

**Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire**

**6<sup>ème</sup> Rencontre SifrARN  
- RENNES 2006 -**

*SifrARennes*

**3 - 6 Juillet 2006**

**Diapason  
Campus Universitaire de Beaulieu  
Avenue du Général Leclerc  
35042 RENNES**

# "Structure, Intégration, Fonction et Réactivité des ARN"

## *SifrARennes*

### *Comité scientifique*

<b>Edouard BERTRAND</b> (Montpellier)	<b>Magali FRUGIER</b> (Strasbourg)
<b>Christiane BRANLANT</b> (Nancy)	<b>Katherine KEAN</b> (Paris)
<b>Béatrice CLOUET d'ORVAL</b> (Toulouse)	<b>Joëlle MARIE</b> (Gif sur Yvette)
<b>Frédéric DARDEL</b> (Paris)	<b>Marie-Christine MAUREL</b> (Paris)
<b>Marc DREYFUS</b> (Paris)	<b>Luc PAILLARD</b> (Rennes)
<b>Brice FELDEN</b> (Rennes)	<b>Jean-Jacques TOULME</b> (Bordeaux)

### *Comité d'organisation (Rennes)*

**Michel PHILIPPE**

<b>Brice FELDEN</b>	<b>Yves LE LOIR</b>	<b>Luc PAILLARD</b>
<b>Serge HARDY</b>	<b>Hubert LERIVRAY</b>	<b>Gilles SALBERT</b>
<b>Reynald GILLET</b>	<b>Jacques LE SEYEC</b>	<b>Denis TAGU</b>
	<b>Agnès MEREAU</b>	

*Secrétariat : Chantal SAFFRAY,  
Université de Rennes1, IFR 140,  
Faculté de Médecine, CS 34317, 35043 RENNES-CEDEX*

*Site : Hubert Lerivray (<http://sifram2006.univ-rennes1.fr/>)  
Réalisation de la couverture : Sylvaine Bitteur (Agrocampus Rennes)*

*Le comité d'organisation remercie pour leur soutien :*

*Nos partenaires publics :*

**L'Université de Rennes 1  
Rennes Métropole  
La Région Bretagne  
L'IFR 140 GFAS (Rennes)  
Le CNRS  
La Ville de Rennes  
L'Agrocampus Rennes**

*Nos partenaires privés :*

**Air-France  
Ambion  
Applied Biosystems  
Cambridge Research Biochemicals  
Eurogentec  
In Cell Art  
Macherey-Nagel  
MitoProd  
MWG Biotech France  
Perbio  
Qiagen  
Sigma Aldrich  
Stratagene**

# *Sommaire*

<b>Programme des Sessions</b>	<b>p 1-7</b>
<b>Résumés des Communications Orales</b>	<b>p 8-67</b>
<b>Résumés des Communications Orales des partenaires privés.</b>	<b>p 68-69</b>
<b>Sessions posters</b>	<b>p 70-75</b>
<b>Résumés des communications par Affiches</b>	<b>p 76-144</b>
<b>Index des auteurs</b>	
<b>Listes des participants</b>	
<b>Plan du campus de Beaulieu</b>	

# Programme des sessions

## Lundi 3 juillet

**9h00-11h00** : Accueil (Diapason). Remise des badges et mallettes. Installation des posters.

**11h00-11h15** : Introduction du congrès (Diapason).

---

### **11h15-12h15 Session "Biosynthèse des ribosomes" : Modérateur Guillaume Stahl**

---

11h15-11h35. **O1. La protéine ribosomique RPS19 et l'Anémie de Diamond-Blackfan (ADB).** Almass-Houd Aguisa Touré.

11h35-11h55. **O2. Analyse structurale et fonctionnelle des particules sRNP à boîtes H/ACA guidant les réactions de pseudouridylation chez les archaea.** Jean-Baptiste Fourmann.

11h55-12h15. **O3. Dynamic association of Mak11 to nucleolar precursors of the large ribosomal subunit in yeast.** Cosmin Saveanu.

**12h15-13h45** : Buffet (Diapason)

---

### **13h45-18h55 Session "Traduction" : Modérateur Yves Méchulam**

---

13h45-14h05. **O4. La poly(A) polymérase GLD-2 est impliquée dans la polyadénylation cytoplasmique dans l'ovocyte de drosophile.** Perrine Benoît.

14h05-14h25. **O5. La protéine CstF-77 cytoplasmique appartient à un complexe de masquage des ARNms avec CPEB dans l'ovocyte de Xénope.** Elisabeth Mandart.

14h25-14h45. **O6. Dynamique des corps GW et des granules de stress dans les cellules de mammifère.** Dominique Weil.

- 14h45-15h05. **O7. Structure du facteur de démarrage de la traduction aIF2.** Yves Mechulam.
- 15h05-15h25. **O8. The pathway of HCV IRES-mediated 80S ribosome formation.** Nicolas Locker
- 15h25-15h45. **O9. Identification par criblage fonctionnel d'aptamères ARN dirigés contre l'IRES du virus de l'hépatite C.** Sandrine Reigadas.
- 15h45-16h05. **O10. L'initiation de la traduction des lentivirus est gouvernée par un mécanisme original.** Bruno Sargueil.

**16h05-16h35 : Pause**

- 16h35-16h55. **O11. Régulation de l'expression du gène codant la protéine ribosomique L20 chez la bactérie *Escherichia coli*.** Julie Haentjens.
- 16h55-17h15. **O12. L'autorégulation de l'expression de la protéine ribosomique S1 n'implique pas le motif C-terminal de la protéine.** Patricia Skorski.
- 17h15-17h35. **O13. Etude des propriétés structurales et fonctionnelles par RMN de la protéine ribosomale S1, impliquée dans le métabolisme des ARN messagers.** Pascale Aliprandi.
- 17h35-17h55. **O14. Evidences expérimentales du rôle de la protéine ribosomale S1 durant la *trans*-traduction *in vivo* et *in vitro*.** Matthieu Saguy.
- 17h55-18h15. **O15. SmpB forme un échafaudage actif autour de l'ARNtm durant le processus de *trans*-traduction.** Reynald Gillet.
- 18h15-18h35. **O16. Structure de l'amidotransférase ARNt dépendante de *Pyrococcus abyssi*.** Emmanuelle Schmitt.
- 18h35-18h55. **O17. Identification d'une nouvelle classe de ligands fluorescents d'ARN présentant une activité antibiotique de type aminoglycoside.** Frédérique Maurice.

**18h55-20h30 : Dîner (Restaurant Universitaire)**

**20h30-22h00 : Session poster 1.**

Dégustation de bières offertes par la société Eurogentec

# Mardi 4 juillet

---

## 8h30-10h10 Session "Structure des ARN et des complexes ARN-protéines" : Modérateur Brice Felden

---

- 8h30-8h50. **O18.** Crystal structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. Stéphane Thore.
- 8h50-9h10. **O19.** Un nouvel axe pour la trans-traduction : structure du pseudo-noeud PK1 de l'ARNtm. Sylvie Nonin-Lecomte.
- 9h10-9h30. **O20.** Aminoglycoside binding to HIV-1 DIS RNA kissing-loop complex: from crystals to cells. Eric Ennifar.
- 9h30-9h50. **O21.** L'ARN recombinant, une stratégie de production à grande échelle d'ARN de structures variées pour des études structurales, fonctionnelles et pharmacologiques. Luc Ponchon.
- 9h50-10h10. **O22.** Modélisation moléculaire d'un système à ribozymes siamois dans l'élément génétique codant pour l'endonucléase I-DirI chez *Didymium iridis*. Bertrand Beckert.

**10h10-10h40** : Pause

---

## 10h40-12h20 Session "Bioinformatique et ARN" : Modérateur Frédéric Dardel

---

- 10h40-11h00. **O23.** Alternative Polyadenylation as a Tool for miRNA and Target Detection. Daniel Gautheret.
- 11h00-11h20. **O24.** Contribution de l'ARNtm au cours de la croissance et de la différenciation cellulaire, de la réplication de l'ADN et dans la réponse aux stress chez *Sinorhizobium meliloti*. Vincent M. Ulvé.
- 11h20-11h40. **O25.** SwS: a solvation web service for nucleic acids. Pascal Auffinger.
- 11h40-12h00. **O26.** MicroRNA – their identification and functional analysis. Vera Atzorn.
- 12h00-12h20. **O27.** Biopolymer Chain Elasticity, BCE, une nouvelle approche de modélisation de l'ARN et de l'ADN. Jean A. H. Cognet.

**12h20-15h00** : Buffet (Diapason). Session poster 2

**15h00-15h20** : Présentation par la société Sigma

**Mission shRNA** : Une collection de 150 000 clones shRNA Lentiviraux à visée Humaine et Murine.

---

**15h20-18h50 Session "ARN, pathologies, développement" : Modérateur Jérôme Cavallé**

---

15h20-15h40. **O28. La protéine Vif du VIH-1 : fixation à l'ARN et propriétés de chaperon de l'ARN.** Roland Marquet.

15h40-16h00. **O29. Vers une thérapie génique de l'amyotrophie spinale par correction de l'épissage de SMN2.** Julien Marquis.

16h00-16h20. **O30. Régulations post-transcriptionnelles de l'expression génétique et segmentation somitique.** Luc Paillard.

16h20-16h40. **O31. Encapsidation des ARN rétroviraux au cours de l'assemblage des particules virales.** Laurent Houzet.

**16h40-17h10 : Pause**

17h10-17h30. **O32. Spinal Muscular Atrophy and the SMN protein in the nucleus organization.** Benoît Renvoisé.

17h30-17h50. **O33. Des variations spécifiques dans la séquence du 5'UTR du VHC de génotype 3 induisent une baisse du niveau de réplication.** Cyril Masante.

17h50-18h10. **O34. Identification de gènes cibles de la protéine Unr chez des cellules souches embryonnaires (ES) de souris.** Hélène Jacquemin-Sablon.

18h10-18h30. **O35. Régulation par le photopériodisme saisonnier d'ARNm codant des protéines de structure et de signalisation chez le puceron.** Denis Tagu.

18h30-18h50. **O36. Quelle lysyl-ARNt synthétase comme cargo de l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> ?** Marc Mirande.

**A partir de 20h00 : Banquet (Restaurant Universitaire)**



# Mercredi 5 juillet

---

## 8h30-11h40 Session "ARN régulateurs" : Modérateurs Béatrice Clouet d'Orval et Brice Felden

---

8h30-8h50. **O37. Physiological suppression of the microRNA-silencing pathway by HIV-1 is required for virus replication.** Robinson Triboulet.

8h50-9h10. **O38. Un nouveau petit ARN chez *E.coli* : suppression de l'essentialité de la protéase RseP et régulation négative de deux protéines de la membrane externe.** Véronique Douchin.

9h10-9h30. **O39. Bsr a novel nuclear-restricted mRNA-like transcript with mono-allelic expression.** Jérôme Cavaillé.

9h30-9h50. **O40 Regulatory RNA in *Staphylococcus aureus*: a common antisense regulatory mechanism for the expression of several virulence factors.** Thomas Geissmann.

**9h50-10h20 : Pause**

10h20-10h40. **O41 Différents mécanismes d'inhibition de la traduction par des petits ARN non codants chez *Escherichia coli*.** Fabien Darfeuille.

10h40-11h00. **O42 Different types of non-coding RNAs mediate the epigenetic programming of developmental genome rearrangements in the ciliate *Paramecium*.** Gersende Lepère.

11h00-11h20. **O43 Régulateurs protéiques de l'ARN 7SK, un inhibiteur du facteur de transcription P-TEFb.** Charlotte Barrandon.

11h20-11h40. **O44. Régulation du gène *msrB* de *E.coli* par le petit ARN non codant RyhB.** Julia Bos.

**11h40-12h00 : Présentation par la société Ambion**

**MicroRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Markers of Disease**

**12h00-14h40 : Buffet (Diapason). Session poster 3**

---

## 14h40-17h30 Session "Maturation et modifications post-transcriptionnelles": Modératrices Béatrice Clouet d'Orval et Joëlle Marie

---

14h40-15h00. **O45. Contrôle de la synthèse et du devenir des transcrits par les corégulateurs transcriptionnels.** Martin Dutertre.

15h00-15h20. **O46. Caractérisation *in vivo* de deux séquences régulatrices contrôlant de manière antagoniste l'utilisation d'un exon 3' terminal.** Serge Hardy.

15h20-15h40. **O47. PTB et les protéines de la famille CELF ont des effets antagonistes sur l'épissage alternatif de l'exon muscle-spécifique du pré-ARNm de la beta-tropomyosine.** Jérôme Saulière.

15h50-16h00. **O48. RBMY, une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le contrôle de la spermatogenèse chez les mammifères.** Cyril Bourgeois.

**16h00-16h30 :** Pause

16h30-16h50. **O49. Contrôle traductionnel de l'épissage des messagers eucaryotes révélé par les introns du cilié *Paramecium tetraurelia*.** Eric Meyer.

16h50-17h10. **O50. Identification d'ARNm ciblés par la désadénylation dépendante de la protéine EDEN-BP/CUG-BP.** Antoine Graindorge.

17h10-17h30. **O51. La protéine MLN51 est recrutée dans les granules de stress, indépendamment de son interaction avec le complexe de jonction des exons.** Aurélié Baguet.

**A partir de 18h00 :** Réception à la mairie de Rennes

Remise du « Prix Rennes Métropole »

Repas et soirée libres (Les Tombées de la Nuit)

# Jeudi 6 juillet

(Amphitéâtre Louis Antoine)

---

## 8h30-10h30 Session "Stabilité des ARN". Modérateur Christophe Grosset

---

- 8h30-8h50. **O52. Synthèse prébiotique de précurseurs potentiels de l'ARN.** Carole Anastasi.
- 8h50-9h10. **O53. Dégradation des ARNm chez le phage T4 : une cascade de coupures endoribonucléolytiques de 5' en 3' régulée par le statut de l'extrémité 5' de l'ARNm.** Sylvain Durand.
- 9h10-9h30. **O54. Deux nouvelles endoribonucléases (J1 et J2) chez *Bacillus subtilis* qui partagent des caractéristiques fonctionnelles avec la RNase E d'*E. coli*.** Harald Putzer.
- 9h30-9h50. **O55. Le manque de contrôle de la transcription dans les mitochondries d'*Arabidopsis thaliana* est contrebalancé par une surveillance des ARN.** Sarah Holec.
- 9h50-10h10. **O56. La régulation de la stabilité des ARNm mitochondriaux par la RNase L dépend de la traduction et contrôle l'apoptose induite par l'IFNalpha.** Florence Le Roy.
- 10h10-10h30. **O57. Structure tridimensionnelle du cœur de l'EJC (Exon Junction Complex) organisé autour de l'ARN hélicase eIF4AIII.** Hervé Le Hir.

**10h30-11h00 : Pause**

---

## 11h00-12h00 Session "Transport des ARN". Modératrice Dominique Weil

---

- 11h00-11h20. **O58. Visualisation de la synthèse des ARN messagers dans des cellules vivantes.** Xavier Darzacq.
- 11h20-11h40. **O59. New approaches to study RNA processing in real-time in live cells.** Eugenia Basyuk.
- 11h40-12h00. **O60. Identification des premiers facteurs protéiques membranaires impliqués dans le transport des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie végétale :VDAC et les protéines du complexe TOM.** Thalia Salinas.

**12h00-12h30 :** Remise du « prix NAR »

Clôture du congrès



# Présentations orales



## **O1. La protéine ribosomique RPS19 et l'Anémie de Diamond-Blackfan (ADB)**

Aguissa Touré A. (1) , Gregory A.L.(2), Léger-Silvestre I. (1), Pinaud N. (2), Fribourg S. (2), Gleizes PE. (1)

**(1) Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes, CNRS et Université Paul Sabatier, Bât IBCG, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex**

**(2) Institut Européen de Chimie et Biologie, 2, rue Robert Escarpit, F-33607 PESSAC Cedex**

*aguissa@ibcg.biotoul.fr*

Des mutations dans le gène codant la protéine ribosomique de la sous-unité 40S RPS19 sont liées à 25% des cas d' anémie de Diamond-Blackfan (ADB), une maladie rare qui se traduit par une forte altération de l'érythropoïèse. Afin de comprendre la fonction de cette protéine, nous étudions son homologue chez la levure *S. cerevisiae*. En effet, la protéine S19 est très conservée entre espèces et présente une homologie de 68% pour 52% d' identité entre *Homo sapiens* et *S. cerevisiae*. Cette conservation est confortée par la complémentation fonctionnelle de la perte de la protéine de *S.cerevisiae* par son homologue de *Homo sapiens*. Chez *S.cerevisiae*, nous avons ainsi montré que Rps19p est impliquée dans la maturation de l'ITS1 dans le pré-ARNr et que des mutations faux-sens trouvées chez des patients ADB altèrent la biogenèse des ribosomes. Cet arrêt de la maturation est liée à un défaut de recrutement de facteurs pré-ribosomiques spécifiques des particules pré-40S. Parallèlement, chez *Homo sapiens*, la déplétion par siRNA de la protéine RPS19 dans des cellules HeLa se traduit par un défaut de maturation des pré-ribosomes très comparable à celui observé chez la levure avec une très forte altération de la production de la petite sous-unité ribosomique. Ces résultats posent la question d'un lien causal entre la biogenèse ou la fonction des ribosomes et l' anémie de Diamond-Blackfan.

Des données obtenues dans des cellules humaines suggèrent que certaines mutations pourraient altérer la localisation de la protéine S19. Nous montrons que la séquence de localisation nucléaire ne se situe dans aucune des régions mutées et que, réciproquement, les différentes mutations liées à l'ADB n'interfèrent pas avec la localisation nucléaire de la protéine. Par ailleurs, nous avons récemment déterminé la structure cristalline de l'homologue de S19 de *Pyrococcus abyssi*. Cette structure cristalline permet de comprendre directement la conséquence des différentes mutations pathologiques sur la structure de Rps19 et de dégager des surfaces potentielles d'interaction avec des partenaires. Les résultats de cette analyse structure-fonction seront discutés.

## O2. ANALYSE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES PARTICULES sRNP A BOÎTES H/ACA GUIDANT LES REACTIONS DE PSEUDOURIDYLATION CHEZ LES ARCHAEA

CHARPENTIER B., CHARRON C., MANIVAL X., FOURMANN J.-B., MULLER S., LECLERC F., BEHM-ANSMANT I., and BRANLANT C.

Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP-Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-Les-Nancy, France.

Les Archaea codent des sRNA homologues aux snoRNA à boîtes H/ACA d'eucaryotes qui guident les conversions de résidus U en pseudoU ( $\Psi$ ) (1). Les séquences de génomes d'Archaea disponibles ont été analysées par une approche bioinformatique et au total 45 gènes pouvant coder des sRNA à boîtes H/ACA ont été identifiés. Nous avons montré l'expression de 6 sRNA H/ACA chez *Pyrococcus abyssi*. En parallèle, les sites de pseudouridylation des ARNr ont été identifiés expérimentalement par l'approche RT-CMCT. Des gènes pouvant coder des homologues des protéines CBF5, NOP10 et GAR1 des snoRNP H/ACA avaient aussi été identifiés chez les Archaea. En utilisant des sRNA produits par transcription *in vitro* et des protéines L7Ae, aCBF5, aNOP10 et aGAR1 de *P. abyssi* produites chez *E. coli*, nous avons réussi à reconstituer des particules sRNP H/ACA actives (2). Nous avons ainsi pu confirmer que aCBF5, qui porte une signature d'ARN: $\Psi$ -synthase, est responsable de l'activité de pseudouridylation de la sRNP. Nous avons également établi l'ordre d'addition des protéines sur les sRNA H/ACA et leur rôle respectif dans la catalyse : les protéines L7Ae et aCBF5 se fixent directement au sRNA H/ACA, la protéine aCBF5 permet le recrutement de la protéine aNOP10 et la particule ainsi assemblée est la structure minimale capable de fixer un ARN substrat et de pseudouridyler spécifiquement un résidu de cet ARN. L'activité des sRNP est fortement augmentée en présence des protéines L7Ae et aGAR1. Nous avons établi la structure 3D de la protéine L7Ae (3) et du complexe aCBF5-aNOP10 (4). Sur la base de ces données et de celles d'autres équipes (5,6,7), nous réalisons des mutations d'acides aminés et des délétions de domaines dans les protéines aCBF5 et aNOP10, ceci afin d'étudier le rôle de ces domaines et de ces résidus dans la fixation de l'ARN guide, celle du substrat et dans la catalyse. En particulier, comment l'interaction entre aCBF5 et aNOP10 permet de révéler l'activité ARN: $\Psi$ -synthase de aCBF5 au sein de la sRNP. Les déterminants de l'ARN guide requis pour l'assemblage de RNP fonctionnelles ont aussi été recherchés par mutagenèse dirigée. L'ensemble des résultats obtenus sera discuté sur la base des différentes structures 3D établies à ce jour et des connaissances actuelles sur les snoRNP à boîte H/ACA d'eucaryotes. L'importance possible des mutations de l'homologue humain de aCBF5 dans la dyskératose congénitale humaine sera aussi discutée.

1. Tang T. H. *et al.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 7536-7541 ;
2. Charpentier B. *et al.* (2005) Nucleic Acids Res., **33**, 3133-44 ;
3. Charron C. *et al.* (2004) J. Mol. Biol., **342**, 757-73 ;
4. Manival X. *et al.* (2006) Nucleic Acids Res., **34**, 826-39 ;
5. Rashid R. *et al.* (2006) Mol. Cell., **21**, 249-60
6. Hamma T. *et al.* (2005) Nat. Struct. Mol. Biol., **12**, 1101-7
7. Khanna M. *et al.* (2006) RNA, **12**, 40-52



### **O3. Dynamic association of Mak11 to nucleolar precursors of the large ribosomal subunit in yeast**

Cosmin Saveanu (1), Alice Lebreton (1), Jean-Claude Rousselle (2), Pascal Lenormand (2), Abdelkader Namane (2), Alain Jacquier (1), Micheline Fromont-Racine (1)

(1) Génétique des Interactions Macromoléculaires, CNRS-URA2171, Institut Pasteur, 25-28 rue du docteur Roux 75015, Paris, France

(2) Plate-Forme Protéomique, Institut Pasteur, Paris, France

*csaveanu@pasteur.fr*

Ribosome biogenesis is driven by a large number of pre-ribosomal factors that associate to, and leave the nascent ribosomes at different stages of their maturation. While many of the factors that are involved in this complex pathways have been identified, for most of them no obvious catalytic or regulatory role has been assigned.

We have previously shown that Mak11, a WD40-repeat protein, was accumulating in the complexes purified in association with the essential pre-ribosomal protein Rlp24 when 60S biogenesis was impaired. Purification of Mak11-associated complexes as well as sucrose gradient ultracentrifugation with extracts from wild type budding yeast cells or cells in which Rlp24 or Nog1 were depleted, showed that Mak11 only associated to pre-60S particles in the presence of Rlp24. Depletion of Mak11 impeded proper maturation of the 27SB rRNA precursors, a phenotype common to many mutants in factors required for nuclear 60S maturation steps. A thermosensitive variant of Mak11 blocked pre-ribosomal particles in the nucleolus of the yeast cells, as demonstrated by the accumulation of Rpl25-GFP. In a high copy suppressor genetic screen we identified RLP24 as the unique suppressor of the *mak11-2* ts phenotype. The MAK11 genetic link with RLP24, their direct *in vitro* binding as well as Mak11 accumulation in Rlp24-associated complexes under mutant conditions suggest that Mak11 is involved in loading Rlp24 on the nascent particles at an early, transient step in 60S ribosomal subunit maturation in the nucleolus.

Putative *S. pombe* (Skb15) or human (hPip1) orthologues of Mak11 were previously described as inhibitors of a p21-activated protein kinase and modulators of cell polarized growth (Xia et al., *Mol Cell* 2001, Kim et al., *PNAS*, 2001). Mammalian protein expression in *S. pombe* showed that these similar proteins were true orthologues (Xia et al.). Even if expression in *S. cerevisiae* of neither Skb15 nor hPip1 allowed complementation of *MAK11* deletion, both proteins concentrated, like Mak11, in the nucleoli of yeast cells. Depletion of *S. pombe* cells for the essential Skb15 protein led to a polysome profile typical for 60S ribosomal subunit biogenesis defects, suggesting the involvement of Skb15 in 60S biogenesis in fission yeast. Functional and physical association data for fission yeast Mak11 homologue thus strongly suggest that Mak11 essential role in ribosome biogenesis was conserved during evolution.

## O4. La poly(A) polymérase GLD-2 est impliquée dans la polyadénylation cytoplasmique dans l'ovocyte de drosophile

Perrine Benoît et Martine Simonelig

Génétique du Développement de la Drosophile, Institut de Génétique Humaine, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5. France.

*perrine.benoit@igh.cnrs.fr*

Une nouvelle classe de poly(A) polymérase cytoplasmiques, appelée GLD-2, a récemment été mise en évidence chez *C. elegans* (Wang et al. 2002. Nature). Comme les poly(A) polymérase canoniques (PAP), les protéines GLD-2 sont capables d'allonger les queues poly(A) *in vitro*. GLD-2 de nématode se lie à l'ARNm par l'intermédiaire d'une protéine à domaines KH, appelée GLD-3. Enfin, les vers mutants pour le gène *gld-2* présentent des défauts pendant la méiose. Les homologues de GLD-2 xénope et mammifères ont récemment été décrits, et contrairement à GLD-2 de nématode, ces protéines interagissent avec la protéine CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein), un facteur important dans la polyadénylation cytoplasmique (Barnard et al. 2004. Cell; Kwak et al. 2004. PNAS; Rouhana et al. 2005. RNA; Nakanishi et al. 2005. Dev. Biol.).

Nous étudions la protéine GLD-2 de drosophile. Nous avons montré que GLD-2 est requise pour l'allongement des queues poly(A) d'ARNm maternels intervenant dans la mise en place des axes de polarité et dans le cycle cellulaire. Nous avons aussi mis en évidence un rôle essentiel de cette protéine au cours de la méiose de drosophile: les femelles homozygotes mutantes pour le gène *gld-2* présentent une létalité embryonnaire de 100%. Des analyses par immunofluorescence montrent que les œufs pondus par ces femelles sont arrêtés à la transition métaphase/anaphase de première division méiotique.

Nos résultats montrent donc un rôle de GLD-2 dans la polyadénylation cytoplasmique au cours du développement précoce chez la drosophile. De plus, cette fonction de GLD-2 est essentielle à la méiose femelle. Les interactions de GLD-2 avec d'autres partenaires du complexe de polyadénylation cytoplasmique sont en cours d'analyse.

## **O5. La protéine CstF-77 cytoplasmique appartient à un complexe de masquage des ARNms avec CPEB dans l'ovocyte de Xénope.**

Rouget Christel, Papin Catherine, Mandart Elisabeth

CRBM, CNRS 1919 route de Mende 34295 Montpellier Cedex 5 Francee

*elisabeth.mandart@crbm.cnrs.fr*

La polyadénylation cytoplasmique est un mécanisme essentiel par lequel est régulée la traduction pendant les phases précoces du développement où il n'y a pas de transcription dépendante de l'ARN polymérase II. Ce mécanisme requiert plusieurs complexes protéiques incluant le facteur CPSF (cleavage and Polydenylation specific Factor) également nécessaire à la polyadénylation nucléaire. Les complexes CPSF et CstF (Cleavage and stimulatory Factor) sont nécessaires pour le clivage de l'ARN pré-messager lors de la polyadénylation nucléaire. Cependant, plusieurs arguments génétiques et de biologie cellulaire suggèrent que la sous-unité CstF-77 a un rôle indépendant de la polyadénylation nucléaire qui pourrait être liée au cycle cellulaire. Dans cette optique, nous avons envisagé un rôle possible de la protéine CstF-77 dans la polyadénylation cytoplasmique et étudié sa fonction dans l'ovocyte de Xénope. Nous avons cloné et identifié la protéine CstF-77 de Xénope et montré qu'elle était majoritairement nucléaire mais qu'elle appartenait aussi à des foyers cytoplasmiques. Dans le cytoplasme, CstF-77 fait partie d'un complexe avec eIF4E, CPEB et XGLD2, mais elle n'est pas requise pour la polyadénylation cytoplasmique. Cependant, l'injection d'anticorps dans des ovocytes induits à la progestérone provoque une accélération de la transition G2/M et une synthèse précoce des protéines Mos, CyclineB1 et Aurora A sans modifier la cinétique de polyadénylation de leurs ARNs messagers. De plus, l'ajout de la protéine CstF-77 dans des lysats de réticulocyte inhibe la traduction *in vitro*.

Ces résultats suggèrent que la protéine CstF-77 est impliquée dans le masquage des ARN messagers avant leur polyadénylation dans le cytoplasme et leur traduction.

## **O6. Dynamique des corps GW et des granules de stress dans les cellules de mammifère**

A. Wilczynska, C. Aigueperse, M. Kress, F. Dautry et D. Weil

Laboratoire des régulations post-transcriptionnelles, Institut André Lwoff, Villejuif, France  
*weil@vjf.cnrs.fr*

Chez les eucaryotes, le métabolisme des ARNm apparaît de plus en plus compartimenté dans le cytoplasme. Les corps GW de mammifères, ou P bodies dans la levure, sont des granules cytoplasmiques qui contiennent l'ensemble de la machinerie de dégradation 5'-3' des ARNm, ainsi que des facteurs régulant la traduction et l'interférence ARN. Plusieurs études ont montré que ces corps constituent des sites de dégradation des ARNm, voire des sites de stockage des ARNm chez la levure. Les granules de stress apparaissent dans les cellules de mammifère en réponse à des stress conduisant à une inhibition générale de la traduction. Ce sont des sites de stockage des ARNm.

CPEB1 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein) est un des régulateurs de la traduction les mieux caractérisés. Selon son état de phosphorylation, il peut soit réprimer l'initiation de la traduction en bloquant le facteur eIF4E via des protéines telles que la maskin ou 4E-T, soit activer la traduction en stimulant l'élongation de la queue polyA, conduisant au recrutement de la PABP (polyA binding protein). Nous avons montré que la protéine CPEB1 s'accumule à la fois dans les corps GW et dans les granules de stress. De plus, son expression suffit à provoquer l'assemblage de granules de stress. Ces granules de stress peuvent fusionner avec les corps GW.

