

STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DES BIRNAVIRUS: IMPLICATIONS POUR L'EVOLUTION DES VIRUS A ARN DOUBLE BRIN.

F. Coulibaly¹, C. Chevallier², I. Gutsche¹, J. Pous¹, J. Navaza¹, B. Delmas², F. Rev¹

¹ *Virologie Moléculaire & Structurale, CNRS / INRA, Gif-sur-Yvette.*

² *Virologie & Immunologie Moléculaires, INRA, Jouy-en-Josas.*

Je présenterai la structure des particules sous-virales icosaédriques, de T=1 (260 Å de diamètre), du birnavirus de la bursite infectieuse aviaire (IBDV) et du birnavirus de la nécrose pancréatique du saumon (IPNV) et déterminé leur structure à 3 Å et à 3,4 Å de résolution, respectivement. Aussi, je présenterai la structure de la particule virale d'IBDV (T=13, environ 700 Å de diamètre) déterminée par cristallographie à 7 Å de résolution. La structure des particules sous-virales, formées de 20 trimères de VP2, montre que cette protéine est repliée en trois domaines distincts. Un domaine de surface S, constitué d'un tonneau bêta dont la topologie en "jelly-roll" est typique des protéines de capsides virales de virus nus à ARN simple brin (comme les picornavirus). Le domaine S assure les contacts entre trimères et l'étanchéité de la particule virale, contenant ainsi les déterminants de l'assemblage de la particule. Un deuxième tonneau bêta, le domaine P, forme les projections ou spicules. Ce domaine est formé par la région variable de VP2 et contient les déterminants d'antigénicité et de virulence du virus. La topologie de ce domaine est aussi du type "jelly-roll", et les projections trimériques formées sont similaires à celles de la protéine de la couche T=13 des membres des *reoviridae* (VP6 des rotavirus, VP7 des orbivirus, μ 1 des reovirus). Finalement, un domaine en hélices alpha, (domaine "B"), formé par les extrémités N et C-terminales de la chaîne polypeptidique, forme la partie intérieure, la "base" du trimère de VP2.

La structure de la particule virale T=13 de l'IBDV a été déterminée en utilisant, comme point de départ, une reconstruction de cryo-microscopie électronique à 20 Å de résolution (Böttcher et al., J Virol., 1997, 71:325-330). Le modèle atomique du trimère de VP2 a été ajusté dans la densité des projections correspondant à cette protéine dans la reconstruction. L'extension de phases, en utilisant nos données de diffraction de rayons X jusqu'à 7 Å de résolution, nous a permis d'obtenir une carte de densité électronique qui montre que VP2 et la seule protéine formant la coque du virus.

Le repliement tridimensionnel de VP2 démontre son homologie structurale à la fois avec la protéine de capside de virus à ARN simple brin (virus de plantes et d'insectes T=3 et T=4, et virus animaux comme les picornavirus) et avec la protéine formant la couche T=13 des membres des *reoviridae* (rotavirus, blue-tongue virus, reovirus). Ces résultats apportent donc une lumière nouvelle pour comprendre l'évolution des virus non-enveloppés. Les birnavirus constitueraient ainsi une sorte de chaînon manquant qui relie les virus icosaédriques simples, à ARN simple brin, aux particules complexes de la famille des *reoviridae*.

PROTEINES VIRALES MATRICE ET INTEGRASE DU VIRUS VIH-1 ET PROTEINE CELLULAIRE EED : UN MENAGE A 3 ?

S. Violot¹, P. Gouet¹, P. Boulanger², R. Haser¹

¹ Laboratoire de BioCristallographie, IBCP UMR 5086 CNRS UCBL, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

² Laboratoire de Virologie et Pathogenèse Virale, UMR 5537 CNRS UCBL, Faculté de Médecine RTH Laënnec, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08, France

La protéine humaine EED (Embryonal Ectoderm Development) semble jouer un rôle important dans le cycle du virus VIH-1, en se liant avec les protéines virales de Matrice MA et l'Intégrase IN [1]. EED appartient à la super-famille des protéines à motifs répétés WD-40, qui interviennent dans la structuration de la chromatine et l'extinction des gènes. Cette protéine pourrait donc agir sur le pouvoir d'infection du virus, en participant à son processus d'intégration tout en agissant sur l'activité des gènes cellulaires.

In vitro, les résultats obtenus par mutagenèse, essais pull-down et phage biopanning, montre que l'interaction EED-IN nécessite l'intégrité des deux motifs répétés WD-40 C-Terminaux de EED. De plus il a été montré que EED semble avoir *in vitro* un effet activateur dose-dépendant sur la réaction d'intégration d'ADN réalisée par l'Intégrase.

In situ, des études réalisées par immuno-électromicroscopie de la distribution cellulaire de l'Intégrase et de EED dans des cellules infectées par le VIH-1 ont montré une co-localisation de EED et IN dans le noyau et à proximité des pores nucléaires. En outre, une triple co-localisation EED, IN et MA a pu être observée dans le nucléoplasme. Ceci suggère, au stade précoce du cycle viral, la présence de complexes multi-protéiques (complexe de pré-intégration?) impliquant ces trois protéines (Violot *et al.*, 2003).

EED présente au niveau de sa séquence une signature de 7 motifs répétés WD-40 et devrait posséder un repliement en turbine de brins- β homologue à celui de la sous unité β de la protéine G [3]. La structure de cette sous unité a été utilisée comme empreinte afin d'effectuer une modélisation par homologie de EED. Les régions antigéniques localisées sur des boucles susceptibles d'interagir avec les partenaires viraux ont été confirmées par technique de phage-display.

[1] Peytavi R., Hong S.S., Gay B., d'Angeac A.D., Selig L., Benichou S., Benarous R., Boulanger P. (1999) HEED, the product of the human homolog of the murine eed gene, binds to the matrix protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1635-1645.

[2] Violot S., Hong S.S., Rakotobe D., Petit C., Gay B., Moreau K., Billaud G., Priet S., Sire J., Schwartz O., Mouscadet J.F., Boulanger P. (2003) The human *Polycomb*-group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J. Virol.*, **77**, 12507-12522.

[3] Sondek J., Bohm A., Lambright D.G., Hamm H.E., Sigler P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* **379**, 369-374.

CARACTERISATION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE NON-STRUCTURALE NSP9 DU COMPLEXE REPLICATIF DU SRAS

Marie-Pierre Egloff¹, François Ferron¹, Valérie Campanacci¹, Sonia Longhi¹, Corinne Rancurel¹, Hélène Dutartre¹, Eric J. Snijder², Alexander E. Gorbalenya², Christian Cambillau¹ & Bruno Canard¹

¹ *Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 6098 CNRS and Universités Aix-Marseille I & II, 31 Ch. Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France,*

² *Molecular Virology Laboratory, Department of Medical Microbiology, Center of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands*

En 2003, l'épidémie du SRAS a mis à jour le manque crucial d'informations biochimiques et structurales concernant les Coronaviruses. De telles données sont pourtant essentielles à la recherche de molécules antivirales "anti-coronavirus". Nous avons utilisé une approche de génomique structurale déjà largement développée au laboratoire, avec pour but la détermination des structures tridimensionnelles de toutes les protéines codées par le génome du SRAS. Actuellement, 28 ORFs ou sub-ORFs ont été clonés, 20 protéines ont été sur-exprimées dans *E. coli* et purifiées, et pour 8 d'entre elles, des microcristaux sont en cours d'optimisation.

Nous avons résolu la structure cristalline à 2.8 Å de la protéine non-structurale Nsp9 (113 résidus) du virus du SRAS. La structure a révélé qu'il s'agissait d'une protéine dimérique présentant un nouveau repliement. Une similarité partielle existe, d'une part avec la superfamille des protéases à sérine, suggérant que NSP9 a pu évoluer à partir d'une protéase, et d'autre part avec la superfamille des OB-fold. Cette dernière similarité a guidé des expériences biochimiques qui nous ont permis de démontrer le rôle de NSP9 dans la liaison à l'ARN simple brin.

Nsp9 n'ayant pas d'homologues dans le monde des virus à ARN, elle pourrait jouer un rôle unique dans les processus de recombinaison et/ou de régulation de la réplication/transcription du virus du SRAS.

DESIGNING NEW DRUGS TARGETED AGAINST THE DIMERISATION INITIATION SITE OF HIV-1 GENOMIC RNA

**E. Ennifar¹, A. Bodlenner², J.C. Paillart¹, J.M. Weibel², P. Walter¹,
C. Ehresmann¹, B. Ehresmann¹, R. Marquet¹, P. Pale² and P. Dumas¹**

¹ UPR 9002 CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg (France)

² UMR 7123 CNRS/Université Louis Pasteur, Institut Le Bel, 4 rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg (France)

HIV genomic RNA is packaged into virions as a dimer. The first step of dimerization is the formation of a kissing-loop complex at the so-called Dimerization Initiation Site (DIS) [1]. We found an unexpected and fortuitous resemblance between the HIV-1 DIS kissing-loop complex and the eubacterial 16 S ribosomal aminoacyl-tRNA site (A site), which is the target of aminoglycoside antibiotics. Similarities exist not only at the primary and secondary structure level, but also at the tertiary structure level, as revealed by comparison of the respective DIS and A-site crystal structures [2] [3]. Gel-shift, inhibition of lead-induced cleavage, and footprinting experiments showed that paromomycin and neomycin specifically bind to the kissing-loop complex formed by the DIS, with an affinity and a geometry similar to that observed for the A site [4]. Modeling of the aminoglycoside–DIS complex allowed us to identify antibiotic modifications likely to increase the affinity and/or the specificity for the DIS and was used as a starting point for designing new potential antiviral drugs against HIV-1 RNA dimerization. In parallel to this work, we are currently trying to obtain more precise structural information about DIS-aminoglycoside antibiotics interactions by obtaining high-resolution crystal structures of such complexes. We have been able to co-crystallize the DIS with paromomycine and neamine and the structure solution is currently under way.

1. Paillart, J.C., et al., *A loop-loop "kissing" complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**: p. 5572-5577.
2. Ennifar, E., et al., *Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(12): p. 1064-8.
3. Vicens, Q. and E. Westhof, *Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site*. Structure Fold Des, 2001. **9**: p. 647-658.
4. Ennifar, E., et al., *HIV-1 RNA dimerization initiation site is structurally similar to the ribosomal A site and binds aminoglycoside antibiotics*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2723-30.

ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1

**M. Foucault¹, C. Guillon², J.-M. Saliou³, A. Beck⁴, M. Benkirane⁵, C. Branlant³,
B. Verrier², R. Haser¹, P. Gouet¹**

¹Laboratoire de BioCristallographie, IBCP UMR 5086 CNRS UCBL IFR128, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

²Laboratoire Immunothérapie des Maladies Infectieuses Chroniques, CNRS-BioMérieux, FRE2736 IFR128, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France

³Laboratoire Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, Faculté des sciences et techniques, BP239, 54506 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex, France

⁴Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5 avenue Napoléon III, BP 497, 74164 St Julien-en-Genevois, France

⁵Laboratoire de Virologie Moléculaire et Transfert de Gène, Institut de Génétique Humaine, UPR1142, 34396 Montpellier, France

Collaboration CNRS/BioMérieux/UCBL/UHP/PIERRE FABRE sur financement de l'ANRS

La protéine Tat est un activateur puissant de la transcription chez les lentivirus. Il s'agit d'une petite protéine de 86 à 101 acides aminés selon la souche de VIH-1 isolée, qui agit en cis sur le promoteur viral (LTR) par liaison directe à une séquence d'ARN appelée TAR [1]. Des protéines cellulaires également capables de reconnaître TAR et qui pourraient moduler la transcription au niveau du promoteur ont été identifiées. Ainsi, la cycline T1 interagit avec Tat et augmente son affinité pour TAR [2]. Tat est aussi connue pour avoir plusieurs fonctions cellulaires liées probablement à différentes régions structurales [3]. Des perspectives très intéressantes se dessinent donc pour l'utilisation de Tat à des fins thérapeutiques.

Dans le cadre de ce projet, deux protéines Tat de 101 acides aminés ont été synthétisées chimiquement : Tat 133wt, issue d'un isolat primaire et Tat 133 STLA, mutant de la précédente, ayant perdu son activité trans-activatrice *in vitro*.

Des mesures de dichroïsme circulaire montrent que Tat est une protéine intrinsèquement non structurée. Elle devrait adopter un repliement stable lors de la formation du complexe ternaire Tat-TAR-cycline T1 que nous souhaitons cristalliser.

Nous avons testé l'activité des protéines Tat synthétisées et mesuré par dichroïsme circulaire leur capacité de se structurer en présence de TFE et de TMAO. Des complexes entre Tat et des fragments d'anticorps, Fab's, dirigés contre diverses régions de la protéine ont également été formés. Des mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur ces complexes et les criblages des conditions de cristallisation ont commencé.

[1] Jones, K.A. & Peterlin, B.M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* **63**, pp. 717-743.

[2] Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H. & Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**, pp. 451-462.

[3] Rubartelli, A., Poggi, A., Sitia, R. & Zocchi, M.R. (1998). HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today* **19**, pp. 543-545.

THE 2.8 Å STRUCTURE OF THE COWPEA MOSAIC VIRUS CAPSID AT 330 MPA.

E. Girard¹, R. Kahn², M. Mezouar³, A.-C. Dhaussy³, T. Lin⁴, J. E. Johnson⁴, R. Fourme¹.

¹ *Synchrotron-SOLEIL, BP48 Saint Aubin, 91192 Gif sur Yvette cedex, France*

² *IBS, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex, France*

³ *ESRF, BP220, 38027 Grenoble cedex, France*

⁴ *Department of Molecular Biology, the Scripps Research Institute, 10550N, Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA*

A 2.8 Å resolution 91.2 % complete data set (113844 unique reflections) was collected from cubic cowpea mosaic virus (CPMV) crystals compressed at 330 MPa in a diamond anvil cell, using synchrotron radiation of ultra-short wavelength (0.331 Å) and a large imaging plate detector. Experiments were performed at the ID30 beamline at ESRF. On the basis of these data, the capsid structure was refined to R- and R_{free}-values equal to respectively 0.163 and 0.171. A detailed comparison between the high pressure (HP) and the atmospheric pressure (AP) structures was performed. The overall organization of the capsid and the structures of the two proteins in the asymmetric unit are only slightly modified under pressure. The HP structure is better ordered with lower Debye Waller factors and a larger number of ordered water molecules. In the HP structure, the number of cavities is lower and the total volume of the cavities in the asymmetric unit is reduced (by more than 40%) ; hydrogen bonds are systematically shorter (by 0.03-0.05 Å). This is the first crystallographic analysis of the structure of a macromolecular assembly under high pressure.

New technical advances as well as preliminary results on proteins from Psychropiezophilic bacteria (collaboration with N. Aghajari and R. Haser, IBCP, Lyon, France) would also be presented.

[1] Fourme, R., Kahn, R., Mezouar, M., Girard, E., Hoerentrup, C., Prangé, T. & Ascone, I. (2001). High pressure protein crystallography (HPPX): Instrumentation, methodology and results on lysozyme crystals. *J. Synchrotron Rad.*, **8**, 1149-1156.

[2] Fourme, R., Ascone, I., Kahn, R., Girard, E., Mezouar, M., Lin, T. & Johnson, J. E. (2002a). New trends in macromolecular crystallography at high hydrostatic pressure. *Advances in high pressure bioscience and biotechnology II. R. Winter ed. Springer, Berlin*, 161-170.

[3] Fourme, R., Ascone, I., Kahn, R., Mezouar, M., Bouvier, P., Girard, E., Lin, T. & Johnson, J. E. (2002b). Opening the high-pressure domain beyond 2kbar to protein and virus crystallography. *Structure*, **10**, 1409-1414.

[4] Fourme, R., Girard, E., Kahn, R., Ascone, I., Mezouar, M., Dhaussy, A.-C., Lin, T. & Johnson, J.E. (2003). Using a quasi-parallel X-ray beam of ultrashort wavelength for high-pressure virus crystallography: implications for standard macromolecular crystallography. *Acta Cryst.*, **D59**, 1767-1772.

SOLEIL : ETAT D'AVANCEMENT TECHNIQUE ET SCIENTIFIQUE DU PROJET, REALISATIONS EN COURS POUR LA BIOLOGIE STRUCTURALE

R. Fourme, SOLEIL, BP48 Saint Aubin, 91192 Gif sur Yvette, France.

Le TGE Synchrotron SOLEIL est un centre national de rayonnement synchrotron construit autour de SOLEIL, un anneau de stockage à électrons de troisième génération qui sera une source de photons X très haute brillante et de stabilité exceptionnelle, qui sera utilisée dans une gamme spectrale allant du domaine THz aux rayons X durs. Les premiers faisceaux seront disponibles en septembre 2005, et les 12 premières lignes de lumière seront mises en service à partir du printemps 2006. Le projet se déroule jusqu'à présent en tenant de très près le planning et le budget prévus.

En sciences de la vie, si la biocristallographie est la pièce maîtresse du programme de biologie structurale avec deux lignes MAD (PROXIMA I & II), notre objectif est de mettre en place une palette d'outils pour les études structurales (diffraction X, diffusion X aux petits angles, spectroscopie d'absorption X), la spectroscopie VUV (dichroïsme circulaire), la spectrométrie de masse de systèmes hydrophobes, l'imagerie confocale de fluorescence et de déclin de fluorescence et, éventuellement, l'imagerie en rayons X mous. Ces techniques complémentaires permettront d'aborder l'étude d'objets allant de la molécule isolée à la cellule et au système intégré observé dans des conditions quasi-physiologiques.

PRELIMINARY STRUCTURE OF FULLY DEUTERATED ALDOSE REDUCTASE BY NEUTRON DIFFRACTION

A Podjarny^a, A. Mitschler^a, I. Hazemann^a, T. Petrova^a, F. Ruiz^a, M. Blakeley^b, M.T. Dauvergne^b, M. Van Zandt^c, S. Ginell^d, A. Joachimiak^d and D. Myles^{b#}.

^aIGBMC, CNRS, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

^bEMBL Grenoble Outstation, ILL, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble, France

^cIDD, 23 Business Drive, Branford, Connecticut, USA

^dBioscience Division, Structural Biology Center and Midwest Center for Structural Genomics, Argonne National Laboratory, 9700 South Cass Avenue, Argonne, Illinois, USA

: Current address: Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

Keywords: Neutron diffraction, enzymology, protein crystallography

Human Aldose Reductase (AR), an enzyme in the polyol pathway belonging to the aldoketoreductase family, is implied in diabetic complications. Its ternary complexes (AR-coenzyme NADPH-selected inhibitor) provide a good model to study the inhibition and enzymatic mechanisms. Indeed, X-ray electron density maps solved at very high resolution of AR complexes with different inhibitors (IDD-594, 0.66 Å; IDD-552; IDD-393; Fidarestat, 0.90 Å) show within the active site crucial protonation states. In some cases, different protonation states appear simultaneously, each with a partial hydrogen atom occupation. Therefore, we have started neutron diffraction experiments. First trials based on H₂O/D₂O exchange, using crystals of 0.1 mm³, showed neutron diffraction up to only ~4.5 Å. New crystallisation trials, with fully deuterated protein (EMBL, Grenoble) complexed with the inhibitor IDD-594, succeeded. X-Ray diffraction from these crystals, measured at the SBC-APS, achieved a resolution of 0.8 Å at 10K. Neutron diffraction measured on LADI (ILL, Grenoble) achieved a resolution of 2.5 Å at room temperature, despite a rather small crystal volume of only 0.14 mm³. Growth of larger crystals is being planned. Even with the current data, the refined model shows information about the protonation states of the inhibitor and active site residues. The results will be presented at the meeting. This work is supported by the U.S. Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research under contract No. W-31-109-ENG-38, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), by collaborative projects CNRS-CERC and ECOS-SUD, by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Hôpital Universitaire de Strasbourg (H.U.S), the ILL, the EMBL, and by the Institute for Diabetes Discovery, Inc. through a contract with the CNRS.

(METHODES EXPERIMENTALES, présentation orale E4-O)

COMPLEMENTARITE DES CRISTALLOGRAPHIES HAUTE RESOLUTION DES NEUTRONS ET DES RAYONS X POUR L'ETUDE DES MACROMOLECULES BIOLOGIQUES.

Cécile BON

*Equipe de Biophysique structurale, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205
rte de Narbonne, 31077, Toulouse, Tél 0561175840, Cecile.bon@ipbs.fr*

Les liaisons hydrogène jouent un rôle prépondérant pour la stabilisation des structures et des interactions entre macromolécules. Elles sont également impliquées dans les mécanismes catalytiques des enzymes. La compréhension de ces mécanismes nécessite donc une connaissance fine des structures. Les atomes d'hydrogène « ordonnés » d'une macromolécule peuvent être visualisés par cristallographie des rayons X lorsque le cristal diffracte à résolution atomique ($<1,2 \text{ \AA}$). Cependant, la majorité des structures de macromolécules est obtenue dans une gamme de résolution allant de 2,5 à 1,5 \AA . De plus, malgré une résolution inférieure à 1,2 \AA obtenue en cristallographie des rayons X, un grand nombre d'atomes d'hydrogène n'est pas visible (chaines latérales, molécules d'eau). Les neutrons étant diffusés par l'ensemble des atomes (H ou D, O, N, C, S) avec une intensité du même ordre de grandeur, la cristallographie haute résolution des neutrons apporte à ces résolutions « moyennes » un outil efficace pour localiser les atomes d'hydrogène, notamment ceux qui auraient un rôle structural ou seraient impliqués dans le mécanisme enzymatique.

PHASAGE EN PRESENCE DE DEGATS D'IRRADIATION

M. Schiltz¹, P. Dumas², G. Bricogne³

¹ *Laboratoire de Cristallographie, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL-FSB-IPMC-LCR, Bât. BSP, CH-1015 Lausanne, Suisse.*

² *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire IBMC, UPR 9002 du CNRS, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg CEDEX, France.*

³ *Global Phasing Ltd., Sheraton House – Castle Park, Cambridge CB3 0AX, England.*

*Sweet are the uses of adversity
--William Shakespeare*

L'endommagement des macromolécules cristallisées à la suite de leur irradiation par rayons X est dans un premier temps localisé au niveau de sites spécifiques, particulièrement fragiles et peut, par exemple, entraîner la rupture de ponts disulfure, la décarboxylation de résidus acides, la réduction d'atomes de métaux ou la radiolyse de sites halogénés (dans les acides nucléiques). La production délibérée de tels dégâts locaux a été proposée comme méthode de fabrication de dérivés isomorphes pour le phasage [1]. Cette technique consiste essentiellement à enregistrer sur un même cristal un jeu de données natif et un deuxième jeu de données enregistré après irradiation intense sous faisceau X (afin de créer des dégâts locaux).

Cependant, des cas bien plus problématiques ont été rapportés où les dégâts d'irradiation se produisent rapidement et où l'acquisition d'un seul jeu de données cohérent est compromise. Tel était le cas pour un dimère d'ARN bromé où une expérience MAD au seuil K du brome n'a pas permis la résolution de la structure [2]. Une étude *post mortem* a révélé que, suite à l'irradiation par les rayons X, les atomes de brome s'étaient dissociés rapidement par radiolyse. Cet effet était déjà très marqué au cours de la première collecte des données (première longueur d'onde) et a ainsi empêché le calcul de phases SAD ou MAD. Les dégâts d'irradiation qui se produisent au niveau des diffuseurs anomaux (Br, Se) sont particulièrement funestes puisqu'ils compromettent l'intégrité des sites dont on dépend pour obtenir l'information de phase.

Nous avons exploré une nouvelle approche [3] qui consiste à ne pas moyenniser les réflexions équivalentes par symétrie. En réalité, ces réflexions ne sont plus équivalentes lorsqu'il y a des changements structuraux (comme p. ex. la radiolyse des atomes de brome) qui se produisent au cours de la collecte des données. Au contraire, les différences d'intensités observées peuvent être exploitées pour modéliser les phénomènes de dégradation en fonction du temps et peuvent ainsi engendrer des informations de phase supplémentaires. On arrive ainsi à tirer profit d'un effet néfaste. Une telle approche a été mise en œuvre dans le logiciel *SHARP* [4] et a permis le phasage du cas cité en haut [2] avec un seul jeu de données (une seule longueur d'onde). Une carte de densité électronique d'une très bonne qualité a été obtenue. Cette approche devrait être utile dans toutes les situations où des dégâts d'irradiation se produisent de façon non volontaire et non désirée et pas uniquement dans des cas où l'on essaye de les créer délibérément.

[1] Ravelli, R. B. G., Schröder-Leiros, H.-K., Pan, B., Caffrey, M. & McSweeney, S. M. (2003). *Structure*, **11**, 217–224.

[2] Ennifar, E., Carpentier, P., Ferrer, J.-L., Walter, P. & Dumas, P. (2002). *Acta Crystallogr.* **D58**, 1262–1268.

[3] Schiltz, M., Dumas, P., Ennifar, E., Flensburg, C., Paciorek, W., Vornrhein, C. & Bricogne, G. (2004). *Acta Crystallogr.* **D60**. Sous presse.

[4] Bricogne, G., Vornrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M. & Paciorek, W. (2003). *Acta Crystallogr.* **D59**, 2023–2030.

STRUCTURE ET FLEXIBILITE D'ASSEMBLAGES CELLULOLYTIQUES PLURIMODULAIRES DETERMINEE PAR DIFFUSION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES

Michal Hammel¹, Henri-Pierre Fierobe², Mirjam Czjzek¹, Véronique Receveur-Bréchet¹

¹AFMB, UMR 6098, CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, F-13402 Marseille cedex 20

²BIP, 31 Chemin Joseph Aiguier, F-13402 Marseille cedex 20

Les cellulosomes sont des assemblages multi-enzymatiques qui hydrolysent avec une très forte synergie la cellulose, un biopolymère insoluble particulièrement récalcitrant à la dégradation. L'organisation structurale de ces gros objets est relativement complexe. Ils sont constitués notamment d'une protéine "charpente" modulaire et a priori flexible, sur laquelle viennent se fixer différents enzymes, eux-mêmes plurimodulaires. Les structures tridimensionnelles des différents domaines constitutifs *isolés* ont déjà été élucidées, par diffraction des rayons X et par RMN, mais ces techniques ne permettent pas d'appréhender la structure de ces assemblages macromoléculaires non cristallisables et a priori flexibles. L'arrangement spatial des protéines au sein des complexes demeure de ce fait inconnu. Afin d'élucider les mécanismes de leur synergie, nous avons donc caractérisé l'organisation spatiale de ces complexes en utilisant la diffusion des rayons X aux petits angles.

Nous avons pour cela travaillé sur des mini-cellulosomes (nanosomes) de *Clostridium cellulolyticum*, de taille et complexité croissante et ne contenant qu'un nombre restreint de domaines. Nous avons ainsi réalisé notamment des expériences au synchrotron sur une cellulase composée d'un domaine catalytique relié à un domaine dockerine par un linker désordonné et flexible, ainsi que sur un nanosome constitué de cette cellulase fixée à un domaine cohésine par l'intermédiaire d'interactions non-covalentes.

Les données de diffusion aux petits angles, associées aux structures cristallographiques des domaines isolés, ont permis de reconstruire la structure de ces objets, grâce aux programmes GASBOR et CREDO (D. Svergun), qui calculent la forme des objets mesurés, et la conformation des régions désordonnées. Les résultats obtenus montrent que le linker adopte de nombreuses conformations dans la cellulase libre, mais que, contre toute attente, il est plus contraint et rigide quand elle est fixée à la cohésine.

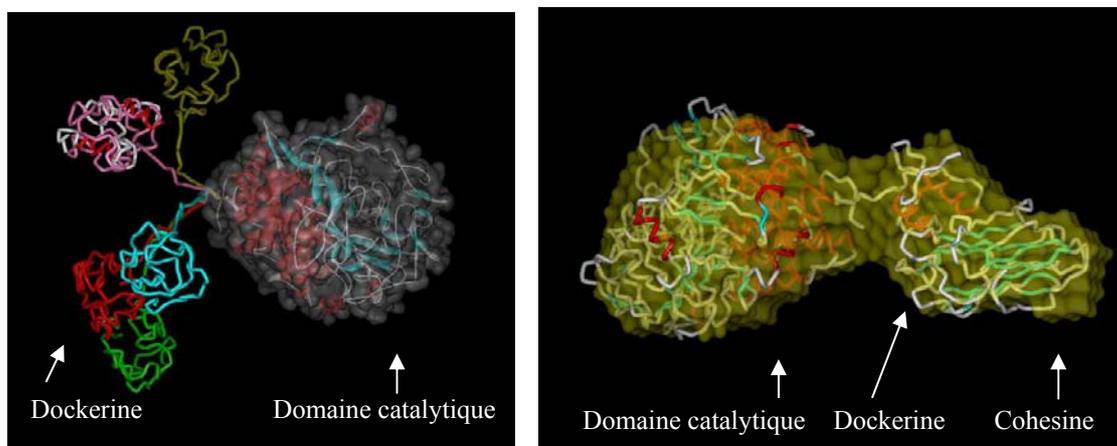


Figure 1. Gauche : Cellulase Cel48F de *Clostridium cellulolyticum* avec le linker et la dockerine dans différentes conformations possibles, vue par diffusion des rayons X aux petits angles. Droite: Cellulase Cel48F avec le linker plus rigide quand la dockerine est fixée à la cohésine.

