle à la croissance sur glycérol. L'analyse protéomique des protéines quantitativement affectées lors de la croissance sur glycérol, lorsque Xrn1 est absente ou inhibée, démontre que l'expression de gènes essentiels à la respiration est particulièrement touchée, ce qui explique le défaut de croissance observé. L'analyse d'un candidat, *POR1* codant la porine mitochondriale, a permis de vérifier l'impact de la voie de dégradation 5'-3' sur l'expression de l'ARNm et de la protéine correspondante. Le maintien de l'activité de dégradation de Xrn1 par les facteurs Dcs est ainsi essentiel pour la respiration, probablement parce qu'il permet d'éliminer des ARN dont l'accumulation inhibe directement ou indirectement l'expression de facteurs nécessaires à la réalisation des fonctions mitochondriales.

Catherine de Vitry

Rôle des protéases FtsH du thylacoïde

En utilisant *Chlamydomonas* comme organisme modèle photosynthétique nous avons conçu un crible génétique pour identifier des protéases qui pourraient dégrader le complexe cytochrome *b₆f*. Le complexe *b₆f* diffère du *bc₁* par un hème supplémentaire dans son site de réduction de quinone, l'hème *c₁*. Les mutants sans hème *c₁* ne sont pas phototrophes car ils accumulent trop peu de complexe *b₆f* partiellement assemblé mais gardent des propriétés fonctionnelles. Nous avons fait l'hypothèse que cette faible accumulation était la conséquence d'une forte sensibilité aux protéases et recherché des mutations supprimeuses qui affectent des protéases et restaurent une accumulation plus forte de ce complexe *b₆f* fonctionnel suffisante pour permettre la croissance phototrophe. Nous avons ainsi obtenu les premiers mutants de la protéase ATP-dépendante FtsH1 de la membrane de thylacoïde dans *Chlamydomonas*.

Zoi Erpapazoglou

Le système ubiquitine-protéasome fait partie intégrante du processus de fusion homotypique des membranes externes mitochondriales

Les mitochondries constituent un véritable réseau dont la morphologie dépend d'un équilibre entre des processus constants de fission et de fusion des membranes mitochondriales. La fusion mitochondriale ne met pas en jeu des SNAREs, mais des GTPases de la famille des dynamines qui sont conservées de la levure jusqu'à l'homme. Nos travaux antérieurs ont montré que la mitofusine de la levure Fzo1, une dynamine impliquée dans la fusion de la membrane externe, fait l'objet d'une dégradation par le système ubiquitine-protéasome (UPS). De façon paradoxale, la présence de Fzo1 est indispensable pour l'initiation du processus de fusion, mais l'élimination de cette même protéine par l'UPS est requise pour que l'efficacité de fusion soit optimale. Nos données récentes permettent d'élucider le rôle exact de l'UPS dans le mécanisme d'action de Fzo1.

Audrey Coornaert

Régulations traductionnelles chez les bactéries : une affaire de protéines et d'ARN.

Il existe de nombreux niveaux de régulation de l'expression génique chez les bactéries. Notre équipe s'intéresse aux mécanismes de régulations post-transcriptionnelles médiées aussi bien par les protéines que par les ARN régulateurs (ARNreg).

Je décrirai tout d'abord l'autorégulation de l'expression de la protéine ribosomique modèle du laboratoire. Ensuite, je discuterai de nos travaux récents qui soulignent l'importance des ARNreg dans la physiologie bactérienne. En effet, nous avons récemment démontré qu'au moins deux ARNreg répriment directement l'expression d'un système de transduction du signal crucial chez les bactéries qui, lui-même, contrôle, principalement l'homéostasie du magnésium, la virulence et la résistance aux peptides antimicrobiens.

Stephan Eberhard

Piégeage et activation traductionnelle du transcrit chloroplastique *atpA* par la protéine d'origine nucléaire TDA1 chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Les chloroplastes dérivent de cyanobactéries ancestrales, capturées par endosymbiose par une cellule hôte. Ces organites ont maintenus un génome,

dont les modalités d'expression ont largement divergées par rapport à celles usuellement observées chez les bactéries. Ainsi, les ARNm chloroplastiques ont une durée de vie de plusieurs heures et leur concentration excède celle exigée pour leur traduction, ce qui déplace l'essentiel de la régulation de l'expression génétique chloroplastique à un niveau post-transcriptionnel. Cette régulation requiert de nombreuses protéines d'origine nucléaire, comme par exemple la protéine TDA1 dont nous montrons qu'elle intervient dans l'expression du messenger chloroplastique *atpA* en jouant un double rôle (i) d'activateur traductionnel et (ii) de piégeage de transcrits non-traduits.