Nous avons développé une approche de vidéomicroscopie 2 couleurs pour explorer la dynamique des corps GW et des granules de stress. Les corps GW sont la plupart du temps immobiles, mais peuvent se déplacer de façon soudaine et dirigée. Malgré certaines protéines en commun, les granules de stress ne s'assemblent pas à partir des corps GW préexistants. Ils sont fréquemment en contact avec des corps GW, mais ces contacts sont réversibles. Les granules de stress, moins mobiles que les corps GW, apparaissent très malléables. Des expériences de FRAP montrent qu'ils échangent rapidement leurs protéines avec le cytoplasme. Ainsi, corps GW et granules de stress sont des structures distinctes, mais fortement connectées, toutes deux dynamiques. Leurs interrelations apparaissent essentielles pour comprendre l'organisation spatio-temporelle de la dégradation et du stockage des ARNm dans les cellules eucaryotes.

## O7. Structure du facteur de démarrage de la traduction eIF2

Yatime Laure (1), Mechulam Yves (1), Blanquet Sylvain (1), Schmitt Emmanuelle(1)

(1) Laboratoire de biochimie, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau cedex.

yves@botrytis.polytechnique.fr

Les facteurs de démarrage de la traduction eucaryote et archéen e/aIF2 sont des protéines G hétérotrimériques ( $\alpha\beta\gamma$ ) chargées d'amener l'ARNt initiateur méthionylé sur la petite sous-unité du ribosome. De plus, e/aIF2 joue un rôle dans la vérification de l'appariement correct entre le codon AUG et l'anticodon de l'ARNt de démarrage. Ce rôle serait lié à l'activité GTPase de e/aIF2. Nos résultats précédents obtenus lors de l'étude de l'hétérotrimère aIF2 de *Pyrococcus abyssi* ont montré que la sous-unité  $\gamma$  forme le cœur qui lie les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . De plus, la résolution de la structure d'aIF2 $\gamma$  montre que cette sous-unité est formée de trois domaines, un domaine de liaison du GTP et deux domaines organisés en tonneaux beta. Cette sous-unité ressemble fortement au facteur d'allongement EF1A. Les résultats biochimiques montrent que la sous-unité gamma seule est capable de lier l'ARNt initiateur méthionylé. Cependant, la sous-unité alpha est nécessaire à l'atteinte de l'optimum d'affinité

Nous avons résolu la structure tridimensionnelle de l'hétérodimère aIF2 $\alpha\gamma$  de l'archée *Sulfolobus solfataricus* lié au Gpp(NH)p-Mg<sup>2+</sup>. La sous-unité  $\gamma$  est en conformation fermée, le domaine G est empilé sur les domaines II et III. Le domaine C-terminal de la sous-unité  $\alpha$  interagit avec le domaine II de la sous-unité  $\gamma$ . Dans la structure de  $\gamma$ , la conformation des régions "switch" impliquées dans la liaison du nucléotide est similaire à celle rencontrée dans le facteur EF1A complexé au Gpp(NH)p-Mg<sup>2+</sup> et au Phe-ARNt<sup>Phe</sup>. La comparaison de la structure d'EF1A à celle de l'hétérodimère aIF2 $\alpha\gamma$  suggère que seule la sous-unité  $\gamma$  est en contact avec l'ARNt. Pourtant, les résultats biochimiques montrent que la sous-unité  $\alpha$  renforce l'affinité de l'ARNt initiateur pour l'hétérodimère. Ainsi, nous proposons un rôle indirect de la sous-unité  $\alpha$  qui pourrait contrôler le positionnement correct des régions switch impliquées dans la liaison du Gpp(NH)p-Mg<sup>2+</sup> et ainsi façonner le site de liaison de l'ARNt initiateur méthionylé.

## **O8. The pathway of HCV IRES-mediated 80S ribosome formation**

**Nicolas Locker, Laura E. Easton and Peter J. Lukavsky**

*MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK.  
locker@mrc-lmb.cam.ac.uk*

Protein synthesis in all cells begins with the recruitment of the small ribosomal subunit to the initiation codon of a messenger RNA, through a complex multi-step process involving numerous protein factors. Internal initiation is an alternative mechanism of translation initiation in eukaryotes. In several viruses and cellular mRNAs, sequence upstream of the coding region forms internal ribosome entry site (IRES) that functionally replaces several eukaryotic initiation factor (eIF) by binding directly to the 40S ribosomal subunit and enabling initiation of translation.

Translation initiation of hepatitis C virus (HCV) mRNA results from internal ribosomal entry. The HCV IRES contains two major RNA domains (II and III). Domain III alone can coordinate the assembly of 48S ribosomal complexes consisting of the 40S ribosomal subunit, eIF3 and the eIF2/GTP/Met-tRNA<sup>Met</sup> ternary complex. Subsequent 80S ribosome formation requires domain II, but its precise role during this process remained elusive. Our previously determined NMR structure of HCV IRES domain II revealed an independently folded IRES subdomain. It contains an apical dynamic hairpin loop, a loop E motif and an asymmetric internal loop at the base, which is responsible for an overall L-shaped conformation (Lukavsky, *Nat Struct Biol*, 2003).

To further investigate the importance of domain II in IRES function, we dissected the role of these structural motifs during 80S ribosome assembly. Using sucrose density gradient centrifugation, we find that deletion of conserved motifs described above, individually or entirely, stalled translation initiation at the 48S stage. Based on Western and Northern blotting and toe-printing analysis of affinity-purified HCV 48S particles (Locker, *RNA*, 2006), we further demonstrate that 48S assembly was proper and complete, and interruption of 80S formation happened further downstream. A domain II deletion mutant of the IRES can efficiently coordinate assembly of 48S complexes with all the required components and with correct codon-anticodon base pairing in the ribosomal P-site. On the other hand, release of eIF2 from the 48S particle is greatly reduced without domain II. We further show that domain II takes an active role in promoting eIF5-induced GTP hydrolysis, as well as eIF2/GDP release from the 48S particle. Finally, we established that the displacement of the remaining factor, eIF3, occurs in a GTP-dependent manner mediated by eIF5B, which couples release of eIF3 and subunit joining event to promote formation of 80S ribosome.

Our results demonstrate that the HCV IRES is a modular, RNA-based initiation factor, which drives both 48S complex and 80S ribosome assembly. Whether this is a general mode of action for other related IRESes will be addressed by discussing our ongoing structural and functional studies of the HCV-like classical swine fever virus domain II.

## O9. Identification par criblage fonctionnel d'aptamères ARN dirigés contre l'IRES du virus de l'hépatite C.

Belair Cédric, Reigadas Sandrine, Chabas Sandrine, Durieu Stéphanie<sup>‡</sup>, Ledan-Schuester Emilie, Toulmé Jean-Jacques.

INSERM U386, Laboratoire de modulation artificielle des gènes eucaryotes, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 BORDEAUX Cedex. <sup>‡</sup> Plateau technique Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac cedex.

*sandrine.reigadas@bordeaux.inserm.fr*

Le virus de l'hépatite C (VHC) présente un génome ARN constitué d'un seul cadre ouvert de lecture, flanqué de régions non codantes, particulièrement conservées, le 5'UTR et le 3'UTR. Ces régions hautement structurées sont essentielles pour la traduction de la polyprotéine et la réplication du VHC. Ainsi, une structure située dans la région 5' non codante appelé IRES (Internal Ribosome Entry Site) interagit avec des facteurs protéiques cellulaires et viraux et permet la traduction du génome viral. La fixation de ligands de haute affinité, spécifiques de ce motif permettrait d'inhiber la traduction de l'ARNv et donc de contrôler la multiplication du virus. Nous avons démontré l'intérêt de synthétiser des aptamères bifonctionnels contre les régions TAR et DIS du VIH-1, inhibiteurs sélectifs de la transcription inverse du génome ARN du VIH-1 (Boucard *et al.*, 2006 *Biochemistry* 45, 1518). L'utilisation d'une banque avec une fenêtre aléatoire de grande taille lors d'un SELEX contre la région 3'X du VHC nous a permis de sélectionner des aptamères bifonctionnels contre les boucles SL1 et SL2 de la 3'X. Un gain d'affinité par rapport aux molécules simples et une inhibition de la réplication du VHC *in cellulo* via le réplicon a pu être récemment décrits dans le laboratoire (Ledan-Schuester *et al.*, soumis).

Nous avons poursuivi cette recherche d'aptamères multifonctionnels. A l'issue d'un SELEX contre l'IRES, la population de candidats sélectionnés a été clonés dans un vecteur rétroviral sous la dépendance d'un promoteur Pol III. La banque rétrovirale ainsi produite a été utilisée pour infecter des cellules Hela exprimant de manière stable la protéine EGFP dont sa traduction est dépendante de l'IRES du VHC. L'expression des aptamères a été vérifiée par RT-PCR. La mesure de fluorescence par cytométrie de flux associée à un trieur (Facs) nous a permis d'isoler une population de cellules exprimant des inhibiteurs potentiels de la traduction du VHC car présentant une diminution de fluorescence. Les aptamères ont été récupérés par PCR sur l'ADN génomique des cellules sélectionnées, clonés et séquencés. L'effet de chaque élément devra être déterminé *in vitro* et *ex vivo* afin d'étudier la spécificité par l'utilisation d'autres IRES, rapporteurs, réplicon ou lignée de cellules Huh7.5.1 productrices de virions (Collaboration M. Ventura, UMR5097 CNRS, Bordeaux).

## O10. L'initiation de la traduction des lentivirus est gouvernée par un mécanisme

### original

Laure Weill, Laurie James, Cécile H. Herbreteau\*, Didier Décimo\*, Théophile Ohlmann\*, et Bruno Sargueil

Centre de Génétique Moléculaire CNRS UPR 2167, 91190 Gif sur Yvette. LaboRetro, \*INSERM U412, Ecole Normale Supérieure de Lyon 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07

*sargueil@cgm.cnrs-gif.fr*

Dans la majorité des cas, la traduction d'un messager eucaryote est initiée par la liaison d'un complexe ribosomal 43S sur la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ARN. Ce complexe migre ensuite jusqu'au codon initiateur où un ribosome fonctionnel est assemblé. Ce mécanisme impose que la région 5' non traduite soit peu structurée et ne contiennent pas de triplet AUG. Lors d'un mécanisme alternatif appelé « Entrée interne des ribosomes », la région 5' non traduite attire directement ou indirectement la sous unité 40S du ribosome sur, ou à proximité du codon initiateur. Les mécanismes moléculaires d'entrée interne des ribosomes semblent être extrêmement variés, mais tous ou presque ont comme point commun de reposer sur la structure de leur région 5' non traduite. La traduction de l'ARN génomique des lentivirus pose un problème théorique puisque leur région 5' non traduite est hautement structurée et est, au cours du cycle viral, le siège de nombreuses interactions indispensables entre autre à la transcription, la réplication et l'encapsidation du virus. Cet encombrement semble peu compatible avec l'étape d'initiation de la traduction quelque soit le mécanisme envisagé (scanning ou entrée interne). La traduction de l'ARN génomique d'HIV-2 conduit à la synthèse de la polyprotéine Gag qui est clivée en trois protéines de structure lors de la maturation virale. Nous avons récemment découvert plusieurs propriétés inédites concernant la traduction de ce gène. Trois isoformes de la polyprotéine Gag sont produites par entrée interne des ribosomes. De manière étonnante, tous les déterminants responsables de la traduction de ces protéines sont situés dans la phase codante c'est à dire en aval du premier codon d'initiation. Plus surprenant encore, il est possible de traduire un gène *gag* débutant directement par l'AUG initiateur alors que la traduction d'un gène "classique" nécessite six à huit nucléotides en amont du codon d'initiation. Contrairement aux autres systèmes décrits cet ARNm se dispense entièrement de 5'UTR. Ces propriétés reposent sur la structure adoptée par les 450 premiers nucléotides de la phase codante. Nous avons depuis peu étendu l'ensemble de ces résultats aux principaux lentivirus, SIV, HIV-1 et FIV. Il semble donc que la traduction des lentivirus soit gouvernée par un mécanisme d'initiation original jusqu'alors inconnu. Nous étudions actuellement le mécanisme moléculaire de l'entrée interne des ribosomes sur ces ARN par une combinaison d'approches ; mutagenèse dirigée, essais *in vivo*, et analyse des complexes ribosomaux par sédimentation sur gradients de sucrose et « toe printing ».



## O11. Régulation de l'expression du gène codant la protéine ribosomique L20 chez la bactérie *Escherichia coli*

Julie Haentjens, Mathias Springer et Claude Chiaruttini

IBPC, CNRS UPR9073, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris  
Julie.Haentjens@ibpc.fr

La protéine ribosomique L20 d'*Escherichia coli* est une protéine essentielle codée par le gène *rplT* de l'opéron IF3. Elle a deux activités. D'une part, elle est indispensable à l'étape précoce de l'assemblage de la sous-unité 50S du ribosome. D'autre part, elle réprime, au niveau de la traduction, l'expression du gène *rpmI* qui se trouve juste en amont de son propre gène et, par couplage traductionnel, l'expression de celui-ci.

La région de l'ARNm nécessaire à ce contrôle, appelée opérateur traductionnel, s'étend sur plus de 400 nucléotides. Il a été montré que la protéine L20 pouvait se fixer à deux sites de cet opérateur: un pseudonœud résultant d'une interaction à longue distance entre deux séquences nucléotidiques de l'opérateur et une structure en tige-boucle irrégulière, située entre les deux séquences formant le pseudonœud. Les deux sites présentent une structure similaire au site de fixation de la protéine à l'ARN ribosomique 23S et tous deux sont essentiels au contrôle.

Le mécanisme par lequel L20 contrôle l'expression du gène *rpmI* repose très probablement sur la compétition entre la protéine L20 et la sous-unité 30S du ribosome pour se fixer à l'ARN messager de *rpmI*. En effet, il a été montré *in vitro* par la méthode de « toeprinting », que la protéine L20 inhibait la formation du complexe ternaire de démarrage de la traduction de l'ARNm de *rpmI*, et qu'elle suffisait à inhiber la formation de ce complexe. Deux *scenarii* peuvent être envisagés *a priori* pour expliquer cette compétition. Dans le premier, le répresseur et la sous-unité 30S se fixent au même site, la fixation de l'un excluant donc la fixation de l'autre (compétition directe). Dans le second, la fixation du répresseur induit un changement de conformation de l'ARNm rendant inaccessible le site de l'ARNm auquel se fixe la sous-unité ribosomique (compétition indirecte).

## **O12. L'autorégulation de l'expression de la protéine ribosomique S1 n'implique pas le motif C-terminal de la protéine.**

Skorski Patricia, Proux Florence, Dreyfus Marc, Hermann-Le Denmat Sylvie.

Laboratoire de Génétique Moléculaire CNRS UMR8541, Ecole Normale Supérieure, Paris,  
France

*skorski@biologie.ens.fr*

L'expression de la protéine ribosomique S1 chez *Escherichia coli* est principalement régulée au niveau traductionnel. Sa traduction est d'une part très efficace, et d'autre part, elle est sujette à une auto-régulation négative exercée par la protéine S1 elle-même.

La protéine S1 est composée de 6 motifs de liaison à l'ARN de type S1 (motifs numérotés R1 à R6). Les deux motifs N-terminaux (R1-R2) sont impliqués dans l'interaction de S1 avec la petite sous unité du ribosome. Les trois motifs suivants (R3-R5) forment les sites de liaison aux ARN (voir (1) pour la structure), mais la fonction du sixième motif demeure inconnue. Il a été proposé que ce motif R6 est responsable de la fixation spécifique à l'ARNm *rpsA* (codant la protéine S1) et donc de l'autorégulation (2).

Les travaux présentés montrent qu'en fait le motif R6 n'est pas responsable de l'autorégulation. Dans un mutant produisant moins de protéine S1, la traduction d'un ARNm rapporteur *TIR rpsA ::lacZ* est fortement déréprimée (par un facteur 3). Le remplacement dans une souche sauvage du gène *rpsA* au chromosome par un allèle tronqué  $\Delta R6$  ne provoque pas cette dérépression de la traduction du rapporteur.

D'autre part, le mécanisme de répression proposé est que trois molécules S1 libres viennent se fixer sur l'ARNm *rpsA*. On peut donc s'attendre à ce qu'une protéine incapable de régulation ne fixe plus l'ARNm *rpsA* avec la même affinité que la protéine sauvage. Or avec des expériences de retard sur gel, on voit que les protéines S1 et S1 $\Delta R6$  se fixent avec une affinité relative similaire à l'ARNm *rpsA in vitro*.

Le rôle du motif R6 n'est donc pas une reconnaissance spécifique de l'ARNm *rpsA* et son autorégulation. Toutefois, la souche S1 $\Delta R6$  présente un ralentissement de croissance, ce qui laisse suggérer que si le motif R6 n'est pas essentiel, il joue un rôle non négligeable dans un mécanisme général de la cellule, probablement la traduction.

1- Subramanian AR. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1983;28:101-42.

2- Boni IR et al. *J Bacteriol*. 2000 Oct;182(20):5872-9.

### **O13. Etude des propriétés structurales et fonctionnelles par RMN de la protéine ribosomale S1, impliquée dans le métabolisme des ARN messagers**

Aliprandi Pascale (1), Sizun Christina (1), Perez Javier (2), Uzan Marc (3) et Bontems François (1)

(1) *Laboratoire ICSN-RMN, Ecole Polytechnique, route de Saclay, 91128Palaiseau, France*

(2) *Synchrotron Soleil, L'Orme des Meurisiens, 91192 Gif sur Yvette, France*

(3) *Institut Jacques Monod, 2 place Jussieu, 75521 Paris Cedex 05, France*

*pascale.aliprandi@icsn.cnrs-gif.fr*

La protéine ribosomale S1 a pour fonction physiologique de permettre l'initiation de la traduction des messagers procaryotes (gram négatif) dont la région Shine-Dalgarno est dégénérée ou absente. Par ailleurs, cette protéine joue aussi un rôle dans le cycle de reproduction d'un certain nombre de bactérie dont le bactériophage T4. Elle seule est en effet indispensable à l'activation de la ribonucléase RegB impliquée dans la transition entre la phase précoce et la phase moyenne du phage. En effet, RegB clive spécifiquement certains de ses messagers au milieu de la séquence GGAG présente dans leur région d'initiation de la traduction.

S1 est la plus grande des protéines du ribosome d'*Escherichia coli*. C'est une protéine modulaire composée de six répétitions d'un motif conservé (F1-F2-F3-F4-F5-F6). Les deux premiers domaines se fixent au ribosome tandis que les quatre autres interagissent avec les ARN. La protéine S1 joue un rôle essentiel dans le démarrage de la traduction et ce rôle est assuré par un fragment situé en C-terminale de la protéine, formé de trois domaines structuraux (F3-F4-F5).

Nous cherchons à savoir si il y a une relation entre le mode de fonctionnement de S1 lors de l'activation de RegB et lors de la reconnaissance par le ribosome. Pour cela, nous avons entrepris d'analyser par Résonance Magnétique Nucléaire l'organisation globale de ce fragment et d'identifier ses zones de contact avec différents ARN. Cette technique permet d'enregistrer des cartes correspondant à de véritables « empreintes digitales » d'une molécule. En effet, chaque signal correspond à un couple proton/azote d'un acide aminé de la protéine étudiée. Toute modification de structure ou d'environnement d'une zone de cette molécule se traduit par un changement sur ces cartes.

Après un important travail de biochimie et de chimie (productions de protéine et synthèses d'ARN), de spectroscopie (mise en place et enregistrements d'expériences RMN) et d'analyse, l'ensemble des signaux du fragment a été identifié. La comparaison de ces signaux avec ceux obtenus sur les domaines isolés (F3, F4 et F5) nous a permis de caractériser les zones de contact entre les domaines et de proposer un modèle d'architecture du fragment. Actuellement, nous commençons à cartographier les régions d'interaction entre le fragment et différents ARN.

## O14. Evidences expérimentales du rôle de la protéine ribosomale S1 durant la *trans*-traduction *in vivo* et *in vitro*.

**Saguy Matthieu<sup>¶</sup>, Gillet Reynald<sup>¶</sup>, Skorski Patricia<sup>†</sup>, Hermann-Le denmat Sylvie<sup>†</sup>,  
Felden Brice<sup>¶</sup>.**

<sup>¶</sup>Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique, UPRES 2311, ERI 6, Faculté de Pharmacie, Rennes, France. <sup>†</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire, UMR 8541, Ecole Normale Supérieure, Paris, France.  
[matthieu.saguy@etudiant.univ-rennes1.fr](mailto:matthieu.saguy@etudiant.univ-rennes1.fr)

Lorsque la traduction bactérienne est bloquée sur un ARN messager (ARNm) incomplet, les ribosomes sont libérés grâce à un mécanisme de contrôle-qualité appelé *trans*-traduction. Ce système requiert le concours d'un partenaire ribonucléique particulier : l'ARN transfert-message (ARNtm), possédant à la fois l'activité d'un ARNt et d'un ARNm. Il agit en présence de plusieurs protéines telles que SmpB, le facteur d'élongation EF-Tu, l'Alanyl ARNt synthétase (AlaRS) et la protéine ribosomale S1.

La protéine S1 est la plus grande protéine du ribosome bactérien. Elle existe sous deux formes : liée au ribosome et libre. Elle est impliquée durant l'initiation de la traduction, mais son rôle pendant la *trans*-traduction est encore débattu (Wower *et al.*, 2000 et McGinness K. E. et Sauer R. 2004).

Afin de mieux comprendre son rôle durant ce mécanisme, nous avons établi deux méthodes d'approche, l'une fait appel à un système de traduction/*trans*-traduction *in vitro* et l'autre à une régulation de S1 *in vivo*.

Les études *in vitro* ont permis d'établir que S1 n'est pas indispensable à la première étape de *trans*-peptidation (transfert de l'alanine porté par l'ARNtm sur la chaîne peptidique bloqué) de la *trans*-traduction mais en revanche elle est essentielle à la traduction du cadre interne de lecture de l'ARNtm. L'étude d'un mutant de la protéine incapable de ce lié au ribosome a permis d'établir que la protéine joue son rôle en solution, en dehors du ribosome. Les études *in vitro* et *in vivo* ont permis de confirmer le rôle essentiel joué par S1 durant la *trans*-traduction. En effet, augmenter ou diminuer le taux d'expression de protéine ribosomale S1 réduit le taux de protéines totales *trans*-traduites.

L'ensemble de ces résultats nous laissent supposer que la protéine S1 permet à l'ARNtm d'adopter une conformation active en solution, en particulier lors de l'étape de traduction de sa séquence codante interne (Saguy *et al.*, en cours de soumission).

McGinness K. E. and Sauer R. T. Ribosomal protein S1 binds mRNA and tmRNA similarly but plays distinct roles in translation of these molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 101: 13454-13459

Saguy M., Gillet R., Skorski P., Hermann-Le Denmat S. and Felden B. Ribosomal protein S1 influences trans-translation *in vivo* and *in vitro*. En cours de soumission

Wower I. K., Zwieb C. W., Guven S. A. and Wower J. Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the *Escherichia coli* ribosome. EMBO J. 2000 19:6612-6621.

## **O15. SmpB forme un échafaudage actif autour de l'ARN<sup>tm</sup> durant le processus de *trans*-traduction**

Gillet Reynald (1), Kaur Sukhjit (2), Li Wen (2), Hallier Marc (1), Frank Joachim (2), Felden Brice (1)

(1) Université de Rennes I, UPRES JE2311, Inserm ERI6 ESPRI Biochimie Pharmaceutique, 2 Avenue du Prof. Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France. (2) Howard Hughes Medical Institute, Health Research, Inc., Wadsworth Center, Empire State Plaza, Albany, NY 12201-0509, USA

*reynald.gillet@univ-rennes1.fr*

**L'ARN transfert-message (ARN<sup>tm</sup>)** est un acide ribonucléique unique, combinant en une seule et même molécule les fonctions d'un ARN de transfert (ARN<sup>t</sup>) et d'un ARN messenger (ARN<sup>m</sup>). Présent au sein de toutes les espèces bactériennes l'ARN<sup>tm</sup> permet, par un mécanisme de contrôle-qualité nommé ***trans*-traduction**, de libérer les ribosomes bloqués sur des ARN<sup>m</sup> problématiques ainsi que de dégrader les peptides incomplets ainsi générés. Une première étude de **cryo-microscopie électronique** d'un ribosome bloqué en présence d'un ARN<sup>tm</sup> nous a permis de visualiser son positionnement ainsi que de préciser le rôle joué par plusieurs partenaires protéiques au cours du démarrage du processus (1). Toutefois, pour des contraintes de résolution, la manière dont l'ARN<sup>tm</sup> reconnaît le site de décodage vide du ribosome problématique n'a pu être précisée. Au cours de cette nouvelle étude nous avons pu confirmer, en accord avec de récentes données biochimiques (2), le rôle clé joué par la petite protéine SmpB dans cette étape précoce. Deux protéines SmpB peuvent se lier simultanément à l'ARN<sup>tm</sup>, formant un solide échafaudage autour de sa portion ARN<sup>t</sup>. L'une des deux protéines est tournée vers la grande sous-unité du ribosome bloqué tandis que l'autre pénètre dans le site de décodage de la petite sous-unité. Ces données confortent un modèle de démarrage de la *trans*-traduction au cours duquel SmpB joue un rôle de sentinelle, fixe les ribosomes bloqués dans leur site de décodage libre, puis construit un échafaudage actif autour de l'ARN<sup>tm</sup> avant de lui permettre d'exercer son action libératrice.

- (1) M. Valle, R. Gillet, S. Kaur, A. Henne, V. Ramakrishnan, J. Frank. Visualizing tmRNA entry into the ribosome. **Science**, 300: 127-130, 2003.
- (2) M. Hallier, J. Desreac, B. Felden. Small protein B interacts with the large and the small subunits of a stalled ribosome during trans-translation. **Nucleic Acids Res.** 34: 1935-43, 2006.

## O16. Structure de l'amidotransférase ARNt dépendante de *Pyrococcus abyssi*

Schmitt Emmanuelle (1), Panvert Michel (1), Blanquet Sylvain (1), Mechulam Yves (1)

(1) Laboratoire de biochimie, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau cedex.

*emma@botrytis.polytechnique.fr*

Dans la plupart des organismes les 20 acides aminés sont directement attachés sur le(s) ARNt(s) qui leur correspond(ent) par une série de 20 aminoacyl-ARNt synthétases (AaRS) distinctes. Cependant, parallèlement à ces voies directes d'amination, il existe dans certains organismes des voies indirectes d'amination. De telles voies sont basées sur l'amination erronée d'un ARN de transfert par une AaRS à spécificité relâchée suivie de la modification de cet ARNt mal aminoacylé par une enzyme spécialisée qui catalyse la production de l'aminacyl-ARNt mature. Ces enzymes sont appelées amidotransférases ARNt-dépendantes.

Chez les archaées et dans beaucoup de bactéries, l'ARNt<sup>Gln</sup> est tout d'abord mal aminoacylé par une glutamyl-ARNt synthétase. Dans une deuxième étape, le Glu-ARNt<sup>Gln</sup> formé est maturé en Gln-ARNt<sup>Gln</sup> grâce à l'action d'une amidotransférase glutamyl-ARNt<sup>Gln</sup> dépendante. Nous avons résolu la structure 3D de l'amidotransférase ARNt dépendante, GatDE de *Pyrococcus abyssi*. Cette structure, affinée à 3.0 Å de résolution, révèle une organisation de l'enzyme en tétramère avec deux molécules de GatD qui forment le cœur de l'enzyme et deux molécules de GatE situées à la périphérie. Le repliement de GatE est nouveau. Il ne peut pas être relié à celui d'autres enzymes impliquées dans la liaison des ARNt. Le repliement de GatD ressemble à celui des L-asparaginases. Le site de liaison du donneur de groupement ammonium est situé au sein de GatD alors que le site de liaison de l'ARNt est situé au sein de GatE. Ces deux sites actifs sont distants de plus de 40 Å. L'hypothèse d'un transit du groupement ammonium via un canal reliant le site de GatD à celui de GatE est proposée. Finalement, la comparaison de la structure de GatD aux structures des L-asparaginases suggère que la réaction globale catalysée par GatDE est contrôlée par le mouvement d'une région en épingle à cheveux qui porte un résidu thréonine crucial pour l'activité de l'enzyme.

## O17. Identification d'une nouvelle classe de ligands fluorescents d'ARN présentant une activité antibiotique de type aminoglycoside

Maurice Frédérique (1), Bégis Guillaume (2), Florence Chung (2), Carine Tisé (1), Dardel Frédéric (1), Micouin Laurent (2)

(1) Cristallographie et RMN biologique, UMR 8015, Université Paris 5, Paris, France  
*frederique.maurice@univ-paris5.fr*

(2) Chimie Thérapeutique, UMR 8638, Université Paris 5, Paris, France

Les aminoglycosides sont une classe importante d'antibiotiques utilisés pour le traitement des infections nosocomiales sévères en milieu hospitalier. Ils agissent sur la fidélité de traduction au niveau du site A de l'ARN ribosomique 16S bactérien. L'apparition préoccupante de résistances chez les pathogènes nécessite le développement de nouvelles molécules actives.

La déoxystreptamine (DOS), cycle central des aminoglycosides, est considérée comme le motif minimal nécessaire à la reconnaissance des aminoglycosides par le site A de l'ARN 16S. La plupart des recherches de ligands d'ARN se base donc sur l'utilisation de la DOS comme châssis moléculaire central, mais la synthèse de ces composés est particulièrement longue et délicate, ce qui a jusqu'ici limité le développement de nouveaux composés. Notre étude se base sur l'utilisation d'un nouveau châssis comme mime de la DOS. Cette molécule non-glycosidique est plus simple d'accès et plus facilement fonctionnalisable. Une bibliothèque de dérivés ciblant l'ARN a ainsi été synthétisée.