IMAGES CRISTALLOGRAPHIQUES MACROMOLECULAIRES A LA RESOLUTION SUBATOMIQUE, DENSITE DE DEFORMATION ET MODELISATION DBE

P. Afonine^{1,2,5}, V.Y. Lunin³, N. Muzet⁴, A. Urzhumtsev²

¹Centre Charles Hermite, LORIA, 54602 Villers-lès-Nancy, France

²LCM3B, UMR 7036 CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy 1, B.P. 239, Faculté des Sciences et Techniques, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

³IMPB, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moscow Region, Russia

⁴SANOFI-SYNTHELABO RECHERCHE, 67080 Strasbourg, France

⁵Adr.actuelle: LBNL, Bld. 4, Mail-Stop 4-230, 1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94720, USA

Des données de diffraction mesurées à une résolution supérieure de 1 Å permettent d'étudier des détails fins de la densité électronique, en particulier, la différence entre la densité expérimentale et la densité calculée, composée d'une somme de contributions d'atomes 'libres'. Ce dernier modèle d'atomes sphériques avec un facteur de déplacement atomique (*ADP*) anisotrope ne permet pas d'expliquer tous les détails des cartes de Fourier correspondantes, d'où l'intérêt de l'étude de cette densité de déformation.

Pour des petites molécules, ce problème peut être résolu par l'introduction d'un modèle multipolaire [1-3]. Cependant, l'étude de la densité de déformation avec ce modèle est ambiguë parce qu'il introduit cette densité explicitement. Nous nous sommes posé la question de savoir si la densité de déformation est visible sur des cartes macromoléculaires classiques à la résolution d'environ 0.9 Å et ce, sans utiliser le modèle multipolaire.

Les conditions pour observer cette densité sur des liaisons individuelles ont été déterminées grâce aux études de cartes théoriques calculées par des méthodes de chimie quantique [4] et ont été confirmées ensuite par l'analyse des cartes expérimentales. Une de ces conditions est que le modèle doit être affiné à la résolution d'environ 0.6 Å même si les cartes sont calculées à une résolution plus basse [5]. L'affinement à la résolution d'environ 0.9 Å 'seulement' donne les *ADPs* trop élevés ce qui rend la densité de déformation invisible sur telles cartes. Cette surestimation des *ADPs* peut être limitée par l'utilisation d'un modèle *DBE*.

Initialement, le modèle *DBE*, 'dummy bond electrons', a été développé pour effectuer l'affinement macromoléculaire à la résolution d'environ 0.8-0.9 Å où le nombre de données expérimentales n'est pas assez grand pour l'affinement d'un modèle multipolaire. Comme les détails principaux d'une carte de déformation se présentent sous la forme de pics quasi sphériques sur des liaisons et dans quelques autres positions, le modèle conventionnel est complété par un jeu de diffracteurs Gaussiens placés proprement [5]. L'application d'un tel modèle se justifie par le facteur d'accord libre [6], par le 'rigid-bond test' [7], par l'amélioration de phases des facteurs de structure [5]. Le facteur d'accord *R* s'approche à la valeur *R* obtenu pour un modèle multipolaire. Ce modèle permet de reproduire des points critiques et limiter la croissance de *ADP* lors l'affinement à la résolution de 0.8-0.9 Å. De plus, le modèle *DBE* permet d'accélérer les calculs par un facteur cent [8].

[1] Kurki-Suonio, K. (1968). *Acta Cryst.*, **A24**, 379-390

[2] Stewart, R.F. (1969). *J.Chem.Phys.*, **51**, 4569-4577.

[3] Hansen, N.K. & Coppens, P. (1978). *Acta Cryst.*, **A34**, 909-921.

[4] Artacho, E., Sanchez-Portal, D., Ordejon, P., Garcia, E. & Soler, J. M. (1999). *Phys. Stat. Sol. B.*, **215**, 809-817.

[5] Afonine, P., Lunin, V., Muzet, N. & Urzhumtsev, A. (2004). *Acta Cryst.*, **D60**, 260-274.

[6] Brünger, A.T. (1992). *Nature*, **355**, 472-474.

[7] Hirshfeld, F.L. (1976). *Acta Cryst.*, **A32**, 239-244.

[8] Afonine, P. & Urzhumtsev, A. (2004). *Acta Cryst.*, **D60**, 19-32.

AFFINEMENT DES STRUCTURES DE PROTEINES A RESOLUTION SUBATOMIQUE AVEC LE LOGICIEL MOPRO: AU DELA DU SIMPLE MODELE DE L'ATOME SPHERIQUE.

Christian Jelsch, Angélique Lagoutte, Benoît Guillot, Chethampadi Gopi Mohan, Virginie Pichon-Pesme, Eric Chabrière & Claude Lecomte.

LCM3B, CNRS, Faculté des Sciences, UHP. UMR 7036. BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

La résolution subatomique (0.4-0.8 Å), permet d'interpréter la densité électronique avec une très grande finesse. En effet, à cette résolution la densité électronique peut nous fournir des informations sur le transfert de charge et la déformation de la couche de valence dus aux liaisons chimiques et aux interactions intermoléculaires. Il est évident que ces informations disponibles sont d'une très grande utilité pour une interprétation chimique de qualité. Malheureusement, le modèle classique de l'atome sphérique ne permet pas d'obtenir ces précieuses informations. Jusqu'à maintenant, cette information n'était disponible que dans le domaine des petites molécules, avec l'utilisation du modèle de l'atome multipolaire (Hansen & Coppens [1]). Avec le développement de sources synchrotrons et les progrès dans le domaine des détecteurs et l'arrivée de nouvelles techniques cryogéniques, un nombre croissant de structures de macromolécules biologiques sont déterminées à résolution subatomique. C'est pourquoi, afin d'obtenir le maximum d'informations sur la chimie des macromolécules (potentiel, pKa, drug design...), le logiciel d'affinement cristallographique MoPro a été développé en adaptant une méthodologie jusque là réservée aux petites molécules [2,3]. En fonction de la qualité des données, de la résolution, de la complexité du système, le logiciel MoPro est polyvalent et autorise plusieurs types de modèle pour l'affinement : modèles d'atome sphérique et multipolaire ainsi que le nouveau modèle d'atome à charges multiples. Nous présenterons le programme MoPro avec ses dernières fonctionnalités, que nous illustrerons par des exemples d'applications : l'affinement de la structure de l'Aldose Réductase Humaine à 0.66Å [3,4] et de la protéine RD1 antigél à 0.62 Å de résolution [5].

[1] Guillot B., Viry L., Guillot R., Lecomte C. & Jelsch C. Refinement of proteins at subatomic resolution with MOPRO. *J. Applied Crystallography* (2001). **34**, 214-223.

[2] Jelsch C., Teeter M.M., Lamzin V., Pichon-Pesme V., Blessing R.H. & Lecomte C. Accurate protein crystallography at ultra-high resolution: valence electron distribution in crambin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2000) **97**, 3171-3176

[3] Muzet N., Guillot B., Jelsch C. & Lecomte C. On the Electrostatic Complementarity in a Human Aldose Reductase / NADP⁺ / Inhibitor Complex as Derived from First-Principles Calculations and Ultra-High Resolution Crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003), **100**: 8742-8747.

[4] Howard E., Cachau R. E., Mitschler A., Chevrier B., Barth P., Lamour V., Joachimiak A., Sanishvili R., Van Zandt M., Sibley E., Moras D. & Podjarny A. (2003) *Prot. struct., funct. and gen.* To be published.

[5] Ko T.P., Robinson H., Gao Y.G., Cheng C.H.C., DeVries A.L. & Wang A.H.J. (2003) *Biophys J.* **84**, 1228-1237.

OBTENIR DES PHASES EXPERIMENTALES DE HAUTE QUALITE : RESULTATS D'EXPERIENCES MAD AVEC DES CRISTAUX DERIVES D'URATE OXYDASE ET DES COMPLEXES DE GADOLINIUM.

Meike Stelter, Jean Vicat & Richard Kahn.

Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel CEA, CNRS, UJF, UMR 3075, 41 rue Jules Horowitz, F38027 Grenoble cedex 1, France.

Dans une publication récente [1], nous avons présenté une nouvelle classe de complexes de Gd pour obtenir des dérivés d'atomes lourds à fort pouvoir de phasage pour la cristallographie macromoléculaire.

Avec chacun des sept complexes décrits il a été possible de résoudre la structure de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* avec des données enregistrées sur la ligne FIP de l'ESRF, Grenoble, au seuil d'absorption L_{III} du gadolinium [2].

Nous présentons ici les résultats obtenus avec des cristaux dérivés d'urate oxydase et le complexe Gd-DOTMA. Des phases à 1,46 Å de résolution ont été obtenues par la méthode MAD (multiple-wavelength anomalous diffraction). Dans ce cristal, l'occupation du site majeur de fixation du complexe est suffisamment élevée pour permettre d'identifier son mode de fixation et de construire le modèle du ligand lié à la protéine.

Sur la base de cet exemple, une stratégie pour l'enregistrement des données de diffraction, pour le phasage et pour l'affinement de structure a été développée afin d'optimiser l'utilisation de l'information apportée par des phases expérimentales. Pendant l'affinement de structure, cette information permet d'améliorer la carte de densité électronique en particulier dans les régions qui correspondent à des parties de la structure qui n'ont pas encore été modélisées, comme celles des ligands du complexe utilisé.

Pour l'enregistrement de données de diffraction sur la ligne FIP, nous avons adopté la stratégie d'enregistrer deux jeux de données de diffraction, un jeu au maximum de f'' dans le seuil d'absorption L_{III} du gadolinium ($\lambda = 1,711$ Å) avec une résolution des données limitée à $\sim 2,7$ Å par des contraintes techniques, et un jeu à la résolution maximale de diffraction obtenu avec une longueur d'onde beaucoup plus courte.

Pour des dérivés présentant un signal anomal suffisamment élevé, nous réalisons le phasage puis nous affinons la structure en prenant en compte les phases expérimentales. Ceci permet d'identifier le mode de fixation des complexes lorsque l'occupation des sites de fixation est suffisamment élevée pour pouvoir visualiser la densité électronique des ligands dans les cartes affinées. Pour des dérivés présentant des taux d'occupation plus bas (même si la fixation est souvent suffisante pour permettre un bon phasage), l'identification des sites de fixation du Gd et éventuellement le phasage permettent de comparer l'efficacité de la fixation du complexe, de localiser les molécules du complexe liées à la protéine et d'identifier les résidus de la protéine impliqués dans la fixation.

Combiner ces informations pourrait permettre d'identifier des critères systématiques de fixation, avec pour objectif de prévoir la fixation potentielle des différents complexes avec des protéines de structure inconnue, en fonction des résidus à la surface de la protéine et éventuellement d'autres facteurs comme l'agent précipitant.

Nous travaillons actuellement avec des cristaux dérivés de plusieurs protéines tests (urate oxydase, protéine hypothétique Yggv de *E. coli*, glucose isomérase de *Streptomyces rubiginosus*) avec les différents complexes de gadolinium.

[1]- Girard, É, Stelter, M., Vicat, J. & Kahn, R (2003). *Acta Cryst.* D59, 1914-1922

[2]- Girard, É, Stelter, M., Anelli, P. L., Vicat, J. & Kahn, R (2003). *Acta Cryst.* D59, 118-126

PHARMACOGENOMIQUE ET MODELISATION A BASSE IDENTITE DE SEQUENCE

V. Catherinot, D. Douguet, L. Martin, G. Poncet-Montange & G. Labesse

Centre de Biochimie Structurale (INSERM U554 - CNRS UMR5048)
15 Av. C. Flahault, 34090 Montpellier cedex. courriel : catrino@cbs.cnrs.fr

La modélisation comparative à basse identité de séquences des structures de protéines seules ou en complexe (holo-enzyme, complexe avec ADN, ARN ou petite molécule) est de plus en plus requise pour l'analyse des génomes [1,2]. Le positionnement de ligands et la conception rationnelle d'inhibiteurs sont une application de la détermination de structures tridimensionnelles de protéines [3]. L'optimisation des alignements est une étape clé pour la modélisation macromoléculaire qui reste largement manuelle

Nous avons développé un nouveau logiciel, ViTO, dédié à l'étude des alignements structuraux de familles de protéines, à la modélisation comparative et au positionnement de ligands. Ce logiciel couple un éditeur d'alignement de séquences avec un visualisateur de structures tri-dimensionnelles. Il est doté des fonctions classiques que l'on rencontre dans les éditeurs d'alignement (alignement automatique, consensus, ...) et dans les visualisateurs de structures (superposition, coloration, rubans, stéréographie, ...). Du fait de la réunion de ces utilitaires, ViTO permet en temps réel de visualiser sur une ou plusieurs structures les informations contenues dans l'alignement (par exemple : la conservation des résidus et la position des insertions-délétions ou l'image de la trace évolutive).

ViTO est par ailleurs interfacé avec des logiciels de modélisation comparative (MODELLER ou SCWRL). Deux modules (position de ligand par superposition localisée et une d'optimisation automatique *in situ* de ligand à partir d'un fragment), sont mis en place et en cours d'évaluation. De plus, ViTO est doté d'un langage de macro permettant d'en étendre les possibilités et de générer des images graphiques (surface, maillage) des structures construites à la volée à partir de fragments des différentes structures présentes dans l'alignement.

L'utilisation de cet outil accélère l'alignement de séquences avec des structures connues ainsi que l'extraction d'information fonctionnelle et structurale et facilite, ainsi, y compris à très bas taux d'identité de séquence (10-30%), l'identification de ligand [3] ou d'inhibiteurs [4].

[1] Ligand binding in the GB2 subunit of the GABA_B heteromeric receptor is not required for receptor activation and allosteric interaction between the subunits Kniazeff, Galvez, Labesse and Pin *J Neurosci* (2002) 22, 7352-7361

[2] Structural and Ligand Binding Properties of YajQ and YnaF, two Proteins from *Escherichia coli* with Unknown Biological Function Saveanu, Miron, Borza, Craescu, Labesse, Gagy, Popescu, Schaeffer, Namane, Laurent-Winter, Bâzu and Gilles *Protein Sci* (2002) 11, 2551-2560

[3] Thymidylate Kinase of *Mycobacterium tuberculosis*: A chimera sharing properties common to Eucaryotic and bacterial enzymes Munier-Lehmann, Chaffotte, Pochet, Labesse *Prot Science* (2001) 10, 1195-1205

[4] Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast Ganem, Devaux, Torchet, Jacq, Quevillon-Cheruel, Labesse, Facca, Faye *EMBO J* (2003), 22: 1588-1598

VERS LE REMPLACEMENT MOLECULAIRE A BASSE IDENTITE DE SEQUENCE

L. Martin, V. Catherinot, D. Douguet, S. Arold & G. Labesse

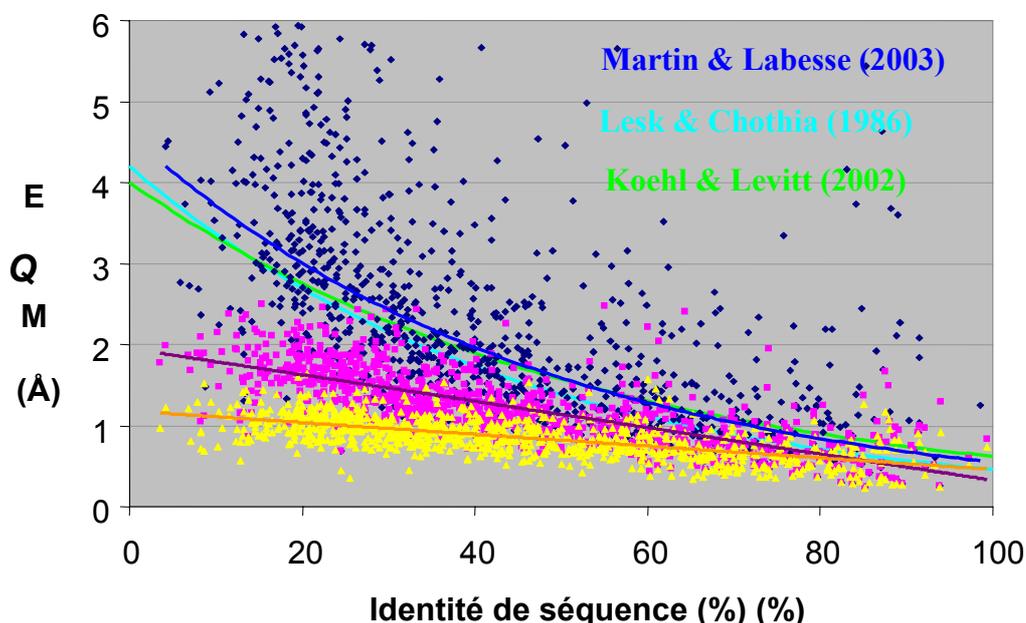
Atelier de Bio- et Chimie-Informatique Structurale

Centre de Biochimie Structurale (INSERM U554 - CNRS UMR5048)

15 Av. C. Flahault, 34090 Montpellier cedex. courriel : labesse@cbs.cnrs.fr

Les comparaisons structurales (séquences et structures) révèlent des similarités vraies y compris à très basse identité [1,2]. Pourtant la qualité des modèles tridimensionnels que l'on peut alors déduire est réputée exponentiellement décroissante vers les bas taux d'identité de séquence [3]. Les défauts intrinsèques des modèles moléculaires ont freiné leur usage en radiocristallographie [1]. Une analyse plus fine de la divergence des structures tridimensionnelles de protéines (Ecart Quadratique Moyen / Identité de séquence : voir figure) ouvre de nouvelles perspectives. Parallèlement, l'utilisation d'un serveur de modélisation automatique [2] couplé à un protocole classique de remplacement moléculaire et d'affinement [4] a permis de résoudre deux structures cristallographiques « tests » à l'aide de modèles construits à 20% d'identité.

HOMSTRAD 2003 – avec et sans filtre 3,8 Å pour la superposition des Calpha.



[1] Jones D.T. (2001) Evaluating the potential of using fold-recognition models for molecular replacement. *Acta Cryst.*, **D57**, 1428-1434.

[2] Douguet D. & Labesse L. (2001) Easier threading through Web-based comparisons and cross-validations. *Bioinformatics* **17**, 752-753.

[3] Chothia C, Lesk AM. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **5**, 823-826.

[4] Collaborative Computational Project. (2002) High-throughput structure determination. Proceedings of the 2002 CCP4 study weekend. *Acta Cryst.*, **D58**, 1897-1970

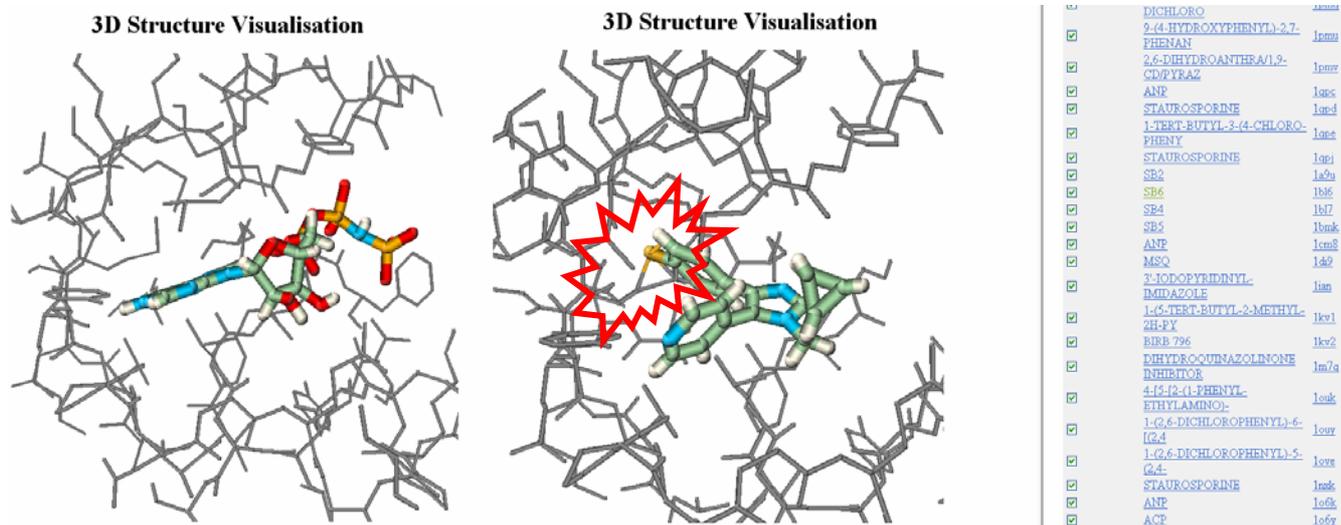
VERS DES CIBLOTHEQUES STRUCTURALES

L. Martin, V. Catherinot, G. Poncet-Montange, D. Douguet, & G. Labesse

Atelier de Bio- et Chimie-Informatique Structurale, Centre de Biochimie Structurale (INSERM U554 - CNRS UMR5048) 15 Av. C. Flahault, 34090 Montpellier cedex. courriel : labesse@cbs.cnrs.fr

Bien que le nombre de structures résolues expérimentalement augmentent rapidement la caractérisation de leurs complexes avec des ligands est généralement plus lente et moins fréquente. Ainsi le quart des complexes protéine-kinases/petites molécules (< 200 complexes et ~30 protéines distinctes) ont été obtenus avec la seule CDK2 (>60 structures dans la PDB) [1,2]. Or les comparaisons de structures révèlent souvent une forte similarité des sites actifs [2,3] et des ligands sont, parfois, communs à deux membres éloignés d'une super-famille de protéines malgré la spécificité observée au sein de chaque sous-famille étudiée [2,3]. Parallèlement, les projets de génomique structurale produisent de nombreuses structures dont les ligands potentiels ne sont pas connus alors que des similarités avec des structures déjà caractérisées peuvent être mises en évidence.

Un serveur INTERNET (<http://bioserv.cbs.cnrs.fr>) est développé pour faciliter l'analyse comparative des complexes protéines/petits ligands. Les ligands peuvent être transposés d'un site actif à l'autre et les interactions (voir figure) au sein des complexes ainsi formés sont évaluées. Parallèlement, l'utilisation d'un serveur de modélisation automatique [4] couplé à ce nouveau serveur permettra d'exploiter les nouvelles structures de complexes pour chercher les homologues potentiellement affins pour le même ligand et ainsi tenter de prédire le spectre d'activité de ce ligand. Cette approche a d'ors et déjà été testée avec succès dans le cadre de similarité très faible (9 et 15% d'identité) [5].



[1] Berman H.M., *et al.* (2002) The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, **58**, 899-907.

[2] Noble M.E., Endicott J.A. & Johnson L.N. (2004) Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* **303**, 1800-1805.

[3] Cohen-Gonsaud M., Catherinot V., Labesse G., Douguet D. (2004) From molecular modelling to drug design In *Progress in Nucleic Acid Research And Molecular Biology*, Ed. K Rychlewski. Springer-Verlag.

[4] Douguet D. & Labesse G. (2001) Easier threading through Web-based comparisons and cross-validations. *Bioinformatics* **17**, 752-753.

[5] Ganem C., Devaux F., Torchet C., Jacq C., Quevillon-Cheruel S., Labesse G., Facca C. & Faye G. (2003) Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *EMBO J.* **22**, 1588-1598.

ENDscript/ESPrift EXTRACTION ET RENDU D'INFORMATION SUR LES STRUCTURES 3D DE PROTEINE

Patrice Gouet^{1*}, Xavier Robert¹ and Emmanuel Courcelle²

¹Laboratoire de BioCristallographie, IBCP-CNRS UMR 5086 UCBL, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

²Laboratoire de Biologie Moléculaire et des Relations Plantes Microorganismes, BP 27 Chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet Tolosan, France

Le programme fortran ESPrift permet de représenter les alignements multiples de séquence de protéine avec un apport d'information structurale sous forme de figures PostScript. Un serveur web basé à Toulouse (<http://genopole.toulouse.inra.fr/ESPrift>) permet d'utiliser ESPrift à distance. Celui-ci est connecté aux serveurs : 1. ProDom (INRA, Toulouse) qui est une base de données de domaines protéiques ; 2. PredictProtein (Columbia University, New York) qui permet de prédire les éléments de structures secondaires ; 3. NPS@ qui permet de générer des alignements de séquences.

Un nouveau serveur web nommé ENDscript a été créé (<http://genopole.toulouse.inra.fr/ENDscript>) afin d'obtenir une importante palette d'information 1D, 2D et 3D à partir d'une protéine de structure connue. Un fichier de coordonnées de protéine est donné en entrée à ENDscript, qui en extrait la séquence et utilise le programme BLAST pour chercher des séquences homologues dans diverses banques de données (TrEMBL, Swiss-Prot, PDBaa). Ces séquences sont ensuite alignées avec les programmes CLUSTAL ou MULTALIN. Puis DSSP extrait l'information de structure secondaire des séquences de protéines de structure connue et PROFIT superpose leurs tracés C α . Enfin, CNS est employé pour calculer des distances de contacts protéine-protéines et protéine-ligands. Au final, quatre figures PostScript sont obtenues grâce aux programmes ESPrift et BobScript, donnant une vision globale sur la séquence et la structure de la protéine étudiée.

Gouet P., Robert X., Courcelle E. (2003). ESPrift/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**:3320-3.

UN MICROSPECTROPHOTOMETRE POUR L'ENREGISTREMENT DE SPECTRES DE FLUORESCENCE UV-VISIBLE SUR DES CRISTAUX DE PROTEINES.

Xavier Vernede¹, Jeremy Ohana¹ Virgile Adam^{1,2} et Dominique Bourgeois^{1,2}

¹LCCP, UMR 9015, IBS-CEA/CNRS/UJF, 41 avenue Jules Horowitz, 38027 Grenoble,
Cedex 1, France

²ESRF, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France

La microspectrophotométrie *d'absorption* est un outil reconnu pour sonder les protéines cristallines contenant des chromophores, des centres métalliques ou bien des substrats ou cofacteurs colorés. Cette technique est une aide précieuse pour interpréter correctement des structures cristallographiques, en particulier lorsqu'on étudie des états intermédiaires.

Nous démontrons ici que la microspectrophotométrie UV-visible de *fluorescence* peut aussi être utilisée pour les mêmes applications, si des fluorophores endogènes sont présents dans le cristal, ou si des fluorophores exogènes sont ajoutés, qui se lient à la protéine ou bien résident dans les canaux de solvant.

Nous avons construit un microspectrophotomètre d'absorption et de fluorescence UV-visible, permettant d'étudier des cristaux montés dans des boucles, à température cryogénique [1]. Des spectres d'émission de fluorescence d'excellente qualité peuvent être collectés en quelques millisecondes.

Cette technique peut être utile dans bien des cas, par exemple pour connaître l'état redox du cofacteur NADP(H) dans un cristal, ou pour mesurer son pH avec un indicateur du type fluorescéine. En suivant l'évolution de la fluorescence en fonction de la température, il est aussi possible d'étudier la dynamique des protéines – cristallisées ou non [2].

Dans ce poster, nous décrivons le microspectrophotomètre, installé à l'ESRF, et donnons quelques exemples d'utilisation.

Site WEB : <http://www.esrf.fr/UsersAndScience/Experiments/MX/Cryobench/>

[1] D. Bourgeois, X. Vernede, V. Adam, E. Fioravanti & T. Ursby, "A novel microspectrophotometer for absorption and fluorescence studies of protein crystals" *J. Appl. Cryst.*, (2002) **35**, 319-326.

[2] M. Weik, X. Vernede, A. Royant & D. Bourgeois. " Temperature Derivative Fluorescence Spectroscopy as a Tool to Study Dynamical Changes in Protein Crystals" *Biophysical J.* (2004) in press

LA DIFFUSION DE NEUTRONS ET SES APPLICATIONS EN BIOLOGIE

M. Ferrand, pour la Société Française de Neutronique

Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Département de Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA Grenoble, 17 Av. des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9

La diffusion de neutrons est une technique avérée en biologie. En raison de leur longueur d'onde caractéristique (1-10Å, correspondant à quelques meV), les neutrons thermiques peuvent échantillonner à la fois les propriétés structurales et dynamiques des macromolécules biologiques. Les propriétés de contraste inhérentes à la technique permettent en outre d'aborder l'étude structurale et dynamique d'assemblages biologiques complexes. La première partie du poster constituera une introduction (pour non-initiés) des propriétés intrinsèques des neutrons, qui sera par la suite illustrée de quatre applications :

- La diffusion aux petits angles des neutrons pour l'étude en solution de protéines ou d'assemblages biologiques.
- La réflectométrie de neutrons pour l'étude des couches minces et des membranes biologiques.
- La diffraction de fibres biologiques.
- La diffusion inélastique et quasi-élastique de neutrons pour l'étude du spectre vibrationnel et des mouvements diffusifs dans les protéines.

(METHODES EXPERIMENTALES, poster E8-P)

ADAPTATION DE LA DYNAMIQUE MOLECULAIRE AUX CONDITIONS EXTREMES

M. Tehei & G. Zaccai

*Institut de Biologie Structurale J.P. Ebel, 41 rue Jules Horowitz
38027 Grenoble Cedex 1 France*

Le prix de thèse annuel 2004 de la Société Française de Neutronique (SFN), ainsi que celui de la Société Française de Biophysique (SFB) ont été attribués à Mr Moeava Tehei pour ses travaux originaux concernant « L'adaptation de la dynamique moléculaire aux conditions extrêmes ». La diffusion élastique incohérente des neutrons a apporté une contribution notoire à ce travail, en permettant de déterminer comment la fonction biologique de protéines issues d'organismes extrémophiles était corrélée à leur dynamique interne sur l'échelle de la picoseconde-nanoseconde, ainsi qu'à leur rigidité et flexibilité moléculaire. Ce travail de thèse, accompli par M. Tehei, sera présenté par M. Ferrand, en relation avec le poster « Diffusion de neutrons et ses applications en biologie ».