Meriem Senissar

Rôle des hélicases dans les processus impliquant l'ARN . Exemple de Ded1

Les ARN hélicases à boîte DEAD sont des protéines ubiquitaires associées à tous les processus impliquant l'ARN. Elles sont au nombre de 25 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la plupart sont essentielles. Toutes sont connues pour lier très spécifiquement l'ATP et pour l'hydrolyser seulement en présence d'ARN (ATPases ARN-dépendantes). Notre étude porte sur la protéine à boîte DEAD de levure Ded1, qu'on trouve associée à de nombreux processus cellulaires, notamment l'épissage, la biogénèse des ARN ribosomiques, le transport, la traduction, la dégradation et la propagation virale. Notre but est de caractériser ses partenaires dans la cellule afin de mieux comprendre son rôle biologique. Nous montrerons notamment, par des techniques de purification sur résines, que Ded1 est associée aux facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIF4G.

Samuela Pasquali

Coarse-grained RNA

Coarse-grained simulations are now becoming a powerful tool in the context of nucleic acids simulations. Empirical force fields have been designed based on the physical intuition and of the reproducibility of some crucial aspects of the molecule behaviour, such as its ability to reach the native state, and a correct form for the specific heat. These approaches allow studying the behaviour of DNA and RNA molecules in principle up to a few hundred bases. At LBT we develop HiRe-RNA, a high resolution coarse-grained force field which has proven able to fold RNA hairpins up to 36 nucleotides from a fully extended configuration and no prior knowledge of the experimental native structure, as well as to correctly assemble RNA duplexes. Through a reconstruction algorithm that builds back the fully atomistic molecule, all-atoms simulations can be performed starting from the equilibrium configurations obtained via coarse-grained simulations, and allow full comparison with experimental data.

At present our efforts focus on the portability of the model to larger and more complex molecules and to the development of a suitable parameterisation for DNA molecules.

Emilie Fallet

Mécanismes du contrôle de la sénescence par le télomère le plus court

Du fait de leur structure inhabituelle, les télomères, extrémités des chromosomes linéaires, ne peuvent être répliqués jusqu'à leur extrémité par la fourche de réplication. La télomérase permet leur maintien à une taille constante. En son absence, les télomères raccourcissent progressivement jusqu'à atteindre une taille critique, qui induit un arrêt du cycle cellulaire : la sénescence répliquative. Nos résultats précédents suggèrent que c'est le télomère le plus court d'une cellule qui permet l'initiation de la sénescence. Mon projet cherche à démêler les événements impliqués dans ce mécanisme, à l'aide d'un système permettant le raccourcissement contrôlé d'un télomère unique et la perte simultanée de la télomérase chez la levure. Nos résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme spécial de recombinaison entre chromatides sœurs, ce qui constituera une nouvelle résolution du problème de réplication des extrémités d'ADN.

Emmanuelle Billon-Denis

Expression *in vitro* des protéines membranaires

L'étude des protéines membranaires s'avère délicate en raison de leur instabilité en dehors des membranes biologiques mais également parce qu'il est

difficile de les produire de manière fonctionnelle et en grande quantité. L'expression in vitro est un système couplant la transcription et la traduction entraînant la production de protéines en absence de cellules. C'est un système ouvert permettant l'ajout de molécules nécessaires au repliement et au maintien en solution des protéines. Elle apparaît comme une technique de choix pour la production de protéines membranaires. Des résultats avec la protéine modèle bactério-rhodopsine et les récepteurs couplés aux protéines G seront présentés.

Samuel Murail

Une structure de plus haute résolution combinée avec des études in-silico donne un nouvel aperçu sur la perméation des canaux pentamériques.