Nous avons utilisé la RMN à flux continu robotisé pour réaliser un criblage de ces différents composés. Nous avons réalisé un criblage différentiel sur l'ARN 16S et sur l'AAC(6'), une enzyme de modification des aminoglycosides responsable de 70 à 80% des résistances observées en milieu hospitalier. Cette stratégie nous a permis de sélectionner un composé présentant une activité antibiotique échappant à la résistance enzymatique. Il présente des propriétés de liaison spécifique à l'ARN 16S et d'inhibition de la traduction comparable à celle de la néamine dont il est l'analogue. Son mode de liaison à l'ARN a été caractérisé structuralement par RMN.

De manière remarquable, ce produit présente une forte fluorescence bleue, sensible à la liaison à l'ARN 16S, ce qui permet d'envisager son utilisation dans des tests de criblage à haut débit de nouveaux composés anti-infectieux.

## **O18. Crystal structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand**

Thore Stéphane (1), Leibundgut Marc (1) Ban Nenad (1)

(1) ETH Zurich, Swiss Federal Institute of Technology, Institute of Molecular Biology and Biophysics, HPK building, CH-8093 Zürich, Switzerland  
*thores@mol.biol.ethz.ch*

In bacteria and in eukaryote, a new level of gene expression regulation has recently been demonstrated. It is based on genetic elements located in the 5' or 3'-untranslated region of several mRNAs encoding proteins used to synthesize essential metabolites such as thiamine pyrophosphate (TPP). These specific sequences, called riboswitches, are composed of two domains, a metabolite-binding domain and a gene expression platform [1]. Metabolite binding to the riboswitch turns it “off” and promotes structural rearrangement of the riboswitch that influences gene expression through, for example, early transcription termination, decrease of translation, or intron splicing [2, 3].

We present the crystal structure of the eukaryotic *Arabidopsis thaliana* TPP specific riboswitch in complex with its natural ligand. The riboswitch specifically recognizes the TPP via conserved residues in the bulges of two highly distorted parallel sensor helices such that its pyrimidine ring stacks with bases of one helix while its pyrophosphate group interacts with the second sensor helix. These interactions induce new tertiary interactions leading to the stabilization of a “switch” helix. Analyzing the complex fold of the RNA in light of the biochemical data on several functional mutants suggests a mechanism for the sequence of folding events that turn the riboswitch to its “off” state and explains the mechanism of resistance to the antibiotic pyrithiamine. The structure provides an excellent starting point for structure-based *in vivo* and *in vitro* experiments aimed at studying the mechanism of TPP riboswitch based regulation of gene expression in general.

[1] Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R. *Nature* **2002**, *419*, 952.

[2] Winkler, W. C.; Breaker, R. R. *ChemBiochem*. **2003**, *4*, 1024.

[3] Sudarsan, N. J.; Barrick, E.; Breaker, R. R. *RNA* **2003**, *9*, 644.



## O19. Un nouvel axe pour la trans-traduction : structure du pseudo-noeud PK1 de l'ARNtm.

Nonin-Lecomte Sylvie (1), Felden Brice (2), Dardel Frédéric (1)

(1) Université René Descartes Paris V - Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, CNRS UMR 8015, 4 av. de l'Observatoire – 75006 Paris France

*sylvie.nonin@univ-paris5.fr*

(2) Université de Rennes I, UPRES JE2311, Inserm ESPRI ERI6, Rennes, France

Certains ARNs messagers sont défectueux (par exemple absence de codon stop). Chez les bactéries, la traduction de ces messagers provoque le blocage des ribosomes, et par suite une véritable panne de la traduction. Sans le déclenchement d'un mécanisme de secours adéquat, cette panne se révélerait fort délétère pour la cellule. La trans-traduction permet le déblocage et le recyclage des ribosomes. Au cours de ce processus, l'ARNtm (environ 360 nucléotides) complexé aux protéines SmpB et EF-Tu.GTP, se lie au ribosome. Il possède une partie ARN de transfert (tRNA Like Domain ou TLD) ainsi qu'une partie messenger interne (iORF) qui lui permettront de se substituer aux ARNt et aux messagers défectueux. En particulier, au cours de la trans-traduction, le TLD s'accommodera dans la grande sous-unité 50S, et le ribosome se transloquera du messenger défectueux vers le messenger interne de l'ARNtm. Une traduction "classique" reprendra à partir de l'iORF de l'ARNtm. Les polypeptides interrompus en cours de synthèse seront marqués d'une étiquette encodée par l'iORF les dirigeant vers le dégradosome.

La structure secondaire de l'ARNtm peut se voir grossièrement comme une grande boucle portant des blocs structuraux bien particuliers : un TLD dont la structure proche d'un ARN de transfert a été résolue par cristallographie en complexe avec SmpB (1), et 4 pseudonoeuds (PK1-PK4). Le seul pseudonoeud essentiel à la trans-traduction est PK1. Sa fonction demeure inconnue. Les images issues de la cryo-EM nous montrent l'étape de préacommodation de cette grande boucle sur le ribosome (2), et un PK1 proche du canal d'entrée de la sous-unité 30S du ribosome. Cependant, un grand nombre de questions demeure. Par exemple, bien que des modèles aient été proposés, on ignore encore comment, en début de trans-traduction, le ribosome glisse ou saute d'un messenger à l'autre, et comment il se repositionne ensuite correctement sur le codon de reprise de l'iORF. Le voyage ultérieur de l'ARNtm entre les deux sous-unités du ribosome n'est topologiquement pas non plus évident.

Nous présentons ici la structure en solution du PK1 d'*Aquifex aeolicus* (3). Composé de seulement 21 nucléotides, c'est le plus petit pseudonoeud connu à ce jour et dont la structure ait été résolue. Malgré sa petite taille, il est extrêmement stable. Les caractéristiques structurales du PK1 le font entrer dans la catégorie des pseudonoeuds de décalage de cadre de lecture programmée (frameshift). Ce résultat suggère pour PK1 un rôle central au sens mécanique du terme lors de la dynamique du processus à l'échelle moléculaire.

(1) Gutmann,S., Haebel,P.W., Metzinger,L., Sutter,M., Felden,B. and Ban,N. (2003) Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature*, 424, 699-703.

(2) Valle, M., Gillet, R., Kaur, S., Henne, A., Ramakrishnan, V. and Frank, J. (2003) Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science*, 300, 127-130.

(3) Nonin-Lecomte S, Felden B, Dardel F. (2006) NMR structure of the Aquifex aeolicus tmRNA pseudoknot PK1: new insights into the recoding event of the ribosomal trans-translation. *Nucleic Acids Res.* 34,1847-53.

## **O20. Aminoglycoside binding to HIV-1 DIS RNA kissing-loop complex: from crystals to cells**

Eric Ennifar (1), Jean-Christophe Paillart (1), Roland F (1), Philippe Dumas (1)

(1) Architecture et réactivité des ARN, CNRS UPR 9002, Strasbourg, France

*e.ennifar@ibmc.u-strasbg.fr*

All retroviral genomes consist in two homologous single stranded RNAs linked near their 5' ends. HIV-1 Dimerization Initiation Site (DIS) is a strongly conserved stem-loop in the 5' region of the genomic RNA. It was shown *in vivo* that alteration of the DIS strongly reduces viral infectivity. We have previously solved crystal structures of the DIS kissing-loop complex [1], [2]. Analysis of these crystal structures revealed an unexpected resemblance between the DIS kissing-loop and the 16 S ribosomal aminoacyl-tRNA site (A-site), which is the target of aminoglycoside antibiotics. We have shown that some aminoglycosides specifically bind to the DIS kissing-loop complex with an affinity and geometry similar to that observed in the A-site [3].

In agreement with these previous results, we have now solved crystal structures of the DIS kissing-loop complex bound to four aminoglycosides: neamine, ribostamycin, neomycin and lividomycin solved at 1.8 to 2.2 Å resolution. Electron density maps are of excellent quality, revealing most of the RNA and drug hydration. These structures show that two aminoglycosides are bound per kissing-loop complex and strongly stabilize the loop-loop interaction. In spite of the difference in topology with the ribosomal A-site, the DIS loop-loop complex is specifically recognized by the antibiotic. Rings 1,2 and 3 of aminoglycosides are required for specific recognition, whereas rings 4 and 5, interacting through non-specific contacts, are required to improve the affinity. Importantly, the binding was also observed by chemical probing in infected cells and in viral particles, showing that the DIS remains accessible to these drugs *in vivo* and is therefore a valuable new viral target. These structures provide an excellent starting point for designing potential new drugs targeted against the viral RNA.

[1] Ennifar E. *et al*, Nature Structural Biology (2001).

[2] Ennifar E. & Dumas P., Journal of Molecular Biology (2006).

[3] Ennifar E. *et al*, Journal of Biological Chemistry (2003).

## **O21. L'ARN recombinant, une stratégie de production à grande échelle d'ARN de structures variées pour des études structurales, fonctionnelles et pharmacologiques.**

Luc Ponchon et Frédéric Dardel

*LCRB-UMR8015 4 avenue de l'observatoire 75270 PARIS*

[Luc.ponchon@univ-paris5.fr](mailto:Luc.ponchon@univ-paris5.fr)

Nous avons mis au point une méthode originale permettant de produire et de purifier de grandes quantités d'ARN de structures très variées. C'est une méthode simple de mise en œuvre, de portée très générale et de faible coût. Elle est fondée sur une stratégie de production *in vivo*, au moyen de micro-organismes recombinants. L'ARN obtenu est de longueur homogène et échappe à l'hydrolyse par les ribonucléases cellulaires.

Un système d'étiquettes de purification peut y être associé et une méthode de coupure a été mise au point pour libérer l'ARN d'intérêt de l'étiquette. Ceci permet en particulier la purification en une étape à partir d'extraits complexes. Plusieurs exemples seront présentés où ont été exprimés différents ARN comme des fragments d'ARN viraux, d'ARN ribosomique ou d'aptamères. La fonctionnalité des ARN produits est conservée et a été vérifiée dans les extraits cellulaires et/ou après purification.

Les rendements obtenus sont importants (>10 mg/L de culture) et les ARN purifiés obtenus sont utilisables pour les études structurales, permettant d'obtenir des cristaux et/ou des spectres RMN de qualité, ainsi que pour des études biochimiques d'interaction ou encore des études pharmacologiques de criblage de ligands spécifiques.

**O22. Modélisation moléculaire d'un système à ribozymes siamois dans l'élément génétique codant pour l'endonucléase I-DirI chez *Didymium iridis*. Bertrand Beckert<sup>1,2,3</sup>, Steinar Johansen<sup>2,4</sup>, Eric Westhof<sup>1</sup>, Benoît Masquida<sup>1\*</sup>**

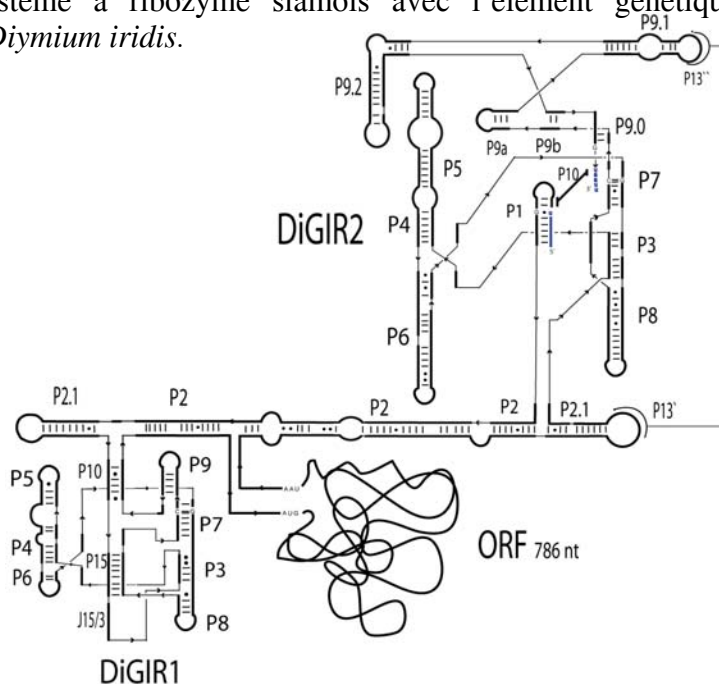
<sup>1</sup>Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR9002, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire-CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France ; <sup>2</sup> Department of Molecular Cell biology, Institute of Medical Biology, University of Tromsø, N-9037 Tromsø, Norvège ; <sup>3</sup> Department of Medical Biochemistry and Genetics, Panum Institute, University of Copenhagen, Blegdamsvej 3C, Danemark ; <sup>4</sup> Norwegian Institute of Gene Ecology, MH building, N-9037 Tromsø, Norvège.

[\\*b.masquida@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:b.masquida@ibmc.u-strasbg.fr)

Les protistes du genre *Didymium* et *Naegleria* possède un élément génétique transposable dans leur ADN ribosomique extrachromosomique. Cet élément qui est inséré dans le gène de l'ARN 18S, contient deux ribozymes siamois. Il se compose d'un ribozyme dérivé d'un intron de groupe I (GIR1) suivi d'un intron de groupe I classique (GIR2). GIR1 est inséré dans le domaine P2 ou P6 de GIR2 chez *Didymium* ou *Naegleria*, respectivement. La jonction entre les deux ribozymes comprend également un cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour l'endonucléase voyageuse I-DirI (HEG : Homing Endonuclease Gene). En phase de reproduction, I-DirI coupe le génome au niveau de son site d'insertion lorsque son gène n'est pas encore présent. Puis, la coupure est réparée par conversion génique, en utilisant le gène de l'ARN 18S intégrant la construction à ribozymes siamois (GIR1-ORF-GIR2) comme matrice. Ainsi, l'élément génétique est transmis aux amibes haploïdes qui ne le contenaient pas jusqu'à présent. L'ARN résultant de l'épissage par GIR2 se compose de l'intron GIR2 dans lequel est inséré GIR1 et l'ORF. En se repliant, GIR1 libère l'extrémité 5' de l'ORF par une unique réaction de transestérification impliquant la formation d'un lariat (équivalent au lariat formé suite à la première étape réactionnelle chez les introns de groupe II) constitué par un nucléotide immédiatement en aval de GIR2 dont les groupements O2' et O3' sont liés à deux groupements phosphates distincts. Ce lariat protège l'extrémité 5' de l'ORF de la dégradation.

Ce système à ribozymes siamois pose de nombreuses questions sur la régulation et le contrôle de l'épissage et de l'expression de l'endonucléase voyageuse I-DirI. Afin de mieux comprendre les bases moléculaires des réactions orchestrées par ces deux ribozymes travaillant en synergie, nous avons choisi : i) d'élucider leur organisation structurale et leur architecture par modélisation moléculaire ; ii) de rationaliser les données de mutagenèse et de cartographie en solution dans un modèle tridimensionnel. Nous présentons les modèles que nous avons obtenus pour ces ribozymes.

**Figure :** Vue du système à ribozyme siamois avec l'élément génétique codant pour l'endonucléase chez *Didymium iridis*.



## **O23. Alternative Polyadenylation as a Tool for miRNA and Target Detection**

Ritchie William (1), Legendre Matthieu (1), Lopez Fabrice (1), Victorero Genevieve (1), Cardinaud Bruno (2), Barbry Pascal (2), Gautheret Daniel (1)

(1) INSERM ERM 206, Université de la Méditerranée, Marseille, France

(2) CNRS UMR6097, Sophia Antipolis, France

*gautheret@esil.univ-mrs.fr*

Alternative polyadenylation sites produce transcript isoforms with 3' untranslated regions (UTRs) of different lengths. If a microRNA (miRNA) target is present in the UTR, then only those target-containing isoforms should be sensitive to control by a cognate miRNA. We carried out a systematic examination of 3' UTRs containing multiple poly(A) sites and putative miRNA targets [1]. Based on EST counts and library analysis, we observed that levels of isoforms containing targets for miR-1 or miR-124, two miRNAs causing downregulation of transcript levels, were reduced in tissues expressing the corresponding miRNA. This analysis was repeated for all conserved 7-mers in 3' UTRs, resulting in a selection of 312 motifs. We show that this set is significantly enriched in known miRNA targets and mRNA-destabilizing elements, which validates our initial hypothesis. We scanned the human genome for possible cognate miRNAs and identified phylogenetically conserved precursors matching our motifs. This analysis can help identify target-miRNA couples that went undetected in previous screens, but it may also reveal targets for other types of regulatory factors. We will present preliminary experimental validations of novel miRNAs identified through this method.

[1] Legendre M, Ritchie W, Lopez F, Gautheret D (2006) Differential Repression of Alternative Transcripts: A Screen for miRNA Targets. PLoS Comput Biol 2(5): e43

## **O24. Contribution de l'ARNtm au cours de la croissance et de la différenciation cellulaire, de la réplication de l'ADN et dans la réponse aux stress chez *Sinorhizobium meliloti***

Vincent M. Ulvé, Angélique Chéron, et Frédérique Barloy-Hubler.

CNRS UMR6061 Génétique et Développement, Université de Rennes 1, Groupe Modèles Génétiques, IFR140 GFAS, Faculté de Médecine, 2 avenue du Pr. Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France.

*vincent.ulve@univ-rennes1.fr*

L'ARNtm (*ssra*) est le seul petit ARN régulateur annoté dans le génome de *Sinorhizobium meliloti*, ceci par homologie avec le gène *sra* de *Bradhyrhizobium japonicum*. Sa fonction est généralement associée aux mécanismes de trans-translation : mécanismes par lesquels l'ARNtm vient débloquent un complexe ribosome / ARN messager défectueux, tout en initiant la dégradation du polypeptide partiellement traduit.

Nous proposons ici une première caractérisation biologique de cet ARN chez *S. meliloti* : bactérie modèle du sous-groupe 2 des alphaprotéobactéries. On y trouve un ARNtm dont la maturation passe par un clivage en deux parties. Celles-ci montrent une très grande stabilité (>60 minutes), contrairement à la forme pré-mature. La cartographie précise des extrémités appelle à proposer une structure secondaire originale, applicable à toutes les bactéries du sous-groupe 2 (*Agrobacterium*, *Brucella*, *Bartonella*...) mais divergente de la structure admise pour *Caulobacter crescentus*. Dans cette nouvelle conformation, tous les pseudonœuds sont substitués par des structures en tiges boucles et le "bras D" semble être modifié.

Une étude transcriptionnelle montre que cet ARNtm est important dans la différenciation cellulaire, dans la réponse aux stress et durant la croissance. Son importance biologique dans l'adaptation de la cellule à l'état sauvage et sa différenciation est discutée. Nous montrons aussi que la quantité d'ARNtm chez *S. meliloti* est dépendante de la réplication de l'ADN. Enfin, un nouveau schéma est proposé pour illustrer le taux d'expression durant la vie libre et la symbiose. Un lien entre l'ARNtm et le basculement entre l'état viable non cultivable (VBNC) et viable cultivable (VC) est alors proposé.

## **O25. SwS: a solvation web service for nucleic acids**

Hashem Yaser, [Auffinger Pascal](#)

IBMC/CNRS – UPR9002 – ARN : Architecture et Réactivité des ARN

15 rue René Descartes – 67084 Strasbourg Cedex, France

[p.auffinger@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:p.auffinger@ibmc.u-strasbg.fr)

Les biomolécules sont très fortement dépendantes des conditions environnementales qu'elles rencontrent. Ainsi, le solvant, en fonction de la qualité et de la quantité des espèces ioniques qu'il contient peut modifier de manière significative la structure et la réactivité des acides nucléiques. Au niveau des phénomènes de reconnaissance moléculaire, les divers ligands approchant les acides nucléiques perçoivent la structure de la première couche de solvation avant d'établir des contacts directs avec le soluté. Ainsi, une connaissance approfondie de la structure de la première couche de solvation des acides nucléiques est primordiale et peut-être obtenue grâce à une analyse détaillée des très nombreuses structures cristallographiques déposées dans la NDB (Nucleic acid DataBase). Toutefois, une analyse statistique de ces structures est très coûteuse en temps et loin d'être triviale. C'est pourquoi nous avons développé une interface à la NDB, nommé SwS (Solvation web Service) qui a pour but de permettre une analyse statistique interactive rapide et précise de la première couche de solvation d'un grand nombre de fragments structuraux élémentaires constituant les ADN et les ARN. Une première version de ce service internet permet d'analyser la structure de la première couche de solvation des 33 appariements de bases (impliquant une ou deux liaisons hydrogène interbases) telles qu'elles ont été classifiés par Leontis et Westhof. Ainsi, il est possible de sélectionner un sous-ensemble de paires de bases en fonction des critères suivants : (i) nature ARN ou ADN de chaque nucléotide ; (ii) plissement de chacun des sucres ; (iii) conformation SYN ou ANTI de chaque nucléotide ; ... et de calculer, à partir de ces sous-ensembles, les positions les plus probables des atomes de solvant (atome d'oxygène des molécules d'eau ; cations mono- et divalents ; anions). Les applications de ce service internet sont nombreuses et résident en particulier dans une meilleure compréhension de la solvation des acides nucléiques qui devrait permettre, à terme, de mieux interpréter les nombreux résultats expérimentaux actuellement disponibles.

## O26. MicroRNA – their identification and functional analysis

Vera Atzorn, Vilanova, D., Delfour, O. and Bernard Michot

Actigenics S.A., 10 avenue de l'Europe, 31520 Ramonville St-Agne  
vera.atzorn@actigenics.com

MicroRNA represent a class of small non-coding RNA (~22 nt long) playing key roles in the post-transcriptional regulation of gene expression. They are involved in biological processes such as cell-proliferation, differentiation, and apoptosis. Moreover they are strongly linked to human diseases such as viral infections, human cancers and neurodegenerative diseases. MicroRNA are supposed to regulate the expression of over 30% of coding genes in human cells by binding to the 3'UTR and thereby downregulating the translation of the target mRNA. To date 462 human microRNA have been identified but scientists estimate that this does not even represent a third of the actual number of total miRNA. Unfortunately, the vast majority of microRNA is tissue specific and temporally expressed at low level and their precise function difficult to discern due to the character of the miRNA-mRNA interaction that mediates translational repression. These features considerably hamper detection of novel microRNA and analysis of microRNA function with conventional laboratory methods. We developed a novel bioinformatics tools that allow prediction of miRNA candidates in different eukaryotic genomes and first step functional analysis of miRNA and their targets. The prediction tool combines phylogenetic conservation and structure prediction in order to identify novel miRNA candidates and allowed the identification of over 1500 potential new miRNA sequences within the human genome. 409 out of these miRNA candidates were tested using highthroughput microarray experiments to monitor microRNA expression profiles in different human tissues and 88 novel miRNA candidates were validated.

Accurate bioinformatics prediction of microRNA targets in animals is particularly challenging because of the “weak” rules controlling the microRNA-mRNA base-pairing interactions. We have developed a methodology able to select those targets which could have biological significance from a raw target list. Our strategy consists in a “functional clustering” of microRNAs, which does not depend on their sequence conservation. Instead it is based on the functional classification of potential miRNA targets based on Gene Ontology. A subsequent statistical treatment led to the elimination of non-significant microRNA-GO term associations on the basis of a p-value. Next, we have calculated a “functional distance” matrix between each pair of microRNAs according to the similarities in their associated GO terms. Finally, we produced a microRNA tree describing the functional relationships between different microRNAs. Our function-based filter appears as an accurate approach to identify the set of microRNAs acting in combination on a definite biological function as well as to detect biological significant targets for each of these microRNAs among hundreds of “raw” targets proposed from methods not including functional clustering of potential targets.



## O27. Biopolymer Chain Elasticity, BCE, une nouvelle approche de modélisation de l'ARN et de l'ADN

Guillaume P. H. Santini,<sup>a</sup> Christophe Pakleza,<sup>b</sup> et Jean A. H. Cognet,<sup>a,\*</sup>  
[cognet@ccr.jussieu.fr](mailto:cognet@ccr.jussieu.fr)

(a) Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Cellulaire et Tissulaire, UMR 7033 CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Genopole Campus 1, RN7, Evry 91030, France. (b) Institute of Biochemistry and Biophysics, P.A.S., Pawlinskiego 5a, 02-106 Warszawa, Pologne.

Les structures en épingles à cheveux sont après les doubles hélices les motifs structuraux les plus importants dans l'ADN et l'ARN, aussi bien sur le plan de la reconnaissance moléculaire que de la fonction. Elles sont formées d'une seule chaîne d'acide nucléique comportant deux séquences auto-complémentaires se structurant en double hélice («la tige»), reliées par une séquence de quelques nucléotides mésappariés ou non appariés («la boucle») qui ferme une extrémité de la double hélice.

L'approche BCE (Biopolymer Chain Elasticity) est une nouvelle méthodologie de modélisation moléculaire que nous développons d'un point de vue théorique et informatique. BCE assimile le squelette de la chaîne polymérique de l'ADN ou de l'ARN (*i.e.* la chaîne sucre-phosphate) à un fil flexible déformable au moyen de la théorie de l'élasticité. Elle est la première méthode qui rend compte avec succès de la déformation globale de structures biomoléculaires complexes (ADN ou ARN) tout en conservant une description à l'échelle atomique. Il est possible de calculer complètement les structures d'épingles à cheveux d'ADN (TTT sans appariement), ou de boucles d'ADN ou d'ARN présentant un « mésappariement » (-AAA-, -GCA- et -GTTA- d'ADN, et -UUCG- d'ARN) avec un petit nombre de degrés de liberté (cf. Pakleza et Cognet (2003) NAR, **31**, 1075-85; Santini *et al.* (2003) NAR, **31**, 1086-96).

BCE est fondée sur deux concepts simples : 1./ physique : le squelette des acides nucléiques (AN) se comporte comme un fil flexible, 2/ mathématique : le squelette peut être représenté par une ligne 1-D dans un espace 3-D à partir de laquelle les nucléotides peuvent être orientés indépendamment.

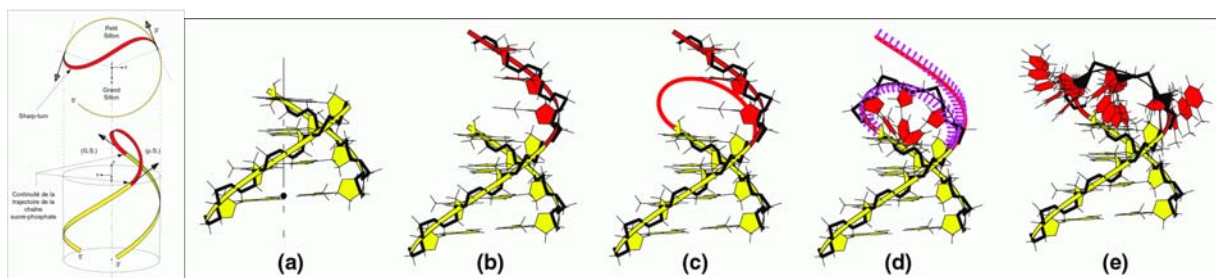


Figure des étapes de construction utilisées par BCE Le squelette est en rouge ou jaune : 1/ Calcul de la trajectoire 3-D de la ligne élastique en rouge à partir des conditions de raccord définies par la tige en double hélice en jaune (1a). 2/ Déformation globale du simple brin ADN ou ARN en rouge (1b), sur la ligne élastique rouge (1c), au moyen d'un transport qui conserve la géométrie locale en violet (1d). 3/ Optimisation des rotations des nucleosides autour de la ligne élastique. Ces rotations sont nécessaires pour retrouver les conformations observées expérimentalement. 4/ Minimisation d'énergie pour restaurer les longueurs et les angles de liaisons atomiques.

Nous sommes parvenus à reconstruire, et donc à fournir une explication rationnelle pour ces structures d'ADN ou d'ARN en épingle à cheveux résolues par RMN, et/ou disponibles dans la PDB. Ces résultats montrent que l'approche BCE :

1. décrit au moyen d'une théorie conceptuellement simple (déformation continue d'un simple brin hélicoïdal) et d'un nombre réduit de paramètres conformationnels la structure des boucles d'AN.
2. met en évidence une caractéristique d'élasticité mécanique des squelettes de courtes chaînes d'AN.
3. peut prédire *ab initio* la trajectoire du squelette de certaines boucles de bio-polymères.
4. unifie le cadre théorique de modélisation et de description des boucles d'ADN et d'ARN : les différences de structures des boucles proviennent principalement de la différence de géométrie des hélices (B pour l'ADN et A pour l'ARN) qui les supportent.

## O28. La protéine Vif du VIH-1 : fixation à l'ARN et propriétés de chaperon de l'ARN

Henriet Simon, Bernacchi Serena, Mercenne Gaëlle, Richer Delphine, Paillart Jean-Christophe & Marquet Roland

Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002 du CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex. R.Marquet@ibmc.u-strasbg.fr

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), responsable du SIDA, code pour plusieurs protéines dites « auxiliaires ». Parmi celles-ci, Vif (Virion Infectivity Factor) est une protéine basique de 24 kDa indispensable à la réplication du virus dans certaines lignées cellulaires du système immunitaire qui sont ses cibles principales. Vif possède plusieurs fonctions. Elle contre l'effet antiviral des cytosines désaminases cellulaires APOBEC-3F et APOBEC-3G, principalement en induisant leur dégradation par le protéasome. Par ailleurs, elle interagit avec le Gag, le précurseur des protéines structurales du virion, et l'ARN génomique lors de l'assemblage des particules virales. L'absence de Vif à ce moment conduit à une maturation et une décapsidation aberrantes des particules virale qui résultent en un défaut des étapes précoces de la rétro-transcription.

Afin de mieux comprendre les fonctions de Vif, nous avons étudié sa fixation à des fragments d'ARN génomique par une vaste panoplie de techniques biochimiques et biophysiques. Nous avons montré que Vif se fixe de façon préférentielle et coopérative à la partie 5' du génome (nucléotides 1 à 1500). A l'intérieur de cette région, nous avons identifié et caractérisé deux sites de haute affinité pour Vif. L'un est situé dans la boucle apicale de la région transactivatrice de la transcription (TAR), tandis que l'autre est une courte région en simple brin localisée dans le gène *gag*. Des études de fluorescence montrent que les  $K_d$  de Vif pour ces régions sont de 10 et 20 nM, respectivement. Contrairement à la fixation de la protéine de nucléocapside (NCp) issue de la maturation de Gag, la fixation de Vif est peu sensible aux sels, si bien que, *in vivo*, Vif est vraisemblablement plus affine pour l'ARN génomique du VIH-1 que la NCp. De plus, Vif lie également certains ADN avec une haute affinité, ce qui pourrait conférer une protection directe contre les facteurs APOBEC-3F/3G.