LA STRUCTURE CRISTALLINE D'ETHR, UN REGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* : ASPECTS FONCTIONNELS, STRUCTURAUX ET PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

Frédéric Frenois¹, Jean Engohang-Ndong², Camille Locht², Alain R. Baulard² & Vincent Villeret¹

CNRS-UMR8525¹, and INSERM-U447², Institut de Biologie de Lille – Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP245 59019 Lille cedex, France

La tuberculose reste, à l'échelle planétaire, la première cause de mortalité liée à un agent infectieux unique. Bien que les programmes d'antibiothérapie de l'OMS participent à limiter l'expansion de la pandémie, les efforts de prévention et de contrôle sont largement handicapés par le développement de souches de *M. tuberculosis* multirésistantes aux antibiotiques, et en particulier à l'isoniazide, la drogue de première ligne la plus utilisée. La seule alternative de traitement consiste alors en l'usage d'antibiotiques dits de seconde ligne, généralement moins actifs mais surtout plus toxiques.

L'éthionamide (ETH), un des antituberculeux de seconde ligne les plus utilisés, est une pro-droge qui nécessite d'être activée, dans la bactérie, par une monooxygénase dénommée EthA (Rv3854c). L'expression de cette monooxygénase est elle-même sous le contrôle transcriptionnel d'EthR (Rv3855), un répresseur de la famille TetR. Il a été montré que seule une proportion limitée de la drogue est activée dans les mycobactéries, à cause d'une répression partielle du gène *ethA* par EthR. Dès lors une augmentation de l'expression de EthA par induction de EthR pourrait augmenter la sensibilité des mycobactéries envers l'ETH. Il en résulterait une amélioration drastique de l'index thérapeutique de cette drogue.

Nous avons déterminé la structure d'EthR ainsi que celle de plusieurs variants. Celles-ci révèlent la présence dans EthR d'un ligand fortuit piégé lors du protocole de production, aussi bien lorsque la protéine est exprimée dans *E. coli* que directement issue d'une mycobactérie. L'analyse structurale qui sera présentée démontre que EthR complexée se trouve dans une forme induite, incapable de se fixer à l'ADN. Ce ligand représente donc, en l'absence d'identification des ligands physiologiques de EthR, une base pour la conception rationnelle d'inducteurs d'EthR.

Le mécanisme moléculaire d'induction d'EthR sera également explicité, par analogie avec QacR et TetR, deux répresseurs de la famille TetR qui ont été caractérisés au niveau structural.

PREMIERE PROTEINE PLASMATIQUE HUMAINE FIXATRICE DU PHOSPHATE

C. Contreras-Martel¹, R. Morales¹, M. Nicodeme², F. Reno³, M.L. Chesne⁴, P. Carpentier¹, J.C. Fontecilla-Camps¹, D. Rochu³, P. Masson³, E. Chabriere⁵

¹ Laboratoire de Cristallogénèse et Cristallographie des Protéines, Institut de Biologie Structurale J.-P. EBEL, CEA-CNRS, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

² Laboratoire des BioSciences de l'Aliment, Université Henri Poincaré, Nancy 1, BP239, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France

³ Département de Toxicologie, Unité d'Enzymologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 38702 La Tronche, France

⁴ Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire, Institut de Biologie Structurale J.-P. EBEL, CEA-CNRS, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

⁵ Laboratoire de Cristallographie et Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques, CNRS-Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Nous avons isolé et résolu la structure d'un transporteur de phosphate plasmatique (humain). De façon surprenante, malgré la grande importance du phosphate, aucun transporteur de phosphate plasmatique n'avait été caractérisé jusqu'à ce jour. En raison de la difficulté d'obtenir des dérivés d'atomes lourds, la structure de cette protéine a été résolue dans un premier temps à basse résolution (25 Å), en utilisant une nouvelle méthode de phasage direct ne nécessitant ni dérivé d'atomes lourds, ni modèle [1]. Avec l'obtention d'un dérivé d'atome lourd, la structure atomique a été finalement résolue à 1.8 Å. Ce dérivé a été obtenu en utilisant un composé appartenant à une nouvelle famille de molécules (Kahn *et al.*, en préparation). La structure de la protéine se compose de deux domaines globulaires avec un repliement très similaire à celui de la protéine fixatrice du phosphate ("phosphate binding protein") d'*Escherichia coli* et de *Mycobacterium tuberculosis* [2,3], protéines de haute affinité pour les ions phosphate dans le système transporteur de phosphate ABC. Bien que les transporteurs ABC existent chez les eucaryotes, c'est la première fois qu'une telle protéine de haute affinité est décrite dans ce règne. Notre résultat suggère que ces transporteurs sont très ubiquitaires.

Nous avons montré que cette protéine est liée à la paraoxonase (PON1) dans le plasma humain. La paraoxonase est une lipoprotéine associée aux HDL ("bon cholestérol"). Cette phosphotriestrase est impliquée dans la protection contre l'athérosclérose. Sachant que l'hyperphosphatémie est un facteur aggravant les risques de pathologies cardio-vasculaires, la protéine humaine fixatrice du phosphate pourrait être un marqueur préclinique de maladies cardio-vasculaires.

[1] Fokine A, Morales R, Contreras-Martel C, Carpentier P, Renault F, Rochu D, Chabriere E. (2003). *Acta Cryst.* D59,2083-7.

[2] Luecke H, Quioco FA. (1990). *Nature* 347,402-6.

[3] Vyas NK, Vyas MN, Quioco FA. (2003). *Structure* 11,765-74.

STRUCTURAL BASIS FOR THE REGULATION OF NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE BY UNIQUE SEQUENCE ELEMENTS.

**E. Garcin¹, C.M. Bruns^{1,2}, S.J. Lloyd¹, D.J. Hosfield³, M. Tiso⁴, R. Gachhui^{4,5},
D. J. Stuehr⁴, J.A. Tainer¹, E.D. Getzoff¹**

¹*Dept of Molecular Biology and the Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.*

²*Current address: Bioinformatics Department, Incyte Genomics, Palo Alto, CA 94304, USA.*

³*Syrrx Inc., San Diego, CA 92121, USA.*

⁴*Dept. Immunology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH 44195, USA.*

⁵*Current address: Dept of Biophysics, Molecular Biology and Genetics, University of Calcutta, 700009 Calcutta, India.*

Three nitric oxide synthase (NOS) isoforms are responsible for the synthesis of nitric oxide, and current interest in isozyme-specific NOS inhibition stems from the distinct role each plays in neurotransmission, host defense and vascular homeostasis. Each chain of a NOS homodimer contains an N-terminal catalytic oxygenase module (NOSox) and a C-terminal electron-supplying reductase module (NOSred) linked by a 32-residue Ca²⁺/CaM-binding region. Despite significant progress in understanding the structural chemistry of NOSox and the recent structure determination of a NOSred fragment, key details of the structural elements acting in enzyme regulation remain elusive. Here, we present the X-ray structure of a fully-assembled neuronal NOSred dimer. NOSred shares the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (CYPOR) fold, with 4 domains: FMN-binding, connecting, FAD-binding and NADPH-binding domains. Unlike CYPOR, NOS is exquisitely regulated by unique elements, including an FMN-domain autoinhibitory insert, a connecting domain CD2A element and a C-terminal tail. Additionally, phosphorylation of the autoinhibitory insert and the C-terminal tail further regulates NO synthesis. The structural data presented here reveal the molecular basis for how three key regulatory structural elements control NOS activity. A newly-identified autoinhibitory helix, which shares striking similarities with canonical calmodulin-binding motifs, packs between the NADPH- and FMN-binding domains, supporting a new mechanism for NOS inhibition. Intricate hydrogen-bond and salt-bridge networks link the FMN- and NADPH-binding domains, the C-terminal tail and co-substrate NADPH to lock the FMN domain in an electron-accepting position and inhibit electron transfer to the catalytic NOSox. To transfer electrons, our analysis suggests a large-scale swinging motion of the entire FMN-domain to an electron-donating position. Our results argue that CaM binding and phosphorylation both activate this inter-module electron transfer by relieving repression of the regulatory elements to promote catalysis.

ETUDES CRISTALLOGRAPHIQUES DE FEMX DE *WEISSELLA VIRIDESCENS* ET DE SON COMPLEXE AVEC L'UDP-MurNAc-PENTAPEPTIDE

S. Biarrotte-Sorin¹, A.P. Maillard², J. Delettre¹, W. Sougakoff³, M. Arthur², C. Mayer^{1,3}

¹ Laboratoire de Minéralogie et Cristallographie de Paris, LMCP, Université Paris 6, 4 place Jussieu, 752525 Paris Cedex 05, France

² Laboratoire de Recherche Moléculaire sur les Antibiotiques, LRMA, Université Pierre et Marie Curie, 15 rue de l'école de Médecine, 75270 Paris Cedex 06, France

³ Laboratoire de Recherche Moléculaire sur les Antibiotiques, LRMA, Université Pierre et Marie Curie, 91 bd de l'hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France

Les enzymes de la famille FemABX sont des nouvelles cibles thérapeutiques car elles sont impliquées dans la construction du peptidoglycane, essentiel à la survie bactérienne. Le peptidoglycane est construit à partir d'un motif contenant de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétyl muramique. Chez la majorité des firmicutes, ces motifs sont branchés via un pont interpeptidique [1]. La longueur et la nature des acides aminés qui le composent varient selon l'espèce bactérienne. Par exemple, chez *Weissella viridescens* le pont interpeptidique est constitué d'une alanine suivie d'une sérine [2], chez *Staphylococcus aureus* de cinq glycines [3] et chez *Enterococcus faecalis* de deux alanines [4]. L'addition des résidus qui constituent le pont interpeptidique est réalisée par les protéines de la famille FemABX qui utilisent deux substrats : l'ARN de transfert aminoacylé et un des précurseurs du peptidoglycane [2, 5]. La protéine FemX de *Weissella viridescens* est une enzyme soluble et nous a servi de modèle dans l'étude de la famille FemABX. FemX catalyse l'addition du premier résidu du pont interpeptidique, une alanine, sur l'UDP-MurNAc-pentapeptide en utilisant l'ARNt chargé en alanine comme substrat [2]. Nous avons récemment résolu la structure de la protéine FemX ainsi que son complexe formé avec l'UDP-MurNAc-pentapeptide à 1.7 Å et 2.1 Å de résolution respectivement [6, 7]. Ceci constitue le premier exemple structural d'un membre de la famille des FemABX qui ne possède pas de coiled-coil [8]. FemX est constituée de deux domaines structurellement équivalents, séparés par une crevasse contenant d'une part le site de fixation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide et d'autre part un canal qui traverse le domaine 2 dans lequel nous avons manuellement modélisé la tige acceptrice de l'ARNt chargé en alanine. Nos études cristallographiques apportent de nouvelles informations structurales quant à la synthèse du peptidoglycane : (1) le transfert d'un résidu ne nécessite pas la participation d'un coiled-coil dans la reconnaissance de l'ARNt, (2) le site de fixation du précurseur du peptidoglycane est spécifique soit d'un intermédiaire lipidique (FemA), soit d'un substrat soluble (FemX), (3) le site présumé de fixation de l'ARNt chargé semble être commun à tous les membres de la famille FemABX, (4) nous montrons comment s'organise la crevasse à la surface de la protéine pour fixer à la fois l'UDP-MurNAc-pentapeptide et la tige acceptrice de l'ARNt.

[1] Schleifer, K. H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407-477.

[2] Plapp, R., and Strominger, J. L. (1970). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. 18. Purification and properties of L-alanyl transfer ribonucleic acid-uridine diphosphate-N-acetylmuramyl-pentapeptide transferase from *Lactobacillus viridescens*. *J. Biol. Chem.* **245**, 3675-3682.

[3] Rohrer, S., Ehlert, K., Tschierske, M., Labischinski, H., and Berger-Bächi, B. (1999). The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9351-9356.

[4] Bouhss, A., Josseaume, N., Allanic, D., Crouvoisier, M., Gutmann, L., Mainardi, J.-L., Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J., and Arthur, M. (2001). Identification of the UDP-MurNAc-pentapeptide:L-alanine ligase for synthesis of branched peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **183**, 5122-5127.

[5] Hegde, S.S., and Shrader, T.E. (2001). FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets. *J. Biol. Chem.* **276**, 6998-7003.

[6] Biarrotte-Sorin, S., Maillard, A.P., Delettre, J., Sougakoff, W., Blanot, D., Blondeau, K., Hugonnet, J.-E., Mayer, C., and Arthur, M. (2003). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Weissella viridescens* FemX UDP-MurNAc-pentapeptide:L-alanine ligase. *Acta cryst.* **D59**, 1055-1057.

[7] Biarrotte-Sorin, S., Maillard, A.P., Delettre, J., Sougakoff, W., Arthur, M., and Mayer, C. (2004). Crystal structures of *Weissella viridescens* FemX and its complex with UDP-MurNAc-pentapeptide: insights into FemABX family substrates recognition. *Structure*. **12**, 257-267.

[8] Benson, T.E., Prince, D., Mutchler, V., Curry, K., Ho, A., Sarver, R., Hagadorn, J., Choi, G., and Garlick, R. (2002). X-ray crystal structure of *Staphylococcus aureus* FemA. *Structure (Camb)* **10**, 1107-1115.

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA 6-PHOSPHO GLUCONOLACTONASE DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*

A. Haouz¹, E. Miclet³, F. Duffieux⁴, J. Ouazzani⁵, P. Lopez⁵, V. Stoven², M. Delarue¹

¹ Laboratoire de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

² Laboratoire de Bio-Informatique Structurale, Institut Pasteur, 75015 Paris, France.

³ NIH, laboratory of chemical physics, NIDDK, Bethesda, USA.

⁴ Aventis Pharma, 93235 Romainville, France

⁵ ICSN-CNRS, avenue de la Terrasse, 91190 Gif sur Yvette

Le protozoaire *Trypanosoma brucei* est un parasite transmis par piqûre de la petite mouche tsétsé. Il provoque la maladie du sommeil, responsable de 300 000 décès par an en Afrique équatoriale. La chimiothérapie repose sur quatre drogues (suramine, melarsoprol, pentamidine, difluorométhyl, ornithine) qui sont insuffisantes: induction de résistance, effets secondaires lourds. Le développement de nouvelles substances actives contre cette affection nécessite l'identification et la caractérisation de nouvelles cibles recherchées parmi les protéines impliquées dans toutes les fonctions cellulaires. Parmi les métabolismes essentiels, la voie des pentoses-phosphate (ou PPP pour Pentose Phosphate Pathway en anglais) présente plusieurs intérêts: c'est la source de pouvoir réducteur (NADPH), de ribose 5-phosphate précurseur des acides nucléiques, et d'intermédiaires métaboliques pour la glycolyse (seule source d'ATP pour les formes sanguines du parasite). Ainsi, l'inhibition de cette voie pourrait être fatale pour le parasite. La première (G6PDH) et la troisième enzyme (6PGDH) de cette voie sont bien caractérisées, mais peu d'informations sont disponibles sur 6PGL.

Nous avons entrepris l'étude fonctionnelle de cette enzyme par RMN, afin de mieux comprendre son rôle dans cette voie métabolique. La structure secondaire a été assignée et une similitude structurale a été trouvée avec la glucosamine 6-phosphate déaminase (1,2). De plus, des expériences d'interaction avec le substrat par RMN ont permis de déterminer les résidus impliqués dans le site actif, ainsi qu'un mécanisme pour la catalyse de l'hydrolyse de la lactone, à partir de celui décrit pour la glucosamine 6-phosphate déaminase (3).

Nous avons également entrepris de déterminer la structure de 6PGL par diffraction des RX. Un jeu de données natif a été enregistré à 2.8 Å sur ID14-EH2 à l'ESRF. La protéine a été surproduite et purifiée au Plateau Technique de protéomique de l'Institut Pasteur (PT5, J. Bellalou et P. Beguin) et un autre jeu de données au mercure a été enregistré à FIP (2.1 Å). Ce dernier a été interprété et un phasage en SIRAS a été effectué, suivi de l'aplatissement de solvant et de la moyennation de la densité pour les deux molécules de l'UA. La carte résultante est interprétable et l'affinement du modèle est en cours.

[1]E. Horjales, M.A. Altamirano, M.L. Calcagno, R.C. Garratt & G. Oliva. The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase : the structure of the T-state at 2.3 Å resolution. *Structure* (1999) 7 :527.

[2] "H^N, N, C^α, C^β, and C^γ assignment of phosphoglucosaminolactonase, a 266-residue enzyme of the pentose-phosphate pathway from human parasite *Trypanosoma brucei*." E Miclet, F. Duffieux, J.Y. Lallemand, V. Stoven. *Journal of Biomolecular NMR* (2003) 25, 249-250.

[3]G.M. Montero-Moran et al. On the multiple functional role of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of E. coli glucosamine 6-phosphate deaminase. *Biochemistry* (2001) 40:10187-10196.

STRUCTURE DE BCLA, UNE PROTEINE DE L'EXOSPORIUM DE LA SPORE DE *BACILLUS ANTHRACIS*

S. Réty¹, S. Salamitou², A. Lewit-Bentley¹

¹ *Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique, Centre Universitaire Paris-Sud, B.P. 34, 91898 Orsay Cedex, France*

² *Institut de Génétique et de Microbiologie, Centre Universitaire Paris-Sud, Bât 409, 91400 Orsay, France*

Bacillus anthracis, la bactérie responsable de l'anthrax, est présente dans l'environnement essentiellement sous forme de spore, un type cellulaire dormant très résistant à la chaleur et à la plupart des agents antiseptiques. La spore est entourée d'une structure épaisse composée de plusieurs couches, dont la couche la plus externe est l'exosporium qui contient au moins une douzaine de protéines différentes. La microscopie électronique a montré que l'exosporium est constitué d'une membrane basale paracrystalline caractérisée par un réseau hexagonal et d'une partie fibrillaire plus externe. La protéine la plus abondante est BclA [1]. BclA est glycosylée et constitue l'antigène dominant de la surface de la spore [2].

Le rôle physiologique de BclA n'est pas connu, mais des études ont montré qu'elle n'était apparemment pas essentielle pour l'infectivité de la bactérie [1]. La séquence ne ressemble à aucune protéine de structure connue; cependant elle contient une série de répétitions Gly-Pro-Thr, typique des collagènes. Le nombre de ces répétitions varie selon la souche de la bactérie (19 répétitions dans la protéine BclA cristallisée): La protéine semble importante pour la formation de fibres sur la surface des spores: le nombre de répétitions GPT est corrélé avec la longueur de ces fibres [3].

La protéine non glycosylée a été produite dans *Escherichia coli* et purifiée par affinité sur résine de Nickel grâce à l'étiquette poly-His ajoutée en position C-terminale. La protéine a cristallisé dans le groupe d'espace P6₃22, avec une molécule par unité asymétrique et une maille de a= b= 68.3Å, c= 163.9Å. Les cristaux diffractent jusqu'à 1,8 Å de résolution sur une source MicroMax de laboratoire. Comme la protéine ne contient aucun acide aminé soufré, une série de dérivés lourds a été préparée par trempe. Seule une trempe courte dans une solution concentrée (1M) de KI a permis d'obtenir un dérivé exploitable pour le phasage SIRAS. Les phases obtenues avec le programme AutoSHARP sont de qualité suffisante pour tracer de manière automatique la chaîne polypeptidique correspondant au deux tiers de la séquence du côté C-terminal et pour identifier les chaînes latérales. La qualité de la densité est excellente, l'affinement est satisfaisant (R=21%, R_{free}=25%) mais actuellement la partie « collagen-like », N-terminale, de la protéine n'est pas visible, bien que l'analyse du contenu des cristaux révèle que la protéine n'est pas protéolysée. Une nouvelle collecte de données natives de bonne qualité et à haute résolution et l'exploitation d'une autre forme cristalline récemment obtenue devraient permettre de tracer la totalité de la structure.

[1] Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. (2002) A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol. Microbiol.* **45**, 169-178.

[2] Steichen C, Chen P, Kearney JF, Turnbough CL Jr. (2003) Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J Bacteriol.*, **185**, 1903-1910.

[3] Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. (2003) Polymorphism in the collagen-like region of the *Bacillus anthracis* BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *J Bacteriol.* **185**, 1555-1563.

L'ENSEIGNEMENT DE LA CRISTALLOGRAPHIE AVEC UN BANC OPTIQUE ET LE LOGICIEL MATHEMATICA

P. Dumas¹, V. Cura²

¹ *Groupe de Cristallographie, IBMC UPR 9002 du CNRS, 15 rue René Descartes 67084 Strasbourg Cedex*

² *UPR 9004 du CNRS, IGBMC, BP 163, 67404 Illkirch Cedex*

L'enseignement de la cristallographie à des étudiants en biologie est un exercice parfois redoutable. En effet, beaucoup se sont orientés ainsi car, en biologie, '*on ne fait plus de maths ou de physique*' ! Après plusieurs années d'expérimentation sur ces cobayes pas toujours consentants, nous avons mis sur pied un enseignement essayant au maximum de faire appel à l'intuition et à des démonstrations visuelles. Pour cela, nous utilisons un banc optique très classique ne mettant en jeu essentiellement qu'un laser ($\lambda=0.6328 \mu\text{m}$) et deux lentilles. Ce dispositif permet de réaliser une expérience de diffraction tout à fait démonstrative en utilisant un négatif 24×36 d'une photo d'un 'cristal 2D' d'une image fort connue, en l'occurrence le portrait d'Einstein tirant la langue. Le cristal est constitué de 80×60 répétitions de la maille unité de paramètres $a = 0.45 \text{ mm}$ et $b = 0.4 \text{ mm}$. Le diagramme de diffraction a été enregistré sur films avec un porte-film en PVC et une enceinte de haute technicité... en carton d'emballage. Il montre nettement des taches jusqu'à l'ordre 21 (soit à peu près 20 μm de résolution), ce qui correspond à plus de 500 réflexions mesurables. Les films ont été digitalisés sur un scanner tout à fait classique. Afin de rendre cette expérience très proche de la réalité, il s'agissait de 'résoudre' cette structure. Pour cela, nous avons réalisé des 'dérivés lourds', comme il se doit en modifiant localement la pseudo-'densité électronique', c'est à dire la densité optique du négatif. Il a suffi de rajouter une 'mouche' à différents endroits sur l'auguste portrait puis de procéder à un réenregistrement des données, ce qui a été fait effectivement pour trois dérivés.

L'aspect calcul a été entièrement réalisé avec le logiciel Mathematica (Wolfram Research). Une première ébauche d'un logiciel d'intégration des données a été réalisé. Celui-ci comporte la localisation des spots et leur intégration par 'profile fitting'. A ce stade, nous avons (momentanément ?) arrêté dans cette voie et procédé (dans un souci d'efficacité, car le temps imparti est compté) avec des données entièrement calculées. Les étudiants peuvent alors déterminer la position des dérivés lourds par inspection des fonctions de Patterson 2D, ce qui prend trois lignes de programmation avec Mathematica. Puis une fonction 'défaut de fermeture' permet de déterminer très simplement les phases nécessaires en utilisant la fonction 'FindMinimum' de Mathematica. Une ligne de code permet alors de représenter la structure résolue en utilisant les données à la résolution désirée. Avec 75 réflexions seulement, l'image ainsi phasée est déjà parfaitement reconnaissable.

De fait, cet aspect de développement en cristallographie avec un logiciel de calcul symbolique comme Mathematica a été largement avancé par ailleurs. Il sera rapidement évoqué et illustré en même temps que l'aspect 'de pédagogie expérimentale' proprement dit.

SIMILARITES ET DIFFERENCES DANS LE MODE DE LIAISON AUX PROTEINES DU XENON ET DU PROTOXYDE D'AZOTE.

Nathalie Colloc'h¹, Jana Sopkova-de Oliveira-Santos², Pascal Retailleau³, Denis Vivarès⁴, Béatrice Langlois d'Estaintot⁵, Jacques Abraini^{1,6} et Thierry Prangé^{3,7}

1 CNRS UMR 6185, Université de Caen, centre Cyceron, bd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen cedex

2 UPRES-EA 2126 (CERMN) - UFR Sciences Pharmaceutiques, 5 rue Vaubénard, Caen.

3 LURE, Université Paris-Sud, Bâtiment 209d, 91405 Orsay cedex.

4 CRMC2-CNRS, Campus de Luminy, case 913, 13288 Marseille cedex 20

5 Unité de Biophysique Structurale, Université Bordeaux I, Avenue des Facultés, Bât. B8, 33405, Talence Cedex, France

6 NNOXe Pharmaceutical, Québec, Canada

7 LCRB, UMR CNRS 8015, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris cedex 06.

Les effets du xénon et du protoxyde d'azote ont été décrits pour leur rôle anesthésique ou pour leurs effets neuroprotecteurs (1) pour lesquels ils ont une action similaire. Les sites de liaison du xénon dans les protéines globulaires ont déjà été étudiés (2), ceux du protoxyde d'azote étaient inconnus avant cette étude.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé deux protéines modèles globulaires, l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* (3) et l'annexine V de rat (4). L'acquisition des données cristallographiques a eu lieu sous une pression de 25 bars de gaz (5). Les cristaux diffractent à haute résolution (1,8 Å). Nous montrons que, dans les deux protéines, le site primaire de liaison est identique pour les deux gaz. Il est situé dans une poche hydrophobe enfouie et vide d'eau dans la protéine native. Il est donc possible de suggérer que le site de liaison du xénon et du protoxyde d'azote soit identique dans les récepteurs canaux neuronaux, leurs cibles d'action physiologique, ce qui expliquerait leur action similaire. Le protoxyde d'azote se lie à un deuxième site dans les deux protéines, et le xénon à un deuxième site dans l'annexine V. Le site secondaire de liaison du protoxyde d'azote est différent de celui du xénon, ceci pourrait être relié à leur différence d'action neurotoxique à pression élevée.

Le xénon et le protoxyde d'azote, contrairement à d'autres anesthésiques volatils, ne se lient pas au récepteur GABA mais aux récepteurs glutamatergiques de type NMDA (6). Ce récepteur est constitué d'un empilement tétramérique de sous-unités NR1 et NR2, chacune possédant trois hélices transmembranaires et un pore. La modélisation du domaine transmembranaire de NR1 et de NR2 a été réalisée en se basant sur la structure du récepteur canal du potassium (7), dont la séquence est proche (8), pour localiser le site de liaison des gaz.

1. David et al., 2003, J. Cereb. Blood Flow Metab., 23, 1168-1173

2. Prangé et al., 1998, Prot. Struc. Funct., 30, 61-73

3. Retailleau et al., 2004, Acta Crystal. D, 60, 453-462

4. Sopkova et al., 1993, J.Mol. Biol., 234, 816-826

5. Schiltz et al., 2003, Methods Enzymol., 374, 83-119

6. Miller, 2002, Br. J. Anaesth., 89, 17-31

7. Zhou et al., 2001, Nature, 414, 43-48

8. Kashiwagi et al., 2002, Mol. Pharmacol., 61, 533-545

ETUDE THERMODYNAMIQUE ET STRUCTURALE DE LA PROTEINE HU DE *E. coli*

B. Castaing, F. Coste, N. Hervouet, C. Zelwer et J. Ramstein

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02, France

HU est la protéine architecturale de l'ADN majeure chez les bactérie [1]. Cette protéine très abondante, petite et basique a été classée parmi les protéines de type histone pour sa capacité à induire des super-structures dans l'ADN chromosomique de *E. coli*. En plus de ces propriétés de compaction de l'ADN, HU est impliquée dans la réplication, la transcription, la recombinaison et dans la réparation de l'ADN et dans la protection de l'ADN contre les radiations ionisantes et contre les stress (chocs chaud et froid). Au niveau moléculaire, la protéine HU est capable de se fixer à l'ADN sous la forme de complexes de faibles affinités ($K_a \approx 10^7 \text{ M}^{-1}$, complexes non spécifiques) et de hautes affinités ($K_a \approx 10^9 \text{ M}^{-1}$, complexes impliqués dans le métabolisme de l'ADN : reconnaissance des structures à 3 et 4 brins et des coupures simple-brin dans l'ADN). Les gènes *hupA* et *hupB* codent respectivement pour les chaînes α et β de HU de *E. coli* (identiques à 70% et similaires à plus de 85%). En fonction des conditions physiologiques, les gènes *hup* ne sont pas exprimées en même temps si bien que la protéine peut exister sous 3 formes dimériques (α_2 , $\alpha\beta$ et β_2). Malgré des repliements globaux *quasi* identiques, les différents dimères de HU ne se fixent pas avec les mêmes affinités à l'ADN. D'un point de vue physiologique, il semble que chaque dimère ne joue pas le même rôle : $HU\alpha_2$ serait plus impliqué dans la réplication et dans la réparation de l'ADN (cellules en phase exponentielle de croissance), $HU\beta_2$ participerait plus spécifiquement à l'adaptation au chocs froids, et $HU\alpha\beta$ serait plus impliqués dans la protection de l'ADN en phase quiescente et dans la résistance aux chocs chauds.

Le fait que des protéines aussi similaires aient des propriétés fonctionnelles aussi déférentes nous a conduit à caractériser chaque dimère de HU d'un point de vue structurale (cristallographie et dichroïsme circulaire), d'un point de vue dynamique (simulations par dynamique moléculaire de la stabilité thermique) et d'un point de vue thermodynamique (stabilité thermique par microcalorimétrie) [2]. Ces études nous ont permis de montrer que chaque dimère possède sa propre signature thermodynamique et existe en solution en équilibre entre 2 formes dimériques ($N_2 \leftrightarrow I_2$) dont l'abondance relative est fonction des conditions physiologiques. N_2 correspond à un dimère compact (structure cristallographique) capable de se fixer à l'ADN tandis que I_2 correspond à un dimère ayant perdu 50% de ces hélices α et est incapable de se fixer à l'ADN. Ces données nous ont permis de faire l'hypothèse que la conformation I_2 de $HU\beta_2$ serait impliquée dans l'adaptation de la bactérie au froid et que d'une façon générale la conformation I_2 des 2 homodimères $HU\alpha_2$ et $HU\beta_2$ permettrait d'obtenir à 37°C de l'hétérodimère $HU\alpha\beta$ à travers la formation d'un hétérotétramère $HU\alpha_2/HU\beta_2$ sans passer par une forme monomérique des dimères (mécanisme d'échange de chaînes). Cette approche pluridisciplinaire illustre la complémentarité entre les études structurales et dynamiques au service de l'étude fonctionnelle d'une macromolécule biologique.