La structure cristallographique affinée à 2.4 Å de GLIC, un canal procaryote homologue des canaux ionotropes pentamériques humains, révèle de nouveaux détails sur le processus de perméation. Les sites de liaison des cations et anions monovalents dans les deux domaines extracellulaire (ECD) et transmembranaire (TMD) de GLIC ont été systématiquement étudiés à l'aide de données anormales recueillies à partir de cristaux cultivés en complexe avec Br⁻, Cs⁺ et Rb⁺. Dans le pore, un pentagone d'eau est observé au niveau du résidu Ser 6' ainsi qu'un second pentagone plus large au niveau du résidu Thr 2' qui contribue à coordonner un ion. Les sites de liaison ionique identifiés par cristallographie sont en accord avec les calculs électrostatiques et les simulations de dynamique moléculaire, qui peuvent à leur tour être utilisés pour prédire des sites de liaison de l'eau. La position du pentagone d'eau est très sensible à la position du groupe hydroxyle de la Ser 6'. Les résultats des différentes études in-silico suggèrent que les résidus polaires conservés aux positions 2' et 6' contribuent activement à la perméation des ions par la réorientation de leurs chaînes latérales lorsque l'ion traverse le pore. Ces réorientations modulent ainsi la hauteur de la barrière énergétique de l'ion pénétrant et agissent comme un filtre de sélectivité. Ces observations sont confirmées par les simulations de dynamique moléculaire qui tirent un cation à travers le pore. La généralisation de ces résultats à d'autres membres de la famille des canaux ionotropes et les différences avec le canal potassique tétramérique KcsA sont discutées.

Audrey Lebas

Le cytochrome *b₆f* et son hème *c₁* : Etude du mutant F40L chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Le complexe cytochrome *b₆f* transfère des électrons entre un transporteur liposoluble (plastoquinol) et un accepteur soluble (plastocyanine) lors de la photosynthèse oxygénique. La structure du cytochrome *b₆f* chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, résolue par cristallographie aux rayons X au laboratoire en 2003, a mis en évidence des différences par rapport à son homologue mitochondrial, le cytochrome *bc₁*. Plus particulièrement, un hème atypique (*c₁*) est présent au niveau du site de réduction des quinones (Q_i). Des mutants du site Q_i ont ainsi été créés par mutagenèse dirigée afin d'élucider la fonction de ce nouveau cofacteur.

Sophie Cloweze

Régulation du transfert d'électrons cyclique chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Le processus photosynthétique engendre un flux d'électrons entre des complexes protéiques distribués dans les thylacoïdes. Ce flux d'électrons peut emprunter deux chemins : de l'hydrolyse de l'eau à la production de NADPH et d'ATP pour le transfert linéaire ou un transfert cyclique ne permettant que la production d'ATP. Ce constat soulève la question des mécanismes prévalant à l'implication des mêmes acteurs protéiques, au sein d'une même membrane, à deux modes fonctionnels différents. Il a été proposé que chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la commutation entre ces deux modes repose sur un mécanisme, la transition d'état, faisant intervenir la redistribution latérale des protéines antennes qui favoriserait la séquestration, au sein d'un unique édifice, des acteurs protéiques du mode cyclique. Selon cette hypothèse, il existerait donc une corrélation forte entre transition d'état et transfert d'électron cyclique. Cette hypothèse sera discutée à la lumière de nos résultats récents.

The Architectural Modules of RNA

Les modules architecturaux de l'ARN

Eric Westhof

Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg,
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS,
15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France
E-mail: e.westhof@ibmc-cnrs.unistra.fr
<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/>

RNA molecules are characterized by the formation of hydrogen bonded pairs between the nucleotide bases along the polymer. All base-base interactions present in nucleic acids can be classified in twelve families where each family is a 4x4 matrix of the usual bases. The common Watson-Crick pairs belong to one of these families and the other eleven families gather the non-Watson-Crick pairs. The Watson-Crick pairs form the secondary structure and all the other families are critical for the tertiary structure. RNA architecture can then be viewed as the hierarchical assembly of preformed doublestranded helices defined by Watson-Crick base pairs and RNA modules maintained by non-Watson-Crick base pairs. RNA modules are recurrent ensemble of ordered non-Watson-Crick base pairs. The geometrical constraints attached to each base pairing family explain the surprising molecular neutrality observed in sequences and structures during biological evolution. Through systematic comparisons between homologous sequences and x-ray structures, followed by automatic clustering, the whole range of sequence diversity in recurrent RNA modules has been characterized. These data permitted the construction of a computational pipeline for identifying known 3D structural modules in single and multiple RNA sequences in the absence of any other information.

Any module can in principle be searched, but four can be searched automatically: the Gbulged loop, the Kink-turn, the C-loop and the tandem GA loop. The present pipeline can be used for RNA 2D structure refinement, 3D model assembly, and for searching and annotating structured RNAs in genomic data.