Pour comprendre le rôle de Vif dans les étapes précoces de la rétro-transcription, nous avons étudié son rôle dans l'hybridation de l'ARN<sup>Lys,3</sup> servant d'amorce à l'ARN génomique, la synthèse de l'ADN strong-stop (-), et le premier transfert de brin. Ces expériences ont été menées en présence et en absence de NCp qui par son activité de chaperon de l'ARN stimule l'hybridation de l'ARN<sup>Lys,3</sup> et le premier transfert de brin. En absence de NCp, Vif favorise non seulement l'hybridation de l'ARN<sup>Lys,3</sup> sur un fragment d'ARN génomique du VIH-1 contenant le PBS (Primer Binding Site), mais aussi la formation de l'ADN strong-stop (-), ce qui indique que les hybrides formés par Vif sont fonctionnels. De plus, Vif stimule le premier transfert de brin en présence d'un ARN accepteur correspondant à la région 3'-terminale de l'ARN génomique du VIH-1. Ces résultats indiquent que Vif possède des propriétés de chaperon de l'ARN. De plus, elle module l'activité de la NCp. En présence de NCp, Vif a des effets synergiques qui sont modulés par la concentration en protéine Vif et par l'état de maturation du précurseur de la NCp (NCp7, p9 et p15). Alors que de faibles concentrations de Vif stimulent la formation d'ADN strong-stop (-) et le premier transfert de brin, surtout en présence de NCp15, de fortes concentrations de Vif ont des effets inhibiteurs sur les activités de chaperon de la NCp. Vif se distingue aussi de la NCp par son effet inhibiteur sur la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1, alors que la NCp favorise ce processus. Ces propriétés suggèrent que Vif joue un rôle majeur en tant que régulateur de la NCp.

## **O29. Vers une thérapie génique de l'amyotrophie spinale par correction de l'épissage de *SMN2***

Julien Marquis, Kathrin Meyer, Rafael Scholl et Daniel Schümperli  
Institute of Cell Biology, University of Bern, Baltzerstrasse 4, 3012 Bern  
[julien.marquis@izb.unibe.ch](mailto:julien.marquis@izb.unibe.ch)

Avec près de 1 naissance sur 6'000, les amyotrophies spinales (SMA pour spinal muscular atrophy) sont des causes majeures de mortalité infantile parmi les maladies génétiques. Elle se caractérise par une dégénération de certains motoneurons conduisant à une faiblesse musculaire généralisée. Le gène responsable, *SMN1* (pour survival of motor neurons 1), est soit délété soit muté, et ne peut alors plus assurer la production de la protéine SMN. Celle-ci joue un rôle essentiel dans la biogenèse des snRNP, de petits ARN impliqués dans la maturation des ARN messagers, notamment en ce qui concerne leur épissage. L'absence de la protéine SMN n'est pas viable et la survie des patients atteints de SMA est possible grâce à la présence d'un autre gène extrêmement similaire appelé *SMN2*. Cependant, ce dernier ne peut se substituer intégralement à *SMN1* à cause d'une mutation qui induit un épissage incorrect de son ARN pré-messager (exclusion de l'exon 7), conduisant à la production majoritaire d'une protéine tronquée et non fonctionnelle. Cette protéine étant exprimée dans tous les tissus, son implication dans une dégénérescence spécifique des motoneurons reste encore largement incomprise aujourd'hui. Néanmoins, dans la mesure où tous les patients atteints de SMA possèdent au moins une copie de *SMN2*, il devrait être possible de restaurer un niveau normal de protéine SMN par des stratégies visant à rétablir l'inclusion de cet exon 7.

Depuis maintenant de nombreuses années, notre laboratoire est spécialisé dans l'étude des snRNP et de leur implication dans les mécanismes de maturation des ARN messagers. Nous avons ainsi réussi à modifier un snRNP particulier appelé U7 et à lui conférer la capacité d'inhiber l'inclusion de n'importe quel exon choisi au préalable. Cette stratégie de "saut d'exon" s'est montrée très efficace dans le cadre d'études précliniques concernant plusieurs maladies comme la  $\beta$ -thalassémie, le SIDA ou encore la dystrophie de Duchenne.

Puisque la correction de *SMN2* ne requiert pas un saut mais au contraire une réinclusion forcée de l'exon 7, nous avons développé et optimisé de nouvelles stratégies de modulation de l'épissage basées sur l'utilisation de snRNAs tels que U7 mais également U1 et U2. Parmi ces approches, 2 s'avèrent prometteuses puisque, testées sur un minigène modèle *SMN2*, elles nous ont permis d'obtenir une réinclusion l'exon 7 atteignant dans certains cas le niveau normalement obtenu à partir de *SMN1* (soit plus de 90% au lieu d'un niveau basal de  $\approx 10\%$ ). L'une d'entre elles repose sur l'utilisation d'un snRNA U1 qui est muté sur un nucléotide afin de reconnaître avec une complémentarité parfaite le site 5' d'épissage "suboptimal" de l'exon 7 de *SMN2* (qui se termine par le nucléotide A au lieu du G retrouvé dans 80% des cas). La seconde est basée sur l'utilisation de séquences dites "bifonctionnelles" associées à un snRNA U7 modifié. Ces séquences bifonctionnelles sont constituées d'une partie antisens permettant un ciblage spécifique de l'exon 7 et d'une partie fonctionnelle capable de se lier à des protéines activatrices de l'épissage. De manière importante, les cassettes d'expression codant ces snRNAs modifiés ne sont pas uniquement efficaces en transfection transitoire mais permettent également une correction durable de l'épissage de *SMN2* lorsqu'elles sont exprimées stablement à l'aide d'un vecteur lentiviral.

Nous travaillons actuellement à l'optimisation de ces différentes stratégies et à la confirmation de leur fonctionnalité sur des ARN pré messagers *SMN2* endogènes dans le cas de fibroblastes obtenus à partir de patients atteints de SMA.

## O30. Régulations post-transcriptionnelles de l'expression génétique et segmentation somitique

Carole Gautier-Courteille, Yann Audic, Julien Marquis<sup>1</sup>, H. Beverley Osborne, Luc Paillard

CNRS UMR6061 Génétique et Développement Groupe REG Université de Rennes1 IFR 140  
2 av du Pr Léon Bernard CS34317 35043 Rennes cedex, France

<sup>1</sup>Généthon, CNRS UMR 8115, 1 bis rue de l'Internationale 91002 Evry cedex 2, France. Adresse actuelle Institute of Cell Biology, Baltzerstrasse 32, 3012 Bern, Switzerland  
[luc.paillard@univ-rennes1.fr](mailto:luc.paillard@univ-rennes1.fr)

L'EDEN-BP/CUG-BP1 est une protéine de liaison aux ARNm multifonctionnelle. Dans le noyau, elle contrôle l'épissage alternatif de certains ARNprém. Dans le cytoplasme, elle stimule ou réprime la traduction d'ARNm, dans certains cas en provoquant leur désadénylation. Nous avons inhibé la fonction de l'EDEN-BP chez l'embryon de xénope (par injection d'anticorps immunoneutralisants ou de morpholinos). Cela provoque des défauts sévères de segmentation somitique ; les somites sont des structures transitoires de l'embryon, dont dériveront les os et les muscles, et qui sont normalement "segmentées" en une série d'unités quasi-identiques le long de l'axe antéro-postérieur. Par des approches de type "gène candidat", nous avons identifié une cible de l'EDEN-BP, appelée XSu(H), dans le processus de segmentation. En particulier, nous avons montré que l'expression de XSu(H) chez les embryons témoins était réprimée par l'EDEN-BP, via une stimulation de la désadénylation de cet ARNm. En conséquence, l'inactivation de l'EDEN-BP provoque la surexpression de XSu(H). Cette surexpression est l'une des causes des défauts de segmentation observés.

Néanmoins, XSu(H) n'est pas le seul ARNm cible de l'EDEN-BP dans la segmentation somitique. L'identification d'autres cibles est compliquée par le peu de connaissances que l'on a, à l'heure actuelle, sur les séquences d'ARN liées par l'EDEN-BP/CUG-BP1. Dans cette optique, un criblage SELEX a été effectué, qui a permis d'isoler et de séquencer une centaine d'aptamères. La capacité de ces aptamères à lier l'EDEN-BP a été confirmée par des expériences de gel-retard et/ou SPR pour environ les 2/3 d'entre eux. Ce travail nous a permis de préciser les contraintes qui pèsent sur les séquences d'ARN capables d'interagir avec l'EDEN-BP. De nouvelles cibles potentielles de l'EDEN-BP dans le processus de segmentation peuvent ainsi être recherchées par analyse de banques de données de séquences.

## **O31. ENCAPSIDATION DES ARN RETROVIRAUX AU COURS DE L'ASSEMBLAGE DES PARTICULES VIRALES**

Laurent Houzet (1), Fatima Smagulova(1), Zakia Morichaud(1), Bernard Gay(1), Roland Marquet (2), Jean Christophe Paillart (2) & Marylène Mougel(1)

(1) CNRS UMR5121, UM1, IFR122, Institut de Biologie, Montpellier

(2) CNRS UPR9002, IBMC, Strasbourg

*lhouzet@univ-montp1.fr*

Les rétrovirus sont des virus à ARN positif, enveloppés, qui se répliquent via une copie ADN intégrée dans le génome de l'hôte. Après intégration, la transcription par la Pol II conduit à un transcrit primaire unique. Ce transcrit va s'engager soit dans la voie des étapes post-transcriptionnelles classiques avec maturations nucléaires, transport, traduction et dégradation, soit, de façon tout à fait singulière, échapper à la machinerie d'épissage, être exporté du noyau malgré la persistance d'introns, être traduit, pour atteindre sa destination finale dans les nouvelles particules virales et servir d'ARN génomique (ARNg). Alors que cette dernière étape d'encapsidation de l'ARNg est essentielle pour l'infectiosité du virus, les mécanismes régissant ces deux voies de l'ARN viral restent très mal connus. Nous étudions ces différentes étapes essentiellement avec le virus de la leucémie murine (MLV) qui est un rétrovirus modèle car ne codant pour aucune protéine régulatrice et avec le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) classé comme rétrovirus complexe car il présente un potentiel codant beaucoup plus élevé via de nombreux épissages alternatifs.

L'encapsidation de l'ARNg résulte d'un prélèvement sélectif parmi tous les ARN viraux épissés et l'abondante population des ARN cellulaires. Il est généralement admis que cette sélectivité est portée par une séquence, appelée Psi, très structurée et localisée en 5' de l'ARNg. Chez MLV, nous avons précédemment identifié 4 tiges-boucles dans Psi et montré que leurs délétions respectives modifiaient les efficacités d'encapsidation, d'épissage et de transcription inverse de l'ARNg, suggérant que toutes ces étapes pourraient être liées. A l'aide d'approches d'imagerie ARN et de biologie cellulaire et moléculaire incluant fractionnement cellulaire et quantification des ARNg par RT-QPCR, nous montrons que ces tiges-boucles jouent aussi un rôle inattendu dans l'export nucléaire de l'ARN.

Nous avons également étudié la localisation de l'ARNg dans le cytoplasme de cellules infectées par MLV. Grâce à la microscopie électronique couplée à l'hybridation in situ, nous avons pu observer l'encapsidation de l'ARNg dans des virus MLV assemblés dans les endosomes. Nous avons également détecté le pouvoir infectieux de ces particules virales intracellulaires. Cet assemblage intravésiculaire a également été rapporté pour le VIH-1.

Actuellement, nous adressons ces mêmes questions avec le virus complexe VIH-1. Notamment, à l'aide de plusieurs virus mutants de Psi, nous étudions la spécificité de l'encapsidation des ARN viraux ainsi que leur localisation intracellulaire. Ces premiers résultats seront également présentés et discutés.

Nous remercions le CNRS, l'ANRS, SIDACTION et le Ministère de la Recherche pour leurs supports financiers.

## **O32. Spinal Muscular Atrophy and the SMN protein in the nucleus organization.**

Benoît Renvoisé \*(1), Kevinee Khoobarry (1), Louis Viollet (2) and Suzie Lefebvre (1).

(1) Laboratoire de Biologie Cellulaire des Membranes, Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS/Univ. Paris 6 et 7, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

(2) UR393 INSERM, IRNEM Institute, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

\* [renvoise@ijm.jussieu.fr](mailto:renvoise@ijm.jussieu.fr)

The common motor neuron degenerative disease spinal muscular atrophy (SMA) is caused by reduced levels of the *Survival Motor Neurons* (SMN) protein. SMN is part of a ubiquitous protein-complex involved in fundamental cellular processes, such as the biogenesis of spliceosomal U snRNPs (U-rich small nuclear ribonucleoproteins). We showed that several SMN functional domains govern its intranuclear localization and residency in gems/Cajal bodies (CBs) in mammalian cells. CBs are maturation platforms of the newly assembled snRNPs and their numbers present a strong correlation with the severity of the SMA disease. We found that CBs lost their capacity to accumulate the snRNPs in cells overexpressing SMA mutants and SMA patient-derived fibroblast cells demonstrating the implication of SMN in the snRNPs accumulation in gems/CBs and the supramolecular organization of the nucleus. Now, we intend to characterize novel proteins that contribute to SMN and snRNPs accumulation in CBs to allow a better understanding of the functional defects and pathological processes of SMA disease.

### **O33. Des variations spécifiques dans la séquence du 5'UTR du VHC de génotype 3 induisent une baisse du niveau de réplication.**

*C. Masante\**, K. Mahias\*, S. Lourenço, E. Dumas, A. Cahour, P. Trémoulet, H. Fleury, T. Astier-Gin & M. Ventura. CNRS UMR5097, Université Victor Ségalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex. [michel.ventura@reger.u-bordeaux2.fr](mailto:michel.ventura@reger.u-bordeaux2.fr).

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN simple brin de polarité positive. Son génome est constitué par une longue phase codante qu'encadrent 2 régions non traduites le 5'UTR et le 3'UTR. Son importante variabilité a conduit au dénombrement de 6 génotypes, eux-mêmes répartis en plusieurs sous-types. La comparaison de 151 séquences correspondant au 5'UTR du VHC montre que le niveau d'homologie ne s'élève pas au dessus de 75%. Les variations de séquences observées sont dans la plupart des cas compensatoires, elles ne modifient donc pas les structures décrites, même si elles peuvent en affecter la stabilité. Mais de manière plus intéressante la variabilité associée à 9 nucléotides (8, 13, 14, 57, 70, 97, 175, 203, 224) se révèle spécifique du génotype 3 : seul ce génotype présente toujours et simultanément ces 9 variations, tandis que l'ensemble des autres génotypes n'en présente aucune.

Outre les aspects phylogénétiques, cette observation revêt une réelle importance en ce qui concerne les pathologies associées à l'infection par un VHC de génotype 3. En effet, on constate chez les sujets infectés par ce virus une stéatose plus sévère, mais sensible au traitement interféron-ribavirine. Il semble que ce phénomène ne puisse être corrélé à aucune des protéines produites par le virus hormis peut-être à la protéine core. Les modifications de séquence dans le 5' UTR de l'ARN viral positif entraînent des changements de la séquence complémentaire correspondant à l'extrémité 3' de l'ARN. Dans cette région 5' non traduite l'ARN(+) possède une activité IRES tandis que la région correspondante de l'ARN(-) est impliquée dans l'initiation de la synthèse d'ARN(+). Nous avons donc étudié l'impact des changements de nucléotides spécifiques du 5'UTR de VHC de génotype 3 sur la réplication et la traduction du virus.

Nous avons montré que l'ARN polymérase virale répliquait 8 fois moins bien l'ARN négatif issu d'un génotype 3 que celui issu d'un génotype 1. Des changements spécifiques de ce génotype dans les 20 premiers nucléotides et aux positions 175 et 224 semblent être impliqués dans cette baisse de la synthèse d'ARN. Nous avons également étudié la réplication *ex vivo* en utilisant des minigénomés développés à l'UMR 5097. Ceux-ci comprennent un gène rapporteur (la green fluorescent protein, EGFP) encadré par le 5'UTR et le 3'UTR du VHC. Après transfection dans des cellules Huh7 exprimant le complexe de réplication du VHC, les minigénomés contenant un 5'UTR de génotype 3 se répliquent moins bien que ceux contenant un 5'UTR de génotype 1, mais la différence semble moins marquée qu'*in vitro*. Enfin la comparaison de l'activité traductionnelle de l'IRES issu d'un génotype 1 ou d'un génotype 3 n'a révélé aucune différence. Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une plus faible réplication du génotype 3 comparé à celle du génotype 1 (Masante et al., en préparation).

\* co-premier auteur

## O34. Identification de gènes cibles de la protéine Unr chez des cellules souches embryonnaires (ES) de souris.

Virginie Dormoy-Raclet(1), Claire Gaugain(2), Judith Markovits (1), Jean Rosenbaum (1), François Dautry(3) et Hélène Jacquemin-Sablon (1).

(1) GREF, INSERM E362, Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex

(2) Centre de Bio-informatique, Université de Bordeaux2, Bordeaux

(3) CNRS UPR 1983, Institut A.Lwoff, Villejuif

[helene.jacquemin-sablon@gref.u-bordeaux2.fr](mailto:helene.jacquemin-sablon@gref.u-bordeaux2.fr)

Unr (upstream of N-ras) est une protéine de liaison à l'ARN, comportant cinq domaines cold-shock. *In vitro*, Unr se lie préférentiellement à des motifs très riches en purines, identifiés par la méthode Selex. Unr est une protéine cytoplasmique, impliquée dans plusieurs étapes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génétique. A ce jour, Unr a été caractérisée comme régulant la stabilité des ARNms *c-fos* et *PTH* (parathyroid hormone), stimulant la traduction dépendante d'IRES des ARNms *c-Myc*, *Apaf-1* et *PISTLRE*, et réprimant la traduction de l'ARNm *msl-2* chez la drosophile. L'inactivation du gène *unr* chez la souris conduit à une létalité embryonnaire, montrant qu'Unr est essentielle au cours du développement. Nous avons généré des cellules ES nulles pour Unr par recombinaison homologe. Les cellules ES *unr*<sup>-/-</sup> prolifèrent normalement, mais montrent une résistance accrue à un stress génotoxique, l'irradiation gamma. Pour identifier des voies régulées par Unr, nous avons réalisé une analyse comparative du transcriptome de cellules ES *unr*<sup>+/+</sup> et *unr*<sup>-/-</sup>, en prolifération et après irradiation. Au total moins d'une centaine de gènes varient de façon significative, positivement ou négativement, en l'absence d'Unr. Pour la plupart, ces gènes sont régulés de façon similaire avant et après irradiation. Ces gènes codent des protéines impliquées dans divers processus cellulaires incluant l'apoptose, puisque deux gènes pro-apoptotiques, *Gadd45γ* et caspase 3, sont sous-exprimés dans les cellules *unr*<sup>-/-</sup>. Plusieurs gènes codant des régulateurs de l'adhésion cellulaire sont fortement régulés par Unr, en particulier ARHGAP6, une protéine activatrice de l'activité GTPase de RhoA. Par des essais fonctionnels, nous avons mis en évidence des changements d'adhérence des cellules nulles pour Unr. L'approche transcriptome ne permettant pas d'identifier les gènes directement régulés par Unr, nous avons recherché dans un sous-groupe d'ARNms issus de l'analyse du transcriptome, la présence du motif consensus [AG]{8}AAC[GA]{3} reconnu spécifiquement par Unr. 14/51 des ARNms testés contiennent ce motif, localisé dans différentes régions non-codantes ou codantes. L'association d'Unr *in vivo* avec les ARNms *Arhgap6* a été mise en évidence par co-immunoprécipitation, et nous avons déterminé un rôle de stabilisation des transcrits *Arhgap6* par Unr. Ces résultats ont ainsi permis d'attribuer à Unr une fonction dans le contrôle de l'adhérence cellulaire.



## **O35. Régulation par le photopériodisme saisonnier d'ARNm codant des protéines de structure et de signalisation chez le puceron**

Gaël Le Trionnaire, Beatriz Sabater-Muñoz, Alessandra Benedetto, Joël Bonhomme, Stéphanie Jaubert, Nathalie Leterme-Prunier, Jean-Christophe Simon et Denis Tagu

INRA Rennes UMR BiO3P, INRA / Agrocampus, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France  
*denis.tagu@rennes.inra.fr*

Les pucerons – ravageurs des cultures – sont capables de changer de mode de reproduction en réponse aux changements de photopériode. Leur grande plasticité phénotypique leur permettent d'alterner entre un mode de reproduction clonal (parthénogenèse) en photopériode longue (printemps et été) et un mode de reproduction sexué en photopériode courte (automne). La reproduction sexuée aboutit à la ponte d'œufs diapausants et résistants aux froids hivernaux. La parthénogenèse vivipare quant à elle permet une multiplication exponentielle des populations, facteur essentiel à la nuisibilité de ces insectes. Dans l'objectif de comprendre les mécanismes sous jacents à cette plasticité phénotypique, nous avons comparé les populations d'ARNm différenciellement accumulés dans des pucerons élevés sous des photopériodes longue (16h, parthénogenèse) ou courte (12h, reproduction sexuée). Une puce à ADNc a été construite représentant 1700 transcrits différents du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. Des hybridations comparatives et compétitives ont été réalisés à partir d'ARNm extraits de têtes de puceron du pois, contenant notamment le cerveau et des glandes endocrines sièges de la perception photopériodique et des événements précoces de transduction du signal vers le système reproducteur. Après normalisation et analyse statistique (ANOVA) des données, 98 ADNc correspondant à 61 transcrits ont été sélectionnés ( $p < 0,01$ ) comme différenciellement exprimés sous l'effet de la photopériode. Un tiers de ces ARNm code des protéines cuticulaires (composant l'exosquelette) et 15 % codent des protéines de signalisation (wunen, nebula, reeler) impliquées chez la drosophile dans la formation des synapses et du système nerveux central. Des expériences de PCR quantitatives ont été réalisées afin de confirmer ces résultats. L'implication de la cuticule et de protéines de signalisation dans les étapes précoces de la plasticité phénotypique induite par la photopériode sera discutée.

## O36. Quelle lysyl-ARNt synthétase comme cargo de l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> ?

Vyacheslav Shalak, Monika Kaminska, Sebastian Flisiak, Mathilde Francin et Marc Mirande

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, LEBS-CNRS,  
1 Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

*marc.mirande@lebs.cnrs-gif.fr*

La réplication de l'ARN viral est un processus complexe qui requiert la participation de molécules de la cellule hôte. A l'instar de la plupart des rétrovirus, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) utilise un ARNt pour amorcer la transcription inverse de son génome ARN en ADN proviral. L'ARNt amorce est spécifique d'un ARN viral donné; dans le cas du VIH-1, l'ARNt amorce est l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup>.

Alors que le rôle essentiel dévolu à l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> au cours de la reverse transcription de l'ARN viral est maintenant bien décrit, les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes antérieures conduisant à son encapsidation restent encore mal connus. Lors des étapes précoces de l'infection virale, les protéines et macromolécules présentes dans la nucléocapside sont nécessaires à l'initiation de la reverse transcription. Pour être infectieuse, la particule virale doit donc contenir l'ARNt amorce. Bloquer cette étape d'encapsidation de l'ARNt est donc une piste thérapeutique intéressante.

Les bases moléculaires de l'encapsidation sélective de l'ARNt<sup>Lys</sup> sont restées longtemps mystérieuses. Sur la base de la détection immunologique de la LysRS de la cellule hôte dans des extraits de particules virales du VIH-1, il a été proposé que la LysRS cytoplasmique pourrait ainsi servir de protéine cargo pour l'encapsidation sélective des ARNt<sup>Lys</sup> [Cen *et al.* 2001].

En fait, le gène humain KARS spécifie les formes cytoplasmiques et mitochondriales de LysRS: LysRS-cyto et LysRS-mito. L'ARNm spécifiant la LysRS-cyto résulte de l'absence de l'exon 2. Nous avons cloné et exprimé les formes cytoplasmique et mitochondriale de la LysRS humaine. Les études menées sur la LysRS-cyto ont conduit à caractériser le motif de liaison à l'ARNt responsable de la propriété de fixation des acides nucléiques par cette enzyme, qui permettrait à la LysRS d'assumer sa fonction de protéine-cargo de l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> vers le virion. Ce motif de liaison de l'ARNt est conservé dans la forme LysRS-mito, suggérant qu'elle puisse servir de protéine cargo. Nous avons produit des anticorps dirigés contre des peptides spécifiques de l'une ou l'autre forme de LysRS. La caractérisation de la forme de LysRS encapsidée dans le virion sera décrite et les premiers résultats montrant l'effet des protéines virales sur le détournement de composantes de l'appareil de biosynthèse de la cellule hôte vers la particule virale seront présentés.

Cen, S., Khorchid, A., Javanbakht, H., Gabor, J., Stello, T., Shiba, K., Musier-Forsyth, K. and Kleiman, L. (2001) *J Virol* 75, 5043-5048.

### **O37. Physiological suppression of the microRNA-silencing pathway by HIV-1 is required for virus replication.**

Robinson Triboulet<sup>1</sup>, Bernard Mari<sup>3</sup>, Yea-Lih Lin<sup>2</sup>, Christine Chable-Bessia<sup>1</sup>, Yamina Bennasser<sup>5</sup>, Kevin Lebrigand<sup>3</sup>, Bruno Cardinaud<sup>3</sup>, Pascal Barbry<sup>3</sup>, Vincent Baillat<sup>4</sup>, Jacques Reynes<sup>4</sup>, Pierre Corbeau<sup>2</sup>, Kuan-Teh Jeang<sup>5</sup> and Monsef Benkirane<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Virologie Moléculaire, <sup>2</sup>Lentivirus et Transfert de Gènes, Institut de Génétique Humaine, Montpellier, France. <sup>3</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097 CNRS/UNSA, Sophia Antipolis, France. <sup>4</sup>Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Gui de Chauliac, Montpellier, France. <sup>5</sup>Laboratory of Molecular Microbiology, NIAID, NIH, Bethesda, MD, USA.

*robinson.triboulet@igh.cnrs.fr*

MicroRNAs (miRNA) are single-stranded non-coding RNAs of 19-25 nucleotides that function as gene regulators. They are conserved in all multicellular organisms and play roles in host cell defence against both RNA and DNA viruses. Emerging findings suggest that an interplay exists between the miRNA-silencing pathway and HIV-1 replication. Here we provide evidence for a physiological role of the miRNA-silencing machinery in controlling HIV-1 replication. We found that the type III RNAses Dicer and Drosha serve to inhibit virus replication in PBMCs from HIV-1 infected donors. siRNAs individually directed against either Dicer or Drosha increased viral production in latently infected cells. Intriguingly, our results suggest that HIV-1 actively suppresses the level of polycistronic microRNA cluster miR-17/92 in infected cells; hence, by blocking the ability of HIV-1 to modulate the abundance of cellular miR-17/92, we observed dramatically attenuated virus replication. Moreover, we identified the histone acetyltransferase PCAF, known to play a critical role in HIV-1 replication, as a target for HIV-1 down-regulated miR-17-5p and miR-20. Our results highlight the involvement of the miRNA-silencing pathway in HIV-1 replication and latency.

**O38.** Un nouveau petit ARN chez *E.coli* : suppression de l'essentialité de la protéase RseP et régulation négative de deux protéines de la membrane externe.

*Véronique Douchin, Chantal Bohn et Philippe Bouloc, Laboratoire Signalisation et Réseaux de Régulations Bactériens, Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, CNRS, UMR8621, Bâtiment 400, 91405 Orsay Cedex, Veronique.Douchin@igmors.u-psud.fr*

L'adaptation au stress extra-cytoplasmique chez *Escherichia coli* dépend de l'activation du facteur sigmaE, normalement séquestré par la protéine trans-membranaire RseA. Sigma E est relargué en réponse à un stress grâce au clivage successif de RseA par les protéases DegS et RseP. SigmaE et les protéases qui le libèrent de RseA, sont essentiels. Nous avons isolé un suppresseur multicopie de la perte de viabilité des protéases RseP et DegS. Ce suppresseur code un nouveau petit ARN, RseX. Son activité requiert la protéine de liaison à l'ARN Hfq. Les petits ARN régulateurs étant souvent impliqués dans des interactions ARN-ARN, nous avons développé une technique *in vitro* qui permet de capturer ces cibles ARN putatives. Les ARN messagers ompA et ompC, codant deux protéines majeures de la membrane externe, ont été identifiés. Par northern blot, nous montrons que les messagers ompA et ompC sont diminués dans une souche sur-exprimant RseX. Comme RseP n'est plus essentiel dans le double mutant  $\Delta ompA \Delta ompC$ , nous proposons que le phénotype de suppression de RseX envers l'absence de la protéase RseP s'explique par une perte de toxicité des protéines de la membrane externe OmpA et OmpC, rendant la voie d'adaptation au stress extra-cytoplasmique partiellement dispensable.

**O39. *Bsr* a novel nuclear-restricted mRNA-like transcript with mono-allelic expression.**

**Cavaillé J**<sup>1</sup>, Hélène Royo<sup>1</sup>, Eugenia Basyuk<sup>2</sup>, Maud Marques<sup>1,3</sup>, Edouard Bertrand<sup>2</sup>

<sup>1</sup>LBME-CNRS, UMR 5095, IFR 109, 118 route de Narbonne, 31062 Cedex Toulouse, France; <sup>2</sup>IGMM-CNRS, UMR 5535, Université Montpellier II, IFR 122, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France. <sup>3</sup>Present address: Département de Biologie, Faculté des Sciences Université de Sherbrooke, 2500 boulevard de l'Université Sherbrooke (Québec) J1K 2R1, Canada.