[1] Kamashev, D. & Rouvière-Yaniv, J. (2000) The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair. *EMBO J.*, 19, 6527-6535.

[2] Ramstein, J., Hervouet, N., Coste, F., Oberto, J., Zelwer, C. & Castaing, B. (2003). « Evidence of a thermal unfolding dimeric intermediate for the *Escherichia coli* histone-like HU proteins : thermodynamics and structure ». *J. Mol. Biol.*, 331, 101-121.

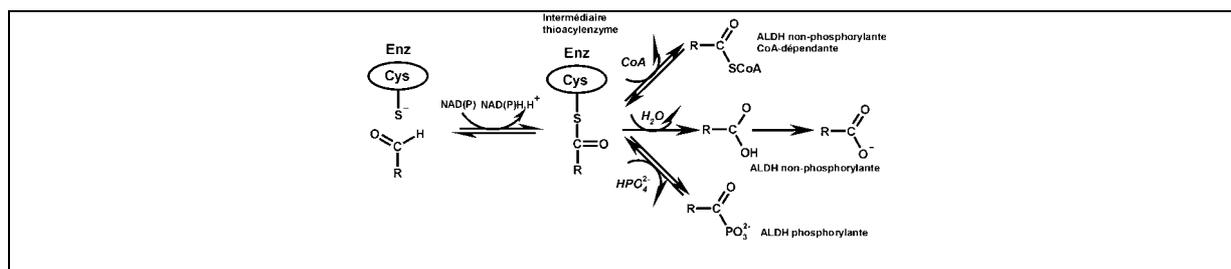
LES ALDEHYDES DESHYDROGENASES CARACTERISATION D'INTERMEDIARES REACTIONELS

C. Didierjean¹, H. Dubourg¹, K. D'Ambrosio¹, F. Talfournier², G. Branlant², A. Aubry¹, C. Corbier¹

¹ Laboratoire de Cristallographie et Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques - UMR 7036 CNRS-UHP-Faculté des Sciences et Techniques, Groupe Biocristallographie, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire – UMR 7567 CNRS-UHP - Faculté des Sciences et techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDHs) constituent une vaste famille d'enzymes intervenant de façon essentielle aussi bien dans les voies du métabolisme cellulaire (anabolisme, catabolisme) que dans des processus de détoxification. Les enzymes étudiés au laboratoire catalysent la conversion d'aldéhydes en acides correspondants (activés ou non activés) *via* une réaction dépendant du nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (NAD(P)). Le mécanisme catalytique de ces enzymes peut se résumer en deux étapes, une oxydoréduction suivie soit d'une étape de phosphorylation (sous-famille des ALDHs phosphorylantes), soit d'une étape de désacylation par hydrolyse ou par transthioestérification (sous-famille des ALDHs non-phosphorylantes). Ces deux sous-familles sont phylogéniquement indépendantes, et possèdent des structures tridimensionnelles distinctes.



Une étude cristallographique d'un représentant de chaque type d'ALDH a été entreprise afin d'identifier les facteurs moléculaires impliqués dans l'efficacité de ces enzymes, leur spécificité de substrat, de cofacteur [1] ou encore les particularités de leur mécanisme [2]. Après une brève introduction des résultats structuraux obtenus sur un complexe michaelien [3] de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase phosphorylante NAD dépendante de *B. stearothermophilus*, les méthodes mises en oeuvre pour étudier le mécanisme de la GAPDH non phosphorylante NADP dépendante de *S. mutans* seront exposées. Enfin, une étude préliminaire de la structure de la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase CoA dépendante de *B. subtilis* sera présentée.

[1] Didierjean C., Rahuel-Clermont S., Vitoux B., Dideberg O., Branlant G., Aubry A. (1997) A crystallographic comparison between mutated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* complexed with either NAD⁺ or NADP⁺. *J Mol Biol*, **268**, 739-749.

[2] Cobessi D., Tête-Favier F., Marchal S., Branlant G., Aubry A. (2000) Structural and Biochemical Investigation of the Catalytic Mechanism of an NADP-dependent Aldehyde Deshydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol*, **300**, 141-152.

[3] Didierjean C., Corbier C., Fatih M., Tête-Favier F., Boschi-Muller S., Branlant G., Aubry A. (2003) Crystal structure of two ternary complexes of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* with NAD and D-glyceraldehyde-3-phosphate. *J Biol Chem*, **278**, 12968-76.

LA BETA-GLUCOSYLTRANSFERASE DU PHAGE T4 : UNE GLYCOSYLTRANSFERASE ET UNE ENZYME DE MODIFICATION DE L'ADN.

Laurent Larivière, Virginie Gueguen-Chaignon, Solange Moréra

LEBS, UPR 9063 CNRS, Bât.34, 1 Avenue de la Terrasse, 91198-Gif-sur-Yvette.

La beta-glucosyltransferase (BGT) du phage T4 transfère le glucose de l'UDP-glucose sur les hydroxyméthyl cytosine de l'ADN du phage. Elle appartient à la grande famille des glycosyltransférases et possède un repliement de type GT-B. Elle est caractérisée par un mécanisme du transfert du glucose en ligne. Nous avons réalisé une étude complète de cette enzyme à travers la résolution de structure de la protéine seule et en complexe avec de l'UDP-glucose, de l'UDP et/ou des oligonucleotides. Nous avons également obtenu une structure entre le mutant D100A et l'UDP-glucose. L'analyse structurale nous a permis de décrire le mécanisme catalytique de BGT qui utilise le retournement de base, d'identifier la base catalytique et un résidu clef dans la reconnaissance spécifique de l'ADN. Les rôles de ces deux résidus ont été confirmés par des tests d'activité. Nous avons également démontré que le mécanisme de retournement de base est chez BGT un mécanisme passif. Nous pensons qu'il s'appliquera à d'autres enzymes de modification de l'ADN telles que les ADN méthyltransférases et les enzymes de réparation de l'ADN qui partagent des points communs avec BGT.

Larivière L, Gueguen-Chaignon V, Moréra S (2003) Crystal structure of the T4 phage beta-glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism. *J Mol Biol.* **330**:1077-1086

Larivière L, Moréra S (2002) A base-flipping mechanism for the T4 phage beta-glucosyltransferase and identification of a transition-state analog. *J Mol Biol.* **29**:483-490

STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE L'INVERTASE DE *THERMOTOGA MARITIMA*: IMPLICATIONS MECANISTIQUES ET EVOLUTIVES

François Alberto, Christophe Bignon, Gerlind Sulzenbacher, Bernard Henrissat et
Mirjam Czjzek

Laboratoire d'Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR6098, CNRS, Universités d'Aix Marseille I & II, 31 chemin Joseph-Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

L'invertase de *Thermotoga maritima*, qui dégrade le saccharose en fructose et glucose, est une des toutes premières enzymes découvertes, puisqu'elle fut décrite dès la deuxième moitié du 19^{ème} siècle. Son nom vient du nom du produit de la réaction catalysée par l'enzyme, le "sucre inversé", qui est un mélange 1:1 de D-glucose dextrogyre et de D-fructose levogyre [1]. En raison de sa structure chimique, le sucrose peut être théoriquement dégradé soit par une α -glucosidase, soit par une β -fructofuranosidase. Koshland a établi que l'invertase est une β -fructofuranosidase en analysant les produits de la réaction conduite dans H₂¹⁸O [2]. L'activité de trans-fructosylation observée pour l'invertase a permis d'établir que la réaction procède par rétention de la configuration anomérique [2]. La dégradation du sucrose est communément utilisée comme source de carbone par les plantes, les bactéries et les champignons. Chez les plantes, le glucose et le fructose sont impliqués dans la signalisation cellulaire et la concentration en sucrose joue donc le rôle de senseur de l'état nutritionnel des cellules ; l'invertase contrôle donc la différenciation et le développement des cellules [3,4]. L'utilisation commerciale de l'invertase se fait surtout dans l'industrie de la confiserie où le mélange glucose:fructose est préféré au saccharose, car il est plus sucré et, surtout, cristallise moins vite.

L'invertase appartient à la famille GH32 de la classification des glycoside hydrolases, basée sur la similitude des séquences [5]. La structure cristallographique, déterminée à 2.0 Å de résolution, révèle deux modules: un "β-propeller" à 5 pales qui possède une similitude structurale avec les structures des glycosidases des familles GH43 et GH68, et un module replié en "β-sandwich". Le centre actif prend la forme d'une cavité en forme d'entonnoir située dans le module β-propeller. Trois résidus carboxyliques y jouent respectivement le rôle de nucléophile, acide-base et stabilisateur d'étape intermédiaire. L'analyse détaillée des séquences primaires a récemment révélé que les glycosidases des familles GH32, GH43, GH62 et GH68 contiennent des motifs similaires, suggérant une origine évolutive commune et, par conséquence, une possible relation structurale. La comparaison des structures cristallographiques montre que la machinerie catalytique de l'invertase est parfaitement superposable non seulement à celle des enzymes de la famille GH68 (qui comme l'invertase possèdent un mécanisme à rétention de configuration anomérique), mais aussi à celle de la famille GH43 qui opèrent par *inversion* de la configuration anomérique [6]. La comparaison structurale des enzymes en complexes avec leurs substrats respectifs permet d'établir que c'est la différence de la position du substrat par rapport à la machinerie catalytique qui explique la différence du mécanisme catalytique entre les enzymes à rétention de la configuration (GH68 et GH32) et à inversion de la configuration (GH43).

1. O'Sullivan, C., and Thompson, F. W. (1890) *J Chem Soc* **57**, 854-870
2. Koshland, D. E., Jr., and Stein, S. S. (1954) *J Biol Chem* **208**, 139-148
3. Sturm, A. (1999) *Plant Physiol* **121**, 1-8
4. Sturm, A., and Tang, G. Q. (1999) *Trends Plant Sci* **4**, 401-407
5. Henrissat, B. (1991) *Biochem J* **280**, 309-316
6. Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B. and Czjzek, M. (2004) *J Biol Chem* **in press**.

ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA SUCROSE ISOMERASE MUTB DE *PSEUDOMONAS MESOACIDOPHILA*

S. Ravaud¹, H. Watzlawick², R. Mattes², R. Haser¹, N. Aghajari¹

¹ Laboratoire de BioCristallographie, IBCP UMR 5086 CNRS UCBL, IFR 128 Biosciences Lyon-Gerland, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

² Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany

La sucrose isomérase MutB de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 est une protéine de 584 acides aminés appartenant à la famille 13 des glucoside hydrolases. Elle catalyse l'isomérisation du sucrose en isomaltulose (α -D-glucosylpyranosyl-1,6-D-fructofranose), et trehalulose (α -D-glucosylpyranosyl-1,1-D-fructofranose), le rapport trehalulose/isomaltulose augmentant lorsque la température de réaction diminue. D'autre part, l'activité enzymatique est optimale à 40°C et à un pH de 5,8 [1]. La protéine a été surexprimée, purifiée et cristallisée à 295 K, en utilisant la technique de la goutte suspendue. Deux formes cristallines ont été obtenues et des données synchrotron ont été enregistrées sur la ligne ID14-EH4 de l'ESRF à Grenoble : la première forme diffracte jusqu'à 1,6 Å et appartient au groupe d'espace P1, avec les paramètres de maille suivant : a=64 Å, b=72 Å, c=82 Å, $\alpha=67,5^\circ$, $\beta=73^\circ$, $\gamma=70^\circ$, la seconde forme diffracte jusqu'à 1,8 Å et appartient au groupe d'espace P2₁, avec les paramètres de maille suivant : a=64 Å, b=86 Å, c=120 Å, $\beta=98^\circ$. Ces données ont été utilisées pour résoudre la structure de MutB par remplacement moléculaire avec comme modèle guide la structure de l'isomaltulose synthase (PalI) de *Klebsiella* sp. LX3, qui présente environ 85 % d'homologie de séquence avec MutB [2, 3]. L'affinement des structures correspondant aux deux formes cristallines est en cours.

[1] Nagai Y., Sugitani T., Tsuyuki K. (1994) Characterization of alpha-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 1789-1793.

[2] Li N., Zhang D., Zhang L. H., Swaminathan K. (2002) Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of isomaltulose synthase (PalI) from *Klebsiella* sp. LX3. *Acta Cryst D*, **59**, 150-151.

[3] Zhang D., Li N., Lok S. M., Zhang L. H., Swaminathan K. (2003) Isomaltulose synthase (PalI) of *Klebsiella* sp. LX3. *J Biol Chem*, **37**, 35428-35434.

STRUCTURE 3D DE LA LECTINE SNA-II DE L'ECORCE DU SUREAU

L. Maveyraud¹, H. Niwa², V. Guillet¹, C.D. Reynolds², P. Rougé³, L. Mourey¹

¹ *Groupe de Biophysique Structurale, IPBS-CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse*

² *School of Biomolecular Sciences, M. Perutz Building, Liverpool J. Moore University, Liverpool L3 3AF, UK*

³ *Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux, UMR-CNRS 5546, 24 chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan*

L'écorce du sureau noir (*Sambucus nigra*) contient une lectine, SNA-II, constituée de sous-unités correspondant à des chaînes B tronquées en N-terminal de SNA-V, une Protéine Inactivant les Ribosomes (RIP) de type II, également exprimée dans l'écorce [1]. Les chaînes B des RIP de type II sont constituées de deux domaines, chacun adoptant un repliement en trèfle β et présentant en général un site de fixation des sucres. La plupart des protéines connues contenant le repliement en trèfle β de la famille de la chaîne B de la ricine sont des protéines chimériques, dans lesquelles ces domaines sont liés de façon covalente à un autre domaine de structure et de fonction variable. Dans le cas des RIP de type II, dont la ricine est l'archétype, ce second domaine correspond à une chaîne polypeptidique distincte, présentant une activité N-glycosidase [2]. Les chaînes A et B sont alors associées par un pont disulfure.

SNA-II et ses orthologues de la famille des sureaux sont des rares exemples de protéines exclusivement constituées de domaines appartenant à la famille de la chaîne B de la ricine. La structure 3D de la glycoprotéine SNA-II a été déterminée à partir de deux formes cristallines : une forme hexagonale, diffractant à 1,9 Å, et une forme tétragonale, diffractant à 1,3 Å. La comparaison de la structure de SNA-II à celle des chaînes B des RIP de type II montre que l'absence de la chaîne A ne perturbe pas le repliement en trèfle β . Les sites de fixation des sucres dans SNA-II sont semblables à ceux observés chez la ricine.

La comparaison de la structure de SNA-II obtenue dans les deux formes cristallines a permis d'identifier plusieurs arrangements oligomériques possibles. Les études en chromatographie d'exclusion suggèrent une forme dimérique, et trois assemblages dimériques distincts semblent possibles. Dans la forme hexagonale, un dimère potentiel est observé, dans lequel la dimérisation fait intervenir la chaîne glycanne portée par l'Asn63 d'un protomère qui interagit dans le site de fixation des sucres de l'autre protomère. Dans la forme cristalline tétragonale, un dimère similaire est observé, pour lequel la chaîne glycanne ne contribue pas à l'interface. L'orientation relative des protomères dans ces deux types de dimère varie d'approximativement 30°. Une forme tétramérique, présentant une symétrie interne 222, est commune aux 2 formes cristallines. Cependant, l'interface d'un des dimères constituant ce tétramère présente des caractéristiques suggérant une plus forte probabilité d'existence en solution, le second type de dimère observé dans cette forme tétramérique paraissant artificiel.

Les conséquences fonctionnelles de ces différents états oligomériques possibles, et notamment la distribution spatiale des sites de reconnaissance des sucres sera discutée.

[1] H. Kaku, W.J. Peumans & I.J. Goldstein (1990), *Arch. Biochem. Biophys.*, **277**, 255–262

[2] E.J. Van Damme, Q. Hao, Y. Chen, A. Barre, F. Vandenbussche, S. Desmyter, P. Rougé & W.J. Peumans (2001), *Crit. Rev. Plant Sci.*, **20**, 395–465

RÔLE DU DOMAINE C DE L' α -AMYLASE AMY1 DU GRAIN D'ORGE DANS LA RECONNAISSANCE ET LA FIXATION DU SUBSTRAT : « LA PINCE À SUCRE »

S. Tranier¹, X. Robert¹, R. Haser¹, S. Bozonnet², B. Svensson², N. Aghajari¹

¹ *Laboratoire de BioCristallographie, IBCP-UMR 5086, CNRS/UCBL, IFR 128 « BioSciences », 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France*

² *Biochemistry and Nutrition Group, Biocentrum - D.T.U., Søltofts Plads - Building 224, DK-2800 Kongens Lyngby, Denmark*

Les α -amylases (1,4- α -D-glucosyl-hydrolase, E.C.3.2.1.1) sont des enzymes monomériques, de poids moléculaire variant entre 41 et 78 kDa, retrouvées largement dans le règne vivant, aussi bien chez les animaux, les plantes supérieures que chez les micro-organismes. Ces enzymes hydrolysent les liaisons glycosidiques α -D-(1,4) internes de l'amidon, du glycogène et des poly- et oligosaccharides apparentés. Elles sont très importantes, tant par leurs applications industrielles et biotechnologiques (biodégradation ou transformation de l'amidon, par exemple) que par leur implication dans certains troubles métaboliques (diabète, obésité, etc.) faisant de ces enzymes des cibles thérapeutiques. A ce jour, 13 structures d' α -amylases de différents organismes ont été déposées. On dénombre ainsi 5 structures d' α -amylases de microorganismes, 3 de mammifères (2 humaines et 1 porcine), 1 de vers, 2 de champignons et 2 de plantes (orge). Leurs structures tridimensionnelles ont toutes en commun un domaine catalytique central formé par un tonneau (β/α)₈ appelé aussi « *TIM Barrel* » (1).

Le grain d'orge possède 2 isoenzymes majeures d' α -amylases, dénommés AMY1 et AMY2. Malgré une très forte identité de séquence (près de 80 %), ces deux isoenzymes se distinguent l'une de l'autre par plusieurs propriétés physico-chimiques ou enzymatiques : point isoélectrique, stabilité à pH acide ou à température élevée, affinité pour l'amidon insoluble et efficacité catalytique (2, 3). La première structure tridimensionnelle d'une α -amylase de plante à avoir été résolue est celle de AMY2 native (4). La structure de AMY2 en complexe avec un inhibiteur de type pseudo-polysaccharidique (l'acarbose) a également été déterminée (5), ainsi que celle en complexe avec un inhibiteur protéique endogène bifonctionnel (BASI) (6). La structure de l'enzyme AMY1 native et celle d'un complexe formé avec un analogue de substrat, le 4I,4II,4III-tri-thiomaltotetraoside, ont récemment été résolues respectivement à 1,5 et 2,0 Å de résolution dans le laboratoire de BioCristallographie de l'IBCP. Un site de surface reconnaissant les malto-oligosaccharides a été identifié. La présence d'un tel site n'a jamais été rapportée pour d'autres α -amylases (7). Il met en évidence un rôle potentiel du domaine C terminal de l'enzyme. Nous avons également montré pour la première fois chez ce type d'enzyme, la fixation d'une molécule de β -cyclodextrine sur ce nouveau site de surface.

1. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) *Nature* **255**, 609-614
2. Sogaard, M., and Svensson, B. (1990) *Gene* **94**, 173-179
3. Ajandouz, E. H., Abe, J., Svensson, B., and Marchis-Mouren, G. (1992) *Biochim Biophys Acta* **1159**, 193-202
4. Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B., and Haser, R. (1994) *J Mol Biol* **239**, 104-121
5. Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B., and Haser, R. (1998) *J Mol Biol* **278**, 205-217
6. Vallee, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K. W., Svensson, B., and Haser, R. (1998) *Structure* **6**, 649-659
7. Robert, X., Haser, R., Gottschalk, T. E., Ratajczak, F., Driguez, H., Svensson, B., and Aghajari, N. (2003) *Structure* **11**, 973-984

LE COMPLEXE PROTEINE SBP2/ARN SECIS AU COEUR DE LA SYNTHÈSE DES SELENOPROTEINES

Vincent Olieric, Christine Allmang, Guillaume Bec, Alain Lescure, Alain Krol et Philippe Dumas

UPR 9002 CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

La sélénocystéine, forme biologique majeure du sélénium, est incorporée dans les sélénoprotéines en réponse à un codon UGA (correspondant habituellement à un codon stop) [1]. Chez les eucaryotes, la protéine SBP2 joue un rôle clé dans ce processus en établissant des interactions protéine/ARN et protéine/protéine multiples. SBP2 permet le recrutement du facteur d'élongation spécialisé mSelB lié à l'ARNt^{sec}. Elle se lie aussi à la région 3'UTR de l'ARNm des sélénoprotéines au niveau d'une structure en tige-boucle (l'élément SECIS), nécessaire pour la différenciation entre codon UGA stop et codon UGA_{sec}. SBP2 assure ainsi le lien fonctionnel entre l'élément SECIS, le ribosome et le codon UGA_{sec} par un mécanisme assez mal détaillé.

Il y a maintenant des évidences montrant que le mode d'interaction de la protéine SBP2/ARN SECIS serait similaire à l'interaction entre la protéine 15.5KD/snARN U4 [2]. Le but de cette étude est de vérifier cette hypothèse en réalisant la structure cristallographique du complexe protéine SBP2/ARN SECIS.

La première étape a consisté à purifier les deux partenaires. L'instabilité de la protéine entière a nécessité le test de plusieurs constructions tronquées du côté N-ter et un fragment minimal qui se lie à l'ARN SECIS a été choisi pour les essais de cristallisation. La production dans *E. coli* et la purification sont facilitées par un domaine thioredoxine en N-ter et une étiquette 6×His. Une colonne échangeuse de cations et un tamis moléculaire permettent d'obtenir une protéine pure.

Pour obtenir un fragment d'ARN SECIS homogène, le transcrit contient un ribozyme en 5' et en 3' (5'-HH/3'-HDV). Le clonage de la construction a été facilité par l'utilisation d'un nouveau plasmide pRZ [3] qui contient déjà le ribozyme HDV en 3'. Il est purifié sur gel d'acrylamide grâce au système BioRad Model 491 Prep Cell suivi d'une colonne échangeuse d'anions.

Les essais de cristallisation du complexe SBP2/SECIS sont maintenant en cours.

[1] Atkins, J.F. and R.F. Gesteland, *The twenty-first amino acid*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 463, 465.

[2] Allmang, C., P. Carbon, and A. Krol, *The SBP2 and 15.5 kD/Snu13p proteins share the same RNA binding domain: Identification of SBP2 amino acids important to SECIS RNA binding*. RNA, 2002. **8**: p. 1-11.

[3] Walker, S.C., J.M. Avis, and G.L. Conn, *General plasmids for producing RNA in vitro transcripts with homogeneous ends*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(15): p. e82.

ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA PROTEINE HUMAINE IRP1, UN REGULATEUR DE L'HOMÉOSTASIE DU FER.

J. Dupuy¹, A. Volbeda¹, P. Carpentier¹, C. Darnault¹, J.M. Moulis², J.C. Fontecilla Camps¹

¹ *Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel. CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, Grenoble, France.*

² *Laboratoire Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Département Réponse et Dynamique Cellulaires. CEA/CNRS UMR5090/Université Joseph Fourier, Grenoble, France.*

Le fer est un métal de transition qui est essentiel à de nombreuses fonctions métaboliques, incluant le transport de l'oxygène (hémoglobine et myoglobine), la synthèse d'ADN ou encore les réactions de transfert d'électron. A côté de son rôle indispensable, le fer peut être toxique surtout quand il est en excès. Chez la plupart des organismes aérobies, les espèces réduites de l'oxygène sont générées, notamment le radical superoxyde. Ce radical, par dismutation, produit du peroxyde d'hydrogène qui lui-même peut réagir avec du fer ferreux et former, par la réaction de Fenton, du fer ferrique et une autre espèce réactive de l'oxygène, le radical hydroxyle :



C'est notamment cette espèce radicalaire qui est très toxique, pouvant entraîner des modifications sur les différents composants cellulaires comme l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides. Le dilemme est donc le suivant : les cellules aérobies doivent acquérir suffisamment de fer pour subvenir à leurs besoins vitaux mais elles doivent aussi éviter une trop forte accumulation pour empêcher tout effet toxique.

L'homéostasie cellulaire du fer chez les animaux est contrôlée par des protéines senseurs connues sous le nom d'*Iron Regulatory Proteins* (IRPs)¹. Leur mode d'action est post-transcriptionnel : elles interagissent avec certains ARN messagers au niveau de motifs spécifiques appelés IRE (*Iron Responsive Element*) situés dans des régions non traduites. Ainsi elles affectent le taux de synthèse des protéines impliquées dans le stockage (ferritine), l'utilisation (synthèse de l'acide aminolevulinique des érythroblastes) ou encore le transport (récepteur de la transferrine, *divalent metal transporter 1*) du fer. Le présent travail porte plus spécifiquement sur IRP1 qui est une protéine bifonctionnelle. Lorsque la concentration cellulaire en fer est faible, elle est capable de réguler la traduction de certains ARNm en se fixant sur leurs motifs IRE. Par contre, en présence de plus fortes concentrations de fer elle acquiert la fonction d'aconitase (interconversion entre citrate et isocitrate) cytoplasmique en intégrant un agrégat [4Fe-4S]² et en se dissociant de l'ARNm. La modulation de l'activité s'effectue donc par un processus d'assemblage et de désassemblage du centre fer-soufre.

IRP1 est une protéine de 889 acides aminés pour un poids moléculaire de 98 kDa. Des études en solution, par dichroïsme circulaire et diffusion de neutrons, ont permis d'avoir quelques informations quant aux changements structuraux d'IRP1 dans son rôle de régulateur³. Néanmoins, afin de mieux comprendre ses propriétés et son fonctionnement nous avons entrepris son étude cristallographique. Deux formes cristallines ont été obtenues. Les premiers résultats montrent que le groupe d'espace est C222₁ pour une des formes avec comme paramètres de maille a=75,6 Å, b=102,9 Å et c=225,3 Å. Pour l'autre forme, en P₁, nous obtenons a=64 Å, b=64 Å, c=215,5 Å, α=γ=90° et β=108°. La résolution maximale est de 1,9 Å pour la forme P1 et de 2,5 Å pour la forme C222₁. Des collectes au seuil d'absorption du fer ont été faites sur la ligne FIP-BM30A de l'ESRF pour les deux formes. De plus les données d'un dérivé lourd ont été enregistrées. Le phasage des données par les méthodes MAD et SIR est en cours.

¹ Hentze, M. W. & Kuhn, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8175-82 (1996).

² Brazzolotto, X., Gaillard, J., Pantopoulos, K., Hentze, M. W. & Moulis, J. M. Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J Biol Chem* **274**, 21625-30. (1999).

³ Xavier Brazzolotto, Peter Timmins, Yves Dupont, and Jean-Marc Moulis Structural Changes Associated with Switching Activities of Human Iron Regulatory Protein 1 *J Biol Chem* Vol. 277, No. 14, Issue of April 5, pp. 11995-12000, 2002 est plus en rapport avec la phrase citée.

ETUDE STRUCTURALE DE POLYKETIDES SYNTHASES DE TYPE I DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

**P. Roblin¹, M. Sanroma¹, V. Guillet¹, F. Boissier¹, C. Chalut², W. Malaga², C. Guilhot²,
L. Mourey¹**

¹Groupe de biophysique structurale, ² Equipe “ Pathogénie moléculaire des mycobactéries ”
Département “ Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes ”
IPBS UMR 5089 CNRS UPS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France

Les polykétides synthases de type 1 (Pks) sont des protéines de grande taille, modulaires et complexes qui sont responsables de la biosynthèse d'une classe de composés naturels très variés, les polykétides. Ceux-ci sont impliqués dans des processus biologiques importants tels que la biogenèse de l'enveloppe de certaines bactéries [1], la pathogénie [2] ou la réponse protectrice de microorganismes à l'infection par des pathogènes. Certains polykétides présentent également des propriétés pharmacologiques intéressantes : antifongiques, antibiotiques, immunodépressives, antitumorales... Les Pks catalysent l'élongation d'un substrat en faisant intervenir plusieurs domaines catalytiques et en utilisant un répertoire diversifié de précurseurs et d'unités d'élongation. Le nombre et la nature des domaines présents sur une Pks vont déterminer quel type de polykétide sera synthétisé [3].

Parmi la vingtaine de Pks produites par *Mycobacterium tuberculosis* [4], l'agent étiologique de la tuberculose, il a été choisi de travailler sur un groupe cohérent d'enzymes, toutes constituées d'une seule chaîne polypeptidique d'environ 2000 acides aminés mais possédant chacune un programme de synthèse spécifique. Le but de cette étude est de contribuer à établir les bases moléculaires et structurales du fonctionnement et de la spécificité de ces Pks et d'aider à concevoir de façon rationnelle des inhibiteurs de ces cibles à haut potentiel pharmacologique pour développer de nouveaux composés antituberculeux.

Plusieurs stratégies complémentaires ont été mises en place pour cette étude. Nous proposons de déterminer les structures de protéines entières par radiocristallographie des rayons X. Pour pallier d'éventuels problèmes de production et/ou de cristallisation de ces enzymes de grande taille, nous travaillons aussi sur les différents domaines catalytiques dont les bornes ont été prédites par analyse bioinformatique ou seront déterminées par des expériences de protéolyse ménagée. Nous utiliserons aussi une approche hybride où des informations structurales obtenues à basse résolution pour des protéines entières seront combinées aux structures cristallographiques haute résolution des domaines individuels. Les résultats obtenus pour la production et la purification d'une Pks entière et de certains de ses domaines seront présentés.

[1] Portevin D., De Sousa-D'Auria C., Houssin C., Grimaldi C., Chami M., Daffé M., Guilhot C. (2004) A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 314-319.

[2] Camacho L. R., Ensergueix D., Perez E., Gicquel B., Guilhot C. (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol*, **34**, 257-267.

[3] Yadav G., Gokhale R. S., Mohanty D. (2003) Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. *J Mol Biol*, **328**, 335-363.

[4] Cole S. T., et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.

L'ADAPTATION AU FROID D'UNE CELLULASE PSYCHROPHILE ETUDIEE PAR CRISTALLOGRAPHIE ET DIFFUSION DES RAYONS- X AUX PETITS ANGLES

S. Violot¹, V. Receveur-Bréchet², M. Czjzek², P. Gouet¹, G. Feller³, R. Haser¹ & N. Aghajari¹

¹ Laboratoire de BioCristallographie, IBCP-UMR 5086, CNRS/UCB Lyon I, IFR 128 BioSciences Lyon-Gerland, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

² Laboratoire d'Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 6098, CNRS /Université Aix Marseille I & II, IBSM IFR 88, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

³ Laboratoire de Biochimie, Institut de Chimie B6, Université de Liège, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique

La bactérie psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* [1], isolée à partir des eaux de l'océan antarctique produit un cellulase adaptée aux basses températures. L'enzyme native CelG est composée de deux domaines : un domaine catalytique de 293 a.a. en N-terminal connecté par un segment charnière de 108 résidus à un petit domaine de fixation du substrat en C-terminal.

Des cristaux du domaine catalytique, diffractant à haute résolution, ont pu être obtenus par la méthode de diffusion de vapeur selon la technique de la goutte suspendue [2]. Sa structure tridimensionnelle a été résolue à 1,4 Å par remplacement moléculaire, en utilisant comme modèle la structure de la cellulase mésophile Cel5A de *Erwinia chrysanthemi* [3]. Le domaine catalytique de cette cellulase psychrophile présente un repliement de type $(\beta/\alpha)_8$, caractéristique des glycosides hydrolases du clan GH-A. Un complexe entre le domaine catalytique et le cellobiose (produit de la réaction d'hydrolyse) a pu être obtenu et sa structure a été établie à 1,6 Å de résolution. Il met en évidence une fixation très spécifique de ce cellobiose dans les sous sites -2 et -3 du site catalytique.

La comparaison structurale des domaines catalytiques de CelG et de Cel5A révèle des déterminants structuraux de l'adaptation de cette enzyme aux basses températures. De plus l'analyse de l'enzyme entière par diffusion des rayons-X aux petits angles montre très clairement que la charnière inter-domaines de CelG est très flexible et non structurée, et semble jouer un rôle clef pour l'activité à basse température.

[1] Garsoux G., Thèse de doctorat (2001) Université de Liège, Belgique.

[2] Violot S., Haser R., Sonan G., Georlette D., Feller G., Aghajari N. (2003) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Acta Cryst.*, **D59**, 1256-1258.

[3] Chapon V., Czjzek M., El Hassouni M., Py B., Juy M., Barras F. (2001) Type II protein secretion in gram-negative pathogenic bacteria: the study of the structure/secretion relationships of the cellulase Cel5 (formerly EGZ) from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.*, **310**, 1055-1066.

UNE PBP2X D'UN ISOLAT CLINIQUE DE *S. PNEUMONIAE* MONTRE UN MECANISME ALTERNATIF POUR DIMINUER SA SENSIBILITE AUX β -LACTAMINES

Lucile Pernot^{1*}, Laurent Chesnel², Audrey Le Gouellec², Jacques Croizé³, Thierry Vernet², Otto Dideberg¹ et Andréa Dessen¹

¹ Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CNRS/CEA/UJF), 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble cedex 1, France

² Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CNRS/CEA/UJF), 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble cedex 1, France

³ Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-38400 Grenoble, France

* adresse actuelle : Département de Génétique et Microbiologie, Centre Médicale Universitaire, 1 rue Michel Servet, CH-1211 Genève 4, Suisse

La bactérie *Streptococcus pneumoniae* est l'un des agents principaux responsables d'infections des voies respiratoires. Actuellement, les isolats cliniques de *S. pneumoniae* montrent souvent une sensibilité diminuée vis-à-vis des β -lactamines, un phénomène lié aux mutations multiples chez les protéines appelées Penicillin-Binding Protein (PBP). PBP2x, une des six PBPs de *S. pneumoniae*, est la première cible à être modifiée sous pression d'antibiotique [1]. En comparant 89 séquences de PBP2x de *S. pneumoniae* issues de bases de données cliniques et publiques, nous avons identifié un groupe principal de séquences issues de souches sensibles ainsi que deux groupes distincts issus de souches résistantes. Le premier groupe comprend des protéines qui présentent une forte ressemblance avec PBP2x issue de la souche résistante Sp328 bien caractérisée [2-4]. Le deuxième groupe contient des séquences dans lesquelles une mutation signature, Q552E, est située proche du troisième motif catalytique. Dans ce travail, une PBP2x issue d'une souche représentative du deuxième groupe (*S. pneumoniae* 5259) a été caractérisée biochimiquement et structuralement [5]. Les analyses phénotypiques des pneumocoques transformés montrent que la mutation Q552E est en grande partie responsable de la diminution de la sensibilité de la souche vis-à-vis des β -lactamines. La structure cristalline de 5259-PBP2x montre un changement de polarité et de charge autour de la cavité du site actif, ainsi qu'un réarrangement du brin β 3 ; ces changements structuraux ont également été observés chez les autres PBPs conférant la résistance chez les pathogènes Gram-positifs. De plus, le site actif de 5259-PBP2x est dans une conformation fermée, tandis que celui de Sp328 est ouverte. Par conséquent, *S. pneumoniae* a évolué en utilisant la même protéine pour deux mécanismes distincts de résistance aux antibiotiques.

[1] Parès S., Mouz N., Petillot Y., Hakenbeck R., & Dideberg O. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 284-289.

[2] Dessen A., Mouz N., Gordon E., Hopkins J. & Dideberg O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45106-45112.

[3] Mouz N., Di Guilmi A.-M., Gordon E., Hakenbeck R., Dideberg O. & Vernet T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19175-19180.

[4] Mouz N., Gordon E., Di Guilmi A.-M., Petit I., Petillot Y., Dupont Y., Hakenbeck R., Vernet T. & Dideberg O. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **A95**, 13403-13406.

[5] Pernot L., Chesnel L., Le Gouellec A., Croizé J., Vernet T., Dideberg O., Dessen A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 16463-16470

ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DES PROTEINES MIAA ET MIAB IMPLIQUEES DANS LA MODIFICATION DE L'ADENINE 37 DES ARN DE TRANSFERT.

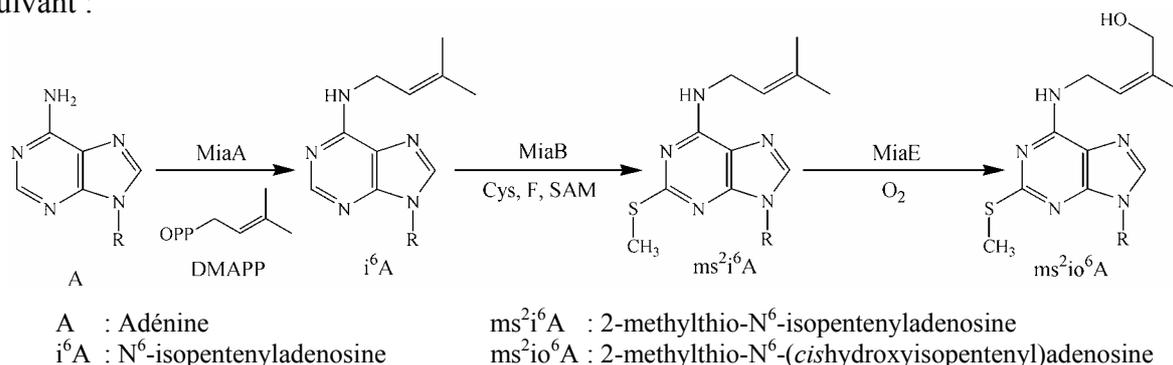
M. Cherrier¹, F. Perriel², M. Fontecave², J.C. Fontecilla Camps¹

¹ Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel. CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

² Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Redox Biologiques, Département de Biologie Moléculaire et Structurale-Chimie Biologie. CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Les ARN de transfert subissent une grande variété de modifications post-transcriptionnelles importantes pour leurs activités biologiques. On trouve donc de nombreuses bases modifiées dans les ARN de transfert, et notamment au niveau de la boucle de l'anticodon. On a estimé qu'environ 1% du génome bactérien était dédié aux modifications des ARN de transfert.

Une modification très répandue, puisqu'on la retrouve chez quasiment toutes les espèces de bactéries et d'eucaryotes, est la modification de l'adénine 37 suivant le schéma suivant :



L'évolution de la modification dépend de l'organisme. Chez *E.coli*, la modification s'arrête au ms²i⁶A, alors que chez d'autres bactéries on obtient le ms²io⁶A.

Cette modification se fait sur les ARN de transfert ayant également une adénine en position 36 : qui correspond à la troisième base de l'anticodon. Les ARN de transfert concernés par cette modification sont donc ceux qui reconnaissent les codons commençant par une uridine, tels que par exemple les ARNt – Phe, ARNt – Ser, ARNt – Trp.

L'absence de cette modification n'a pas d'effet cinétique sur l'étape d'aminoacylation, mais elle provoque une altération de la croissance cellulaire et du taux de traduction, et une augmentation de l'activité du mécanisme de correction de la traduction (proofreading).

Nous nous sommes donc intéressés à l'étude par cristallographie aux rayons X, en collaboration avec le laboratoire de M. Fontecave, aux deux premières protéines impliquées dans cette modification : les protéines MiaA et MiaB.

A l'heure actuelle des cristaux des deux protéines ont été obtenus. Ceux de MiaB diffractent en moyenne jusqu'à 3 Å, et ceux de MiaA ne diffractent malheureusement pas.

F. Pierrel, G.R. Bjork, M. Fontecave, M. Atta (2002). *J Biol Chem*, **16**, 13367-13370.

T. Soderberg and C.D. Poulter (2001). *Biochemistry*, **40**, 1734-1740.

T. Soderberg and C.D. Poulter (2000). *Biochemistry*, **39**, 6546-6553.

J.A. Moore, C.D. Poulter (1996). *Biochemistry*, **36**, 604-614.

STRUCTURE D'UNE PHOSPHOGLYCERATE KINASE PSYCHROPHILE ET COMPARAISON AVEC CES HOMOLOGUES MESOPHILES, THERMOPHILES ET HYPERTHERMOPHILES

D. Wolff¹, D. Mandelman¹, R. Haser¹, G. Feller², N. Aghajari¹

¹ Laboratoire de BioCristallographie, IBCP, UMR 5086, CNRS-UCBL, IFR 128
« BioSciences », 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

² Laboratoire de Biochimie, Institut de Chimie B6, Université de Liège, Sart Tilman, B-4000
Liège, Belgique

Parmi les organismes extrémophiles, ceux qui opèrent dans des environnements très froids sont appelés psychrophiles. Ils produisent des enzymes particulièrement adaptées à ces conditions, dont une phosphoglycérate kinase (PGK) issue de *Pseudomonas sp. TACII 18*.

Cette enzyme, comme toutes les enzymes psychrophiles, présentent une haute activité spécifique à basse température et une thermostabilité réduite par rapport à leurs homologues mésophiles. Ces organismes, et les enzymes issues de ceux-ci, présentent, non seulement un intérêt fondamental mais aussi un intérêt biotechnologique [1].

Cette enzyme glycolytique catalyse le transfert d'un groupement phosphate du 1,3-bisphosphoglycérate vers le Mg-ADP pour former du Mg-ATP et du 3-phosphoglycérate.

La première structure élucidée de cette enzyme est celle du muscle de cheval, qui a permis de montrer l'existence de deux domaines reliés par une hélice α [2]. Chaque domaine lie un des deux substrats, et grâce à un mouvement de l'hélice reliant les deux domaines, les deux substrats se retrouvent à proximité [3].

La cristallisation [4] et l'élucidation de la structure de cette enzyme permet d'analyser et de comparer les structures tridimensionnelles de la phosphoglycérate kinase psychrophile avec celle d'une mésophile [5], d'une thermophile [6] et d'une hyperthermophile [3]. Des études structurales précédentes montrent que plusieurs facteurs structuraux semblent être mis en jeu quant à l'adaptation moléculaire aux températures extrêmes. Pour les enzymes issues d'organismes psychrophiles, ces modifications semblent conférer une plus grande flexibilité, ce qui leur permettra d'avoir une activité augmentée, malgré les vitesses de réaction réduites aux basses températures.

[1] Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., et Feller, G. (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol*, **18**(3): p. 103-107.

[2] Banks, R.D., Blake, C.C., Evans, P.R., Haser, R., Rice, D.W., Hardy, G.W., Merrett, M., et Phillips, A.W. (1979) Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature*, **279**(5716): p. 773-777.

[3] Auerbach, G., Huber, R., Grattinger, M., Zaiss, K., Schurig, H., Jaenicke, R., et Jacob, U. (1997) Closed structure of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritima* reveals the catalytic mechanism and determinants of thermal stability. *Structure*, **5**(11): p. 1475-1483.

[4] Mandelman, D., Bentahir, M., Feller, G., Gerday, C., et Haser, R. (2001) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a bacterial psychrophilic enzyme, phosphoglycerate kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**(Pt 11): p. 1666-1668.

[5] Bernstein, B.E., et Hol, W.G. (1998) Crystal structures of substrates and products bound to the phosphoglycerate kinase active site reveal the catalytic mechanism. *Biochemistry*, **37**(13): p. 4429-4436.

[6] Davies, G.J., Gamblin, S.J., Littlechild, J.A., et Watson, H.C. (1993) The structure of a thermally stable 3-phosphoglycerate kinase and a comparison with its mesophilic equivalent. *Proteins*, **15**(3): p. 283-289.

FLEXIBILITE DU SITE ACTIF CHEZ L'ENZYME DSBA DE ESCHERICHIA COLI.

A. Koné & L. Serre

Laboratoire des Protéines Membranaires. Institut de Biologie Structurale. 40 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble

Chez *Escherichia coli*, la présence des ponts dissulfures est contrôlée par les enzymes codées par les gènes *dsb* [1]. Parmi celles-ci, DsbA et DsbB sont responsables de la biosynthèse de ces liaisons. Ainsi, lorsqu'une protéine arrive dans le périplasma de la bactérie, DsbA échange le pont dissulfure présent dans son site actif avec une paire de groupements thiols situés sur la protéine en cours de maturation. DsbA est alors réduite et retrouve sa forme oxydée active en interagissant avec DsbB, son partenaire membranaire.

DsbA appartient à la famille des thiorédoxines et possède comme tous les membres de cette famille, un site actif du type CXXC. Ses deux cystéines actives, Cys30 et Cys33, sont séparées par le dipeptide Pro-His. Contrairement à la thiorédoxine qui est réductrice, DsbA est un fort oxydant. L'échange rapide des groupements thiols catalysé par DsbA, a été expliqué partiellement par le caractère nucléophile particulier de Cys30, la cystéine la plus accessible de l'enzyme dont le pK_a est de 3.5 [2]. La séquence du dipeptide Pro-His entre les deux cystéines réactives semble aussi importante pour comprendre le pouvoir oxydant de DsbA[2].

La structure de *E. coli* DsbA sous sa forme oxydée ou réduite est connue depuis longtemps par RMN et cristallographie [3-5]. Cependant ces études structurales n'ont pas permis d'élucider totalement la réactivité de DsbA au niveau atomique, les formes réduites et oxydées étant très similaires. Nous avons cristallisé et résolu la structure du mutant C33A de DsbA, un mutant caractérisé pour sa capacité à former un complexe stable avec DsbB [6]. Contrairement aux modèles précédemment obtenus, la structure de ce mutant montre un changement conformationnel spectaculaire dans la région du site actif, en particuliers, l'isomérisation *trans/cis* de Pro31 qui rappelle de récentes études RMN effectuées sur des peptides du type CPXC [7]. Ce changement de conformation inclue également une région supposée impliquée dans la reconnaissance du substrat et un domaine en hélices spécifique de DsbA. Nous avons analysé ces changements structuraux en fonction des processus réactionnels qui impliquent DsbA.

[1] Kadokura *et al.*, (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 111-135.

[2] Grauschopf *et al.* (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell*, **83**, 947-55.

[3] Martin *et al.*, (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature*. **365**, 464-8.

[4] Guddat, L.W. *et al.* (1998) Crystal structures of the reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure*. **6**, 757-767.

[5] Shirra *et al.* (1998) *Biochemistry* **37**, 6267-76.

[6] Kadokura & Beckwith, (2002). Four cysteines of the membrane protein DsbB act in concert to oxidize its substrate DsbA., *EMBO J*. **15**, 2354-63.

[7] Shi *et al.* (2004). Unexpectedly fast *cis/trans* isomerization of Xaa-Pro peptide bonds in disulfide-constrained cyclic peptides. *J Am Chem Soc*. **28**, 790-6.

RECONNAISSANCE SPECIFIQUE ET DIFFERENCIEE DES LESIONS DE L'ADN FAPYDG ET 8-OXODG PAR L'ENZYME DE REPARATION FPG

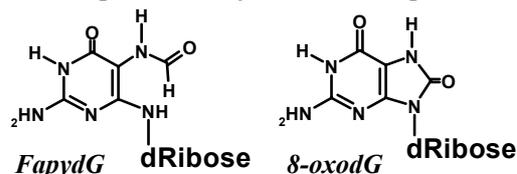
Franck Coste¹, Matthias Ober², Thomas Carell², Serge Boiteux³, Charles Zelwer¹, Bertrand Castaing¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02, France

²Department of Chemistry, Philipps-University, Hans-Meerwein-Str., D-35043 Marburg, Germany

³Laboratoire de Radiobiologie du DNA, UMR217, CNRS-CEA, Centre d'Etudes Nucléaires, BP6, 92265 Fontenay-Aux-Roses, France

La Formamidopyrimidine-ADN glycosylase (Fpg) est une enzyme bactérienne de réparation de l'ADN par excision de base. Ses activités sont conservées de la bactérie jusqu'à l'homme où son homologue fonctionnel est la protéine hOgg1. Fpg appartient à la famille des ADN glycosylase/AP lyase puisqu'elle reconnaît et excise la base endommagée par coupure du lien glycosidique entre la base et le sucre qui lui est associé. Elle excise ensuite le site abasique formé par un clivage en 3' et en 5' du désoxyribose selon une réaction de β,δ -élimination [1,2]. Ses cibles principales dans l'ADN sont les purines oxydées telles que les résidus FapydG et 8-oxodG [3]. Ces lésions résultent de l'action des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN. Elles sont produites de façon endogène par le métabolisme cellulaire ou résultent d'une exposition de la cellule à des agents chimiques ou physiques externes. Du fait du fort potentiel létal et mutagène de ces dérivés FapydG et 8-oxodG, les cellules ont développé pour survivre des systèmes enzymatiques de réparation de leur ADN.



Récemment, la structure cristallographique d'un complexe entre la protéine Fpg et un oligonucléotide contenant un résidu 8-oxodG a permis de mettre en évidence les éléments structuraux importants pour la reconnaissance spécifique de la base lésée [4]. Mais qu'en est-il des lésions FapydG ? Pour la première fois, un résidu FapydG a pu être incorporé dans un oligonucléotide synthétique grâce à une synthèse chimique originale [5]. Des cristaux d'un complexe entre la protéine Fpg et un oligonucléotide de 14 paires de bases contenant un résidu FapydG ont été obtenu au laboratoire et diffractent à 1,8Å de résolution. La structure du complexe a été résolue par remplacement moléculaire. Le modèle moléculaire obtenu montre clairement un mode de reconnaissance différent et spécifique entre les lésions FapydG et 8-oxodG et contribue de façon significative à une meilleure compréhension du mécanisme de discrimination des substrats développé par la protéine Fpg.

[1] Boiteux S., O'Connor T.R., Laval J. (1987) Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. *EMBO J.*, **6**, 3177-3183.

[2] O'Connor T.R., Laval J. (1989) Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/aprimidinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A.*, **86**, 5222-5226.

[3] Castaing B., Geiger A., Seliger H., Nehls P., Laval J., Zelwer, C., Boiteux, S. (1993) Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2899-2905.

[4] Fromme J.C., Verdine G.L. (2003) DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51543-51548.

[5] Ober M., Linne U., Gierlich J., Carell T. (2003) The two main DNA lesions 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine exhibit strongly different pairing properties. *Angew. Chem. Int Ed Engl.*, **42**, 4947-4951.

MISE EN EVIDENCE DU COUPLAGE ENTRE TRANSITION VITREUSE DU SOLVANT ET ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA PROTOCHLOROPHYLLIDE OXYDOREDUCTASE EN VUE DE PIEGER DES INTERMEDIAIRES REACTIONNELS DANS LE CRISTAL.

G. Durin^{ab}, A. Royant^{ab}, D. Heyes^c & D. Bourgeois^{ab}

^aLCCP, UMR 9015, IBS, 41 avenue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

^bESRF, 6 rue Jules Horowitz, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France

^cKrebs Institute and R Hill Institute for Photosynthesis, The University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK

La protochlorophyllide oxydoréductase (POR) catalyse la réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide en présence de NADPH, pénultième étape dans la synthèse de la chlorophylle. Cette enzyme présente la particularité d'être l'une des deux seules connues, avec l'ADN photolyase, à requérir de la lumière pour déclencher la catalyse. La réaction catalysée par la POR est très rapide, s'effectuant en quelques nanosecondes à température ambiante. Lors de la catalyse, des états intermédiaires se forment, dont les propriétés spectroscopiques remarquables (fluorescence et absorption) sont facilement utilisables pour caractériser l'avancement de la réaction [1], en particulier dans le cristal.

Notre objectif final consiste, après cristallisation de la protéine et résolution de sa structure, à piéger ces états intermédiaires dans le cristal de façon à reconstituer les changements conformationnels liés à l'acte catalytique. Pour cela, la réaction pourra être déclenchée dans le cristal par irradiation lumineuse à température cryogénique (100 K), et en augmentant progressivement la température, les différents intermédiaires devraient s'accumuler dans le cristal.

En attendant l'obtention de cristaux, nous avons travaillé en solution à caractériser la formation de ces états intermédiaires en fonction de la température et de la composition du solvant, en utilisant la technique « TDFM » (Temperature Derivative Fluorescence Microspectroscopy) [2]. Ces études ont permis d'établir de façon simple et élégante que la « transition vitreuse » du solvant (passage d'un état amorphe, très rigide, à un état relativement fluide), aux alentours de 180 K est l'élément déclenchant la formation d'un intermédiaire fluorescent à 684 nm. La production de cet intermédiaire résulte probablement d'un changement conformationnel de la POR requérant un degré de flexibilité qui n'est pas permis en dessous de la « transition dynamique » de la protéine (en dessous de laquelle seuls de petits mouvements harmoniques sont possibles). Cette étude démontre donc, dans le cas de la POR, la présence d'un couplage direct entre transition vitreuse du solvant et transition dynamique de la protéine, alors même que l'existence de tels couplages fait encore aujourd'hui l'objet de vifs débats.

[1] D.J. Heyes *et al* (2003) Protochlorophyllide Oxidoreductase: "Dark" reactions of a Light-Driven Enzyme, *Biochemistry*. 42, 523-528.

[2] M. Weik *et al* (2004) Temperature Derivative Fluorescence Spectroscopy as a Tool to Study Dynamical Changes in Protein Crystals *Biophysical J* in press

CARACTERISATION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE MODULAIRE HUMAINE KIN17, UNE PROTEINE IMPLIQUEE DANS LA REPONSE CELLULAIRE AUX DOMMAGES DE L'ADN

A. le Maire¹, J. Couprie¹, MH. Le Du¹, E. Stura¹, L. Miccoli², J. Angulo², S. Zinn-Justin¹

¹ *Laboratoire de Structure des Protéines, Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA SACLAY, 91190 Gif-sur-Yvette, France*

² *Laboratoire de Genetique de la Radiosensibilite, Departement de Radiobiologie et de Radiopathologie, CEA, BP 6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France*

La protéine kin17 humaine est une protéine nucléaire remarquablement conservée entre les espèces. Différentes observations suggèrent que kin17 est une protéine de la maintenance nucléaire impliquée dans la réplication et la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN mais son activité biochimique reste à caractériser. Une fraction de kin17 est associée à l'ADN chromosomique dans les cellules humaines, en particulier elle est liée à l'ADN courbe trouvé au niveau des sites de recombinaison illégitime (Mazin *et al.*, 1994) et une autre fraction de kin17 est associée à des structures nucléaires non-chromatiniennes pendant la phase S (Miccoli *et al.*, 2003). De plus, kin17 est régulée de façon positive après irradiation par des UV et des radiations ionisantes (Biard *et al.*, 1997) et la protéine est alors trouvée concentrée en de larges foyers associés à la protéine de réplication RPA. Elle est exprimée de façon ubiquitaire chez les mammifères et forme des foyers dans le noyau de cellules en prolifération.

L'utilisation de programmes de reconnaissance de domaines (SMART, PFAM) montre que la séquence de kin17 est segmentée en domaines : un doigt à zinc de type C₂H₂ en N-terminal pouvant être impliqué dans la liaison aux acides nucléiques ; un domaine central prédit comme un domaine FF, observé en particulier dans des protéines se liant à l'ARN polymérase II ; une région peu structurée ; puis un domaine TUDOR à motif KOW en C-terminal impliqué dans des interactions protéine-acides nucléiques et/ou protéine-protéine. La caractérisation structurale de kin17, par cristallographie aux rayons X et par RMN, est abordée domaine par domaine en raison de difficultés d'expression de la protéine entière. Des cristaux de la région C-terminale ont été obtenus en diffusion de vapeur et des données synchrotron (jeux natifs, jeux MAD et jeux SAD) ont été enregistrées sur la ligne FIP BM30A de l'ESRF à Grenoble. Les cristaux appartiennent au groupe d'espace P212121, les paramètres de maille sont a= 45,8 Å, b= 46,3 Å, c= 60,8 Å et la résolution est de 1.5 Å. La structure de ce domaine sera présentée. En parallèle, l'attribution du squelette de la protéine est réalisée par RMN afin de pouvoir cartographier l'interaction du domaine TUDOR avec ses partenaires biologiques. De plus, les premiers spectres RMN proton des deux autres domaines montrent que ceux-ci sont repliés et la détermination de leur structure est en cours.

Par ailleurs, des expériences de GST pull-down et d'études d'interaction avec les acides nucléiques sont en cours pour chacun de ces domaines et pour la protéine entière afin d'identifier les partenaires de kin17. Des premiers résultats suggèrent des interactions avec des protéines importantes dans la réplication de l'ADN. Ces travaux sont réalisés en collaboration avec le groupe de J. Angulo au CEA de Fontenay-aux-Roses.

Mazin A, Milot E, Devoret R, Chartrand P. KIN17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. *Mol Gen Genet.* 1994;244(4):435-8.

Miccoli L, Biard DS, Frouin I, Harper F, Maga G, Angulo JF. Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(14):4162-75.

Biard DS, Saintigny Y, Maratrat M, Paris F, Martin M, Angulo JF. Enhanced expression of the Kin17 protein immediately after low doses of ionizing radiation. *Radiat Res.* 1997;147(4):442-50.

ÉTUDES STRUCTURALES DE LA SPÉCIFICITÉ D'ESPÈCE D'UN INHIBITEUR DE PROTÉASE D'INSECTE

P. Leone¹, C. Kellenberger² et A. Roussel¹

¹ *Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR-6098, CNRS et Universités d'Aix-Marseille I et II, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20*

² *Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, UMR-145, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Case 906, 13009 Marseille*

La famille pacifastine est une nouvelle classe de petits inhibiteurs peptidiques de protéase à sérine qui a été mise en évidence particulièrement chez les arthropodes [1]. Elle comprend notamment HI, un peptide de 35 acides aminés isolé chez le criquet *Locusta migratoria* [2]. Sa structure, qui a été résolue par RMN, consiste en un feuillet β composé de 3 brins anti-parallèles et fortement stabilisé par 3 ponts disulphures [3]. HI présente une propriété inhabituelle: il possède une spécificité d'inhibition selon l'espèce. En effet, il inhibe fortement les trypsines digestives du criquet ($K_i \leq 5.10^{-11}$ M) alors qu'il a peu d'effet sur la trypsine bovine ($K_i \approx 4.10^{-8}$ M) et est inactif sur la trypsine porcine [3]. A partir des structures de complexes entre des peptides homologues et la chymotrypsine bovine [4] et des alignements des trypsines connues, nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène implique la boucle de l'enzyme contenant le résidu 173. La trypsine du champignon *Fusarium oxysporum* diffère des trypsines bovine et porcine dans cette région et pourrait donc interagir avec HI. Des tests d'activité ont confirmé cette hypothèse en montrant que HI est un fort inhibiteur de cette trypsine ($K_i \leq 2,6.10^{-11}$ M) [3].