[Cavaillé@ibcg.biuotoul.fr](mailto:Cavaillé@ibcg.biuotoul.fr)

The Dlk1-Gtl2 domain contains many imprinted non-coding RNA (ncRNA) genes whose functions are unknown. To understand the intracellular fates of these ncRNAs, fluorescence *in situ* hybridization was carried out at the rat Dlk1-Gtl2 domain. This locus is characterized by a ~100 kb-long C/D small RNA gene cluster comprising ~86 homologous RBII-36 C/D RNA gene copies, all of them intron-encoded within Bsr, a large ncRNA gene. Here, we demonstrate that in rat embryonic fibroblasts, the active Bsr allele replicates earlier than the silent one and yields not only the mature nucleolar RBII-36, but also many unspliced and spliced Bsr RNAs, detected near the transcription site as large, elongated “comet-like” and “track-like” signals, respectively. Surprisingly, spliced Bsr RNAs are also found as multiple, metabolically stable, nucleoplasmic dots (probably reflecting the detection of single RNA molecules) that are preferentially associated with the edges of the speckle domains. Thus, our findings identify Bsr as a novel nuclear-retained poly(A) RNA.

## **O40 Regulatory RNA in *Staphylococcus aureus*: a common antisense regulatory mechanism for the expression of several virulence factors**

Thomas Geissmann (1) Eric Huntzinger (1), Sandrine Boisset (2), Pierre Fechter (1), Maria Possedko (1), Nadia Bendridi (2), Yvonne Benito (2), Alain Jacquier (3), Christine Gaspin (4), François Vandenesch (2), Pascale Romby (1)

(1)UPR 9002 CNRS, ULP, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France.

(2) Faculté de Médecine Laennec, INSERM E0230, IFR62, Lyon, France. (3) URA2171-CNRS Institut Pasteur, Paris, France. (4) INRA, Laboratoire de Biométrie et Intelligence artificielle, Castanet Tolosan, France. [t.geissmann@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:t.geissmann@ibmc.u-strasbg.fr)

*Staphylococcus aureus* RNAIII is one of the largest regulatory RNAs, which controls several virulence genes encoding exoproteins and cell-wall-associated proteins. RNAIII acts as a messenger RNA encoding *hld* (delta-hemolysin), and carries multiple regulatory functions: repression of the expression of surface proteins such as protein A during the exponential phase, and activation of the expression of extracellular toxins and enzymes during the post-exponential phase. The secondary structure of RNAIII is characterized by 14 stem-loop structures and by two long helices, which close off structural domains. Only two specific domains of RNAIII have been shown to control the expression of target mRNAs. The 5' end of RNAIII positively regulates the translation of *hla* (encoding alpha-hemolysin) by competing directly with an intramolecular RNA secondary structure that sequesters the *hla* ribosomal binding site. The 3' end domain, highly conserved among Staphylococcal species, is sufficient to inhibit the synthesis of protein A, a major virulence factor. One hairpin motif of the 3' domain binds to *spa* mRNA, encoding protein A, and causes repression of translation initiation and rapid degradation initiated by the double-strand-specific endoribonuclease III. Here we show that this domain acts primarily as an antisense RNA, and specifically anneals to several mRNAs encoding virulence factors (SA1000, a fibrinogen-binding protein, coagulase..) and a transcriptional regulator, the repressor of toxins Rot. In all cases, the RNAIII-mRNA interaction causes repression of translation initiation. Depending on the mRNA context, rapid degradation mediated by the RNase III, was observed for several of the repressed mRNA targets. These results suggest that this specific regulatory domain coordinately represses the expression of several virulence factors which are known to act rather earlier in the infectious process. In addition, regulation of *rot* mRNA, explains several indirect effects induced by RNAIII. These data bring additional clues towards the determination of the RNAIII-dependent regulatory networks.

## **O41 Différents mécanismes d'inhibition de la traduction par des petits ARN non codants chez *Escherichia coli***

Darfeuille Fabien (1,2), Unoson Cecilia (2), Udekwu Klas (2), Vogel Jörg (3), Wagner Gerhart (2)

(1) INSERM U386, Université Victor Segalen, Bordeaux, France.

(2) Dept. of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

(3) MPI for Infection Biology, Berlin, Germany.

*fabien.darfeuille@bordeaux.inserm.fr*

Depuis quelques années, le nombre de petits ARN non codants impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes va croissant aussi bien chez les procaryotes (sRNA) que chez les eucaryotes (miRNA, siRNA). Chez *E. coli* ce sont plus de 60 nouveaux petits ARN qui ont été identifiés par des approches expérimentales et bioinformatiques. Ces petits ARN dont les tailles varient de 50 à 300 nucléotides sont codés au niveau des régions intergéniques et sont extrêmement conservés chez les entérobactéries gram négatives.

Au cours de la caractérisation fonctionnelle (analyse du protéome) des sRNA chez *E. coli*, nous avons montré que la surexpression d'un de ces petits ARN, l'ARN MicA, permettait d'inhiber de plus de 20 fois la synthèse de la porine OmpA qui est un constituant majeur de la membrane externe d' *E. coli* (1). Nous avons pu montrer que le mécanisme de régulation mis en jeu par l'ARN MicA est de type antisens. En effet l'ARN MicA possède 16 nucléotides complémentaires de la région 5' non traduite de l'ARNm *ompA*. L'interaction de MicA avec cette région inhibe la fixation du ribosome au site d'initiation de la traduction et facilite ainsi la dégradation de l'ARNm *ompA* au cours de la phase stationnaire. Le type de régulation petit ARN non codant est aussi exprimé chez d'autres bactéries telles que *S. typhimurium* et *Y. pestis* et le mécanisme de régulation de la porine OmpA semble lui aussi conservé chez ces bactéries pathogènes.

En parallèle, nous avons étudié un autre type d'ARN régulateur, l'ARN IstR, qui permet d'inhiber la synthèse d'un peptide toxique TisB exprimé au cours de la réponse SOS (réparation de l'ADN) (2). Dans ce cas et contrairement à la majorité des ARN antisens de *E. coli*, l'ARN IstR interagit dans une région située à une centaine de nucléotides du site de fixation du ribosome (séquence Shine Dalgarno). Cette interaction d'une vingtaine de nucléotides est suffisante pour inhiber l'étape d'initiation de la traduction.

En conclusion un modèle permettant de décrire les deux modes de régulation sera présenté et discuté.

(1) Udekwu et al. (2005) Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA.

*Genes Dev.* 19, 2355-66.

(2) Vogel et al. (2004) The samll RNA IstR inhibits the synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr. Biol.* 14, 2271-2276

## **O42 Different types of non-coding RNAs mediate the epigenetic programming of developmental genome rearrangements in the ciliate *Paramecium*.**

Gersende Lepère, Mariusz Nowacki, Sandra Duhaucourt and Eric Meyer.

CNRS UMR 8541, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Ecole Normale Supérieure, Paris, France.

*lepere@biologie.ens.fr*

Homology-dependent maternal effects have been shown to regulate the rearrangements of the germline genome that occur during development of a new somatic macronucleus after sexual events. Many experiments have suggested that the epigenetic programming of rearrangements involves a global comparison of the germline genome with the previously rearranged genome of the maternal macronucleus. Short RNAs, 25-nt in length, that are produced from the germline genome during meiosis, appear to promote DNA elimination in the developing macronucleus. It has been suggested that they also mediate the *trans*-nuclear comparison of germline and somatic genomes: The 25-nt RNAs (scanRNAs) produced by the germline genome would first be exported to the maternal macronucleus, where they would scan the genome by pairing interactions. Those unable to find homologous sequences would then be specifically transported to the developing macronucleus to target the deletion of germline-specific sequences.

However, it remains unclear whether the scanning of the maternal genome involves a direct interaction of scanRNAs with maternal DNA or with maternal transcripts. We show that maternal macronuclear transcripts can be detected by RT-PCR for coding as well as non-coding regions of the genome, both during vegetative growth and during sexual events. Targeted degradation of such transcripts by RNA interference (which involves a distinct class of short RNAs, 23-nt in length) before meiosis alters the rearrangement profile in the new macronucleus after sexual events. This strongly suggests that maternal transcripts produced from the macronuclear genome protect homologous germline loci against elimination. The implications of these results for the current models of genome scanning in ciliates will be discussed.



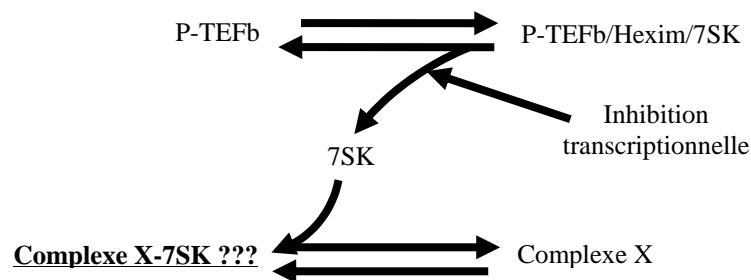
## O43 Régulateurs protéiques de l'ARN 7SK, un inhibiteur du facteur de transcription P-TEFb

Barrandon Charlotte, Bonnet François, Nguyen Van Trung, Bensaude Olivier.

Laboratoire de Génétique Moléculaire, Ecole Normale Supérieure, 75230 Paris Cedex 05,  
France

*cbarrand@wotan.ens.fr*

L'ARN 7SK est devenu un paradigme d'ARNs non codants régulateurs de la transcription. Les années précédentes, notre laboratoire a montré qu'il s'associe à la protéine HEXIM1 et au facteur P-TEFb (positive transcription elongation factor b) au sein d'un même complexe. Il en résulte une inactivation du P-TEFb. Ces interactions sont dynamiques, elles sont en perpétuelle formation/dissociation. Des traitements qui inhibent la transcription entraînent la séparation de l'ARN 7SK et du P-TEFb ce qui provoque une accumulation de la forme active de ce dernier. L'ARN 7SK libéré n'est pas dégradé mais s'intègre à d'autres snRNP7SK que nous avons caractérisées. Nous avons identifié des composants de ces 7SK snRNP dont l'association à l'ARN 7SK augmente après un arrêt de transcription. Ce sont des protéines déjà connues pour être engagées dans la maturation des ARNs pré-messagers. Cette observation constitue une nouvelle illustration du couplage existant entre transcription et maturation des pré-messagers.



## O44. Régulation du gène *msrB* de *E.coli* par le petit ARN non codant RyhB

Julia Bos<sup>1</sup>, Benoit Thouvenot<sup>2</sup>, Bruno Charpentier<sup>2</sup>, Christiane Branlant<sup>2</sup> and Frédéric Barras<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Bactérienne- IBSM. CNRS Chemin Joseph Aiguier 13009 Marseille

<sup>2</sup> Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie moléculaire UMR CNRS Facultés des Sciences et Techniques 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Methionine sulfoxide reductases (Msr) are conserved in all organisms, in which they repair proteins that have been oxidized on their methionine residues. *E. coli* synthesizes two Msrs, referred to as MsrA and MsrB (1;2). Recently, we found that *msrB* gene expression is repressed by iron starvation. This led us to postulate that *msrB* is a new target of the recently discovered ryhB dependent regulon. RyhB is a small non coding RNA which is predicted to mediate repression of genes encoding iron using proteins, such as *sodB*, encoding superoxide dismutase or *sdh*, encoding succinate dehydrogenase. Use of translational lacZ fusions and Northern blot analysis allowed us to show that down regulation of *msrB* expression upon iron starvation involves the Fur repressor, the sRNA RyhB and the RNA chaperone Hfq. In vitro analysis, using mobility shift assays we confirmed the interaction between *msrB* transcript, RyhB and Hfq. Use of folding predictions, primer extension assays and site directed mutagenesis allowed us to identify, in the *msrB* transcript, four cis-acting sequences that are involved in mediating the RyhB/Hfq control. Surprisingly, these four cis-acting sites are widespread throughout the whole transcript. Specifically, site I locates upstream the Shine Dalgarno sequence, sites II and III overlap the Shine Dalgarno and translational start sequences, while site IV lies at the distal part of the coding sequence. This contrasts with known ryhB targets, wherein cis-acting sequence only overlap translational initiation signals. Current investigations aim at defining the role of each of the cis-sequences in RyhB/Hfq mediated regulation of *msrB* expression, and in particular whether they act by preventing translational initiation and/or promoting mRNA degradation.

(1) Ezraty B, Aussel L, Barras F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta*. 2005. Review. 1703(2):221-9

(2) Grimaud R, Ezraty B, Mitchell JK, Lafitte D, Briand C, Derrick PJ, Barras F. Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J.Biol.Chem.* 2001; 276(52):48915-20.

## **O45. Contrôle de la synthèse et du devenir des transcrits par les corégulateurs transcriptionnels**

Barbier Jérôme, Bittencourt Danielle, Gratadou Lise, Sanchez Gabriel, Auboeuf Didier,  
Dutertre Martin.

INSERM U685/AVENIR, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Paris,  
France

*dutertre@stlouis.inserm.fr*

L'expression des gènes codant pour des protéines est un processus multi-étapes incluant la transcription, l'épissage et l'export des ARNm vers le cytoplasme où ils sont traduits. Toutes les étapes post-transcriptionnelles peuvent être régulées et affecter l'effet biologique résultant de l'activation transcriptionnelle de gènes par des stimuli comme les hormones stéroïdiennes. Nous avons préalablement montré que les hormones stéroïdiennes affectent simultanément la transcription et le processus de "sélection" des exons par le recrutement au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles, de corégulateurs transcriptionnels impliqués dans la transcription et l'épissage (Auboeuf et coll., Science 2002, MCB 2004 et 2005, et PNAS 2004).

Nous montrons maintenant que ces corégulateurs interagissent non seulement avec leurs gènes cibles et les ARN pré-messagers de ces derniers, mais aussi avec les ARNm matures correspondants, dans le noyau et dans le cytoplasme. De plus, nous montrons que ces corégulateurs font la navette entre noyau et cytoplasme, suggérant un rôle de ces corégulateurs dans l'export des ARNm.

De façon intéressante, nous avons également observé que certains transcrits régulés par les hormones stéroïdiennes sont enrichis dans le noyau et sont absents ou très peu concentrés dans le cytosol, et pour certains gènes, nous avons observé que les variants d'épissage sont différenciellement "exportés" vers le cytoplasme.

Enfin, dans certains cas, les interactions entre transcrite et corégulateur sont augmentées par les hormones stéroïdiennes. Par conséquent, notre hypothèse de travail est qu'un sous-ensemble de corégulateurs transcriptionnels sont impliqués dans la maturation et l'export des ARNm de leurs gènes cibles, ce qui permet un contrôle coordonné de la synthèse (transcription), de la maturation (contenu exonique) et du devenir (export) des produits de ces gènes cibles.

## **O46. Caractérisation *in vivo* de deux séquences régulatrices contrôlant de manière antagoniste l'utilisation d'un exon 3' terminal.**

Caroline Le Sommer, Agnès Méreau, Sandra Hamon, Hubert Lerivray, Vincent Anquetil et Serge Hardy

UMR 6061 CNRS Université de Rennes1, Faculté de Médecine, 2 Ave du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France, [serge.hardy@univ-rennes1.fr](mailto:serge.hardy@univ-rennes1.fr)

La maturation des ARN pré-messagers est composée d'un ensemble de processus interconnectés qui sont l'objet de nombreuses régulations. L'utilisation différentielle des exons 3' terminaux nécessite ainsi un contrôle coordonné des machineries d'épissage et de clivage/polyadénylation. Nous utilisons le gène de la tropomyosine  $\alpha$  de xénope comme modèle pour étudier les déterminants moléculaires qui contrôlent l'utilisation tissulaire des exons 3' terminaux et les couplages physiques et fonctionnels existant entre les réactions d'épissage et de clivage/polyadénylation. Ce gène possède plusieurs exons 3' terminaux dont l'exon 9A9' qui est spécifiquement utilisé dans les tissus musculaires embryonnaires et exclu dans les tissus non musculaires.

Une stratégie *in vivo*, dans l'embryon de xénope, basée sur l'injection de minigènes couvrant une partie de la région 3' terminale du gène de la tropomyosine  $\alpha$ , placée sous le contrôle de promoteurs tissus spécifiques, nous a conduit à l'identification de deux séquences régulatrices qui contrôlent l'utilisation tissulaire de l'exon 9A9' : une séquence inhibitrice nommée 150 PY et une séquence activatrice nommée USE.

En utilisant une combinaison d'approches *in vivo* et *in vitro* nous avons montré que la protéine xPTB est un facteur essentiel dans le contrôle tissulaire de l'exon 9A9'. xPTB se lie à des sites de haute affinité présent dans l'élément 150 PY et réprime l'utilisation de l'exon 9A9' dans les tissus non musculaires en contrôlant d'une part la réaction d'épissage et d'autre part la réaction de clivage/polyadénylation. La déplétion dans l'embryon, à l'aide de morpholino oligonucléotides antisens, provoque une utilisation de l'exon 9A9' dans les tissus non musculaires qui est dépendante de la séquence USE. Ceci indique que xPTB agit en prévenant l'utilisation de l'élément USE et que ce dernier est actif dans les cellules non musculaires. Une stratégie de facteurs candidats développée dans l'ovocyte a abouti à l'identification de protéines activatrices, appartenant à la famille des protéines SR, qui contrôlent l'utilisation de l'exon 9A9' *via* l'élément USE. Nous avons par la suite démontré qu'il existe un antagonisme fonctionnel entre la protéine xPTB et l'un des membres de la famille des protéines SR, la protéine xSC35. Ce résultat nous conduit à proposer un modèle de régulation tissulaire de l'épissage de l'exon 9A9' qui serait basé sur une compétition entre xPTB et des facteurs activateurs.

## **O47. PTB et les protéines de la famille CELF ont des effets antagonistes sur l'épissage alternatif de l'exon muscle-spécifique du pré-ARNm de la $\beta$ -tropomyosine**

Jérôme Saulière, Alain Sureau, Alain Expert-Bezançon et Joëlle Marie

*Centre de Génétique Moléculaire, CNRS-UPR2167, 91190 Gif-sur-Yvette, France*  
[sauliere@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:sauliere@cgm.cnrs-gif.fr)

Le pré-ARNm de la  $\beta$ -tropomyosine aviaire contient deux exons mutuellement exclusifs, 6A et 6B, qui sont épissés alternativement au cours de la différenciation myogénique. L'exon 6A est incorporé dans les ARNm des cellules non-musculaires et des myoblastes tandis que l'exon 6B est inclus dans les ARNm des cellules de muscles squelettiques et des myotubes. La répression de l'épissage de l'exon 6B dans les cellules non-musculaires est complexe et fait intervenir plusieurs séquences régulatrices. Nous nous sommes intéressés au contrôle exercé par la région intronique en amont de l'exon 6B. Nous avons purifié les complexes protéiques provenant d'extraits nucléaires myogéniques interagissant avec cette région. Les protéines ont été séparées par gel 2D et identifiées par spectrométrie de masse.

Nous montrons que PTB interagit avec la région du point de branchement et la région riche en pyrimidine. La protéine CUG-BP (membre de la famille CELF) interagit avec la région du point de branchement et la région en amont du site 3' d'épissage de l'exon 6B. Des expériences d'épissage *in vitro* en présence d'extraits nucléaires HeLa dépourvus de PTB et d'ARN interférence dans les cellules HeLa indiquent que PTB réprime l'épissage de l'exon 6B.

La répression de l'épissage de l'exon 6B par PTB intervient à une étape précoce de l'assemblage du spliceosome. Nous montrons par des expériences de pontage au psoralène que PTB empêche la fixation du snRNA U2 au niveau du point de branchement en amont de l'exon 6B. D'autre part, des expériences de pontage aux UV suivies d'immunoprécipitation indiquent que PTB inhibe l'interaction de la protéine U2AF65, facteur essentiel à la reconnaissance du point de branchement par U2 snRNP. L'analyse par gel retard indique que PTB et U2AF65 interagissent sur des sites chevauchants suggérant que PTB entre en compétition avec U2AF65 pour la fixation à l'ARN. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de pontage aux UV avec un ARN marqué à des positions spécifiques. De plus, la protéine PTB est capable de déplacer la protéine U2AF65. PTB réprime donc l'inclusion de l'exon 6B en inhibant la reconnaissance du site pyrimidique par U2AF65, empêchant ainsi la reconnaissance du point de branchement par U2 snRNP.

Le rôle des protéines CELF a été caractérisé par des expériences de transfection de lignée myogénique. La surexpression de trois membres de la famille CELF (CUG-BP, ETR3 et CELF4) augmente l'inclusion de l'exon 6B dans les myoblastes. Des expériences de co-transfection cellulaire montrent un antagonisme entre les protéines CELF et PTB. De manière intéressante, l'expression de la protéine PTB diminue au cours de la différenciation myogénique alors que celle de CUG-BP augmente suggérant que la concentration relative des protéines de la famille CELF et PTB puisse jouer un rôle clé dans la sélection de l'exon 6B au cours de la différenciation myogénique.

## **O48. RBMY, une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le contrôle de la spermatogenèse chez les mammifères**

Bourgeois Cyril F. (1), Skrisovska Lenka (2), Kister Liliane (1), Grellscheid Sushma-N. (3), Elliott David J. (3), Allain Frédéric H.T.(2) et Stévenin James (1)

(1) Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Inserm U596, CNRS UMR7104, Université Strasbourg I, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67400 Illkirch, France.

(2) Institute of Molecular Biology and Biophysics, ETH Zurich, CH-8093 Zürich, Switzerland.

(3) Institute of Human Genetics, University of Newcastle-upon-Tyne, Newcastle-upon-Tyne NE1 3BZ, UK.

[cyril@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:cyril@igbmc.u-strasbg.fr)

Le gène *RBMY* est localisé sur le chromosome Y des mammifères, dans une région qui peut être soumise à des délétions associées à une infertilité masculine par azoospermie (absence totale de spermatozoïdes). La protéine RBMY est une hnRNP dont la fonction est encore très mal connue, mais qui est exprimée exclusivement dans les cellules germinales au cours de la spermatogenèse. Elle possède un domaine de liaison à l'ARN et un domaine d'interaction protéine-protéine qui lui permet notamment d'interagir avec certaines protéines SR, des facteurs jouant un rôle essentiel au cours de la maturation des ARN, et plus particulièrement dans les mécanismes de régulation de l'épissage. L'existence de ces interactions, comme d'autres résultats, suggère que RBMY pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la spermatogenèse en régulant, par exemple, l'épissage de certains transcrits de manière spécifique à cette voie de différenciation.

Nous avons montré précédemment que l'interaction entre RBMY et les protéines SR perturbe *in vitro* l'épissage de transcrits placés sous la dépendance de ces protéines SR et nous poursuivons cette approche en utilisant des cellules transfectées. Parallèlement, nous avons concentré notre attention sur le domaine de liaison à l'ARN de RBMY, et avons identifié (par la technique de SELEX) les séquences d'ARN reconnues avec une haute affinité par la protéine humaine. Ces séquences ont la particularité de former une structure secondaire en tige-boucle très spécifique. La résolution par RMN de la structure du complexe ARN-protéine, ainsi qu'une étude de mutagenèse, ont permis de valider ces résultats et de révéler l'existence d'un mode original de reconnaissance de l'ARN. Curieusement, cette spécificité et ce mode de reconnaissance semblent être uniques à la protéine RBMY humaine, puisque ni la hnRNP G, une protéine exprimée ubiquitairement à partir d'un gène autosomal paralogue de *RBMY*, ni la protéine RBMY de souris ne reconnaissent de telles séquences. Nous recherchons maintenant les cibles naturelles de RBMY, par une approche *in silico* associée à une analyse fonctionnelle de la protéine en cellules transfectées avec des minigènes porteurs de motifs de reconnaissance pour la protéine.

## **O49. Contrôle traductionnel de l'épissage des messagers eucaryotes révélé par les introns du cilié *Paramecium tetraurelia***

Jaillon Olivier (1), Duret Laurent (2), Aury Jean-Marc (1), Gout Jean-François (2), Noël Benjamin (1), Anne Le Mouél (3), Gersende Lepère (3), Mariusz Nowacki (3), Mireille Bétermier (4), Betina M. Porcel (1), Vincent Schächter (1), Patrick Wincker (1), Jean Cohen (4), Linda Sperling (4), Eric Meyer (3).

(1) Genoscope and CNRS UMR 8030, 2 rue Gaston Crémieux CP5706, 91057 Evry, France.

(2) Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive CNRS UMR 5558, Univ. Lyon 1, Villeurbanne, France.

(3) Laboratoire de Génétique Moléculaire, CNRS UMR 8541, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

(4) Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.  
*emeyer@biologie.ens.fr*

Most eukaryotic genes are interrupted by non coding introns that must be accurately removed from pre-mRNAs to produce translatable mRNAs. Splicing is locally guided by short conserved sequences, but genes contain many potential splice sites that are never used, and the mechanisms controlling splicing patterns remain poorly understood. In multicellular organisms, splicing specificity is relaxed and multiple mRNA variants are frequently produced by alternative splicing, a process that can be regulated by a variety of auxiliary motifs in exons and introns. The observed sets of spliced mRNAs may also be shaped by the selection of translatable variants: up to a third of human mRNA variants contain premature termination codons (PTC) making them targets of the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) conserved pathway. Pre-mRNA translatability has further been proposed to influence splice site choice through unknown mechanisms, but this remains controversial. Here we show that the very short introns of the ciliate *Paramecium tetraurelia* are under strong selective pressure to introduce PTCs in pre-mRNAs or incompletely spliced mRNAs. The bias is also observed in multicellular eukaryotes, where it can be revealed by an analysis of the shortest introns. This indicates that mRNA translatability is an important factor that determines splicing patterns, even in organisms that use little or no alternative splicing.

## **O50. Identification d'ARNm ciblés par la désadénylation dépendante de la protéine EDEN-BP/CUG-BP**

Graindorge Antoine (1), Thuret Raphaël (2), Pollet Nicolas (2), Osborne Howard B. (1) et Audic Yann (1)

(1) CNRS UMR6061 Génétique et développement, IFR140, Génétique Fonctionnelle Agronomie et Santé, Faculté de Médecine, Université de Rennes1, Rennes, France.

(2) CNRS UMR8080, Université Paris Sud, Orsay, France.

*antoine.graindorge@univ-rennes1.fr*

Les régulations post-transcriptionnelles (stabilité, localisation, traductabilité des ARNm) jouent un rôle important dans le contrôle de l'expression génétique. Chez *Xenopus tropicalis*, les premières étapes du développement (de la maturation ovocytaire jusqu'au stade Mid-Blastula – 4000 cellules) se déroulent en l'absence de transcription et de dégradation des ARNm. Dans ce contexte, le contrôle de l'expression génétique repose sur les régulations post-transcriptionnelles des ARNm maternels stockés pendant l'ovogénèse. Le contrôle de l'état d'adénylation d'un ARNm permet notamment de réguler sa traduction et sa stabilité : un ARNm possédant une queue poly(A) est généralement traduit, au contraire d'un ARNm désadénylé.

Certains ARNm possèdent dans leur région 3' non traduite une séquence appelée EDEN (Embryonic Deadenylation EleMeNt). La fixation de la protéine EDEN-BP sur cette séquence entraîne, à partir de la fécondation, la désadénylation de l'ARNm ciblé et donc l'inhibition de sa traduction. A ce jour, quatre cibles de la désadénylation dépendante d'EDEN-BP après la fécondation sont connues : Eg2/Aurora A, Eg5, c-mos et Xsu(H).

Dans le but d'identifier de nouveaux ARNm ciblés par cette désadénylation, nous avons immuno-purifié la protéine EDEN-BP et analysé la population d'ARNm co-purifiés dans ces mRNPs par puces à ADN (3000 gènes testés). Cette analyse a permis d'identifier une centaine d'ARNm candidats. Des analyses de séquence indiquent que la proportion de motifs EDEN (tels que définis en SELEX) augmente dans les régions 3' non traduites des ARNm co-purifiés. La fixation d'EDEN-BP sur les candidats testés a été validée *in vitro* par des expériences de retard sur gel. Des expériences de biotine pull-down sont réalisées pour tester *in vitro* la fixation d'EDEN-BP endogène sur ces ARNm candidats, ainsi que des expériences d'immuno-neutralisation d'EDEN-BP suivies d'une analyse de l'état d'adénylation de ces ARNm candidats pour vérifier le rôle de ce facteur dans leur désadénylation.

L'identification de nouvelles cibles d'EDEN-BP permettra de découvrir des ARNm jouant un rôle dans la progression du cycle cellulaire et/ou le développement précoce de l'embryon. Cette étude permettra également une définition plus précise de la séquence EDEN naturelle, afin de rechercher *in silico* d'autres ARNm-cibles d'EDEN-BP.



## **O51. La protéine MLN51 est recrutée dans les granules de stress, indépendamment de son interaction avec le complexe de jonction des exons.**

Aurélie Baguet<sup>1</sup>, Sébastien Degot<sup>1</sup>, Hervé Le Hir<sup>2</sup>, Corinne Wendling<sup>1</sup>, Marie-Christine Rio<sup>1</sup> et Catherine Tomasetto<sup>1</sup>.

(1) Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Département de Pathologie Moléculaire, UMR7104CNRS/U596INSERM/Université Louis Pasteur, BP 10142, 67404 Illkirch, C.U. de Strasbourg, France. [abaguet@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:abaguet@igbmc.u-strasbg.fr).

(2) Centre de Génétique Moléculaire, CNRS UPR2167, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

MLN51 (Metastatic Lymph Node 51) est une protéine nucléo-cytoplasmique participant au complexe de jonction des exons (EJC). L'EJC est un complexe multi-protéique formé d'au moins neuf protéines : Magoh, Y14, RNPS1, SRm160, REF, UAP56, eIF4AIII, MLN51 et Pinin, déposé au cours de l'épissage, 20-24 nucléotides en amont de la jonction exonique. L'EJC influence le devenir cytoplasmique des ARNm en favorisant l'export nucléaire, la traduction et participe également aux mécanismes de surveillance tel que le NMD (Non sense Mediated mRNA Decay). Chez la mouche, les équivalents de plusieurs protéines de l'EJC sont impliqués dans la localisation de certains ARNm et sont essentiels au développement embryonnaire.