Afin de mieux définir les mécanismes à l'origine de cette spécificité d'espèce, nous avons résolu la structure par rayons X du complexe HI / trypsine de *Fusarium oxysporum*. Le complexe cristallise dans le groupe d'espace $P3_12_1$ avec les paramètres de maille suivants $a=70.35$ Å, $b=70.35$ Å, $c=110.27$ Å, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ et diffracte jusqu'à une résolution de 1.8Å. Malgré un maillage méroédral parfait du cristal, la structure du complexe a été obtenue par remplacement moléculaire en utilisant comme modèle la structure de l'enzyme seule [5]. L'affinement a été mené jusqu'à un R_{fac} de 19.1% et un R_{free} de 23.9%.

[1]: Simonet G., Claeys I., V. Broeck J., (2002) Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **132**(1): 247-255.

[2]: Kellenberger C., Boudier C., Bermudez I., Bieth J. G., Luu B., Hietter H., (1995) Serine protease inhibition by insect peptide containing a cysteine-knot and a triple-stranded β -sheet, *J. Biol. Chem.* **270**: 25514-25519.

[3]: Kellenberger C., Ferrat G., Leone P., Darbon H., Roussel A., (2003) Selective inhibition of trypsins by insect peptides: role of P6-P10 loop, *Biochemistry.*, **42**(46):13605-12.

[4]: Roussel A., Mathieu M., Dobbs A., Luu B., Cambillau C., Kellenberger C., (2001) Complexation of two proteic insect inhibitors to the active site of chymotrypsin suggests decoupled roles for binding and selectivity, *J. Biol. Chem.* **276**: 38893-38898.

[5]: Rypniewski W.R., Hastrup S., Betzel C., Dauter M., Dauter Z., Papendorf G., Branner S., Wilson K.S., (1993) The sequence and X-ray structure of the trypsin from *Fusarium oxysporum*, *Protein Eng.* **6**:341-8.

**DOMAINE PIR DE GRB14 : NOUVEAU MEMBRE DE LA FAMILLE
DES « INTRINSICALLY UNSTRUCTURED PROTEINS ».
IMPLICATION DANS LA SIGNALISATION DE L'INSULINE.**

Moncoq Karine*, Broutin I*, Larue V*, Cailliau K‡, Browaeys-Poly E‡, Ducruix A*

* *Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques UMR 8015, 4 Avenue de L'Observatoire 75270 Paris Cedex 06.*

‡ *Université des Sciences et Technologies de Lille, Laboratoire de Biologie du Développement, UE 1033, Bâtiment SN3, Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

Une nouvelle famille d'adaptateurs moléculaires est actuellement en émergence : la famille Grb7, qui comprend les protéines Grb7, Grb10 et Grb14 et mises en évidence pour leur rôle dans les voies de signalisations de facteurs de croissance, initiées par des récepteurs à activité tyrosine kinase. Grb7 semble jouer un rôle dans le développement de certains cancers (cancers gastriques, du sein, de l'œsophage). La protéine Grb10 est associée au syndrome de Silver-Russel et semble également impliquée dans la transmission du signal mitogénique stimulé par certains facteurs de croissance. Quant à l'adaptateur Grb14, il a été identifié comme premier inhibiteur endogène spécifique de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline. Ces protéines sont caractérisées par la succession de domaines d'interaction protéine-protéine: une région N-terminale riche en proline, un domaine Ras-Associating like, un domaine PH central, un domaine SH2 C-terminal et un nouveau domaine d'interaction : PIR (Phosphorylated insulin receptor Interaction Region) localisé entre les domaines PH et SH2. Le domaine PIR est responsable de l'interaction et de l'action inhibitrice de Grb14 avec le récepteur de l'insuline. En revanche, le domaine SH2 semble jouer un rôle majeur dans l'interaction des protéines Grbs avec le récepteur de l'insuline. L'importance relative de ces deux domaines PIR et SH2 des protéines Grbs dans l'interaction avec leurs récepteurs semble être déterminante dans leur spécificité d'action.

Compte tenu de la spécificité du domaine PIR de Grb14 pour le récepteur de l'insuline, des études structurales ont été réalisées sur les protéines PIR et PIR-SH2. Ainsi, des expériences hétéronucléaires RMN menées sur ces protéines marquées en azote ¹⁵N, ont montré que le domaine PIR est un domaine non structuré en solution. Des expériences complémentaires : protéolyse ménagée, résistance à la chaleur, dichroïsme circulaire, diffusion des rayons X aux petits angles, ont confirmé la grande flexibilité, l'absence de structure secondaire et la faible compacité du domaine PIR. Néanmoins, des expériences in vivo montrent que la protéine recombinante PIR est fonctionnelle dans les ovocytes de Xénopes. L'ensemble de ces résultats montre que PIR Grb14 appartient à l'émergente et grandissante famille des « Intrinsically Unstructured Proteins » (IUPs). Les propriétés conformationnelles de PIR Grb14 ont permis de proposer un modèle d'interaction avec le récepteur de l'insuline ⁽¹⁾.

La suite de ces travaux permettront de concevoir de nouvelles molécules capables de bloquer la fonction des protéines Grb14 et Grb7 et agiront, soit sur l'état de résistance à l'insuline des patients obèses ou diabétiques (Grb14), soit sur la prolifération cellulaire incontrôlée (Grb14, Grb7).

⁽¹⁾ Moncoq, K., Broutin, I., Larue, V., Perdereau, D., Cailliau, K., Browaeys-Poly, E., Burnol, A-F., and Ducruix, A. (2003). The PIR domain of Grb14 is an intrinsically unstructured protein. Implication in insulin signalling. FEBS letters sous presse.

EFFETS DE VARIABLES PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LA QUALITE DE CRISTAUX D'ASPARTYL-ARNt SYNTHÉTASE

**A. Moreno¹; A. Théobald-Dietrich¹; B. Lorber¹; C. Sauter¹, R. Graff², D. Sauer²,
G. Ritzler³ and R. Giegé¹**

¹UPR 9002, IBMC du CNRS, 15, Rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France.

²Institut de Chimie, Université Louis Pasteur 67000 Strasbourg, France.

³Institut Le Bel, Université Louis Pasteur 67000 Strasbourg, France.

Actuellement, chaque jour de nombreuses protéines sont découvertes, isolées et cristallisées à l'aide de méthodes à haut débit. En revanche, peu d'entre elles sont étudiées de manière systématique pour comprendre comment des variables physiques ou chimiques influencent leur cristallisation.

Ici, nous rapportons des données nouvelles sur la cristallogénèse de l'aspartyl-ARNt synthétase (DRS-1) de l'eubacteria *Thermus thermophilus*. Cette protéine, un homodimère de M_r 130,000 qui possède une architecture en plusieurs domaines et est impliqué dans l'estérification spécifique du tRNA^{Asp} par l'acide aspartique pendant la première étape de la biosynthèse des protéine, est devenue un modèle pour des études de cristallogénèse. Deux formes cristallines peuvent être produites, soit en solution de sulfate d'ammonium [1] ou en solution de polyéthylène glycol gélifiée avec de l'agarose [2,3]. Alors que la forme orthorhombique a permis d'obtenir une structure à 2.0Å de résolution [4], celle qui est monoclinique ne diffracte qu'à la résolution de 2.65Å [2]. Les contacts intermoléculaires dans les deux empilements cristallins ont été examinés [2] et comparés à ceux dans les cristaux de mutants [5].

Dans cette étude, nous avons quantifié et comparé les effets de variables physiques (comme la température, la constante diélectrique, les champs électrique et magnétique, la convection et la diffusion, la force de Lorentz) et de variables chimiques (telles la nature et la concentration en agent cristallisant, ou encore le pH du milieu) sur la cristallisation de la DRS-1. Toutes les expériences ont été faites sur un même lot de protéine aussi bien en solution ou qu'en milieu gélifié. Des mesures de diffusion de lumière ont permis d'estimer l'énergie de Gibbs de formation des cristaux dans les deux systèmes cristallins. Les meilleurs cristaux ont été obtenus quand la convection était réduite. L'effet néfaste des impuretés macromoléculaires sur la cristallisation de DRS-1 a été démontré. Finalement, des cristaux ont été produits en solution ou en gel sous l'influence d'un champ magnétique ou d'un champ électrique. Ils ont été analysés et leur qualité a été comparée par diffraction des rayons X. Ces résultats vont être présentés et discutés.

[1] Ng *et al.*, *J. Crystal Growth* **168** (1996) 50;

[2] Charron *et al.*, *J. Crystal Growth* **232** (2001) 376;

[3] Zhu *et al.*, *Acta Cryst.* **D57** (2001) 552;

[4] Ng *et al.* *Acta Cryst.* **D58** (2002) 645;

[5] Charron *et al.*, *Acta Cryst.* **D58** (2002) 1729.

ETUDE DE L'EFFET DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE SUR LA CRISTALLOGENESE DES PROTEINES

A. Kadri ^{1,2}, B. Lorber ¹, C. Sauter¹, G. Jenner² and R. Giegé ¹

¹Laboratoire « Cristallogénèse et ingénierie des systèmes d'aminocyclation », UPR9002, IBMC du CNRS, 15, rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

²Laboratoire de Piézochimie Organique, UMR7123, Faculté de Chimie, 2 rue Blaise Pascal, Université Louis Pasteur, 67008 Strasbourg, France

La pression, paramètre physique comme la température, est de plus en plus utilisée en cristallogénèse, plus récemment dans le domaine des protéines. La présence du gel d'agarose dans le milieu est d'importance capitale pour la cristallisation. Dans ce travail, nous avons entrepris le couplage de la pression avec l'utilisation du gel d'agarose. Nous avons réussi à cristalliser deux nouvelles protéines sous pression hydrostatique. La thaumatine (jusqu'à 250 MPa) et le lysozyme de dinde ou TeL (jusqu'à 100 MPa). Le lysozyme de poule ou HeL (jusqu'à 75MPa) sert de modèle, mais sa cristallisation sous l'influence de ces deux paramètres est aussi une première. Dans un premier temps, nous avons abordé l'effet de la pression sur la cristallisation de ces trois protéines en présence du gel d'agarose et avons déterminé certains paramètres physico-chimiques du processus de cristallisation (nombre et taille des cristaux, solubilité, sursaturation et volume de cristallisation) [1].

L'analyse topographique et structurale (qualité cristalline et nombre de molécules d'eau liées à la couche d'hydratation) des cristaux des trois protéines obtenus sous pression montre que ce paramètre joue un rôle majeur en favorisant la croissance des cristaux de bonne qualité suite à la désorganisation et la dissociation des noyaux mal formés. La résolution structurale de la thaumatine à 150MPa permet de cerner la raison pour laquelle la pression diminue la solubilité par le biais du nombre de molécules d'eau sous pression (233 à 150 MPa contre 282 à 0,1 MPa) diminuant ainsi la solvatation [2].

Le couplage du pH avec la pression nous a permis de mieux comprendre ce processus via des diagrammes de phases tridimensionnels. Nous avons ainsi observé que, lorsque la pression augmente, le polymorphisme des cristaux de HeL se situe à des pH plus acides et permet aussi de montrer que la variation du volume de cristallisation dépend aussi du pH [3]. La pression affecte aussi la cinétique de nucléation et de croissance des cristaux des trois protéines en favorisant généralement leur nucléation et en défavorisant leur croissance et permet d'affirmer qu'une pression de 75 MPa affecte moins le processus de nucléation que le gel d'agarose [4]. Les paramètres thermodynamiques de cristallisation (enthalpie, entropie, énergie libre) montrent que chaque protéine se comporte différemment, en fonction du milieu de cristallisation et de l'effet de la température sur la solubilité. Enfin une corrélation a été trouvée entre les paramètres physico-chimiques, thermodynamiques et les caractéristiques cristallographiques.

[1] Kadri, A., Lorber, B., Jenner, G. & Giegé, R. (2002). Effects of pressure on the crystallization and the solubility of proteins in agarose gel. *J. Crystal Growth*, 245: 109-120.

[2] Charron, C., Robert, M. -C., Capelle, B., Kadri, A., Jenner, G., Giegé, R. & Lorber, B. (2002). X-ray diffraction properties of protein crystals prepared in agarose gel under hydrostatic pressure. *J. Crystal Growth*, 245, 321-33.

[3] Kadri, A., Jenner, G., Damak, M., Lorber, B. & Giegé, R. (2003). Crystallogenesis studies of proteins in agarose gel. Combined effect of high hydrostatic pressure and pH. *J. Crystal Growth*, 257: 390-02.

[4] Kadri, A., Damak, M., Jenner, G. Lorber, B. & Giegé, R. (2003). Investigating the nucleation of protein crystals with hydrostatic pressure. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 15: 8253-62.

STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE D'UNE THREONINE SYNTHASE DE PLANTE COMPLEXEE AVEC SON ACTIVATEUR ALLOSTERIQUE : LA S-ADENOSYLMETHIONINE

C. Mas¹, V. Biou², R. Dumas¹

¹ Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale DRDC/CEA-Grenoble 17 avenue des martyrs 38000 Grenoble, France,

² Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurale, CNRS, UPR 9063, Bat 34, avenue de la terrasse 91198 Gif sur Yvette Cedex, France.

La Thréonine Synthase (TS) est une enzyme dépendante du pyridoxal phosphate (PLP) qui catalyse chez les plantes et les microorganismes la synthèse de thréonine à partir de l'O-phosphohomosérine (OPH). Chez les plantes, la TS et la Cystathionine- γ -synthase, la première enzyme de la voie de synthèse de la méthionine, utilisent le même substrat, OPH. Au niveau de ce point de branchement, la TS est activée par la S-adénosylméthionine (SAM), un métabolite-clé produit à partir de la méthionine. Cette allostérie positive de la TS par la SAM est spécifique des plantes. Afin de déterminer les bases moléculaires de cette activation, des études biochimiques et cristallographiques ont été menées. La première structure de la TS d'*Arabidopsis thaliana* a été résolue dans notre groupe [1]. Dans cette structure, le PLP n'est pas fixé dans le site actif et la conformation locale ne permet pas la fixation du PLP dans la position observée pour les TS non allostériques comme celle de *Thermus thermophilus* [2]. En effet plusieurs acides aminés qui interagissent avec le cofacteur sont dans des orientations différentes par rapport à la TS de *Thermus thermophilus*. De plus, une boucle qui permet de stabiliser le PLP est désordonnée dans la structure de la TS de plante. Nous avons récemment obtenu des cristaux de TS en présence de l'activateur SAM, et du cofacteur PLP, à 2.8 Å de résolution. L'unité asymétrique contient un dimère asymétrique. Deux molécules de SAM sont fixées à l'interface du dimère et induisent des changements conformationnels et des stabilisations de boucles. Il est clair que la présence de l'activateur provoque des changements de conformation qui permettent l'orientation active du PLP. Cependant un seul site contient le PLP dans la même orientation que dans la TS de *Thermus thermophilus*, alors que l'autre site est vide. Ces premiers changements conformationnels montrent que le rôle de la SAM est de permettre la fixation du PLP conduisant à la reconnaissance du substrat dans un monomère. Des études biochimiques [3] ainsi que la structure cristallographique de la TS de *Thermus thermophilus* [2] en absence et en présence d'un analogue du substrat indique que la fixation du substrat pourrait induire d'autres changements de conformation et conduirait à la liaison du PLP dans le deuxième monomère. Ces résultats nous permettent de proposer un nouveau mécanisme pour l'activation de la TS de plantes par la SAM.

[1] Thomazeau, K., Curien, G., Dumas, R., and Biou, V. (2001) *Protein Science* 10, 638-648.

[2] Omi, R., Goto, M., Miyahara, I., Mizuguchi, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H., and Hirotsu, K. (2003) *J Biol Chem* 278, 46035-45.

[3] Curien, G., Job, D., Douce, R. and Dumas, R. (1998) *Biochemistry* 37,13212-13221

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DU REGULATEUR DE 'QUORUM SENSING' EXPR d'*ERWINIA CHRYSANTHEMI*

S. Castang¹, S. Reverchon-Pescheux¹, W. Nasser¹, B. Chantegrel³, C. Deshayes³, R. Dolmazon³, A. Doutheau³, P. Gouet².

¹Unité de Microbiologie et Génétique (UMG). UMR CNRS-INSA-UCB 5122. Bât. A. Lwoff. UCB. 69622 Villeurbanne.

²Laboratoire de BioCristallographie (LBC), IBCP-CNRS UMR 5086 UCBL, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

³Laboratoire de Chimie Organique (LCO). UMR CNRS-CPE-INSA-UCB 5622. Bât. J. Verne. INSA. 69621 Villeurbanne

Les bactéries pathogènes produisent des facteurs de virulence leur permettant de coloniser les tissus de l'hôte. Lors de l'infection, il est nécessaire pour ces bactéries d'assujettir la synthèse de leur(s) facteur(s) de virulence à leur densité cellulaire afin de déclencher l'agression au moment opportun. Ce contrôle, nommé quorum sensing, se fait chez les bactéries à Gram négatif *via* de petites molécules diffusibles de la famille des *N*-acylhomosérine lactones (HSLs). Lorsque la concentration en HSLs atteint un niveau seuil, elles interagissent avec une protéine régulatrice de la famille LuxR qui va activer l'expression de gènes cibles, notamment des gènes de virulence. De ce fait, les régulateurs de quorum sensing constituent des cibles de choix pour développer de nouveaux agents anti-bactériens.

Une seule structure tridimensionnelle de régulateur de type LuxR a été résolue. Celle de TraR d'*Agrobacterium tumefaciens* complexé à son ligand HSL et à l'ADN ([TraR-HSL]₂/ADN) (1). Cette structure donne des indications précises sur la structure du site de fixation du ligand mais ne permet pas de comprendre le mécanisme d'activation de ces régulateurs par les HSLs (la protéine TraR ne peut être purifiée et surproduite qu'en présence de son ligand). Afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction des régulateurs de type LuxR avec les HSLs et d'envisager la conception d'analogues capables d'inactiver les régulateurs de « quorum sensing », nous avons développé deux approches, l'une structurale l'autre fonctionnelle :

- L'étude structurale repose sur la cristallisation du domaine N-terminal de fixation à l'HSL d'un régulateur de la famille LuxR, ExpR d'*Erwinia chrysanthemi*, en présence ou en absence de l'HSL. La protéine ExpR a été retenue comme modèle en raison de sa relative solubilité et de sa capacité à contracter des interactions réversibles avec son ligand naturel.
- L'étude fonctionnelle est basée sur la recherche d'analogues structuraux des HSLs capables de bloquer le régulateur sous une forme inactive. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une nouvelle famille de composés antagonistes des HSLs, les *N*-sulfonylhomoserine lactones (2). Afin de tenter d'expliquer les propriétés antagonistes de ces composés nous avons modélisé le site actif de LuxR par analogie avec la structure cristalline de TraR.

(1) Zhang, R. G., Pappas, T., Brace, J. L., Miller, P. C., Oulmassov, T., Molyneaux, J. M., Anderson, J. C., Bashkin, J. K., Winans, S. C., and Joachimiak A. (2002). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA *Nature*. 417 :971-974.

(2) Castang, S., Chantegrel, B., Deshayes, C., Dolmazon, R., Gouet, P., Haser, R., Reverchon, S., Nasser, W., Cotte-Pattat, N., Doutheau, A. *N*-Sulfonyl-homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg Med Chem Lett, soumis*.

LES TENSIOACTIFS HEMIFLUORES, UN NOUVEL OUTIL POUR MANIPULER LES PROTEINES MEMBRANAIRES EN SOLUTION?

Florence Lebaupain¹, Blandine Olivier², Grégory Durand², Bernard Pucci², Jean-Luc Popot¹ et Cécile Breyton¹

¹ IBPC, Physico-chimie des membranes biologiques, 13, rue P. et M. Curie, 75005 Paris

² Laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels, Université d'Avignon, 33, rue L. Pasteur, 84000 Avignon

La manipulation des protéines membranaires en dehors de la membrane fait appel à l'utilisation de détergents. Souvent, ce changement d'environnement est fatal pour le complexe membranaire, et conduit à son inactivation, voire à sa dénaturation. C'est pour pallier ce problème qu'ont été dessinées de nouvelles molécules qui seraient moins dénaturantes, moins intrusives, tout en maintenant les protéines membranaires en solution : l'idée de base est l'introduction d'atomes de fluor dans la chaîne hydrophobe de tensioactifs de structure par ailleurs classique, ce qui diminue leur miscibilité avec les lipides et leur caractère dissociant. Afin de favoriser leur interaction avec la partie hydrophobe des protéines membranaires, l'extrémité de la chaîne carbonée est hydrogénée (Fig. 1). Ces molécules *hémifluorées* sont en cours d'optimisation, et nous utilisons comme modèles trois protéines représentantes de catégories de protéines membranaires différentes : le cytochrome *b₆ f*, une protéine constituée de plusieurs sous-unités et cofacteurs, ayant des domaines extramembranaires importants ; la bactériorhodopsine, associant une chaîne polypeptidique presque totalement enfouie dans la membrane et une molécule de rétinol. Ces deux protéines traversent la membrane en faisceau d'hélice alpha. La troisième protéine est le domaine transmembranaire de OmpA, formé d'un tonneau de 8 brins beta. Nous testons le maintien en solution des protéines dans ces nouveaux tensioactifs, leur monodispersité, état d'oligomérisation et stabilité dans le temps afin de les comparer aux conditions de manipulation en détergents classiques.

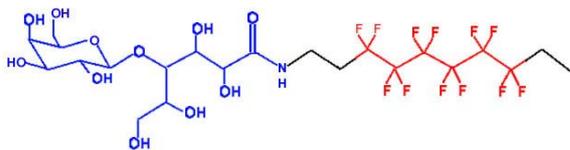


Figure 1 : Structure du Lactobionamide hémifluoré.
M = 713,5 g/mol, concentration micellaire critique
~ 1 mM.

ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA F₁F₀ ATP SYNTHASE DE LEVURE

M.F. Giraud, A. Dautant, D. Brèthes, J. Velours

Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, IBGC, UMR 5095, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 1, rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux cedex

La F₁F₀-ATP synthase mitochondriale utilise la différence de potentiel électrochimique généré au travers de la membrane interne par la chaîne respiratoire pour produire l'ATP à partir d'ADP et de Pi. L'enzyme de levure est un complexe de 600 kDa constitué de 14 sous-unités distinctes. Les sous-unités catalytiques ($\alpha\beta$)₃ sont solidaire d'un anneau membranaire de sous-unités 9 par l'intermédiaire d'une tige centrale (γ, δ, ϵ) et d'une tige périphérique (su6, su4, su8, i, d, f, h, OSCP).

La structure de la partie soluble de l'enzyme mitochondriale, chloroplastique et bactérienne est aujourd'hui bien documentée[1]. Mais la connaissance des composantes membranaires ou de la tige périphérique est limitée et fait appel à la RMN, à des techniques microscopiques (AFM, cryoTEM) ou des pontages chimiques[2]. Le modèle le plus complet dont nous disposons est celui d'un sous-complexe F₁c₁₀ construit dans des cartes de densité à 4 Å de résolution obtenues grâce à des cristaux d'ATP-synthase de levure de boulangerie[3].

Les données structurales et l'observation directe de la rotation de la sous-unité γ au sein des sous-unités catalytiques ($\alpha\beta$)₃ ont conduit à un modèle de mécanisme de moteur rotatif. La translocation des protons au travers de la membrane induirait la rotation de l'anneau de sous-unités 9 qui entraînerait la rotation de la sous-unité γ à l'intérieur du domaine ($\alpha\beta$)₃ libérant ainsi l'ATP. Notre but est donc d'obtenir un modèle de l'enzyme le plus complet possible et à une résolution suffisante pour visualiser les canaux à protons.

Les deux difficultés majeures limitant la détermination de structures de protéines membranaires sont la quantité disponible en protéine d'intérêt et la détermination de la nature et de la concentration du détergent nécessaire pour extraire, solubiliser et conserver l'intégrité et l'activité de l'enzyme. Ces étapes sont encore plus délicates lorsqu'il s'agit de complexes, comme c'est le cas de la F₁F₀ ATP synthase.

Afin de surmonter ces barrières, nous avons développé une stratégie de purification à partir d'une enzyme dont une des sous-unités membranaire a été génétiquement modifiée. Nous avons sélectionné, par électrophorèse en milieu non dénaturant (BN-PAGE), parmi une large gamme de composés tensio-actifs, le détergent le moins hétérogène et ne dissociant pas le complexe F₁F₀. Nous présentons ici l'état d'avancement de notre travail. Différents jeux de données ont été enregistrés à l'IPBS de Toulouse. La résolution maximale est de 7,2 Å. Le phasage des données est en cours par remplacement moléculaire. Les premières observations confirment que la dissociation de la tige périphérique a lieu au cours du processus de cristallisation même pour des concentrations très faibles en détergent.

[1] Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. (2000). The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 7, 1055-1061.

[2] Velours, J., Arselin G., The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. (2000) *J Bioenerg Biomembr.* 32(4):383-90

[3] Stock, D, Leslie, A.G., Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* 286, 1700-1705.

CRYSTAL STRUCTURE OF THE PYOVERDIN OUTER MEMBRANE RECEPTOR FPVA FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

Cobessi D., Célia H., Folschweiler N., Schalk I., Abdallah M. & Pattus F.

Département Récepteurs et Protéines Membranaires, UPR9050 CNRS, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Boulevard Sébastien Brant, 67410 Illkirch, France. Email: cobessi@esbs.u-strasbg.fr

When grown under iron-deficient conditions, many bacteria synthesize and release into the environment iron chelators termed siderophores. By solubilizing the ferric iron of insoluble complexes that form under aerobic conditions at physiological pH, siderophores make iron available for use by the cell. In the host it is expected that siderophores sequester iron from iron-containing molecules such as transferrin and lactoferrin, and subsequently deliver iron to the microbial cell. In general, the first step of entry of ferric siderophores into Gram negative bacteria is mediated by specific outer membrane receptors. Three X-ray structures of the outer membrane ferric siderophore receptors from *E. coli* have been reported. This transport into the periplasm requires the cytoplasmic proton motive force and an energy transduction complex which includes the cytoplasmic membrane proteins TonB, ExbB and ExbD [1]. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen which infects injured, immunodeficient, or otherwise compromised patients. Under iron-limited conditions, the bacterium secretes a major siderophore called pyoverdin (PaA). PaA seems to play an important role in infection by competing with transferrin for iron in order to overcome the iron-withholding mechanism present in mammals. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that pyoverdin mediated iron uptake through its outer membrane receptor FpvA occurs through a novel mechanism different from the uptake mediated by ferrichrome in *E. coli*. FpvA is able to bind both iron free PaA and ferric-PaA and the normal state of the FpvA receptor in the absence of iron seems to be the FpvA-PaA complex. During iron uptake, the extracellular ferric-PaA displaces the bound PaA on the FpvA receptor to form the FpvA-PaA-Fe complex which is then internalized [2]. The FpvA-PaA complex is non competent for translocation. We over-expressed and purified FpvA (MM: 86245) from *P. aeruginosa* in its siderophore-bound (FpvA-PaA) and in its ligand-free (FpvA) forms. We crystallized the different forms of the receptor in presence of detergents in several crystallization conditions. We are currently building a first atomic model of FpvA-PaA at 3.6 Å resolution from a dataset collected using crystals of a SeMet substituted FpvA-PaA. The current free-R and R factors are now below 30 %. Three molecules related by a non crystallographic 3-fold axis are in the asymmetric unit. The model was rebuilt in electron density maps calculated after the density modification. Data were also collected from FpvA crystals at 4.3 Å resolution. The FpvA-PaA model contains 687 residues and the pyoverdin. The structure can be divided in two domains. The N-terminal part of the structure called cork-domain contains 146 residues. It fills the second domain composed of 541 residues which is a β -barrel of 22 antiparallel transmembrane strands. The siderophore is bound on the extracellular side of the receptor where the loops connecting the α -strands are larger than the ones situated in the periplasm. The TonB-box which interacts with TonB is poorly defined in the electron density map while the "signal transduction" domain situated in the N-terminal part is not observed in the electron density suggesting disorder/flexibility. This structure is the first of an *in vivo* loaded siderophore receptor and also the first TonB-receptor structure from another bacterium than *E. coli*.

[1] Braun, V. and Braun, M. (2002). *FEBS Lett.*, **529**, 78-85.

[2] Schalk, I.J., Abdallah, M.A. and Pattus, F. (2002). *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 702-705.

STRUCTURE FONCTION DE MARQUEURS TUMORAUX PROTEIQUES.

Marie-Hélène Le Du

Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines (DIEP), CEA, C.E. Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Le processus de cancérisation est caractérisé par une dérégulation génétique qui induit l'expression de gènes normalement réprimés. Les protéines ainsi exprimées peuvent être impliquées dans la croissance ou la prolifération cellulaire, dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, dans les processus d'angiogénèses, ou tout processus permettant l'invasion tumorale. Lorsque l'expression d'une telle protéine coïncide systématiquement avec le développement d'un tissu tumoral donné, et que son taux d'expression est très différent de celui d'un individu sain, elle pourra être utilisée comme marqueur tumoral. La détection d'un marqueur s'effectue au niveau sanguin, ou dans des coupes histologiques, ce qui nécessite de disposer d'anticorps spécifiques, mais absolument pas de connaître la fonction de la protéine marqueur. En fait, la fonction des marqueurs tumoraux utilisés cliniquement reste généralement inconnue ou méconnue. L'étude structurale de ces marqueurs va apporter des informations qui vont intéresser le diagnostic proprement dit, en permettant une cartographie des épitopes à la surface de la protéine, ainsi qu'une localisation des régions correspondant aux isoformes de la protéine. D'autre part, lorsque les études structurales sont couplées à des études fonctionnelles, la structure permettra de mettre en évidence des régions impliquées dans la fonction de la protéine, et/ou dans l'interaction avec un partenaire fonctionnel. Ainsi, la connaissance de la fonction du marqueur de diagnostic permettra d'affiner le diagnostic mais aussi son exploitation potentielle comme cible thérapeutique. Les cas du PSA, de la PLAP, ou du CEACAM1, par exemple, illustrent bien l'apport des études structurales dans ce domaine.