L'EJC est un complexe dynamique organisé autour d'un cœur formé de protéines interagissant directement avec l'ARN nouvellement épissé. Récemment il a été mis en évidence que le cœur du complexe était formé, en présence d'ATP, par l'association entre les protéines MLN51, Magoh, Y14, eIF4AIII et l'ARNm. MLN51 possède un module protéique conservé nommé SELOR pour SpEckles LOcalizer and RNA binding module. Ce module d'environ 80 acides aminés est nécessaire à l'interaction du dimère Magoh/Y14 avec eIF4AIII et donc à la formation du cœur de l'EJC.

La protéine MLN51 est surexprimée dans 30% des cancers du sein. Dans les cellules cancéreuses où la protéine MLN51 s'accumule, sa localisation est majoritairement cytoplasmique mais son marquage peut parfois être granulaire. MLN51 est une protéine liant les ARN et les ARNm non traduits peuvent être présents dans des granules cytoplasmiques. Nous avons donc étudié la présence de MLN51 dans ces granules cytoplasmiques *in vivo*. La protéine MLN51 est recrutée dans les granules de stress contenant de l'ARNm et la protéine FMRP. En utilisant différents mutants de MLN51 nous avons montré que son association à ces granules était vraisemblablement indépendante de son incorporation aux ARNm *via* la formation de l'EJC et qu'elle était liée à la présence d'un domaine C-terminal riche en proline.

Par ailleurs, la surexpression d'un mutant « dominant négatif » altère la formation des granules de stress sans toutefois modifier la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ .

Ces résultats suggèrent que MLN51 joue un rôle important dans la formation des granules de stress et agit en aval de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  entraînant la séquestration des ARNm non traduits dans les granules de stress.

## **O52. Synthèse prébiotique de précurseurs potentiels de l'ARN.**

Anastasi Carole (1), Crowe Michael (1), Powner Matthew (1), Sutherland John (1).

(1) School of Chemistry, The University of Manchester, Oxford road, Manchester M20 2YA, U.K.

*anastasicarole@yahoo.fr*

Il a été démontré que le ribose, sucre indispensable à la synthèse prébiotique de l'ARN, est d'une part difficile à synthétiser en conditions prébiotiques et d'autre part peu stable. Lors de précédents travaux nous avons montré que la ribose amino-oxazoline présentait une plus grande stabilité que le sucre libre, mais qu'il s'agissait également d'un précurseur avancé des nucléosides pyrimidiques. Néanmoins étant donné l'instabilité du ribose la question de sa formation se pose. La réponse à cette question est restée longtemps en suspens, mais récemment de nouvelles études nous ont permis de démontrer que les différents pentoses amino-oxazolines pouvaient être obtenus au cours d'une réaction court-circuitant l'étape de synthèse des sucres libres correspondants. En effet la 2-amino-oxazole, résultant de la condensation du cyanamide et du glycolaldéhyde, réagit avec le glycéraldéhyde en conditions douces. Ce remarquable processus est quantitatif et de plus possède une grande stéréosélectivité pour la ribose amino-oxazoline et l'arabinose amino-oxazoline.

## O53. Dégradation des ARNm chez le phage T4 : une cascade de coupures endoribonucléolytiques de 5' en 3' régulée par le statut de l'extrémité 5' de l'ARNm

Sylvain Durand, Graziella Richard, Marc Uzan

Institut Jacques Monod, CNRS, Universités Paris VI et VII. 2, Place Jussieu, 75251 Paris cedex 05

durand@ijm.jussieu.fr

La dégradation des ARNm est une étape clef de la régulation de l'expression génétique. Cette dégradation est le résultat de l'action combinée d'exo- et d'endoribonucléases. Chez les procaryotes, la dégradation se fait essentiellement suivant une polarité 5'-3'. Or, aucune exonucléase de cette polarité n'a été identifiée à ce jour dans les bactéries. L'un des modèles propose une action successive de coupures endoribonucléolytiques de 5' en 3' dans l'ARNm, chaque fragment d'ARN étant ensuite rapidement dégradé par les exoribonucléases 3'-5'. Cependant, ce modèle reste à démontrer et ses détails mécanistiques à élucider.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de dégradation des ARNm initiée par des coupures endonucléolytiques, nous nous sommes intéressés à l'endoribonucléase RegB du bactériophage T4. Elle déstabilise de manière importante les ARNm précoces du phage, mais n'affecte pas ou très peu la stabilité des transcrits synthétisés ultérieurement dans le cycle viral. De plus, il a été observé dans le laboratoire qu'un clivage par RegB permettait une seconde coupure, par une endonucléase qui était encore non identifiée à ce jour. Cette coupure « secondaire » à lieu 6 à 8 nucléotides en aval du site de clivage par RegB, dans une région riche en A.

La spécificité de séquence de cette seconde enzyme nous a amené à tester le rôle de la RNase E et de la RNase G d'*E.coli*. L'analyse de souches mutantes pour ces deux enzymes nous a permis de déterminer que, pour les ARNm étudiés, la RNase G est la principale enzyme responsable de ces coupures secondaires. En revanche, la RNase E n'intervient pas ou très peu dans ces clivages. Nous avons ensuite voulu comprendre la dépendance de la RNase G vis à vis d'une coupure préalable par RegB. Des travaux antérieurs avaient montré, *in vitro*, que la RNase G était activée en présence d'une extrémité libre 5'-P. Or, RegB après coupure libère une extrémité 5'-OH. Cette observation nous a conduit à rechercher une fonction capable de phosphoryler l'extrémité 5'-OH libérée par RegB. Nous avons trouvé que la polynucléotide kinase, codée par le phage T4, assure cette fonction et permet ainsi à l'ARN d'être attaqué par la RNase G.

Nos travaux démontrent pour la première fois *in vivo* (1) la nécessité pour un transcrit d'être mono-phosphorylé en 5' afin d'être attaqué par certaines endonucléases et finalement dégradé. L'absence de cette étape de phosphorylation constitue un véritable « verrou » à la dégradation des ARNm (2) un exemple de mécanisme de dégradation des ARNm de 5' en 3', par une cascade de coupures endonucléolytiques successives assurées par au moins deux endonucléases différentes.

## **O54. Deux nouvelles endoribonucléases (J1 et J2) chez *Bacillus subtilis* qui partagent des caractéristiques fonctionnelles avec la RNase E d'*E. coli***

Even Sergine (2), Hébert Agnès (1), Zig Lena (1), Pellegrini Olivier (1), Putzer Harald (1)

(1) IBPC, CNRS UPR9073, 13 rue P. et M. Curie, Paris, France

(2) INRA, UMR1253, Laboratoire de Microbiologie, 65 rue de Saint Briec, Rennes, France  
*putzer@ibpc.fr*

La RNase E joue un rôle clef dans la dégradation de l'ARNm chez *E. coli* or un grand nombre d'organismes procaryotes ne possèdent pas d'équivalent de cette enzyme. Nous avons récemment identifié deux endoribonucléases paralogues chez *B. subtilis* codées par des gènes de fonction jusqu'alors inconnue (*ykqC* et *ymfA*) et les avons nommées RNase J1 (*rnjA*) et J2 (*rnjB*). Les RNases J1 et J2 ont été trouvées associées au ribosome. Seul la RNase J1 est essentielle à la survie bactérienne.

Ces deux enzymes n'ont aucune homologie de séquences avec la RNase E quoique partageant avec elle des similarités fonctionnelles.

Ces nucléases sont capables de cliver la région 5' non-codante du gène *thrS* de *B. subtilis* à un site qui peut également être clivé par la RNase E d'*E. coli*. Nous avons montré précédemment qu'un clivage à cet endroit augmente la stabilité du transcrit en aval. Une analyse de divers ARNm a révélé qu'un clivage peut avoir lieu dans des régions codantes ou non codantes.

Les RNases J1 et J2 sont sensibles à l'état de phosphorylation en 5' du substrat ce qui renforce l'analogie avec la RNase E.

Ces enzymes appartiennent à la famille des metallo- $\beta$ -lactamases. Des orthologues se trouvent conservés chez de nombreuses eubactéries ne disposant pas du couple RNase E et G ainsi que dans les archées. Nous avons également identifié des orthologues potentiels chez les plantes.

Les RNases J1 et J2 représentent une nouvelle classe d'endoribonucléases qui semblent être impliquées dans des clivages régulateurs et la maturation d'ARNm spécifiques mais qui pourraient également contribuer à la dégradation globale des ARNm.

## **O55. Le manque de contrôle de la transcription dans les mitochondries d'*Arabidopsis thaliana* est contrebalancé par une surveillance des ARN.**

Sarah Holec, Heike Lange, Dominique Gagliardi

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes – CNRS UPR2357, 12 rue du général Zimmer, 67084 Strasbourg cedex, France

*sarah.holec@ibmp-ulp.u-strasbg.fr*

Les génomes mitochondriaux des plantes, contrairement aux génomes mitochondriaux des animaux, sont de grandes molécules, avec de larges régions non codantes. Par exemple, le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* fait 367kpb tandis que celui de l'homme fait seulement 16,6kpb. De plus, les gènes mitochondriaux de plante ont souvent des promoteurs multiples. La régulation et la terminaison de leur transcription sont minimales. Les ARN matures et fonctionnels sont issus de plusieurs événements post-transcriptionnels : épissage, édition, maturation. Le taux de ces ARN dans la mitochondrie est dû à l'équilibre entre leur stabilisation et leur dégradation. Au contraire des ARN messagers nucléaires, la polyadénylation des ARN des mitochondries de plante ne conduit pas à leur stabilisation, mais à leur dégradation par la Polynucléotide Phosphorylase (PNPase) (1). Ce phénomène est retrouvé chez *E.coli* (2) et dans les chloroplastes (3).

Dans cette étude, nous avons identifié des ARN polyadénylés, s'accumulant dans les plantes d'*Arabidopsis thaliana* sous-exprimant la PNPase (plantes PNP-). L'exploitation de ces données a révélé que la PNPase était responsable de la dégradation des sous-produits de la maturation des ARN ribosomiques et de transfert. Mais surtout, la PNPase est impliquée dans la dégradation d'ARN provenant de régions qui, bien qu'étant exemptes de gène connu, sont parfois très fortement transcrites. Certains de ces transcrits présentent un danger potentiel pour les fonctions de la mitochondrie. C'est le cas de ceux qui contiennent des cadres de lectures chimériques créés par recombinaison, ou des ARN antisens transcrits à partir du brin opposé à celui d'un gène connu. Des transcrits aberrants et non fonctionnels sont donc produits en permanence mais rapidement dégradés par la PNPase.

Ainsi, le transcriptome des mitochondries d'*Arabidopsis thaliana* ne dépend pas directement de la transcription mais du contrôle de la stabilité des ARN, qui s'appuie sur la polyadénylation et la dégradation par la PNPase (4).

1. Gagliardi, D. and Gualberto, J. M. (2004) Gene expression in higher plant mitochondria. Dans "Plant mitochondria: from genome to function". Editeurs: A. Day, A. Millar, J. Whelan. Kluwer Academic Publishers. 55-82.
2. Dreyfus M. and P. Regnier. 2002. The poly(A) tail of mRNAs : bodyguard in eucaryotes, scavenger in bacteria. Cell 111 : 611-613.
3. Bollenbach TJ, Schuster G, Stern DB. Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2004;78:305-37.
4. Holec S., H. Lange, K. Kühn, M. Alioua, T. Börner and D. Gagliardi. 2006. Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. Mol. Cell. Biol. 26 : 2869-2876.

## **O56. La régulation de la stabilité des ARNm mitochondriaux par la RNase L dépend de la traduction et contrôle l'apoptose induite par l'IFN $\alpha$ .**

Le Roy Florence (1), Silhol Michelle(2), Salehzada Tamim(3) et Bisbal Catherine(3).

(1) FRE2937, Institut André Lwoff, 7 rue Guy Moquet, BP3 94801 Villejuif Cedex.

(2) INSERM 710, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier.

(3) UPR CNRS 1142, Institut de Génétique Humaine, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier.

*leroyfg@vjf.cnrs.fr*

Les interférons (IFN) inhibent la croissance de différents types cellulaires en régulant spécifiquement l'expression de certains gènes. L'activité des IFN est médiée en partie par la voie 2'-5' oligoadenylates-RNase L. La RNase L est une endoribonucléase nécessitant l'activation par des 2'-5' oligoadenylates pour cliver l'ARN simple brin. Nos résultats montrent le rôle central de la dégradation des ARNm mitochondriaux par la RNase L dans l'apoptose induite par les IFNs. Nous identifions et caractérisons le facteur d'initiation de la traduction mitochondrial IF2mt comme un nouveau partenaire de la RNase L. Par ailleurs, nous montrons que l'inhibition spécifique de la traduction mitochondriale par le chloramphenicol inhibe la dégradation des ARNm induite par l'IFN $\alpha$ . Finalement, nous montrons que la surexpression de IF2mt dans les cellules H9 stabilise les ARNm mitochondriaux, inhibe l'apoptose induite par l'IFN $\alpha$  et reverse partiellement l'inhibition de la croissance cellulaire par l'IFN $\alpha$ . Sur la base de ces résultats nous proposons un modèle décrivant comment la RNase L régule la stabilité des ARNm mitochondriaux via son interaction avec IF2mt.

## **O57. Structure tridimensionnelle du cœur de l'EJC (Exon Junction Complex) organisé autour de l'ARN hélicase eIF4AIII.**

Christian B.F. Andersen<sup>1</sup>, Lionel Ballut<sup>1,2</sup>, Klaus Nielsen<sup>1</sup>, Jesper Johansen<sup>1</sup>, Bertrand Séraphin<sup>2</sup>, Hervé Le Hir<sup>2</sup> et Gregers R. Andersen<sup>1</sup>

1: Department of Molecular Biology, University of Aarhus, Denmark

2: Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

*herve.lehir@cgm.cnrs-gif.fr*

Chez les mammifères, le complexe multiprotéique appelé EJC (de l'anglais "Exon Junction Complex") est assemblé sur les ARN messagers en amont des jonctions exoniques suite à la réaction d'épissage. L'EJC est composé d'un complexe cœur qui d'une part, se lie de manière stable à l'ARN et d'autre part, sert de plate-forme d'ancrage pour de nombreux facteurs. La composition dynamique de l'EJC au cours du voyage des ARNm dans la cellule, lui permet d'intervenir dans des processus aussi divers que le transport, la traduction et la dégradation des ARNm. Nous avons récemment reconstitué le cœur de l'EJC à l'aide des protéines recombinantes Magoh, Y14, le domaine Selor de MLN51 et l'ARN hélicase à boîte DEAD, eIF4AIII, en présence d'ATP et d'ARN simple brin (Ballut et al. 2005). Nous avons ainsi montré que l'association stable et séquence indépendante du cœur de l'EJC avec l'ARN est maintenue par inhibition de l'activité ATPase d'eIF4AIII par l'hétérodimère Magoh/Y14.

Nous avons maintenant déterminé la structure du cœur de l'EJC assemblé sur un ARN polyU en présence d'ADPNP (analogue non hydrolysable de l'ATP) par cristallographie aux rayons X à une résolution de 2,2 Å. Nous avons été capable de modéliser la majorité des résidus des quatre protéines excepté pour Selor dont deux-tiers des résidus sont désordonnés. La densité électronique de six bases de polyU, de l'ADPNP et d'un ion magnésium au site catalytique a été également observée.

Le cœur de l'EJC est un complexe allongé avec une dimension totale de 99x67x54 Å. Les deux domaines d'eIF4AIII (1 et 2) adoptent une conformation compacte dans laquelle est enfermée l'ADPNP qui interagit avec cinq motifs conservés. Selor interagit avec les deux domaines d'eIF4AIII. Sur la face opposée du complexe, Magoh/Y14 contacte le domaine 2 et la région reliant les deux domaines. Dans eIF4AIII, quatre motifs conservés forment de nombreuses interactions avec le squelette ribose-phosphate de l'ARN. Quatre des six groupements 2'-OH des riboses sont reconnus par eIF4AIII permettant ainsi une reconnaissance spécifique de l'ARN. Nous discuterons du mécanisme par lequel Magoh/Y14 pourrait inhiber l'activité ATPase d'eIF4AIII, ainsi que des sites d'interactions spécifiques qu'offre ce complexe pour l'association des facteurs périphériques de l'EJC.

*Ballut L, Marchadier B, Baguet A, Tomasetto C, Séraphin B, Le Hir H. (2005). The Exon-Junction complex is locked onto mRNA by inhibition of eIF4A3 ATPase activity. Nature Structural and Molecular Biology 12(10):861-869.*

## **O58. Visualisation de la synthèse des ARN messagers dans des cellules vivantes**

Xavier Darzacq<sup>1</sup>, Yaron Shav-Tal<sup>2</sup> et Robert H. Singer<sup>3</sup>

(1) Laboratoire de Génétique Moléculaire, UMR 8541, Ecole Normale Supérieure, Paris, 75005, France

(2) The Mina & Everard Goodman Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat Gan 52900, Israel

(3) Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

*darzacq@ens.fr*

La transcription d'un ARN messager par l'ARN polymérase II (pol II) est une réaction complexe impliquant différentes étapes de recrutement et assemblage du complexe enzymatique sur un gène particulier avant que l'étape d'élongation du transcrit ARN ne prenne place. Nous décrivons ici une méthodologie permettant de quantifier ces différentes étapes sur un gène unique et dans une cellule vivante. Nous utilisons le marquage de différents composants de la machinerie transcriptionnelle pour cibler différents états d'activité de cette machine moléculaire en utilisant des techniques telles que le FRAP et la photo-activation.

Nous montrons que le recrutement d'une ARN Pol II capable d'allonger efficacement un ARN messager sur notre gène rapporteur est un processus très inefficace ou 1.25% des polymérases recrutées sur le gène seront finalement capables de produire un ARN messager. La réaction enzymatique elle-même semble opérer à des vitesses d'élongation de l'ordre de 4.3 kilobases par minute. Nous identifions également une sous population de polymérases qui semblent être engagées dans un processus lent qui correspondrait à des pauses transcriptionnelles. Ce travail permet de proposer le premier « bilan cinétique » de l'activité transcriptionnelle de l'ARN pol II sur un gène particulier et dans une cellule vivante.



## O59. New approaches to study RNA processing in real-time in live cells

Eugenia Basyuk (1), Stéphanie Boireau (1), Alessandro Marcello (2), and Edouard Bertrand.  
(1)

(1)IGMM, UMR 5535, 1919 route de Mende, Montpellier 34293, Cedex 5

(2) ICGEB, Padriciano, 99 - 34012 Trieste, Italie

*Eugenia.basyuk@igmm.cnrs.fr*

Many critical steps controlling gene expression occur at the mRNA transcription sites. This includes transcriptional control, splicing, 3'-end formation, and release of the mRNA into the nucleoplasm.

We have developed a system to visualize HIV-1 gene expression at the level single cells and in real time. The DNA is tagged with multiple copies of LacO sites, while the mRNA is tagged with 24 copies of MS2-binding sites. Transfection of Tat induces expression of HIV-1 mRNAs, and the transcription site becomes visible as a bright spot within the nucleus. With this system, we have undertaken studies of the dynamic of HIV-1 transcription sites.

With a new method, dubbed RNA FRAP (fluorescent recovery after RNA photobleaching), we have built a model of early RNA biogenesis. With this model, we could estimate the initiation and elongation rate of RNA pol-II, and the residency time of newly synthesized RNA at the transcription site. Similar studies are now being performed with slightly different reporters to analyze the rates of splicing.

These cell lines can also be used to analyze events at the protein levels: recruitment of specific factors to the HIV-1 transcription sites, and their residency times at this location. With these experiments, we hope to provide novel information on the basic processes of gene expression.

## **O60. Identification des premiers facteurs protéiques membranaires impliqués dans le transport des ARNt cytosoliques dans la mitochondrie végétale : VDAC et les protéines du complexe TOM**

Salinas Thalia, Duchêne Anne-Marie, Delage Ludovic, Zaepfel Marlyse et Maréchal-Drouard Laurence.

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP). UPR du CNRS n°2357, 12 rue du Général Zimmer, 67000 Strasbourg, France.

*thalia.salinas@ibmp-ulp.u-strasbg.fr*

Au cours de l'évolution, les génomes mitochondriaux ont subi de multiples réarrangements, aboutissant à la perte d'information génétique. Une des conséquences est que le nombre d'ARN de transfert (ARNt) codés par le génome mitochondrial n'est pas suffisant pour permettre la traduction mitochondriale. Afin de combler ce manque, des ARNt codés dans le génome nucléaire sont importés du cytosol vers la mitochondrie.

Bien que ce transport soit un processus largement répandu chez les eucaryotes, il reste encore mal compris. En utilisant les plantes comme modèle, nous avons cherché à comprendre comment l'ARNt, une molécule chargée négativement, pouvait traverser la double membrane mitochondriale contre le gradient électrochimique.

Nous avons démontré par des études biochimiques et par l'utilisation d'un système *in vitro*, que la protéine « Voltage Dependent Anion Channel » (ou VDAC) connue jusqu'à maintenant pour être un transporteur de métabolites, est impliquée dans la translocation des ARNt à travers la membrane mitochondriale externe. De plus, nous avons montré que la fixation des ARNt sur la membrane externe ne se fait pas directement par VDAC mais plutôt par l'intermédiaire de TOM20 et TOM40, des protéines jusqu'alors caractérisés comme des composants du complexe d'importation des protéines. Cependant, bien que les machineries d'import des protéines et des ARNt dans la mitochondrie utilisent des facteurs communs, nous avons pu montrer par des expériences de compétition *in vitro* que les deux mécanismes sont bien distincts.

Ainsi, nos travaux nous ont permis de décrire chez les plantes un mécanisme de transport des ARNt du cytosol vers la mitochondrie végétale, différent de ceux précédemment établis pour d'autres modèles et qui utilise des protéines ayant acquis des fonctions multiples au cours de l'évolution.

# **Présentations orales des partenaires privés**



## **Communication orale de la société SIGMA-ALDRICH**

### **Banques shRNA Humaine et Murine**

Fabrice Sabathé,  
Sigma-Aldrich, France

Mission shRNA™ est une librairie de 150,000 clones shRNA ciblant 30,000 gènes annotés humains et murins.

Cette banque est issue du consortium RNAI regroupant des centres académiques universitaires et privés américains. La composition des centres de recherche académique sont le Broad Institute, la Harvard Medical School (HMS), le Massachusetts Institute of Technology (MIT), le Dana-Farber Cancer Institute (DFCI), le Whitehead Institute for Biomedical Research (WIBR). Parmi les centres privés Novartis, Eli Lilly, Bristol-Myers Squibb, Sigma-Aldrich et le centre Academia Sinica in Taiwan.

#### **Caractéristiques :**

I

**Large couverture :** 3-5 constructions shRNA par cible

**Vecteur Lentiviral :** pseudotype VSV-G pour la transduction de lignées difficiles (cellules primaires, hématopoïétiques, neurones, adenocytes, ...).

**Flexibilité :** Extinction transitoire ou stable (sélection en présence de puromycine).

**Application :** *in vitro* et *in vivo*.

**Efficacité d'extinction :** Validation des constructions par les membres du Consortium. Une garantie d'au moins 70 % d'extinction.

**Formats disponibles :** Bactérien, plasmides et particules Lentivirales

**Qualité :** Librairie vérifiée par séquençage et restriction enzymatique.

La présentation sera axée sur un descriptif de la banque shRNA (vecteurs, design, ...) ainsi que sur la discussion de données d'application sur différents modèles cellulaires.

## **Communication orale de la société AMBION**

microRNA : Tiny Regulators with Global Impact  
Profiling and Functional Studies  
Case Study : Ras Protein Regulation by let7

MicroRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Markers of Disease

J. Shingara, K. Keiger, J. Shelton, P. Powers, I. Wolf, R. Jarvis, M. Byrom, A. Cheng, R.  
Conrad, E. Labourier, D. Brown,  
*Ambion, Inc., 2130 Woodward, Austin, Texas 78744*

MicroRNAs (miRNAs) are small, siRNA-like molecules encoded in the genomes of plants and animals that regulate the expression of genes by binding and modulating the translation of specific mRNAs. Several published reports have shown that the expression levels of some miRNAs are reduced in chronic lymphocytic leukemia, colonic adenocarcinoma, and Burkitt's lymphoma samples providing possible links between miRNAs and cancer. We developed methods for isolating and quantifying all of the known miRNAs in tissue samples. We have used these procedures to analyze tumor and normal adjacent tissues from patients with lung, colon, breast, prostate, bladder, thyroid, and pancreas cancer. Each tumor type can be readily distinguished from the accompanying normal samples based on the expression levels of 3-10 miRNAs. While each different tumor type was characterized by its own unique miRNA profile, it is interesting to note that several miRNAs appear to be up- or down-regulated in almost all tumor samples relative to normal adjacent tissue. This suggests that specific miRNAs might play roles in tumor suppression. Putative mRNA targets for a number of these miRNAs are known oncogenes providing a potential link with oncogenesis. We have developed reagents for up- and down-regulating specific miRNAs that have allowed us to identify genes (like RAS and MYC) and cellular processes (like proliferation and apoptosis) that are regulated by miRNAs. Further analysis of miRNA expression profiles in various disease states also suggests that these bioregulators play a role in disease progression.

Some of the data is based from our recent publication in Cell:

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) *RAS* is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* **120**: 635–47.

# Posters





---

## Session 1 - Biosynthèse des ribosomes

---

- **P1** Régulation de l'expression de l'opéron ribosomique infC-rpmI-rplT de *Bacillus subtilis* via un contrôle de type Riboswitch. Nasslie Choonee, Sergine Even, Léna Zig et Harald Putzer
- **P2** Specific involvement of an Hsp40 chaperone in the biogenesis of the yeast ribosomal large subunit. Demoinet E., Fromont-Racine M. and Lutfalla G.
- **P3** Étude de deux ARN hélicases à boîte D-E-A-D de la bactérie psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Gontier Gwendoline, Iost Isabelle, Dreyfus Marc.
- **P4** Rôle d'une ARN hélicase à boîte D-E-A-D dans l'assemblage des ribosomes chez *Escherichia coli*. Ivona Bagdiul, Marc Dreyfus et Isabelle Iost
- **P5** Etude fonctionnelle de la kinase Rio1p : une protéine régulatrice de la maturation de l'ARN ribosomique ? Julien Soudet , Annie Mougin, Jean-Paul Gelugne, Emilie Yétérián, & Michèle Caizergues-Ferrer
- **P6** Analyse génétique des facteurs associés à RPS15 dans la biogenèse des ribosomes. Chabosseau P, Gallardo F, Gleizes PE, Stahl G

---

## Session 2 - Maturation et modifications post-transcriptionnelles des ARN

---

- **P7** L'édition des ARN mitochondriaux de plantes . Bégu Dominique, Choury David & Araya Alejandro
- **P8** Mise en évidence directe de l'épissage co-transcriptionnel dans des cellules humaines. Bittencourt Danielle, Dutertre Martin, Auboeuf Didier
- **P9** Régulation du facteur d'épissage SF1 par la protéine kinase KIS. Maucuer Alexandre, Manceau Valérie, Swenson Matthew, Le Caer Jean-Pierre, Kielkopf Clara L., Sobel André
- **P10** Identification par protéomique de facteurs impliqués dans le contrôle de l'utilisation tissulaire d'un exon 3' terminal de l' $\alpha$ -tropomyosine lors du développement de l'embryon de Xénope. Vincent Anquetil, Serge Hardy et Agnès Méreau
- **P11** Etudes des mécanismes régulant la production de l'ARNm tat du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 par approche biochimique et par RMN. Houda Hallay, Nicolas Locker, Lilia Ayadi, Delphine Ropers, Jean Michel Saliou, Eric Guittet et Christiane Branlant
- **P12** Etude in vivo de la structure modulaire de l'hélicase à ARN Brr2p impliquée dans l'épissage chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Olivier.Cordin and Jean D. Beggs

- **P13** Conserved residues in the C-terminus of Prp43 are required for activity . Edwalds-Gilbert, G., Kum-Loong Boon, Tatsiana Auchynnika, Jean D. Beggs.
- **P14** Vers la compréhension de la fonction des ARN C/D orphelins chez les mammifères . Cavailé Marie-Line, Hoareau Magali, Marty Virginie, Vitali Patrice, Cavailé Jérôme
- **P15** L'Exon Junction Complex est-il un activateur de l'épissage ? Brice Marchadier , Lionel Ballut , Bertrand Séraphin et Hervé Le Hir
- **P16** Etude structurale et fonctionnelle sur la snoRNP U3 de *Saccharomyces cerevisiae*. Cléry Antoine, Senty-Ségault Véronique, Marmier-Gourrier Nathalie, Schlotter Florence et Branlant Christiane.
- **P17** Etude des bases moléculaires de la spécificité de reconnaissance entre l'ARN:Ψ-synthase Pus7 de *S. cerevisiae* et ses substrats. Alan Urban, Christophe Charron, Yuri Motorin et Christiane Branlant
- **P18** Analyse fonctionnelle de l'hnRNP Nab2p et comparaison de son activité de régulation de la polyadénylation avec celle de la protéine Pab1p. Viphakone N., Minvielle-Sebastia L.

---

### Session 3 - Transport des ARN

---

- **P19** Localisation des ARNm à la surface mitochondriale : outil de diagnostic et de traitement des pathologies mitochondriales. Kaltimbacher Valérie, Crystel Bonnet, Ellouze Sami, Simmonutti Manuel, Fradot Valérie, Sahel José A., Corral-Debrinski Marisol
- **P20** Biogenesis and trafficking of Box C/D snoRNPs occur in the nucleus and involve small RNA methylase Tgs1 in a CRM1 dependent manner. Céline Verheggen, Bérengère Pradet-Ballade, Cyrille Girard, Séverine Boulon, Conception Paul, Henri Neel, Rémy Bordonné, Edouard Bertrand
- **P21** Caractérisation de protéines impliquées dans l'importation nucléaire des snRNPs Daniela Lener, Edouard Bertrand et Remy Bordonné

---

### Session 4. Traduction

---

- **P22** Methylation-dependent accumulation of CIRP in cytoplasmic granules upon cellular stress.. Frederic De Leeuw, Tong Zhang, Georges Huez, Véronique Kruys, and Cyril Gueydan
- **P23** Liaison de l'ARNt initiateur par e/aIF5B, l'homologue eucaryote/archéen du facteur d'initiation bactérien IF2. Guillon L., Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y.
- **P24** La petite protéine B (SmpB) présente d'autres sites d'interactions avec l'ARN transfert-message (ARNtm) que sur le domaine pseudo-ARNt : les pseudonoeuds et la partie ARN messenger sont de nouveaux domaines d'interactions. Laurent Metzinger, Marc Hallier et Brice Felden

- **P25** Manipulation de l'expression génétique dans les mitochondries de plante par l'import de séquences passagères associées à une structure de type ARNt. Val Romain, Valentin Clarisse, Bouasker Samir, Dreher Théo, Dietrich André
- **P26** 5'NTR du VHC dimérise par le mécanisme de «kissing loop» complexe similaire à celui de 5'NTR du VIH-1. Marie Menade, Sandrine Papazian, Larissa Balakireva
- **P27** Interactions ARN/protéines au niveau de l'ARN SECIS : variations autour du motif L7A/L30 et des ARN en K-turn. Laurence Wurth , Antoine Cléry , Christiane Branlant , Alain Krol et Christine Allmang
- **P28** Contrôle de l'état d'adénylation des ARNm maternels lors du développement de *Xenopus Tropicalis*. Antoine Graindorge, H.B. Osborne, Yann Audic
- **P29** Méthylations ciblées de l'ARN ribosomique comme outil pour étudier les évènements de décodage non conventionnels chez *Saccharomyces cerevisiae*. Baudin-Baillieu A., Fournier M.J., Decatur W. , Rousset J.P.
- **P 30** L'enzyme MnmC, codée par le gène yfcK d'*Escherichia coli* catalyse les deux dernières étapes de la biosynthèse de mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U, une uridine hypermodifiée en position wobble de certains ARNt. Yamina Oudjama, Martine Roovers, Joël Caillet, Janusz M. Bujnicki and Louis Droogmans
- **P31** Etude du gène IMP3 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cosnier Bruno, Hermann Sylvie, Rousset Jean-Pierre, Fabret Céline
- **P32** Identification of the sequence determinants mediating the nucleocytoplasmic shuttling of TIAR/TIA-1 RNA-binding proteins.. Tong Zhang, Nathalie Delestienne, Georges Huez, Véronique Kruys, and Cyril Gueydan.
- **P33** La méthylation de eRF1 chez *Saccharomyces cerevisiae* nécessite la présence d'un hétérodimère, composé de l'enzyme Ydr140w et d'une protéine à doigt de zinc, Ynr046w. Valérie Heurgué-Hamard, Nathalie Scrima et Richard H. Buckingham
- **P34** Les facteurs de traductions dans le génome de l'oursin. . Julia Morales, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé, Bertrand Cosson, Emmanuelle Morin, Patrick Cormier
- **P35** Caractérisation de la poly(A) polymérase XGld2 et de son interacteur RBM9, une protéine liant l'ARN chez le Xénope. Catherine Papin, Christel Rouget, Elisabeth Mandart
- **P36** Détermination de la voie de formation du Gln-tRNA<sup>GLN</sup> dans les mitochondries et les chloroplastes chez *Arabidopsis thaliana* Pujol Claire, Bailly Marc, Maréchal-Drouard Laurence, Becker Hubert, Duchêne Anne-Marie.

---

## Session 5. Stabilité et dégradation des ARN

---

- **P37** Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles des ARN messagers d'Igf2. Frank Court, Hélène Hagège, Roudaïna Nasser, Michaël Weber, Caroline Braem, Thierry Forné, Guy Cathala

- **P38** The ARE-associated factor AUF1 binds the poly(A) in vitro in competition with PABP. Francis Sagliocco, Benoît Laloo, Bertrand Cosson, Laurence Laborde, Michel Castroviejo, Jean Rosenbaum, Jean Ripoche and Christophe Grosset.
- **P39** La sur-expression d'une nouvelle protéine contrôlant la stabilité des ARN mitochondriaux est capable de compenser des défauts d'assemblage des complexes respiratoires dus à des mutations dans OXA1 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Nouet Cécile., Hlavacek Otakar., Bourens Myriam, Marsy Sophie, Lemaire Claire and Dujardin, Geneviève.
- **P40** La stimulation de RegB par son co-facteur, la protéine ribosomique S1, nécessitent une séquence conservée de 10-12 nucléotides Sylvain Durand, Graziella Richard, Marco Bisaglia, Soumaya Laalami, François Bontems et Marc Uzan
- **P41** NPM-ALK cytoplasmic granules: A functional relevance to oncogenesis? Mohamad-Ali FAWAL, Henri DUPONT and Dominique MORELLO
- **P42** Relationships between premature termination, NMD, and the poly(A)-binding protein. Kervestin S., and Jacobson A.

---

## Session 6. ARN régulateurs

---

- **P44** Les dicistrons tsnoARNs chez les plantes, étude in vivo in vitro, du gène à la particule ribonucléoprotéique. Nicolas Barbezier, Katarzyna Kruska, Julio Saèz-Vasquez, Steffen Schiffer<sup>1</sup>, Anita Marchfelder<sup>1</sup> et Manuel Echeverria.
- **P45** Effet de siRNA vectorisés par des nanocapsules dirigés contre l'oncogène EWS-Fli1 dans un modèle de sarcome d'Ewing chez la souris. Toub N, Bertrand JR, Malvy C, Couvreur P
- **P46** The K-loop, a general feature of the *Pyrococcus* C/D guide RNAs, is an RNA structural motif related to the K-turn. Sophie Nolivos, Agamemnon J. Carpousis and Béatrice Clouet-d'Orval
- **P47** Functional analysis of genes coding for Argonaute/Piwi proteins in *Paramecium Tetraurelia*. Khaled Bouhouch and Eric Meyer
- **P48** Identification d'Aptamères dirigés contre une protéine de la matrice extracellulaire, la metalloprotéase matricielle, MMP-9. Applications Diagnostiques. Sonia Da Rocha Gomes, Eric Dausse, Jean-Jacques Toulmé
- **P49** Etude fonctionnelle d'ARN régulateurs exprimés par le *Staphylococcus aureus*. Christophe Pichon, Thomas Dubrunfaut, Ambre Jousset, Svetlana Chabelskaya, Laurent Metzinger et Brice Felden.
- **P50** Experimental study of the secondary structure of the A-repeat region of the Xist RNA implicated in X chromosome silencing in female mammals. Maenner Sylvain, Marchand Virginie, Clerc Philippe, Visvikis Athanase and Branlant Christiane
- **P51** L'ARN C/D HBII-52 et la maturation de l'ARNm 5-HT2c. Vitali Patrice, Marty Virginie et Cavallé Jérôme.

---

## Session 7. ARN, pathologies et développement

---

- **P52** Etude des mécanismes de synthèse de l'ARN du virus de l'hépatite C par la RNA polymérase RNA dépendante du virus. Kathleen Mahias, Pantxika Bellecave, Cyril Masante, Simon Litvak, Michel Ventura et Thérèse Astier-Gin
- **P53** La protéine FMRP est associée au complexe SMN in vivo grâce à son interaction directe avec la protéine SMN. Nathalie Piazzon , Florence Schlotter , Hervé Moine, Christiane Branlant et Séverine Massenet
- **P54** Interaction Spécifique entre la protéine de nucléocapside du VIH-1 et le bras T de l'ARNt<sup>Lys3</sup>. Pierre Barraud, Frédéric Dardel & Carine Tisné
- **P55** Aptamères : nouveaux outils pour le diagnostic prénatal non invasif. Daguer Jean Pierre, Toulmé Jean-Jacques
- **P56** La régulation post-transcriptionnelle dépendante D'EDEN-BP est nécessaire à la segmentation somitique de *Xenopus laevis*. Carole Gautier-Courteille, Christophe Le Clainche, Carine Barreau, Yann Audic, Antoine Graindorge, Dominique Maniey, H. Beverley Osborne, Luc Paillard
- **P57** Identification d'inhibiteurs de la traduction du Virus de l'Hépatite C par la stratégie des Eléments Génétiques Suppresseurs (GSE). JAFFRELO Loïc, CHABAS Sandrine, PFLIEGER Aude, WYCHOWSKI Czeslaw , CAHOUR Annie , STAEDDEL Cathy et TOULME Jean-Jacques
- **P58** Etude de la fixation du facteur de régulation d'épissage MBNL1 sur ses ARN cibles et sur les ARN à répétitions CUG anormalement longues, présents dans les cellules de malades atteints de Dystrophie Myotonique de type 1. MARMIER-GOURRIER Nathalie, VAUTRIN Audrey, MANIVAL Xavier, LECLERC Fabrice, AIGUEPERSE Christelle et BRANLANT Christiane.
- **P59** Trafficking of HIV Genomic RNA. Dorothee Molle, Cedric Espenel, Carolina Segura-Morales, Eugenia Basyuk and Edouard Bertrand
- **P60** Sélection in vitro de ribozymes « hairpin » adénine-dépendants pour cibler des gènes impliqués dans la progression du cancer du sein. Yanli Li , Claire Torchet, Jacques Vergne, Marie-Christine Maurel

---

## Session 8. Structure des ARN et des complexes ARN-protéines

---

- **P61** The nucleolar localization of Ilf3 and NF90 trans-acting factors requires an alternatively-spliced signal sequence and is regulated by posttranslational modifications. Viranaicken Wildriss , Gasmi Laila, Denoulet Philippe Larcher Jean-Christophe
- **P62** Une seule mutation dans le motif IV peut bloquer l'hélicase Ded1 dans une conformation inactive. Josette Banroques, Monique Doere, Olivier Cordin, Patrick Linder et Kyle Tanner

- **P63** Sélection in vitro de complexes boucle-boucle ARN-ARN de haute affinité. Dausse, E., Ferry-Dumazet, H. , Maurel, S. , Magnin, N. , Watrin, M. , Di Primo, C., De Daruvar A. et Toulmé, J.J.
- **P64** Caractérisation de la structure de complexes boucle-boucle ARN de type « ALIL » impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Lebars I. et Toulmé J.J.
- **P65** Etude structurale par diffraction des rayons et mutagenèse dirigée des particules H/ACA d'archaea. Manival X., Charron C., Charpentier B., Fourmann JB., Muller S. and Branlant C.
- **P66** Analysis of the binding of the N-terminal conserved domain of yeast Cbf5p to a box H/ACA snoRNA. Christophe Normand , Régine Capeyrou, Sophie Quevillon-Chérueil, Annie Mouglin, Yves Henry and Michèle Caizergues-Ferrer
- **P67** Criblage de ligands de l'ARNtLys3 par RMN à flux continu.. Tisné C. , Chung F. , Micouin L. , Dardel F.

---

## **Session 9. Bioinformatique et ARN**

---

- **P68** Analyse Génomique de petits ARN accumulés au cours de la réponse hypersensible chez *Arabidopsis thaliana*. Boccaro M., Sarrazin A., Billoud B., Martienssen, R., Baulcombe, D. and Colot V.
- **P69** fast DB : une plateforme d'outils bioinformatiques pour étudier l'expression des produits des gènes humains. De la Grange P, Dutertre M, Auboeuf D
- **P70** Approche transcriptomique pour identifier des protéines impliquées dans le fonctionnement de la symbiose *Riftia pachyptila* : résultats de banques soustractives tissu-spécifiques. Sanchez Sophie, Hourdez Stéphane et Lallier François H.

## **P1 Régulation de l'expression de l'opéron ribosomique *infC-rpmI-rplT* de *Bacillus subtilis* via un contrôle de type Riboswitch.**

Nasslie Choonee, Sergine Even, Léna Zig et Harald Putzer

**IBPC, CNRS-UPR9073, 13 rue P. et M. Curie, 75005 Paris, France**

[Harald.Putzer@ibpc.fr](mailto:Harald.Putzer@ibpc.fr)

Chez *E. coli*, l'expression des protéines ribosomiques est souvent soumise à un autocontrôle qui agit au niveau de la traduction. En revanche, aucun mécanisme moléculaire contrôlant la biosynthèse des protéines ribosomiques n'a été élucidé chez les bactéries à Gram positif. Nous avons mis en évidence que l'expression de l'opéron *infC-rpmI-rplT* de *B. subtilis* codant le facteur de démarrage de la traduction IF3 et les protéines ribosomiques L35 et L20, est autorégulé par un mécanisme d'antiterminaison transcriptionnelle. Tandis que l'ordre des gènes est semblable à celui observé chez *E. coli*, le contrôle de cet opéron est différent et implique une région 5' non codante de 200 pb en amont d'*infC*. Cette région contient deux éléments conservés dont l'un pouvant agir comme un terminateur de la transcription. Nous avons utilisé des approches *in vitro* et *in vivo* pour montrer que l'expression de l'opéron est régulée au niveau de l'élongation de la transcription via une structure de type riboswitch sensible à la protéine ribosomique L20. La fixation de L20 au niveau d'un domaine conservé augmente la terminaison prématurée de la transcription au niveau de la structure terminatrice, en amont du 1<sup>er</sup> cistron. Nous proposons, au travers de notre étude sur l'interaction L20-ARNm, un modèle de régulation impliquant un mimétisme moléculaire entre les sites de fixation de L20 sur l'ARN 23S et son ARNm. Nos résultats suggèrent que le modèle de Nomura sur la biogénèse des protéines ribosomiques fondé sur l'autorégulation et le mimétisme moléculaire est également valide chez les microorganismes à Gram positif.

## **P2 Specific involvement of an Hsp40 chaperone in the biogenesis of the yeast ribosomal large subunit**

Demoinet E. (1), Fromont-Racine M. (2) and Lutfalla G. (1)

(1) Défenses Antivirales et Antitumorales, UMR5124, Université Montpellier II, cc86, place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

(2) Génétique des Interactions Macromoléculaires, CNRS-URA2171, Institut Pasteur, 25-28 rue du docteur Roux 75724 Paris cedex 15, France

*edemoine@univ-montp2.fr*

In eukaryotes, two different networks of chaperones have been described, one dedicated to protein biogenesis and the other one to protect cellular proteome from stress. Beside these “general” chaperones, some chaperones are specifically involved in structural transitions for polypeptides in large molecular complexes. The aim of this project is the study of an Hsp40 chaperone (JJJ1) that would be specifically involved in the biogenesis/maturation of the large ribosomal subunit.

The ribosome is one of the most important cellular macromolecular structures both by its size and by the energy that a cell consumes for its biogenesis. In addition to the ribosomal protein themselves, about 200 factors have now been predicted or shown to participate in ribosome biogenesis. Many of these factors associate temporarily with the maturing subunits. These associations/dissociations can be driven by specific modifications of the different factors, but up to now no chaperones has been shown to be specifically involved in the biogenesis of the ribosomal large subunit.

We have shown that the JJJ1 Hsp40 chaperone is involved in ribosome biogenesis and that this chaperone interacts with factors involved in the latest steps of ribosome large subunit biogenesis.

Jjj1p is a late pre-ribosomal factor that associates to the pre-60S particle. Its absence interferes with 60S biogenesis and results in a slow growth phenotype, an altered polysome profil and the presence of half-mers.



### **P3 Étude de deux ARN hélicases à boîte D-E-A-D de la bactérie psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*.**

Gontier Gwendoline, Iost Isabelle, Dreyfus Marc.

Laboratoire de génétique moléculaire CNRS UMR 8541 Ecole Normale Supérieure, Paris,  
France

*gontier@biologie.ens.fr*

Les enzymes des organismes psychrophiles (vivant à basse température) doivent faire face à différentes contraintes liées au froid comme par exemple le renforcement de la stabilité des structures de l'ARN. Cette étude se penche sur l'adaptation face au froid du métabolisme de l'ARN, en se focalisant sur les propriétés des ARN hélicases à boîte D-E-A-D. Ces enzymes jouent des rôles importants dans la plupart des réactions impliquant l'ARN, probablement en dissociant des structures d'ARN ou des interactions ARN-protéine. Deux d'entre elles, SrmB et RhlB, présentes chez *Escherichia coli*, nous intéressent particulièrement. SrmB participe à l'assemblage du ribosome alors que RhlB est impliquée dans la dégradation des ARNm. Notre objectif est de caractériser les protéines correspondantes chez les bactéries psychrophiles pour savoir s'il existe une adaptation de ces enzymes à des conditions où les réarrangements structuraux de l'ARN sont plus difficiles.

Ces deux enzymes ont été identifiées par homologie de séquences chez *Pseudoalteromonas haloplanktis*, une bactérie psychrophile proche de *E. coli*. Le clonage puis l'expression des orthologues putatifs de *rhlB* et *srmB* de *P. haloplanktis* dans des souches de *E. coli* dépourvues des gènes correspondants a permis de confirmer qu'il s'agit des homologues fonctionnels des protéines de *E. coli*. En effet, l'étude des profils de polysomes révèle que SrmB de *P. haloplanktis* corrige les anomalies d'assemblage du ribosome à différentes températures. Des expériences sont actuellement menées pour tester la capacité de RhlB de *P. haloplanktis* à restaurer la dégradation d'ARNm structurés.

## **P4 Rôle d'une ARN hélicase à boîte D-E-A-D dans l'assemblage des ribosomes chez *Escherichia coli***

Ivona Bagdiul (1), Marc Dreyfus (2) et Isabelle Iost (2)

(1) Dpt of Crystallography, Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, Poznan, Pologne

(2) Laboratoire de Génétique Moléculaire, Ecole Normale Supérieure, Paris, France

*iost@biologie.ens.fr*

L'assemblage du ribosome procaryotique est un processus complexe au cours duquel une cinquantaine de protéines s'associent à trois ARN pour former les deux sous-unités du ribosome. Alors que les structures des protéines et des ARN du ribosome sont maintenant caractérisées à l'échelle atomique, nous ignorons encore comment ces molécules sont assemblées et repliées pendant l'assemblage pour former la structure finale du ribosome.

Nous avons montré que SrmB, une protéine appartenant à la famille des ARN hélicases à boîte DEAD (1), est impliquée dans l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome chez *E. coli*, particulièrement à basse température (2). L'analyse du profil de ribosomes d'une souche portant la délétion du gène *srmB* montre une forte diminution de la quantité de sous-unités 50S et l'accumulation d'une particule aberrante d'environ 40S correspondant à une sous-unité 50S incomplète. L'une des protéines ribosomiques manquantes dans cette particule est L13, qui joue un rôle important au cours des étapes précoces de l'assemblage *in vitro* (3). Ces résultats suggèrent que SrmB agit à une étape précoce de l'assemblage. Son activité ARN hélicase (4) permettrait de dérouler ou de réarranger des structures de l'ARNr 23S pour faciliter le recrutement de certaines protéines ribosomiques au cours de l'assemblage.

Grâce à un crible de double-hybride bactérien, nous avons identifié la protéine ribosomique L15 comme partenaire potentiel de SrmB. Nous avons analysé les domaines d'interaction entre ces deux protéines et nous tentons maintenant de confirmer cette interaction *in vitro*. L'importance fonctionnelle de cette interaction sera discutée.

(1) Tanner, N.K. and Linder, P. (2001) DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell*, **8**, 251-262.

(2) Charollais, J., Pflieger, D., Vinh, J., Dreyfus, M. and Iost, I. (2003) The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **48**, 1253-1265.

(3) Nierhaus, K.H. (1991) The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie*, **73**, 739-755.

(4) Bizebard, T., Ferlenghi, I., Iost, I. and Dreyfus, M. (2004) Studies on three *E. coli* DEAD-box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases. *Biochemistry*, **43**, 7857-7866.

## **P5 Etude fonctionnelle de la kinase Rio1p : une protéine régulatrice de la maturation de l'ARN ribosomique ?**

**Julien Soudet, Annie Mouglin, Jean-Paul Gelugne, Emilie Yétérian, & Michèle Caizergues-Ferrer**

LBME / UMR 5099 CNRS/UPS, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE

[Julien.Soudet@ibcg.biotoul.fr](mailto:Julien.Soudet@ibcg.biotoul.fr)

La synthèse de ribosomes est l'activité métabolique majoritaire dans toute cellule en prolifération. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, ce ne sont pas moins de 200 facteurs protéiques qui participent à la maturation des ARN ribosomiques (ARNr). Cependant, pour la plupart de ces facteurs, les fonctions moléculaires restent à déterminer.

Des travaux précédents dans notre équipe ont permis de caractériser **Rio1p/Rrp10p** comme étant impliquée spécifiquement dans la maturation de la petite sous-unité ribosomique (1,2). En effet, la déplétion de cette protéine essentielle à la viabilité cellulaire et conservée des Archées à l'Homme se caractérise par l'accumulation cytoplasmique de pré-ARNr 20S, le précurseur direct de l'ARNr 18S. Rio1p présente un domaine central conservé au cours de l'évolution et contenant en séquence et structurellement la signature de protéines kinases eucaryotes malgré l'absence de certains sous-domaines (3,4). Ainsi, ce domaine est à la base de la définition d'un domaine protéine kinase « atypique », le domaine RIO. *In vitro*, la protéine recombinante Rio1p possède bel et bien une activité protéine kinase (3). Etant donnée la part importante des protéines kinase dans la régulation de nombreux processus cellulaires, Rio1p pourrait avoir un rôle régulateur dans la maturation de l'ARNr. Ainsi, nos travaux visent à explorer la fonction moléculaire de Rio1p notamment en tentant de concilier activité protéine kinase et maturation de l'ARNr.

Nos travaux récents montrent que l'activité kinase de Rio1p est requise pour la viabilité cellulaire et, en particulier, pour la maturation du pré-ARNr 20S. *In vitro*, RIO1p s'autophosphoryle sur des résidus sérine (3). Les sites de phosphorylation de Rio1p ont été déterminés par spectrométrie de masse pour la protéine recombinante autophosphorylée *in vitro* et la protéine naturelle issue de la levure. *In vitro*, cette autophosphorylation semble requise pour l'activité catalytique, et le mécanisme par lequel cette phosphorylation s'effectue et son implication dans la fonction de la protéine *in vivo* sont en cours d'étude. L'extrémité C-terminale de Rio1p comporte de nombreux sites potentiels de phosphorylation par CKII, fortement phosphorylés par cette enzyme *in vitro*. Le rôle, et le niveau de phosphorylation de ces sites *in vivo* est en cours d'investigation. La recherche de substrat(s) de Rio1p parmi les composants de la particule pre-40S est en cours. La recherche par voie génétique, d'interactants fonctionnels de RIO1p a permis d'identifier des partenaires suggérant l'implication de RIO1p dans d'autres processus cellulaires ou une interaction entre biogenèse des ribosomes et d'autres voies métaboliques.

(1) E. Vanrobays *et al*, EMBO J, **20** (2001) 4204-4213 (2) Vanrobays *et al*, (2003) Mol Cell Biol **23**, p 2083-95 (3) M. Angermayr *et al*, (2002) Mol Microbiol **44** 309-324 (4) N. Lalonde-Leblanc *et al*, (2004) Structure **12** 1-20

## **P6 Analyse génétique des facteurs associés à *RPS15* dans la biogenèse des ribosomes.**

Chabosseau P, Gallardo F, Gleizes PE, Stahl G

(1) Université Paul Sabatier, CNRS – LBME, Toulouse, France

*stahl@ibcg.biotoul.fr*

Chez les eucaryotes, la biogenèse des ribosomes est compliquée par l'existence d'une barrière entre le noyau, lieu de synthèse et d'assemblage des sous-unités ribosomiques, et le cytoplasme, où a lieu la traduction. La biogenèse et le transport nucléo-cytoplasmique sont ainsi intimement liés, puisque la biogenèse des sous-unités ribosomiques est compartimentée, avec des étapes spécifiques ayant lieu successivement dans le nucléole, le nucléoplasme et enfin dans le cytoplasme. Nous avons identifié chez la levure *S. cerevisiae*, une mutation thermosensible dans le gène codant pour la protéine ribosomique Rps15p qui provoque une accumulation nucléoplasmique des précurseurs de la petite sous-unité ribosomique 40S. Ceci indique un rôle de Rps15p dans cette étape cruciale de la biogenèse de la petite sous-unité ribosomique qu'est le transport au travers de la membrane nucléaire.

Afin de caractériser les facteurs en association avec Rps15p, nous avons entrepris un crible génétique de létalité synthétique dans ce mutant *rps15-ts*. Grâce à un système d'expression conditionnelle, nous recherchons des mutants sans effet en contexte sauvage, mais délétères en contexte *rps15-ts*. A ce jour, nous avons identifié une demi-douzaine de ces mutations, que nous avons appelées *ins*, pour *Ins is Not S15*. Des résultats préliminaires suggèrent que des mutations aggravant le phénotype de *rps15-ts* peuvent être identifiées très en amont dans la biogenèse des ribosomes, comme dans des gènes codant des protéines impliquées dans les étapes très précoces, co-transcriptionnelles, de la formation de la particule pré-40S, mais aussi dans des étapes beaucoup plus tardives, jusqu'à l'initiation de la traduction dans le cytoplasme. Nous espérons aussi avoir identifié des facteurs directement impliqués dans l'étape d'export de la particule pré-40S.

Nous exposerons les résultats obtenus par clonage par complémentation des mutants déjà identifiés. Nous avons étudié dans les simple et double mutants, divers phénotypes, comme l'état de maturité des ARNr ou la localisation des particules pré-ribosomiques dans la cellule. En nous basant sur ces observations, nous présenterons un modèle expliquant les relations de létalité synthétique obtenus.

## **P7 L'édition des ARN mitochondriaux de plantes**

Bégu Dominique, Choury David & Araya Alejandro

Laboratoire de Réplication et Expression des Génomes Eucaryotes et Rétroviraux  
(UMR5097)

Université Victor Segalen-Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux CEDEX  
*dominique.begu@reger.u-bordeaux2.fr*

Dans les organelles de plantes supérieures, l'édition des ARN consiste en la désamination ciblée de cytosines en uraciles (C->U) entraînant la modification de nombreux codons, ainsi que la création de codons d'initiation et de terminaison de la traduction. Ce processus postranscriptionnel modifie la quasi totalité des ORFs, et constitue une étape de maturation indispensable à la synthèse de protéines fonctionnelles.

Afin de déterminer les éléments de reconnaissance en *cis* des sites d'édition, nous avons mis au point un système permettant d'exprimer un transgène après électroporation dans des mitochondries purifiées. Deux régions minimales de 16nt et 6 nt, situées de part et d'autre du C à éditer, sont nécessaires et suffisantes pour la reconnaissance de deux sites d'édition. La mutation ponctuelle à l'intérieur de ces régions a montré l'importance critique pour l'édition de quelques nucléotides seulement. Ces nucléotides, de position et de nature différentes pour chaque site, constitueraient une empreinte de reconnaissance spécifique par des éléments trans qui restent encore à identifier.

Un second mécanisme d'édition mettant en oeuvre la conversion inverse d'uraciles en cytosines (U->C), absent chez les plantes supérieures, existe dans les organelles de certains bryophytes et ptérydophytes. Tout d'abord décrit comme marginal dans le processus d'édition, nos études *in vivo* ont révélé un exemple spectaculaire de conversion U->C dans les mitochondries de fougères. En effet, plusieurs gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire ne sont plus fonctionnels du fait de la présence de très nombreux codons stops. Le cadre de lecture est rétabli au niveau des ARNm par la suppression systématique des codons stop via des conversions U->C. De plus, un nombre très élevé de conversions U->C et C->U modifient jusqu'à 25% des codons de certains ORFs, ce qui constitue le taux d'édition le plus élevé décrit à ce jour dans les organelles de plante.

## **P8 Mise en évidence directe de l'épissage co-transcriptionnel dans des cellules humaines**

Bittencourt Danielle, Dutertre Martin, Auboeuf Didier

INSERM 685, IUH Hôpital Saint-Louis, Centre G. Hayem, 1 Avenue Claude Vellefaux,  
75010 Paris, France

*daniellebittencourt@hotmail.com*

Les ARNm codant les protéines résultent de l'épissage (sélection des exons et élimination des introns) des pré-ARNm synthétisés lors la transcription par l'ARN polymérase II (pol II). Les processus de transcription et d'épissage sont couplés puisqu'il a été montré que la nature du promoteur transcriptionnel a un impact sur les décisions d'épissage. Par ailleurs, des études chez la levure et chez la drosophile ont montré que le recrutement des facteurs d'épissage sur le pré-ARNm se fait au cours même de sa synthèse par la pol II et que l'interaction entre ces facteurs et le domaine carboxy-terminal (CTD) de la pol II favorise leur recrutement au niveau de pré-ARNm.

Bien que le recrutement des facteurs d'épissage puisse avoir lieu pendant la transcription, il reste à déterminer si la réaction d'épissage elle-même est co-transcriptionnelle. Afin de tester cette hypothèse, j'ai analysé dans des lignées cellulaires humaines l'épissage des transcrits du gène de la Cycline D1, qui est un proto-oncogène fréquemment sur-exprimé dans les cancers. Pour cela, j'ai développé une nouvelle approche expérimentale dérivée de la technique d'immuno-précipitation (IP) de la chromatine. En utilisant des anticorps dirigés contre la pol II, j'ai pu immuno-précipiter les transcrits naissants (pre-messagers associés à la pol II) détectés par RT-PCR. De plus, j'ai pu montrer que des transcrits partiellement épissés sont associés à la pol II. **Ce résultat démontre clairement, pour la première fois, que l'épissage a lieu au moins en partie au cours même de la transcription.** Actuellement nous effectuons des analyses de RT-PCR quantitative afin de mesurer en réponse à différents stimuli le taux de transcription du gène ainsi que la cinétique d'épissage de chaque intron.

## **P9 Régulation du facteur d'épissage SF1 par la protéine kinase KIS.**

Maucuer Alexandre (1), Manceau Valérie (1), Swenson Matthew (2), Le Caer Jean-Pierre (3), Kielkopf Clara L. (2), Sobel André (1)

(1) INSERM U706, IFM, UPMC, Paris, France.