References :

- M-H Le Du, T Stigbrand, MJ Taussig, A Ménez, and EA Stura. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**, 9158-9165.
E Mornet, EA Stura, T Stigbrand, A Ménez, and M-H Le Du *J. Biol. Chem.* (2001) **276**, 31171-31178.
M-H Le Du, and J.L. Millan *J. Biol. Chem* (2002) **277**, 49808-49814.
A. Kozlenkov, M-H Le Du, P. Cuniasse, T. Ny, M. F. Hoylaerts, and J.L. Millán. *J. Bone Miner. Res.* (2004) sous presse

LE CHAPERON MOLÉCULAIRE HSP90: STRUCTURE, FONCTION ET RÉGULATION PAR DES CO-CHAPERONS.

**P. Meyer^{1,4}, S. M. Roe¹, M.U.M. Ali¹, C.K. Vaughan¹, B. Hu², C. Liao²,
I. Vlastic², B. Panaretou², P.W. Piper³, C. Prodromou¹ & L.H. Pearl¹**

¹ Section of Structural Biology, Chester Beatty Laboratories, Institute of Cancer Research, Fulham Road, London, United Kingdom, ² Division of Life Sciences, King's College, London, United Kingdom, ³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London, United Kingdom, ⁴ Adresse actuelle: Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurales, CNRS UPR 9063, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Le chaperon moléculaire Hsp90 est responsable de la maintenance et de l'activation d'un ensemble de protéines métastables appelées protéines clientes d'Hsp90. Parmi ces protéines clientes, on retrouve une majorité de protéines de la signalisation et de la régulation cellulaire impliquées dans les processus de l'oncogenèse (facteurs de transcription, protéine kinases). L'inhibition d'Hsp90 entraîne l'inactivation de ces protéines, le chaperon moléculaire est donc devenu une cible pour les thérapies contre le cancer.

L'activation des protéines clientes est un phénomène ATP-dépendant dans lequel la fixation du nucléotide et son hydrolyse sont couplées aux changements conformationnels d'Hsp90 qui se comporte comme une pince moléculaire. Nous avons déterminé la structure de la région centrale du chaperon Hsp90 et identifié les résidus catalytiques du site ATPase ainsi que les résidus du site de reconnaissance des protéines clientes. Cette structure nous a permis de construire un modèle de la pince moléculaire Hsp90 dans son état fermé [1].

Le cycle ATPase d'Hsp90 est régulé par un ensemble de protéines partenaires appelées co-chaperons. Nous avons isolé le co-chaperon Aha1 qui stimule l'activité ATPase d'Hsp90 [2] puis montré que p50^{cdc37}, un autre co-chaperon responsable du recrutement spécifique des protéine kinases clientes vers Hsp90, inhibe au contraire l'activité ATPase du chaperon [3].

La structure d'un complexe entre Hsp90 et Aha1 nous a permis de mettre en évidence un interrupteur conformationnel contrôlé par la fixation du co-chaperon et responsable de la stimulation de l'activité ATPase [4]. La structure d'un complexe entre p50^{cdc37} et Hsp90 a permis d'expliquer comment ce co-chaperon est capable d'inhiber Hsp90 lors du chargement des protéine kinases clientes et nous avons proposé un modèle de la pince moléculaire Hsp90 maintenue ouverte par le co-chaperon p50^{cdc37} [5].

[1] Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W. & Pearl, L.H. (2003) Crystal structure and functional analysis of the middle segment of Hsp90: Implications for ATP hydrolysis and client protein and co-chaperone interactions. *Mol. Cell.*, **11**, 647-658.

[2] Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J.K., Singh, S., Millson, S.H., Clarke, P.A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Cramer, R., Mollapour, M., Workman, P., Piper, P.W., Pearl, L.H. & Prodromou, C. (2002) Activation of the ATPase activity of Hsp90 by Aha1, a novel stress-regulated co-chaperone. *Mol. Cell.*, **10**, 1307-1318.

[3] Siligardi G, Panaretou B, Meyer, P, Singh, S., Woolfson, D.N., Piper, P.W., Pearl, L.H. & Prodromou, C. (2002) Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J. Biol. Chem.*, **277**, 20151-20159.

[4] Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., Hu, B., Roe, S.M., Vaughan, C. K., Vlastic, I., Panaretou, B., Piper, P.W. & Pearl, L.H. (2004) Structural basis for the recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J.*, **23**, 511-519.

[5] Roe, S. M. , Ali, M. U. M., Meyer, P., Vaughan, C. K., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., & Pearl, L.H. (2004) The mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific co-chaperone p50^{cdc37}. *Cell*, **116**, 87-98.

REGULATION DE LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES: STRUCTURE D'UN COMPLEXE TUBULINE- COLCHICINE:DOMAINE STATHMINE.

R. Ravelli¹, B. Gigant², P. Curmi³, S. Lachkar³, I. Jourdain³, A. Sobel³, M. Knossow²

¹ *European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, BP 181, 38042 Grenoble Cedex 9, France.*

² *Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, UPR 9063, Centre National de la Recherche Scientifique, Bâtiment 34, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.*

³ *U440 INSERM/UPMC, Institut du Fer à Moulin, 17 rue du Fer à Moulin 75005 Paris, France.*

Les microtubules (MT) sont des constituants dynamiques essentiels du cytosquelette impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la division cellulaire, le trafic intracellulaire ou la croissance des neurones. Ce sont des cylindres creux formés de polymères linéaires de tubuline, une protéine cellulaire abondante. La dynamique d'assemblage et de désassemblage de la tubuline en MT est contrôlée par diverses protéines, comme par exemple celles de la famille de la stathmine ; ces dernières sont impliquées dans l'intégration et le relai de voies de signalisation intracellulaire. La dynamique des MT peut être également contrôlée par des composés pharmacologiques issus de composés naturels, tels certains médicaments anti-cancéreux. La colchicine est un exemple de composé pharmacologique qui en se liant à la tubuline, empêche sa polymérisation en MT. Le mécanisme de cette inhibition était jusqu'ici incompris.

Nous avons déterminé la structure cristalline d'un complexe tripartite composé de deux molécules de tubuline liée à la colchicine, et d'une protéine de type stathmine [1]. L'élucidation de cette structure permet de mieux comprendre le mode d'action de ces trois composantes dans le contrôle de l'assemblage/désassemblage des MT. Elle permet notamment de décrire les changements de conformation de la tubuline au sein du polymère et en solution, ce qui rend compte de l'étape de dépolymérisation rapide caractéristique de la dynamique des MT. Elle approfondit également notre compréhension du mécanisme d'action des protéines à domaine stathmine: au sein du complexe avec deux molécules de tubuline, le domaine stathmine a une structure très allongée, avec la partie N-terminale qui coiffe l'une des deux tubulines et la partie C-terminale qui les maintient dans une conformation courbe, les empêchant ainsi de polymériser en MT. L'analyse cristallographique a également permis de localiser le site de liaison de la colchicine. La colchicine inhibe l'assemblage des MT en bloquant la tubuline dans une conformation courbe, via un mécanisme moléculaire différent de celui de la stathmine.

[1] Ravelli et al. (2004). *Nature* **428**,198-202.

ETUDE STRUCTURALE DE TRANSPORTEURS HOMOLOGUES A LA GLYCOPROTEINE-P, RESPONSABLE D'UNE RESISTANCE CELLULAIRE A LA CHIMIOETHERAPIE

Stéphanie Ravaud¹, Marie Jidenko², Christine Ebel³, Marc le Maire², Hélène Cortay⁵, Jean-Michel Jault⁴, Attilio Di-Pietro⁵, Richard Haser¹ et Nushin Aghajari¹

¹Laboratoire de BioCristallographie & ⁵Laboratoire de Protéines de résistance aux agents chimiothérapeutiques, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086, CNRS-Université Claude Bernard Lyon 1, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon, Cedex 07,

²DBJC/SBFM, URA CNRS 2096 et LRA17V, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex

³Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 38 027 Grenoble Cedex 1

⁴LBMC, UMR 5090 CEA-CNRS-UJF, CEA 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9.

Environ la moitié des cancers s'avère résister aux traitements mis en oeuvre actuellement en chimiothérapie. Contrer la résistance à la chimiothérapie est un enjeu majeur de la cancérologie. Les cellules résistantes ont acquis des capacités de survie exceptionnelles leur permettant de continuer de proliférer en présence d'agents cytotoxiques comme les antimétabolites utilisés dans le traitement des cancers. L'un des projets du laboratoire s'inscrit dans l'élucidation des mécanismes moléculaires mis en oeuvre dans ce phénomène de résistance. Il porte en effet sur l'étude structurale de deux protéines appartenant à la superfamille des transporteurs membranaires de type ABC « ATP-binding cassette », impliquées dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie et qui jouent un rôle central dans l'acquisition du phénotype MDR (« Multi Drug Resistance ») [1, 2].

Ainsi, nous avons engagé l'étude par cristallographie aux rayons X du demi-transporteur BmrA de *Bacillus subtilis*, homologue bactérien de la glycoprotéine-P [3, 4] et du domaine cytoplasmique NBD1 (N-terminal) du transporteur humain, MRP1 [5].

Dans ce cadre, nous cherchons à mettre au point un protocole de purification adapté aux exigences de cette méthode expérimentale. Nous avons pour cela identifié les différents facteurs critiques pour la formation de cristaux 3D.

Parmi ceux-ci nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'homogénéité et à la dispersité de la protéine. Ces paramètres ont été caractérisés par gel natif, chromatographie d'exclusion et ultracentrifugation analytique.

Les analyses préliminaires montrent notamment que la protéine BmrA purifiée et solubilisée en *n*-dodecyl- β -D-maltoside est globalement homogène et monodisperse, sous forme dimérique, comme c'est le cas au sein des membranes.

Ces premiers résultats encourageants doivent être confirmés par des mesures supplémentaires, notamment en fonction de la concentration en protéine, de la nature et de la concentration du détergent.

[1] Gottesman, M.M., Hrycyna, C.A., Schoenlein, P.V., Germann, U.A. & Pastan, I., *Annu. Rev. Genet.* **29** (1995) 607-649.

[2] Cole, S. P. C., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V. & Deeley, R. G., *Science* **258** (1992) 1650-1654.

[3] Steinfels, E., Orelle, C., Dalmas, O., Penin, F., Miroux, B., Di Pietro, A., Jault, J; M., *Biochim. Biophys. Acta* **1565** (2002) 1-5.

[4] Chami, M., Steinfels, E., Orelle, C., Jault, J.M., Di Pietro, A., Rigaud, J.L. & Marco, S., *J. Mol. Biol.* **315** (2002) 1075- 1085.

[5] Trompier, D., Baubichon-Cortay H., Chang, X. B., Maitrejean M., Barron, D., Riordon, J. R., Di Pietro A., *Cell. Mol. Life Sci.* **60** (2003) 2164-2177.

ETUDE STRUCTURALE DE LA NUCLEOLINE

C. Crézé¹, B. Rinaldi², P. Gouet¹, P. Bouvet² et R. Haser¹

¹ *Laboratoire de BioCristallographie, IBCP UMR 5086 CNRS UCBL, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France*

² *Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Ecole Normale Supérieure de Lyon, UMR 5161, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France*

La nucléoline, protéine majeure du nucléole, est fortement exprimée dans les lignées de cellules dérivées de tumeurs cancéreuses. Elle est souvent utilisée comme marqueur de la prolifération cellulaire. La nucléoline est une protéine clef de la biogenèse des ribosomes, impliquée à la fois dans la régulation de la transcription des gènes ribosomiques et dans l'assemblage co-transcriptionnel des pré-ribosomes.

La nucléoline compte 706 résidus chez l'Homme, répartis en 3 domaines principaux : (1) un domaine N-terminal, très acide, (2) un domaine central composé de 4 sous-domaines homologues requis pour une interaction avec une séquence simple brin de l'ARN pré-ribosomique et (3) un domaine C-terminal interagissant également avec des acides nucléiques. La structure de deux sous-domaines centraux en interaction avec un segment d'ARN a été résolue par RMN ^[2,3].

Le Laboratoire de BioCristallographie et le Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule ont établi une collaboration afin de surproduire et de cristalliser le domaine central seul ou en complexe avec un fragment nucléotidique.

Une interaction entre la nucléoline et des séquences d'ADN riches en Guanines a été mise en évidence récemment ^[4]. Ces séquences ont la propriété de se structurer en « G-quartet », qui pourrait aider à la stabilisation du repliement de la protéine. Différents oligomères d'ADN ont été choisis et testés selon leur capacité de se structurer et d'interagir avec la protéine. Les essais de cristallisation des complexes entre le domaine central de la nucléoline et les G-quartets sont en cours.

[1] Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. (1999) Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci.* **112**, 761-72

[2] Allain F.H., Gilbert D.E., Bouvet P., Feigon J. (2000) Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *J Mol Biol.* **303**, 227-41.

[3] Johansson C., Finger L.D., Trantire L., Mueller T.D., Kim S., Laird-Offringa I.A., Feigon J. (2004) Solution structure of the complex formed by the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and a pre-rRNA target. *J Mol Biol.* **337**, 799-816.

[4] Hanakahi L.A., Sun H., Maizels N. (1999) High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J Biol Chem.* **274**, 15908-12

FIP : L'AUTOMATISATION AU SERVICE DES UTILISATEURS

L. Jacquamet, J. Ohana, Jacques Joly, M. Pirocchi, P. Charrault, A. Bertoni, P. Carpentier, R. Kahn, F. Borel, S. Fieulaine, J. Dupuy, L. Serre, P. Israel-Gouy, J.-L. Ferrer

Institut de Biologie Structurale J-P Ebel, CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France

FIP (ligne Française pour l'Investigation des Protéines) est une ligne de lumière située à l'ESRF et destinée à la cristallographie des protéines par rayons X. Sa spécificité réside dans l'utilisation du signal anomal pour la résolution de la structure tridimensionnelle des protéines.

Dès sa construction, FIP a été pensée pour pouvoir être automatisée au maximum. L'automatisation présente en effet un triple but : d'une part elle permet d'assurer une fiabilité accrue de la ligne, ensuite elle permet d'en augmenter le rendement et enfin elle permet de faciliter l'accès aux utilisateurs. De ce fait, les différentes étapes pour mener à bien une expérience de cristallographie ont été successivement automatisées.

En premier lieu, le réglage de l'énergie du faisceau de rayons X et l'optimisation de son intensité ont été complètement automatisés [1].

Le montage du cristal est également automatique puisqu'il est assuré par un système robotisé CATS (Cryogenic Automated Transfer System) [2].

L'enregistrement des données et leurs analyses ont également été automatisés avec le programme ADP (Automated Data Processing) [3].

L'équipe FIP a poussé encore plus loin l'automatisation puisque le robot du système CATS peut remplacer le diffractomètre [4]. Les lignes de lumière de cristallographie pourraient donc ressembler à l'avenir à un système complètement intégré où le robot, non seulement placerait les cristaux dans le faisceau de rayons X, mais assurerait aussi leur rotation.

Ce robot offre également la possibilité d'analyser directement le contenu des gouttes de cristallisation à l'intérieur des boîtes de cristallogénèse de type « Greiner » [5]. Il permet ainsi d'analyser, sans endommager le contenu des boîtes, la nature des gouttes, et donc de discriminer entre les cristaux de protéine et de sel. Dans certains cas, le robot peut même réaliser sur les boîtes de cristallisation, des enregistrements complets conduisant à la structure cristallographique.

Dernière étape dans l'automatisation, le pilotage de FIP hors de l'ESRF *via* une liaison internet haut débit. Ce pilotage à distance nécessite une fiabilité accrue de chacune des composantes de la ligne.

L'automatisation poussée de FIP est ainsi aux services des utilisateurs et sera illustrée ici à travers le pilotage de FIP depuis le GTBIO.

[1] Roth M. *et al.* (2002). *Acta Cryst.* , 805-814.

[2] J. Ohana *et al.* (2004). *J. Appl. Cryst.* 37, 72-77.

[3] Ferrer J. L. (2001). *Acta Cryst.* , 1752-1753.

[4] L. Jacquamet *et al.* (2004). *Acta Cryst.* D60, 888-894.

[5] L. Jacquamet *et al.* (2004). *Structure*, in press.

FUNCTIONAL INSIGHTS FROM STRUCTURAL GENOMICS

N. Leulliot, S. Quevillon-Cheruel, M. Graille , L. Trésaugues, D. Liger, A. Poupon, J. Janin* and H. van Tilbeurgh

IBBMC , Université de Paris-Sud, bat 430, 91405-Orsay, France

**LEBS-CNRS, 91198-Gif-sur-Yvette, France*

The Yeast structural genomics project aims at the systematic expression, purification and structure determination of yeast proteins of unknown structure. Yeast was chosen because it is a eukaryotic organism that contains many of the crucial eukaryotic cellular functions. The considerable amount of systematic post genomic studies on this organism offer the possibility to analyse structural information against a wide functional background. The yeast genome offers the advantage of compactness (few genes contain introns). We have chosen 250 targets smaller than 500 amino acids, excluding membrane and coiled coil proteins, and more than 15 structures have been solved.

We will present briefly our strategy for the systematic cloning, expression, purification and crystallisation. The main objective of the pilot project was to either discover new folds or to expand sequence space covered by certain folds. Inevitably, many structures that were solved raised the question about their function: can we make reasonable predictions about function from protein structure alone ? A survey of the functional characterisation of some of our structures, based on structure alone or proved by biochemical experiments, will be presented.

South Paris Yeast structural genomics consortium web site:

<http://genomics.eu.org/>

CASPR: A WEB-SERVER FOR AUTOMATED MOLECULAR REPLACEMENT USING HOMOLOGY MODELLING

J-B. Claude, K. Suhre, C. Notredame, J-M. Claverie, C. Abergel

¹ *Information Génomique & Structurale, IGS UPR 2589 CNRS IBSM, 31, chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France*

Molecular replacement (MR) is the method of choice for X-ray crystallography structure determination when structural homologues are available in the Protein Data Bank [1].

Although the success rate of MR decrease sharply when the sequence similarity between template and target proteins drops below 35% identical residues, it has been found that screening for MR solutions with a large number of different homology models may still produce a suitable solution where the original template failed [2].

We want to report on a new web-tool named CaspR, implementing such a strategy in an automated manner. On input of experimental diffraction data, of the corresponding target sequence, and of one or several potential templates, CaspR executes an optimized molecular replacement procedure using a combination of well-established stand-alone software tools. The protocol of model building and screening begins with the generation of multiple structure-sequence alignments produced with T-Coffee [3], followed by homology model building using MODELLER [4], molecular replacement with AMoRe [5], and model refinement based on CNS [6].

As a result, CaspR provides a progress report in form of hierarchically organized summary sheets that describe the different stages of the computation with an increasing level of detail. For the ten highest scoring potential solutions pre-refined structures are made available for download in PDB format. Results already obtained with CaspR and reported on the web-server suggest that such a strategy may significantly increases the fraction of protein structures which may be solved by MR. Moreover, even in situations where standard MR yields a solution, pre-refined homology models produced by CaspR significantly reduce the time consuming refinement process. We expect this automated procedure to have a significant impact on the throughput of large-scale structural genomics projects.

[1] Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N. & Bourne P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242.

[2] Jones D.T. (2001) Evaluating the potential of using fold-recognition models for molecular replacement. *Acta Cryst.*, **D57**, 1428-1434.

[3] Notredame, C., Higgins, D. & Heringa, J. (2000), T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217.

[4] Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815.

[5] Navaza, J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Cryst.* **D57**, 1367-1372.

[6] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S. & Kuszewski, J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination , *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.

BIOXHIT

(Biocrystallography (X) on a Highly Integrated Technology Platform for European Structural Genomics): Contribution of the EMBL Hamburg outstation

B. Kauffmann¹, A. Schmidt¹ and M.S. Weiss¹

¹ EMBL Hamburg outstation, Notkestrasse 85 22603 Hamburg, Germany.

BIOXHIT is an integrated project funded for four years started in January 2004 within the 6th Framework Programme of the European Commission. **BIOXHIT** will coordinate scientists at all European synchrotrons and leading software developers in a timely and unprecedented joint effort to develop, assemble and provide a highly effective technology platform for Structural Genomics.

BIOXHIT aims to consolidate the process of bio-macromolecular structure determination from bottom up. Research will be undertaken to develop new approaches in crystallisation, to completely automate the diffraction data collection process all the way towards the automated determination of the structure. All of this will be unified and embraced by an efficient bioinformatics structure.

Some preliminary results from the EMBL Hamburg outstation will be presented concerning different aspect of the project.

BIOXHIT : <http://www.embl-hamburg.de/BIOXHIT/>

STRUCTURE DE LA SUPEROXYDE REDUCTASE LIEE AU FERROCYANURE ET EXPANSION DU SITE ACTIF INDUITE PAR PHOTO-REDUCTION.

V. Adam^{1,2}, A. Royant¹, V. Nivière³, F.P. Molina-Heredia³, D. Bourgeois^{1,2}

¹LCCP, UMR 9015, IBS-CEA/CNRS/UJF, 41 avenue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, Cedex 1, France

²ESRF, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France

³CBCRB, UMR 5047, DRDC-CEA/CNRS/UJF, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble, Cedex 9, France

Certaines bactéries sulfatoréductrices et microaérophiles utilisent l'enzyme superoxyde réductase (SOR) pour éliminer l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) [1, 2]. La SOR catalyse la réduction à un électron du $O_2^{\bullet-}$ en peroxyde d'hydrogène, avec un centre à fer ferreux non hémique [3, 4]. Les structures de la SOR de *Desulfoarculus baarsii* (mutant E47A) seule et en complexe avec le ferrocyanure ont été résolues à 1.15 et 1.7 Å de résolution, respectivement. Cette dernière structure, la première jamais rapportée d'un complexe entre un composé organométallique et une protéine révèle que le ferrocyanure bouche entièrement le site actif, en se coordonnant au fer actif via un pont cyanure [5]. Étonnamment, les données biochimiques ne montrent qu'une réduction modeste de l'activité SOR quand le ferrocyanure est ajouté, suggérant que le complexe reste capable de réagir avec $O_2^{\bullet-}$ en adoptant un mécanisme de réduction alternatif. Les différences structurales subtiles entre les espèces SOR-ferrocyanure à valence mixte et totalement réduite ont été étudiées en tirant profit des photoélectrons induits par les rayons X. La photo-réduction du site actif de la SOR a été suivie en temps réel par microspectrophotométrie d'absorption en ligne, et s'est avérée être un processus très rapide sous un faisceau synchrotron puissant.

L'analyse de jeux de données composites [6] a montré que la photo-réduction du centre à fer de Fe(III) à Fe(II) induit une expansion significative du site actif de la SOR.

[1] Jenney F.E. Jr., Verhagen, M.F. Cui X., Adams M.W. (1999). Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science*, **286**, 306-309.

[2] Lombard M., Fontecave M., Touati D., Nivière V. (2000). Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *J Biol Chem*, **275**, 115-121.

[3] Yeh A.P., Hu Y., Jenney F.E. Jr., Adams M.W., Rees D.C. (2000). Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. *Biochemistry*, **39**, 2499-2508.

[4] Coelho A.V., Matias P., Fülöp V., Thompson A., Gonzalez A., Carrondo M.A. (1997). Desulfoferrodoxin structure determined by MAD phasing and refinement to 1.9 Å resolution reveals a unique combination of a tetrahedral FeS₄ centre with a square pyramidal FeSN₄ centre. *JBIC*, **2**, 680-689.

[5] Auchere F., Raleiras P., Benson L., Venyaminov S.Y., Tavares P., Moura J.J., Moura I., Rusnak F. (2003). Formation of a stable cyano-bridged dinuclear iron cluster following oxidation of the superoxide reductases from *Treponema pallidum* and *Desulfotributium vulgare* with K(3)Fe(CN)₆. *Inorg Chem*, **42**, 938-940.

[6] Berglund G.L., Carlsson G.H., Smith A.T., Szoke H., Henriksen A., Hajdu J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, **417**, 463-468.

STRUCTURAL INHIBITION OF THE COLICIN D TRNASE BY THE TRNA-MIMICKING IMMUNITY PROTEIN

M. Graille¹, L. Mora², RH. Buckingham², H. van Tilbeurgh^{1,3} and M. de Zamaroczy²

1 LEBS, CNRS, UPR 9063, Bât. 34, 1 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France

2 IBPC, CNRS, UPR 9073, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

3 IBPMC, CNRS, UMR8619, Université Paris 11, Bât. 430, 91405 Orsay, France

The plasmid-encoded antibacterial toxins called colicins are present in many natural strains of *E. coli* and secreted under a variety of environmental stress conditions, into the extracellular medium in order to kill other *E. coli* competing bacteria. Most colicins display a similar tripartite architecture of functional domains [1], each of which is related to a specific step of penetration or killing activity. The central R region is necessary for interacting with the cell surface receptor, whereas the subsequent penetration of the outer cell membrane requires the N-terminal T (translocation) domain. The cytotoxic activity is associated with the 10-15 kDa C-terminal part of the colicin molecule. Colicin D is a 75 kDa protein whose cytotoxic domain specifically cleaves the anticodon loop of all 4 tRNA^{Arg} isoacceptors, thereby inactivating protein synthesis and leading to cell death [2,3].

Using SAD method, we have solved the 2.0 Å resolution crystal structure of the complex between the toxic domain and its immunity protein ImmD [4]. Neither component shows structural homology to known RNases or their inhibitors. In contrast to other well characterised colicin nuclease-Imm complexes, the colicin D active site pocket is completely blocked by ImmD, which by bringing a negatively charged cluster in opposition to a positively charged cluster on the surface of colicin D, appears to mimic the tRNA substrate backbone. Site directed mutations affecting either the catalytic domain or the ImmD protein have led to the identification of the residues vital for catalytic activity and for the tight colicin D / ImmD interaction that inhibits colicin D toxicity and tRNase catalytic activity.

[1] Lazdunski CJ., Bouveret E., Rigal A., Journet L., Lloubes R., Benedetti H. (1998) Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*, **180**, 4993-5002.

[2] Tomita K., Ogawa T., Uozumi T., Watanabe K., Masaki H. (2000) A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8278-8283.

[3] de Zamaroczy M., Mora L., Lecuyer A., Geli V., Buckingham RH. (2001) Cleavage of colicin D is necessary for cell killing and requires the inner membrane peptidase LepB. *Mol Cell*, **8**, 159-168.

[4] Graille M., Mora L., Buckingham RH., van Tilbeurgh H., de Zamaroczy M. (2004) Structural inhibition of the colicin D tRNase by the tRNA-mimicking immunity protein. *Embo J*, **in press**.

CRYSTAL STRUCTURES OF A WILD-TYPE CRE RECOMBINASE- LOX P SYNAPTIC COMPLEX

E. Ennifar^{1,2}, J. Meyer¹, F. Buchholz¹, F. Stewart¹ and D. Suck¹

¹ EMBL, Meyehofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (Germany)

² UPR 9002 CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg (France)

Cre recombinase catalyses the site-specific recombination of DNA containing loxP sites made up of an 8-base pair spacer and two 13-base pair inverted repeats. Cre requires no accessory proteins and mediates all steps in site-specific recombination from synapse formation, DNA cleavage, strand exchange, religation, to Holliday junction isomerization and resolution. We have determined the crystal structure of a wild-type Cre recombinase-loxP synaptic complex. In contrast to previously determined structures [1-4], it contains a full tetrameric complex in the asymmetric unit, showing that the antiparallel arrangement of the loxP sites is an intrinsic property of the Cre-loxP recombination synapse. The conformation of the spacer is different to that seen in complexes containing loxA and loxS sites (symetrized versions of the loxP site). A kink next to the scissile phosphate in the top strand leads to unstacking of the TpG step and a widening of the minor groove. Since this side of the spacer is interacting with a cleavage-competent Cre subunit, our structure suggests that the first cleavage occurs at the ApT steps in the top strands at the left hand side of the spacer, and furthermore that the Cre-induced kink next to the scissile phosphodiester activates the DNA for cleavage at this position and facilitates strand transfer. Furthermore, we were also able to solve the structure of a 3'-phosphotyrosyl covalent intermediate resulting from the first DNA strand cleavage. The cleavage, as well as the covalent bond between a tyrosine and the scissile phosphate confirms that the top strand is cleaved first.

[1] Guo, F., D.N. Gopaul, and G.D. van Duyne, *Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse*. Nature, 1997. **389**(6646): p. 40-6.

[2] Gopaul, D.N., F. Guo, and G.D. Van Duyne, *Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination*. EMBO J, 1998. **17**(14): p. 4175-87.

[3] Guo, F., D.N. Gopaul, and G.D. Van Duyne, *Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7143-8.

[4] Martin, S.S., et al., *The order of strand exchanges in Cre-LoxP recombination and its basis suggested by the crystal structure of a Cre-LoxP Holliday junction complex*. J Mol Biol, 2002. **319**(1): p. 107-27.

STRUCTURES DE PAB0955, UNE GTPASE D'ARCHAE CONSERVEE CHEZ LES EUCARYOTES ET DONT LE ROLE BIOLOGIQUE EST INCONNU.

S. Gras¹, P. Carpentier¹, B. Fernandez², J. Armengaud², P. Forterre³, D. Housset¹

¹ Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, LCCP, CEA-CRNS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble cedex 1

² Service de Biochimie et Toxicologie Nucléaire, CEA-ValRho Marcoule, BP17171, F-30207 Bagnols sur Cèze cedex.

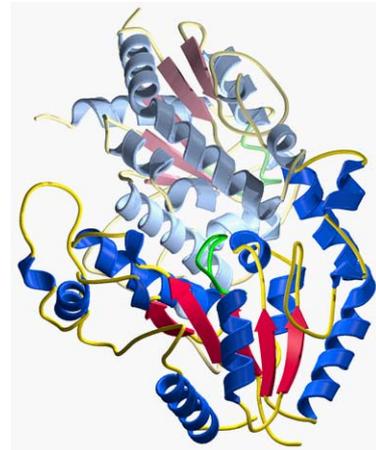
³ Institut de Génétique et Microbiologie (IGM), Bat 409, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, F-91405 Orsay Cedex

Le séquençage des génomes et la génomique comparative ont permis de mettre en évidence une catégorie particulièrement intéressante de protéines d'*archaea* conservées chez les eucaryotes : les PACE dont la fonction est actuellement inconnue [1]. Ces protéines, qui ont gardé une similitude après plus de 3 milliards d'années de divergence, ont toutes les chances d'avoir une fonction essentielle, telles que la transcription, la méthylation ou la réparation de l'ADN, qui seraient restées les mêmes des *archaea* jusqu'à l'homme.

Ce projet de type génomique structurale et fonctionnelle a pour but de déterminer les bases structurales de la fonction de ces protéines d'*archaea*, plus facile à étudier, puis d'étendre ces informations à leur homologues humains. Aujourd'hui trente deux protéines PACE ont été identifiées [2].

Nous nous sommes intéressés à la protéine PAB0955, protéine dimérique de 30kDa. En combinant les méthodes MAD et SIRAS, nous avons résolue la structure de la protéine pace12 native.

Le repliement de PAB0955 est un repliement de Rossmann contenant une boucle liant le phosphate (P-loop). Ceci est caractéristique des ATPases/GTPases. Un alignement structural à l'aide du logiciel DALI a permis d'identifier différentes ATPases et GTPases dont le repliement est proche de celui de PAB0955. L'activité GTPase de cette protéine suggérée par la présence d'un motif " P-loop " en N terminal a été confirmé par des analyses biochimiques. Ce qui nous a conduit à entreprendre des co-cristallisations avec différents nucléotides. Trois complexes de PAB0955 ont été obtenus, avec du GTP γ S, du GTP et du GDP, dont les structures ont été résolues par remplacement moléculaire.



L'ensemble de ces structures devraient nous fournir des indices fiables pour mieux comprendre la fonction de cette protéine.

1 - Matte-Taille, O., Forterre, P., Zivanovic, Y (2000) Mining archaeal proteomes for eukaryotic proteins with novel functions : the PACE case. *Trends in Genetics*, 16, 533-536.

2 - <http://www-archbac.u-psud.fr/>

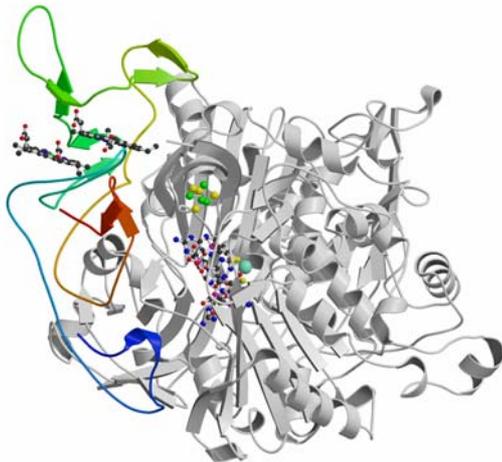
PLASTICITE REDOX ET STRUCTURALE DE LA NITRATE REDUCTASE PERIPLASMIQUE DE *RHODOBACTER SPHAEROIDES*.

Pascal ARNOUX, Monique SABATY, David PIGNOL

Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire, Département d'Ecophysiologie Végétale et Microbiologie, Bât156 CEA Cadarache, 13107 St Paul lez Durance. david.pignol@cea.fr

La nitrate réductase périplasmique de *Rhodobacter sphaeroides* (complexe NapA-NapB) est une molybdoenzyme hétérodimérique qui catalyse la réduction des nitrates en nitrite, première étape du processus de dénitrification (respiration des nitrates). Elle peut également réduire des oxydes métalliques extrêmement toxiques, tels que les Sélénates, mais avec une activité plus faible (1). L'étude structurale et fonctionnelle de cet enzyme pourrait nous permettre d'augmenter ces activités dans un but de bioremediation.

Le complexe NapA-NapB a été cloné dans un système homologue, surexprimé (1mg/L de culture) et cristallisé au laboratoire (4 formes cristallines)(2). Sa structure a été résolue à 3.1 Å de résolution par une approche combinée de remplacement moléculaire et de moyennation. Cette structure correspond à la première image d'une séléniate réductase. La sous-unité catalytique (NapA ; 800 résidus) possède un centre 4Fe-4S et un cofacteur à molybdène (MGD) enfouit au fond d'une crevasse correspondant au site de fixation du substrat (nitrate ou séléniate), la sous-unité cytochromique (NapB ; 130 résidus) possède deux hèmes de type *c*. La structure du complexe montre 1/ les résidus potentiellement impliqués dans la spécificité de substrat, 2/ l'arrangement des cofacteurs et 3/ le mode d'association des sous-unités. Nous avons étudié par ailleurs la formation du complexe par des techniques d'enzymologie et par la mesure des variations des potentiels rédox des cofacteurs dans les sous-unités libres ou complexées. Les effets importants mesurés sont analysés à la lumière de la structure tridimensionnelle et permettent de décrire une plasticité rédox et structurale contribuant à un transfert d'électrons efficace entre l'hème I de NapB et le site actif à molybdène de NapA.



1) Sabaty, M., Avazeri, C., Pignol, D. & Vermeglio, A. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 2001 Nov;67(11):5122-6. « Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases. »

2) Pignol D, Adriano JM, Fontecilla-Camps JC, Sabaty M. *Acta Crystallogr D.* 2001 Dec;57(Pt 12):1900-2 « Crystallization and preliminary X-ray analysis of the periplasmic nitrate reductase (NapA-NapB complex) from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. Denitrificans ».

3) Arnoux P., Sabaty M., Alric J., Frangioni B., Guigliarelli B., Adriano J.M. & Pignol D. (2003) *Nature Struct. Biol.* 10(11):928-34 « Structural and redox plasticity in the heterodimeric periplasmic nitrate reductase. »

LA STRUCTURE DE LA MYOSINE VI REVELE LE MECANISME DE SA DIRECTIONNALITE INVERSEE

A. Bahloul^{1*}, J. Ménétrey^{1*}, A. Wells², HL. Sweeney², A. Houdusse¹

* Ces auteurs ont contribué de façon égale à ce travail

¹ Motilité structurale, UMR 144 Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Cedex 05, France

² Department of Physiology, University of Pennsylvania School of Medicine, 3700 Hamilton Walk – Philadelphia, PA 19104-6085, U.S.A.

Les myosines sont des moteurs moléculaires capables de convertir l'énergie chimique produite par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique pour se déplacer le long des filaments d'actine. Certaines, comme les myosines V ou VI, sont processives; elles sont capables de générer plusieurs pas le long du filament d'actine sans s'en détacher. Cette propriété leur permettent de jouer des rôles critiques au niveau du transport intracellulaire des vésicules. La myosine VI est une myosine tout à fait originale si l'on considère sa motilité. En effet, sa directionnalité est inversée par rapport à toutes les autres myosines; elle avance en direction du bout pointu du filament d'actine [1]. De plus, elle génère des pas de géant compte tenu de la taille de son bras de levier [2], ce qui remet en cause la « théorie du bras de levier » proposée pour les autres myosines. Dans le but de comprendre les propriétés de motilité originales de la myosine VI, nous avons entrepris la caractérisation biochimique et structurale de ce moteur.

Nous avons résolu la structure d'une forme monomérique de la myosine VI, correspondant au domaine moteur où siège le site nucléotidique et la poche qui interagit avec le filament d'actine, suivi d'une insertion de 39 acides aminés trouvée uniquement dans la famille des myosines VI, et de son bras de levier. La comparaison de cette structure à celle de la myosine V, résolue précédemment dans notre laboratoire dans le même état conformationnel [3] a permis de mettre en évidence les éléments structuraux impliqués dans sa directionnalité, et de comprendre comment la myosine VI génère un mouvement en sens inverse des autres myosines. D'autre part, nous avons montré que l'insertion de 39 aa située entre le domaine moteur et le bras de levier de la myosine VI fixe avec une très forte affinité une chaîne légère, la calmoduline en présence de calcium [4]. Notre structure révèle que la conformation de l'insert-calmoduline allonge le bras de levier de la myosine VI. Toutefois, cet allongement n'est pas suffisant pour expliquer les pas de géant générés par la myosine VI. Cette dernière observation suggère que le mécanisme du mouvement généré par la myosine VI est probablement différent de celui qui a été décrit pour les autres myosines, et ne peut pas se limiter à une simple inversion de mouvement.

[1] Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*. **401**, 505-8.

[2] Rock RS, Rice SE, Wells AL, Purcell TJ, Spudich JA, Sweeney HL. (2001) Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 13655-91.

[3] Coureux PD, Wells AL, Ménétrey J, Yengo CM, Morris CA, Sweeney HL, Houdusse A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature*, **425**, 419-23.

[4] Bahloul A, Chevreux G, Wells AL, Martin D, Nolt J, Yang Z, Chen LQ, Potier N, Van Dorsselaer A, Rosenfeld S, Houdusse A, Sweeney HL. The unique insert in myosin VI is a structural calcium-calmodulin binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. - U.S. in press.*

ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA SUCROSE-6-PHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE DE *SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803*

S. Fieulaine¹, J. Lunn², F. Borel¹, J-L. Ferrer¹

¹ Institut de Biologie Structurale J-P. Ebel (IBS), Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines (LCCP), CEA/CNRS/UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

² Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Am Muhlenberg 1, 14476 Golm, Germany

L'enzyme sucrose-6-phosphate phosphohydrolase ou SPP catalyse l'étape finale de la voie de biosynthèse du sucrose, ou saccharose [1]. Elle permet de déphosphoryler le sucrose-6-phosphate obtenu par l'addition d'une molécule d'UDP-glucose à une molécule de fructose-6-phosphate, réaction catalysée par une sucrose-phosphate synthase ou SPS. Le sucrose étant le produit principal de la photosynthèse chez la plupart des plantes, l'enzyme SPP est considérée comme la dernière enzyme de la voie de l'assimilation du carbone par la photosynthèse. De manière surprenante, c'est la seule enzyme de cette voie de biosynthèse dont le gène n'avait pas été cloné et la protéine étudiée jusqu'à il y a peu. Nous nous intéressons à la protéine SPP de *Synechocystis sp.*, qui est l'un des rares procaryotes à synthétiser du sucrose [2].

Nous avons résolu la structure de la protéine SPP de *Synechocystis sp.* à 1.4Å de résolution (code PDB 1S2O), en utilisant la technique SAD et un dérivé lourd erbium au sein du cristal. La détermination de la structure de la protéine SPP nous a permis de confirmer l'hypothèse, basée sur l'observation de la séquence, selon laquelle la protéine appartiendrait à la famille des protéines HAD ou halo-acide déshalogénases [3]. La protéine est composée de deux domaines, la crevasse située entre eux constitue le site actif. Dans cette structure, la protéine a une conformation ouverte. La superposition de la protéine SPP avec d'autres protéines de structure similaire permet d'identifier un certain nombre de résidus susceptibles d'être impliqués dans la fixation du ligand et/ou le mécanisme enzymatique.

Une deuxième forme cristalline de la protéine SPP a été obtenue et la structure résolue par remplacement moléculaire. Bien que les cristaux aient poussé en présence de sucrose, qui est le produit de la réaction catalysée par l'enzyme, aucun ligand n'a pu être observé dans les cartes de densité électronique. Cependant, dans cette deuxième structure, la protéine est dans une conformation fermée, c'est-à-dire que les deux domaines se sont rapprochés l'un de l'autre. D'autre part, l'empilement cristallin montre une protéine dimérique au sein du cristal. Nous recherchons actuellement quelle pourrait être la signification biologique de cette dimérisation, et si la présence du ligand dans les gouttes de cristallisation peut en être à l'origine.

Prochainement, nous étudierons la structure de la protéine SPP de maïs, qui possède une extension C-terminale par rapport à la protéine de *Synechocystis sp.* La comparaison des deux structures, cyanobactérie/plante, nous renseignera sur l'importance des modifications survenues au cours de l'évolution. De plus, nous devrions pouvoir étudier l'enzyme SPS, qui précède l'action de l'enzyme SPP dans la voie de biosynthèse du sucrose. La protéine SPS contient un domaine SPP.

[1] Lunn J., Ashton A.R., Hatch M.D., Heldt H.W. (2000) Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6^F-phosphate phosphohydrolase from plants. *PNAS*, 97(23), 12914-12919

[2] Lunn J. (2002) Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiol*, 128, 1490-1500.

[3] Collet J-F., Stroobant V., Pirard M., Delpierre G., van Schaftingen E. (1998) A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif. *J Biol Chem*, 273(23), 14107-14112.

STRUCTURE DE LA SYLVATICINE, NOUVELLE ELICITINE ET TRANSPORTEUR DE STÉROLS, ISOLEE DE *PYTHIUM* *SYLVATICUM*.

Marie Bernard Lascombe¹, Pascal Retailleau^{2,3}, Michel Ponchet⁴,
Marie Louise Milat⁵, Jean Pierre Blein⁵ et Thierry Prangé^{1,2}

¹ LCRB, UMR CNRS 8015, Faculté de Pharmacie, 4 Ave de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06

² LURE, Université Paris-Sud, Bâtiment 209d, 91405 Orsay Cedex

³ ICSN-CNRS, Av. de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex

⁴ INRA-IPMSV, 62, Bld du Cap, BP 2078, 06606 Antibes Cedex

⁵ Phytopharmacie, UMR 692, INRA-ENESAD, Université de Bourgogne, 21065, Dijon Cedex

Les élicitines représentent une famille de protéines ~10kD, isolées d'oomycètes parasites de végétaux [1]. Ces protéines induisent, en dehors d'une réaction hypersensible (dite HR) conduisant à la nécrose des parties aériennes puis à la mort, une résistance systémique non-spécifique (dite SAR) à d'éventuelles attaques par d'autres espèces, d'où leur intérêt considérable en lutte agro-biologique. Ces protéines extra-cellulaires sont de plus des transporteurs de stérols [2]. Selon leur pI (acide ou basique), on parle d' α - ou de β -élicitines. Leurs séquences sont très voisines (env. 80 % d'homologies) et ont la particularité de ne jamais contenir de résidus histidine, arginine ou tryptophane. Les structures de deux β -élicitines sont connues [3,4] : la cryptogéine (isolée de *Phytophthora cryptogea*) et la β -cinnamomine (isolée de *Phytophthora cinnamomi*) dont les structures sont quasi-superposables. Depuis, nous avons cristallisé deux autres protéines 'élicitines-like', l'une de type α (l'oligandrine [5], isolée de *Pythium oligandrum*), l'autre d'un type nouveau car il s'agit de la première élicitine contenant les résidus arginine et tryptophane, la sylvaticine [6] isolée de *Pythium sylvaticum*. Cette dernière ne présente cependant qu'une homologie de 45 % par rapport à la séquence consensus des élicitines.

La sylvaticine cristallise en présence de PEG 2000 MME et de NiCl₂ 10⁻² M, à pH 7,4. La structure a été abordée par remplacement moléculaire, mais n'a pu être résolue selon cette technique. Partant de l'hypothèse d'un nickel ordonné, la méthode Ni-SAD a été appliquée (un enregistrement au seuil du nickel à 1,483 Å, plus une native, enregistrés sur la ligne BM14 de l'ESRF). L'utilisation de *SHARP* [7] suivi de *wARP* [8], en mode automatique à la résolution nominale de 1,7 Å, a directement conduit à une carte suivie d'un modèle d'excellente qualité. Cette communication illustre les différences structurales entre les classes cryptogéine-cinnamomine et sylvaticine.

1. Ponchet *et al.* (1999) *Cell Mol. Life Sci.* **56**, 1020-1047

2. Mikes *et al.* (1997) *FEBS Lett.* **4**, 190-192

3. Boissy *et al.* (1996). *Structure*, **4**, 1429-1439

4. Rodrigues *et al.* (2002) *Acta Cryst.* **D58**, 1314-1321

5. Lascombe *et al.* (2000) *Acta Cryst.* **D56**, 1498-1500

6. Lascombe *et al.* (2004) *Acta Cryst.* **D60**, 362-364

7. de La Fortelle & Bricogne (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 472-494

8. Lamzin & Wilson (1997) *Methods Enzymol.* **277**, 269-305

ETUDE DE DOMAINES DE PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES VOIES DE SIGNALISATION ET DE REPARATION DES DOMMAGES DE L'ADN : EXEMPLE DU DOMAINE TUDOR DE LA PROTEINE HUMAINE 53BP1.

J. Couprie¹, G. Charier¹, B. Alpha-Bazin², V. Meyer³, E. Quéméneur², R. Guérois³, I. Callebaut⁴, B. Gilquin¹, S. Zinn-Justin¹.

¹ Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA SACLAY, 91191 Gif-dur-Yvette cedex, France

² Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA VALRHO, 30207 Bagnols-sur-Ceze, France

³ Département de Biologie Joliot-Curie, CEA SACLAY, 91191 Gif-dur-Yvette cedex, France

⁴ Systèmes Moléculaires et Biologie Structurale, LMCP, CNRS UMR 7590, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

L'ADN des cellules eucaryotes est constamment exposé à des agents de dommages endogènes et exogènes. Afin d'empêcher l'accumulation de dommages de l'ADN et d'éviter les dysfonctionnement cellulaires, les cellules ont développé des mécanismes de réponse : les voies de signalisation et de réparation des dommages de l'ADN, dont le dysfonctionnement est fréquemment associé à des cancers. Ces voies sont régulées par des réseaux interconnectés d'interactions protéine-protéine, dont la caractérisation est essentielle pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'activation des différentes voies. Nous avons identifié plusieurs domaines TUDOR, un module d'interaction protéine-protéine impliqué dans la formation de complexes protéine-ARN, au sein de protéines humaines impliquées dans la réparation de l'ADN (MSH6), la signalisation des dommages de l'ADN (53BP1 et son homologue supposé chez la levure Rad9), et dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (kin17). Nous avons entrepris l'étude structurale et fonctionnelle de ces domaines TUDOR pour comprendre leur rôle dans les voies de réponse aux dommages de l'ADN.

La protéine 53BP1 est un transducteur clé du 'point de contrôle' des dommages de l'ADN. Elle est requise pour la phosphorylation de plusieurs substrats de la kinase ATM et l'accumulation de p53. Après irradiation des cellules, la région N-terminale de 53BP1 est phosphorylée. Ses deux motifs BRCT C-terminaux interagissent avec p53. Sa région centrale est nécessaire et suffisante pour la formation de foyers de 53BP1 au niveau des cassures double brin de l'ADN et pour la liaison de 53BP1 au kinétochore, et elle interagit avec l'ADN *in vitro*. Nous avons résolu par RMN la structure du domaine globulaire principal de la région centrale de 53BP1 [1, 2]. Ce domaine adopte un nouveau motif structural composé de deux domaines TUDOR au contact l'un de l'autre, et d'une hélice- α C-terminale. Une surface unique, essentiellement localisée dans le premier domaine TUDOR est impliquée à la fois dans la liaison de séquences peptidiques riches en RG et dans la liaison de l'ADN. Nous proposons que la répétition de TUDOR en tandem pourrait agir comme un adaptateur, impliquée dans des interactions protéine-protéine intra- ou intermoléculaires et dans des associations protéine-acides nucléiques.

[1]. Charier G., Alpha-Bazin B., Couprie J., Callebaut I., Berenguer F., Quemeneur E., Gilquin B., Zinn-Justin S. (2004) ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the region 1463-1617 of the mouse p53 binding protein 1 (53BP1). *J. Biomol. NMR*, **28**, 303-304.

[2] Charier G., Couprie J., Alpha-Bazin B., Meyer V., Quéméneur E., Guérois R., Callebaut I., Gilquin B., Zinn-Justin S. The tandem Tudor of 53BP1 : a new structural motif involved in DNA and RG rich peptide binding. *Structure* Submitted.

CARACTERISATION STRUCTURALE DU DOMAINE TRANSPEPTIDASE DE PBP1B DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Pauline Macheboeuf¹, Viviana Job¹, Anne Marie Di Guilmi², Thierry Vernet², Otto Dideberg¹ et Andréa Dessen¹

¹ Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire (LCM).

² Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules (LIM).

Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CEA/CNRS/UJF)

41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble.

Les « Penicillin-Binding Proteins » (PBPs) sont des macromolécules associées à la membrane, impliquées dans la synthèse du peptidoglycane bactérien et qui ont un rôle fondamental dans la morphologie et la division bactérienne. Les PBPs de haute masse moléculaire sont divisées en deux classes principales : celles de classe A catalysent l'élongation des chaînes de sucre composant la paroi cellulaire (activité Glycosyltransférase ou GT) ainsi que la réticulation de ces chaînes par des ponts peptidiques (activité Transpeptidase ou TP). Celles de classe B sont monofonctionnelles et ne possèdent que l'activité TP. Le domaine TP des PBPs est notamment la cible préférentielle des antibiotiques de la famille des β -lactamines qui ont été utilisés pendant de nombreuses années dans les milieux hospitaliers. L'apparition de souches résistantes à ces antibiotiques pose un grave problème de santé publique. Nos efforts se sont essentiellement portés sur *Streptococcus pneumoniae*, pathogène majeur responsable de pneumonies, méningites, otites aiguës dans les pays en voies de développement.

Les informations structurales accessibles sur les PBPs concernent uniquement les PBPs de classe B quel que soit l'organisme de référence. Nous nous intéressons de plus près à PBP1b du pneumocoque dans le but d'avoir de plus amples informations structurales concernant les PBPs de classe A, ainsi que leurs rôles dans la division cellulaire afin d'élaborer de nouveaux antibiotiques. La première étape de ce travail consistant en l'étude du domaine transpeptidase de cette protéine.

La région soluble de PBP1b a été exprimée en tant que protéine de fusion avec la GST, le domaine transpeptidase étant extrait grâce à une étape de trypsination, puis purifié. Des cristaux du domaine TP de PBP1b ont été obtenus en présence de sulfate d'ammonium et de chlorure de sodium par la méthode de la goutte suspendue. Ils appartiennent au groupe d'espace C222₁ avec les paramètres de maille suivants : a=98.331 Å, b=149.447 Å, c=97.976 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Des données synchrotron ont été enregistrées sur la ligne FIP BM30A de l'ESRF, Grenoble, à partir de cristaux de protéine native (1.9 Å) et de protéine sélénée (12.5Å). La structure affinée à 1.9 Å de TP PBP1b montre une topologie à trois domaines : un domaine N-terminal en 'Hélice-Boucle-Hélice' permettant l'accroche du domaine GT en amont, un domaine central comportant l'activité transpeptidase, de repliement similaire aux transpeptidases de classe B et aux β -lactamases connues et un domaine C-terminal de fonction inconnue. Des efforts sont en cours pour visualiser la cavité enzymatique grâce à des trempages avec des pseudo-substrats et des antibiotiques (1).

(1) Macheboeuf P., Job V., Di Guilmi A.M., Vernet T., Dideberg O. et Dessen A. (2004). En préparation.

LA STRUCTURE CRISTALLINE DU DOMAINE DE SECRETION DE L'HEMAGGLUTININE FILAMENTEUSE DE *BORDETELLA PERTUSSIS* ET SES IMPLICATIONS DANS LA VOIE DE SECRETION A DEUX PARTENAIRES.

B. Clantin¹, H. Hodak², E. Willery², C. Locht², F. Jacob-Dubuisson² et V. Villeret³

¹ FRC3 (CNRS), Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille Cedex, France.

² U629 (INSERM), Institut de Biologie de Lille.

³ UMR8525 (CNRS), Institut de Biologie de Lille.

L'hémagglutinine filamenteuse (FHA), l'adhésine majeure de *Bordetella pertussis*, est une des protéines les mieux sécrétées chez les bactéries à Gram négatif. FHA est sécrétée via la voie de sécrétion à deux partenaires (TPS) [1]. Le système TPS est composé de deux protéines distinctes, d'une part, TpsA, la protéine sécrétée et d'autre part, TpsB, son transporteur spécifique ancré dans la membrane externe. Les protéines TpsA comprennent un module N-terminal distinct essentiel à la sécrétion appelé domaine TPS [1, 2]. Fha30, un fragment N-terminal de FHA de 30 kDa, comprend le domaine TPS et conserve la propriété d'être sécrété grâce au système TPS. La structure de Fha30 a été déterminée à 1.7 Å de résolution par la méthode MIRAS [3]. Le domaine TPS présente une structure en hélice β avec trois motifs extra-hélice, un hairpin β , un feuillet β de quatre brins anti-parallèles et le capping N-terminal de l'hélice. Ces trois motifs comprennent principalement des résidus non conservés chez les différentes TpsA. La structure de Fha30 révèle que le domaine TPS a également pour fonction d'initier le repliement après sécrétion de l'ensemble de l'adhésine en hélice β et que les régions extra-hélice moins conservées sont vraisemblablement impliquées dans les propriétés spécifiques du domaine TPS telles que la reconnaissance de son transporteur membranaire. Cette structure est représentative des domaines TPS trouvés jusqu'à présent dans plus de 100 protéines sécrétées par des bactéries pathogènes. Elle nous indique également par quel mécanisme structural le repliement de la protéine est lié à sa sécrétion par le système TPS.

[1] Jacob-Dubuisson F., Locht C., Antoine R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.*, **40**, 306-313.

[2] Jacob-Dubuisson F., Buisine C., Willery E., Renauld-Mongenie G., Locht C. (1997) Lack of functional complementation between *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and *Proteus mirabilis* HpmA hemolysin secretion machineries. *J. Bacteriol.*, **179**, 775-783.

[3] Clantin B., Hodak H., Willery E., Locht C., Jacob-Dubuisson F., Villeret V. (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 6194-6199.

CRYSTAL STRUCTURE AT 1.8 Å OF THE *BACILLUS SUBTILIS* CATABOLITE REPRESSION HISTIDINE CONTAINING PROTEIN (CRH) REVEALS AN UNEXPECTED SWAPPING DOMAIN AS AN INTERTWINED DIMER

M. Juy¹, A. Böckmann², A. Galinier³, F. Penin² and R. Haser¹

¹ Laboratoire de Bio-Cristallographie - Institut de Biologie et Chimie des Protéines CNRS-UCBL UMR 5086, 7 passage du Vercors 69367 LYON Cedex 07, France

² Laboratoire de RMN - Institut de Biologie et Chimie des Protéines CNRS-UCBL-I, UMR 5086, 7 passage du Vercors 69367 LYON Cedex 07, France

³ Laboratoire de Chimie Bactérienne, CNRS, UPR 904, 31 chemin Joseph Aiguier 13402 MARSEILLE Cedex 20, France

La protéine Crh participant à la répression catabolite de *Bacillus subtilis* montre 45% d'identité de séquence avec la protéine HPr de *B. subtilis*, mais ne possède pas de site catalytique (His-15 remplacée par une Gln-15) et par conséquent ne peut être phosphorylée en cet endroit. Toutefois Crh possède comme HPr un site régulateur, le résidu Ser-46 qui peut être phosphorylé in vitro à partir d'ATP par l'HPrKinase/Phosphatase (1).

Dans une étude plus récente (2) les premiers résultats pour obtenir la structure de Crh par RMN ont révélé la présence d'au moins deux formes en équilibre. Une de ces deux formes étant ininterprétable par RMN (forme dimérique) nous avons décidé de cristalliser cette molécule et nous avons obtenus des cristaux de la forme dimérique.

Pour résoudre le problème de phases de la structure cristallographique de Crh, nous avons utilisé la méthode MAD en séléno-méthionylant les 3 sites Met de Crh (85résidus).

Cette protéine cristallise dans 2 groupes d'espace différents, selon la présence ou non du selenium en position N-ter (Met-1).

La structure 3D montre une association de domaines dans ce dimère sous forme de "swapping domain" (croisement des brins N terminaux pour 15 résidus environ) (3, 4). Les dimères s'auto-associent entre eux dans le cristal sous forme de tétramère par le biais d'ions phosphates et de la Ser-46 pour former des ponts ioniques qui stabilisent l'édifice cristallin.

(1) Galinier A., Deutscher J. & Martin-Verstraete I. Phosphorylation of either Crh or Hpr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis* xyncre and catabolite repression of the xyn operon. **J. Mol. Biol** (1999) 286, 307-314.

(2) Favier A., Brutscher B., Blackledge M., Galinier A., Deutscher J., Penin F. *et al.* Solution structure and dynamics of Crh, the *Bacillus subtilis* catabolite repression Hpr. **J. Mol. Biol** (2002) 317, 131-144.

(3) M. Juy, F. Penin, A. Favier, A. Galinier, R. Monserret, R. Haser, J. Deutscher, A. Bockmann. Dimerization of Crh by reversible 3D domain swapping induces structural adjustments to its monomeric homologue Hpr. **J. Mol. Biol** (2003) 332, 767-776.

(4) M. Juy, A. Bockmann, A. Galinier, F. Penin, R. Haser. 3 D crystal structure at 1,8 Å of *Bacillus subtilis* catabolite repression Hpr (Crh) reveals an unexpected domain swapping as a twinned dimer. En préparation.