(2) Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health, Baltimore, USA.

(3) Ecole Polytechnique, LCMR, Palaiseau, France.

*maucuer@fer-a-moulin.inserm.fr*

La phosphorylation des protéines joue un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes. Si de nombreux exemples illustrent ce type de régulation à l'étape transcriptionnelle, relativement peu d'évènements de phosphorylation de facteurs d'épissage ont été décrits à ce jour. De façon intéressante, nous avons récemment observé que le facteur d'épissage SF1 est fortement phosphorylé.

Le facteur d'épissage SF1 a été identifié initialement comme nécessaire pour la formation du spliceosome *in vitro*, et un ensemble de données indique son rôle dans la reconnaissance initiale du site 3' d'épissage. A une étape précoce de la formation du spliceosome, SF1 interagit avec l'intron dans la région du site de branchement et avec le facteur U2af65, qui se fixe lui sur la séquence polypyrimidine située juste en 3' du site de branchement. Par ailleurs l'interaction directe de SF1 avec U2af65 explique la coopérativité de leur interaction avec la région 3' de l'intron.

Nous avons observé que SF1 est phosphorylé de façon importante dans les cellules sur les deux sérines d'un motif Ser-Pro-Ser-Pro situé dans une région très conservée dans les différentes espèces eucaryotes. La position de ce motif SPSP dans la structure primaire de SF1, entre son domaine de liaison à l'ARN et son domaine de liaison à U2af65, suggère un rôle de sa phosphorylation dans les régulations de ces deux interactions. Effectivement la phosphorylation de SF1 sur ce motif SPSP augmente d'une part son affinité pour U2af65, d'autre part la formation *in vitro* d'un complexe SF1-U2af65-ARN.

SF1 s'est révélé être un excellent substrat *in vitro* pour la protéine kinase KIS. KIS est une kinase nucléaire dirigée par les prolines, ubiquitaire mais avec une expression préférentielle dans le système nerveux; l'inspection de sa séquence montre la présence d'un motif UHM (U2af Homology Motif) dans sa région C-terminale. Les motifs UHM ont été décrits récemment sur la base des structures de deux motifs RRM (RNA Recognition Motifs) de U2af35 et U2af65. Ils forment une sous classe des domaines RRM et sont caractérisés par la conservation de déterminants structuraux nécessaires pour des interactions avec des protéines partenaires. Notamment, le domaine UHM de U2af65 est impliqué dans sa liaison à un peptide N-terminal de SF1. De façon similaire nous montrons que le domaine UHM de KIS permet son ancrage sur SF1 et la phosphorylation efficace de son motif SPSP. Nous proposons que la phosphorylation de SF1 par KIS participe, notamment au cours du développement, à des régulations d'évènements d'épissage qui sont l'objet de nos recherches actuelles.

## **P10 Identification par protéomique de facteurs impliqués dans le contrôle de l'utilisation tissulaire d'un exon 3' terminal de l' $\alpha$ -tropomyosine lors du développement de l'embryon de Xénope.**

Vincent Anquetil, Serge Hardy et Agnès Méreau

UMR6061 CNRS-Université de Rennes1, Génétique et Développement, Faculté de Médecine, 2 Avenue du Pr. Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex, France

[vincent.anquetil@univ-rennes1.fr](mailto:vincent.anquetil@univ-rennes1.fr)

L'utilisation d'un exon 3' terminal nécessite un contrôle des réactions d'épissage, de clivage/polyadénylation et de leurs couplages physique et fonctionnel. Les bases moléculaires de ces derniers ne sont pas clairement identifiées à ce jour.

Le gène  $\alpha$ -tropomyosine contient dans sa région 3' terminale un exon composite interne/3' terminal dont l'utilisation est dépendante de l'environnement tissulaire. L'étude de l'utilisation de cet exon dans différents tissus de l'embryon a conduit à l'identification de deux séquences régulatrices qui contrôlent les réactions d'épissage et de polyadénylation. Notre objectif est d'identifier les protéines impliquées dans les mécanismes mis en jeu au cours du contrôle concerté de ces deux processus.

Nous avons dans un premier temps purifié des complexes protéiques à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa par chromatographie d'affinité en utilisant comme appât les séquences régulatrices auxquelles un tag a été ajouté. L'analyse par électrophorèse puis immunoblot des protéines purifiées montre que la protéine PTB, préalablement identifiée comme un facteur majeur de la répression de l'utilisation de l'exon 9A9' dans les tissus non musculaires, est spécifiquement présente dans les complexes assemblés autour des séquences régulatrices inhibitrices. L'analyse des protéines sur gel bi-dimensionnel révèle plusieurs facteurs qui interagissent spécifiquement avec les séquences régulatrices. La caractérisation de ces différentes protéines est actuellement en cours.

Nous élaborons également une stratégie de purification des complexes régulateurs *in vivo* dans l'embryon. Celle-ci est basée sur l'expression d'un ARN pré-messager tagué spécifiquement dans les tissus musculaires ou non musculaires de l'embryon en utilisant des minigènes placés sous contrôle de différents promoteurs tissu-spécifiques. Nous avons montré dans un même temps que la présence du tag dans l'ARN pré-messager ne modifiait pas son profil de maturation dans les différents tissus de l'embryon.

Ce travail devrait nous permettre d'étudier le remodelage des protéines associées aux séquences lors de la différenciation myogénique ainsi que d'identifier de nouveaux facteurs pour lesquels une fonction dans la régulation de l'épissage ou de clivage/polyadénylation n'a pas été encore décrite.



## **P11 Etudes des mécanismes régulant la production de l'ARNm tat du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 par approche biochimique et par RMN**

Houda Hallay<sup>1</sup>, Nicolas Locker<sup>2</sup>, Lilia Ayadi<sup>1</sup>, Delphine Ropers<sup>1</sup>, Jean Michel Saliou<sup>1</sup>,  
Eric Guittet<sup>2</sup> et Christiane Branlant<sup>1</sup>

*Lilia.Ayadi@maem.uhp-nancy.fr*

<sup>1</sup> Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Boulevard des Aiguillettes, BP239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie et Biologie Structurales, ICSN-CNRS, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

La protéine Tat joue un rôle clé dans la multiplication du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1. Son expression est requise pour la production d'ARN viraux de pleine longueur, mais, comme Tat a des propriétés apoptotiques, son expression est étroitement contrôlée par le virus. Ce contrôle a lieu au niveau de l'épissage. La production de l'ARNm tat nécessite l'utilisation d'un des 8 sites accepteurs de l'ARN viral, le site A3. Ce site est situé dans une structure tige-boucle (SLS2), elle-même suivie d'une longue structure tige-boucle irrégulière (SLS3) contenant plusieurs éléments régulateurs : un élément inhibiteur fort ESS2, dont l'activité dépend de la protéine hnRNP A1 (1,2) et deux activateurs, l'élément ESE2 (3) et l'élément ESEt que nous avons mis en évidence. En utilisant des techniques d'empreintes par les RNases et l'approche RMN, et en produisant un très grand nombre de mutants de la structure SLS3, nous avons cherché à comprendre comment un élément négatif ESS2 situé à 80 nucléotides du site accepteur A3 peut inhiber l'utilisation de ce site, en présence de protéine hnRNP A1. Au travers de cette étude, nous avons montré pour la première fois, l'interaction directe entre hnRNP A1 et l'élément ESS2. Les nucléotides en interaction ont été identifiés par des expériences de RMN. Nous avons constaté que la protéine hnRNP A1 recouvre de manière simultanée plusieurs segments de la structure SLS3, dont l'élément ESS2. La mutation de ESS2 abolit la fixation aux autres segments. Par ailleurs, un deuxième ensemble de sites de fixation de hnRNP A1 a été mis en évidence. La présence de l'élément ESS2 n'est pas indispensable pour qu'il y ait fixation à cet ensemble de sites. Néanmoins, la présence de l'ESS2 renforce la fixation. Donc l'élément ESS2 joue un rôle central dans l'association de hnRNP A1 à l'ensemble de la structure SLS3. Nous avons montré que le site A3 est fortement activé par les protéines SR SC35 et SRp40 *in vitro* et *in cellulo* (4). Par empreinte enzymatique et par des expériences de retards sur gel, nous montrons que la protéine SC35 possède deux sites de fixation sur la structure SLS3 qui permettent de bloquer la fixation de hnRNP A1 sur l'ensemble de la structure SLS3, d'où les propriétés activatrices de SC35. En plus de la compréhension des régulations du site A3, l'analyse RMN réalisée apporte des informations importantes sur le mode d'interaction avec l'ARN du domaine N-terminal de hnRNP A1 et a permis de déterminer la structure 3D de la partie très conservée de SLS3.

1. Si, Z., Amendt, B. A., and Stoltzfus, C. M. (1997) *Nucleic Acids Res* 25, 861-867
2. Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A. R., and Zahler, A. M. (1999) *Embo J* 18, 4060-4067
3. Zahler, A. M., Damgaard, C. K., Kjems, J., and Caputi, M. (2004) *J Biol Chem* 279, 10077-10084
4. Ropers, D., Ayadi, L., Gattoni, R., Jacquenet, S., Damier, L., Branlant, C., and Stevenin, J. (2004) *J Biol Chem* 279, 29963-29973

## **P12 Etude in vivo de la structure modulaire de l'hélicase à ARN Brr2p impliquée dans l'épissage chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Olivier.Cordin and Jean D. Beggs

ICMB/WTCB, University of Edinburgh, Michael Swann Building, EH9 3JR, Edinburgh Scotland. [cordin\\_olivier@hotmail.com](mailto:cordin_olivier@hotmail.com)

L'épissage des ARN est un processus complexe qui nécessite l'intervention de nombreux facteurs protéiques et ribo-nucléiques au sein d'un complexe macromoléculaire, le complexe d'épissage. Ce complexe est très dynamique et de nombreux réarrangements doivent avoir lieu de façon ordonnée pour permettre la progression de l'épissage à travers toutes ses étapes. Huit hélicases à ARN participent au contrôle de l'activité du complexe d'épissage et à sa régulation. Parmi ces hélicases, Brr2p, un membre de la famille Ski2-like, présente un intérêt particulier : Brr2P est la seule hélicase associée de façon stable au complexe d'épissage tout au long de la réaction d'épissage, et sa structure primaire révèle une architecture inhabituelle pour un hélicase à ARN. Brr2p possède en effet deux domaines hélicase, le premier étant nécessaire à la dissociation des snRNA U4 et U6, et deux domaines Sec63 dont le rôle est inconnu. Finalement, Brr2p apparaît comme étant au centre d'un vaste réseau d'interaction établies avec d'autres facteurs d'épissage, et notamment avec deux autres hélicases à ARN, Prp2p et Prp16p, qui sont respectivement nécessaire à la première et à la deuxième réaction de trans-estérification. De façon à mieux comprendre le rôle de Brr2p et de ses différents domaines, nous avons entrepris d'exprimer in vivo différents fragments de Brr2p au cours d'expériences de trans-complémentation. Les résultats préliminaires de ces expériences sont présentés ici.

## **P13 Conserved residues in the C-terminus of Prp43 are required for activity**

Edwalds-Gilbert, G<sup>1</sup>., Kum-Loong Boon<sup>2</sup>, Tatsiana Auchynnikava<sup>2</sup>, Jean D. Beggs<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>W.M. Keck Science Center of The Claremont Colleges, Claremont CA 91711

<sup>2</sup>Wellcome Institute for Cell Biology, University of Edinburgh, EH9 3JRUK

*gedwalds@jsd.claremont.edu*

The yeast splicing factor Prp43 is an RNA-dependent ATPase required for snRNP recycling and pre-ribosomal RNA processing. Prp43 interacts in vivo with the splicing factor Spp382/Ntr1, which promotes the release of excised introns from splicing complexes. Prp43 contains three domains: a unique N-terminal domain, a helicase domain, which is highly conserved in the DExD/H protein family, and a C-terminal domain, which is conserved in the DEAH sub-family of splicing factors, including Prp2, Prp16, Prp22, and Prp43. Although residues required for RNA-dependent ATPase activity have been identified, the role of conserved residues in the C-terminus is not understood. The C-terminus of Prp43 was mutagenized by both random and site-directed mutagenesis, identifying amino acids important for function in vivo. A motif conserved in the DEAH splicing proteins was identified and its role in vivo and in vitro will be discussed.

## **P14 Vers la compréhension de la fonction des ARN C/D orphelins chez les mammifères**

Cavaillé Marie-Line, Hoareau Magali, Marty Virginie, Vitali Patrice, Cavaillé Jérôme

LBME-CNRS, UMR 5095, IFR 109, 118 route de Narbonne, 31062 Cedex Toulouse, France

Les **ARN C/D** appartiennent à une grande famille d'ARN non-codants comprenant une centaine de membres chez les mammifères. Via la formation d'appariements de base, ils spécifient la formation de méthylations en 2'-O-ribose sur les ARN ribosomiques (ARNr) et les petits ARN du spliceosome (snARN) ou participent aux réactions de clivages du pré-ARNr qui libèrent les ARNr matures 28S, 18S et 5.8S.

Certains ARN C/D uniquement retrouvés chez les mammifères ne présentent pourtant aucune complémentarité avec les ARNr ou les snARN. On parle alors d'«**ARN C/D orphelins**» dont la fonction est d'autant plus énigmatique que certains présentent un patron d'expression spécifique avec notamment une expression marquée voire exclusive dans le cerveau. Comprendre leurs fonctions représente un réel enjeu non seulement sur le plan fondamental (découverte d'autres ARN-cibles ?) mais aussi d'un point de vue appliqué dans la mesure où la perte de l'expression de l'un d'entre eux - l'ARN C/D HBII-85 - est associée à l'apparition d'une maladie rare humaine : le syndrome de Prader-Willi.

Nous développons actuellement des techniques d'inactivation des ARN C/D orphelins basées sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens modifiés (**Locked Nucleic Acids, LNA**) transfectés dans les cellules de mammifères en culture ou directement injectés par stéréotaxie dans le cerveau de souris adultes.

## **P15 L'Exon Junction Complex est-il un activateur de l'épissage ?**

Brice Marchadier, Lionel Ballut , Bertrand Séraphin et Hervé Le Hir

*Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, France.*

Brice.Marchadier@cgm.cnrs-gif.fr

Suite à l'épissage des ARN pré-messagers, un complexe multiprotéique nommé EJC (de l'anglais Exon Junction Complex) est assemblé en amont des jonctions exoniques des ARN messagers (ARNm). Il accompagne les ARNm depuis le noyau jusqu'au cytoplasme, jouant un rôle dans le transport des ARNm, le NMD (de l'anglais Nonsense Mediated mRNA Decay) et la traduction.

Les ARN pré-messagers contiennent de nombreux introns. Nous nous sommes tout d'abord demandé si un EJC était présent à chaque jonction exonique. Par injection d'ARN synthétiques contenant trois introns dans des oocytes de xénopes, nous avons observé par protection dirigée à la RNase H qu'un EJC est présent sur chaque jonction exonique des ARNm épissés.

L'ordre dans lequel les introns sont excisés dépend de leur propre séquence et de la présence de séquences régulatrices environnantes. La plupart des activateurs d'épissage caractérisés appartiennent à la famille des protéines SR. L'EJC contient trois protéines de type SR, RNPS1, Acinus et SRm160. Nous avons émis l'hypothèse que l'EJC déposé lors du premier événement d'épissage puisse activer la reconnaissance et/ou l'excision des introns voisins. Nous avons conduit des expériences d'épissage *in vitro* confirmant que (i) RNPS1 est capable d'activer l'épissage d'introns faibles et que (ii) l'épissage d'un intron active celui d'un intron plus faible situé en amont.

A ce stade, nous montrerons une nouvelle stratégie permettant de savoir si l'EJC participe à cette activation de l'épissage entre introns voisins.

## **P16 Etude structurale et fonctionnelle sur la snoRNP U3 de *Saccharomyces cerevisiae*.**

CLERY Antoine, SENTRY-SEGAULT Véronique, MARMIER-GOURRIER Nathalie,  
SCHLOTTER Florence et BRANLANT Christiane.

Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UHP Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, Entrée 4A, 5<sup>ème</sup> étage, Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

*veronique.segault@maem.uhp-nancy.fr*

Le snoRNA U3 est un snoRNA à boîtes C/D qui joue un rôle essentiel dans les premières étapes de la maturation des ARN pré-ribosomiques. Son domaine 5'-terminal est impliqué dans plusieurs appariements avec le pré-ARNr, qui sont bien documentés : un avec la région 5'-ETS et trois avec la région 18S. De plus, une séquence essentielle de 11 nt de long du snoRNA U3 a été proposée comme formant une seconde interaction avec la région 5'-ETS (hélice VI) (Borovjagin et Gerbi, 2000, 2004). Ici, nous montrons que la substitution de la moitié 5' ou 3' du segment VI du snoRNA U3 de *S. cerevisiae* limite fortement la production d'ARNr 18S et abolit la croissance cellulaire. L'effet des substitutions de bases dans la moitié 3' du segment VI est totalement supprimé par des mutations compensatoires dans la région 5'-ETS. Par contre, l'effet des substitutions de bases dans la moitié 5' du segment n'est que partiellement supprimé par des mutations compensatoires. Ces résultats démontrent l'importance fonctionnelle de l'hélice VI, de même que l'importance de la séquence conservée du domaine 5' du snoRNA U3 impliquée dans la formation de cette hélice. Par analyses par extension d'amorce, nous avons étudié les défauts de maturation du pré-ARNr et montré l'implication potentielle du segment VI dans les clivages aux sites A1 et A2.

Le domaine 3' du snoRNA U3 contient deux motifs hautement conservés : le couple de boîtes C'/D qui fixe les protéines communes aux snoRNA à boîtes C/D, et le motif B/C, qui fixe les protéines Snu13 et Rrp9. Nous avons étudié la fonctionnalité d'un snoRNA U3 de *S. cerevisiae* tronqué présentant des substitutions de bases dans les motifs C'/D et B/C phylogénétiquement conservés. L'utilisation du snoRNA U3 contenant des mutations dans le motif B/C et la réalisation d'expériences de coimmunoprécipitation nous a permis d'identifier les éléments ARN requis pour le recrutement de la protéine Rrp9. De plus, en utilisant des molécules de snoRNA U3 mutées dans le domaine 5', nous avons développé des conditions expérimentales pour purifier des complexes de maturation du pré-ARNr bloqués à l'une des étapes de la phase précoce de maturation du pré-ARNr.

## **P17 Etude des bases moléculaires de la spécificité de reconnaissance entre l'ARN:Ψ-synthase Pus7 de *S. cerevisiae* et ses substrats.**

Alan Urban, Christophe Charron, Yuri Motorin et Christiane Branlant

Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP Nancy I, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France  
alan.urban@maem.uhp-nancy.fr

Les résidus pseudouridine (Ψ) sont les résidus modifiés les plus abondants dans les 3 domaines du vivant. Les enzymes (ARN:pseudouridine-synthases) catalysant la conversion des uridines en pseudouridines après transcription portent des motifs de séquence caractéristiques. Néanmoins, l'une des ARN:Ψ-synthase, Pus7p, n'a été identifiée que récemment du fait de sa divergence de séquence par rapport aux autres enzymes (Kaya et Ofengand, 2003). Nous avons montré que Pus7p est multifonctionnelle, puisqu'elle agit à la fois à la position 13 de 10 ARNt cytoplasmiques, en position 35 du pré-ARNt<sup>Tyr</sup> (Behm-Ansmant *et al.*, 2003) et en position 35 du snRNA U2 (Ma *et al.*, 2003). La comparaison des différents substrats met en évidence une séquence de 7 nucléotides au sein de laquelle la modification est générée, mais aucune conservation de structure secondaire n'est observée. Par mutagenèse dirigée des différents substrats (ARNt<sup>Asp</sup>(GUC), pré-ARNt<sup>Tyr</sup>(GΨA) et snRNA U2) nous avons pu démontrer que la modification n'a lieu qu'en présence d'un résidu U en position -2 et d'un résidu A en position +1 par rapport au résidu cible. C'est la première fois qu'une dépendance des ARN:Ψ-synthase vis-à-vis de la séquence du substrat est mise en évidence. Par ailleurs, en produisant différents ARNt tronqués, nous avons pu montrer que la présence de la séquence cible dans une structure tige-boucle est le seul requis au niveau structure secondaire. Des homologues de Pus7p sont présents chez les bactéries et les archaea, en particulier l'enzyme TruD d'*E. coli*, dont la structure 3D a été établie (Kaya *et al.*, 2004). Ces enzymes ont une taille très réduite par rapport à Pus7p (348 aa contre 676 aa) et elle ne semble catalyser que la conversion du résidu U13 de l'ARNt<sup>Glu</sup>(UUC) en Ψ13. Afin de savoir si les domaines additionnels de Pus7p expliquent sa multiplicité de fonction, chacune des séquences additionnelles dans Pus7p par rapport à TruD a été éliminée individuellement et les propriétés des enzymes mutantes ont été étudiées. Deux des domaines (position 85 à 217 et 371 à 446) se sont avérés nécessaires à l'activité. Afin de mieux comprendre leur fonction, un travail de cristallogénèse a été entrepris. Nous essayons actuellement d'améliorer la qualité des premiers cristaux obtenus.

## **P18 Analyse fonctionnelle de l'hnRNP Nab2p et comparaison de son activité de régulation de la polyadénylation avec celle de la protéine Pab1p.**

Viphakone N., Minvielle-Sebastia L.

Laboratoire de Maturation des ARN eucaryotiques, IBGC UMR5095-CNRS, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France.

*Nicolas.Viphakone@ibgc.u-bordeaux2.fr*

Notre laboratoire s'intéresse à la maturation en 3' des ARN messagers (ARNm) et plus particulièrement à l'étape de polyadénylation.

Tandis que la régulation de la polyadénylation *de novo* des ARNm est bien décrite chez les eucaryotes supérieurs, son mécanisme est encore sujet à débat chez l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Actuellement, un modèle de synthèse de la queue poly(A) puis raccourcissement par dégradation faisant intervenir la protéine Pab1p (Poly(A) Binding Protein 1) et le complexe PAN (Poly(A) Nuclease) fait encore référence (cf. (a)).

Nous avons pu montrer en collaboration avec le laboratoire de M. Swanson (Gainesville, Floride), que la protéine Nab2p, impliquée dans l'export des ARNm chez la levure, semble également jouer un rôle dans le contrôle de la longueur des queues poly(A) *in vivo* et *in vitro* (cf. (b)). Plus récemment, nous avons observé que le complexe PAN ne semble pas essentiel à ce processus *in vitro* (cf. (c)), et que la protéine Pab1p, qui est décrite dans la littérature comme un composant à part entière des complexes de clivage/polyadénylation, n'est pas non plus requise pour avoir une machinerie fonctionnelle *in vitro*. Par ailleurs, nous avons pu montrer que l'absence apparente d'activité de Nab2p dans un extrait cellulaire est due à sa séquestration par son importine Kap104p, abondamment présente dans ce système *in vitro* (cf. (c)). Enfin, contrairement à ce que nous pensions auparavant, nous avons pu observer qu'une partie des protéines Nab2p endogènes est active en extrait cellulaire et est responsable du phénomène de régulation "partielle" de la polyadénylation, observée avec un extrait cellulaire *pab1Δ*.

Afin de mieux comprendre le(s) mécanisme(s) mis en jeu par Nab2p, nous avons d'une part analysé l'implication de chacune des régions connues de la protéine dans la régulation de la polyadénylation, et d'autre part, comparé son mode d'action à celui de Pab1p.

Nos résultats montrent que la dualité fonctionnelle de Nab2p observée *in vivo* (cf. (b)) se retrouve *in vitro* :

- la région N-terminale, importante pour la fonction d'export des ARNm, n'est pas requise pour réguler la polyadénylation et peut-être remplacée par la Glutathion-S-Transférase.
- l'autre partie de la protéine, contenant les régions responsables de la liaison à l'ARN, est responsable de l'activité de régulation.

L'étude comparée de Pab1p et de Nab2p montrent des différences notables dans le mécanisme mis en jeu pour contrôler la longueur de la queue poly(A), notamment en terme d'accessibilité du 3'OH de l'ARN.

Afin de mieux caractériser ces différences, une étude structurale des complexes Pab1p/poly(A) et Nab2p/poly(A) par microscopie électronique est en cours.

(a) Brown C.E. *et al*, (1998) *Mol.Cell.Biol.*, 18 (11) : 6548-6559

(b) Hector R.E. *et al*, (2002) *EMBO J.*, 21 (7) : 1800-1810

(c) Dheur S., Nykamp K.R., Viphakone N., Swanson M.S., Minvielle-Sebastia L.(2005) *J.Biol.Chem.*, 280 (26):24532-8



## **P19 Localisation des ARNm à la surface mitochondriale : outil de diagnostic et de traitement des pathologies mitochondriales**

Kaltimbacher Valérie, Crystel Bonnet, Ellouze Sami, Simmonutti Manuel, Fradot Valérie, Sahel José A., Corral-Debrinski Marisol

Laboratoire de physiopathologie moléculaire et cellulaire de la rétine, INSERM U592, 184 rue du Fbg Saint-Antoine, Paris, France

*kaltimbacher\_valerie@st-antoine.inserm.fr*

La mitochondrie joue un rôle central dans la cellule en fournissant plus de 90 % de l'énergie cellulaire. Un défaut dans la chaîne respiratoire peut entraîner des dysfonctionnements sévères du système nerveux central et notamment de la rétine. Aucun traitement n'existe à ce jour pour ces troubles métaboliques. Environ 30 % des pathologies mitochondriales sont causées par des mutations de l'ADN mitochondrial. Les essais de thérapie génique par expression allotopique (dans le noyau) de ces gènes se sont avérés infructueux. Nous avons optimisé cette stratégie pour la protéine ATP6 du complexe V de la chaîne respiratoire codée par le génome mitochondrial. Le gène *ATP6* est impliqué dans certaines pathologies rétinienne comme LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy) et NARP (Neuropathy, Ataxie, Retinitis Pigmentosa). L'optimisation de l'expression allotopique implique une importation mitochondriale efficace des précurseurs synthétisés dans le cytoplasme, pour cela nous avons contraint l'ARNm à se localiser à la surface mitochondriale. Ainsi, l'ARNm hybride *ATP6* a été fusionné en 5' avec la région codante pour le MTS (Mitochondrial Targeting Sequence) du gène *SOD2* et en 3' avec le 3'UTR de *SOD2*. Nos constructions ont été testées dans des fibroblastes de patients atteints de la pathologie de NARP et portant le gène *ATP6* muté. L'expression allotopique du gène *ATP6* a amélioré de manière significative la capacité respiratoire des cellules.

Plus de 99 % des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Ces protéines sont importées dans la mitochondrie par voie post-traductionnelle ou co-traductionnelle. Cette dernière nécessite la localisation des ARNm à la surface mitochondriale. La localisation subcellulaire d'ARNm à partir de cerveaux et de rétines chez la souris a été obtenue à l'aide des puces à ADN de 15.000 EST. Près de 400 ARNm ont été répertoriés à la surface mitochondriale, dont environ 25 % codent des protéines orphelines. Cette base de données va permettre d'identifier de nouvelles protéines mitochondriales. A l'heure actuelle, seule la moitié des protéines mitochondriales a été caractérisée chez l'homme. L'identification de nouvelles protéines mitochondriales est indispensable pour des études de liaison de pathologies mitochondriales dont aucuns criblages n'ont pu identifier le gène délétère.

En conclusion, la localisation des ARNm à la surface mitochondriale est exploitée pour répertorier de nouvelles protéines mitochondriales chez les mammifères et pour développer des thérapies géniques innovantes. Notre projet aspire à offrir pour certaines rétinopathies aujourd'hui incurables, une approche thérapeutique novatrice visant à éviter la cécité chez les adultes affectés par celles-ci.

**P20 Biogenesis and trafficking of Box C/D snoRNPs occur in the nucleus and involve small RNA hypermethylase Tgs1 in a CRM1 dependent manner.**

Céline Verheggen, Bérengère Pradet-Ballade, Cyrille Girard, Séverine Boulon, Conception Paul, Henri Neel, Rémy Bordonné, Edouard Bertrand  
Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR 5535 du CNRS, 1919 route de Mende, 34 293 Montpellier Cedex 5, France  
*verheggen@igmm.cnrs.fr*

The mechanisms that control transport and localization of RNAs within the nucleus are poorly understood. Box C/D snoRNAs provide a very nice system to study these processes. We have previously gained evidences that m7G-capped U3 precursors are first transported to Cajal bodies to undergo cap-hypermethylation by hTgs1, before being routed to nucleoli. Fluorescent snoRNA U3 can rapidly localize to nucleolus when microinjected in the nucleus of Hela cells. With this system, we have characterized some of the factors responsible for Cajal body targeting of U3, and found that PHAX, the snRNA export factor, is required during this process. In contrast, CRM1, the exportin recruited by PHAX, is required at a later step, to transport TMG-capped U3 to nucleoli. In microinjection assay, the inhibitory effect of leptomycin B on CRM1 prevents localization of U3 in nucleolus but not in Cajal body of treated cells. We wondered whether nucleolar localization of U3 and others Box C/D snoRNA like U14 requires their transit to the cytoplasm or if in contrast these RNAs remain in the nucleus during their biogenesis, involving CRM1 as a nuclear factor. We observed that nuclear pore function is required because nuclear injection of wheat germ agglutinin that blocks the nuclear pores prevents nucleolar localization of co-injected U3 and U14. Nevertheless, we did not observe export of snoRNA in heterocaryon experiments. Our results suggest that CRM1 plays a new function which is strictly nuclear during the biogenesis of Box C/D snoRNA. We searched among the factors involved in biogenesis of Box C/D snoRNA which one could have a link with CRM1 function. Leptomycin B treatment of Hela cells did not disturb localization of any of these factors except for Tgs1. We are now trying to determine if effect of CRM1 inhibition on Box C/D snoRNA biogenesis is a direct consequence of changes on Tgs1 localization and function.

## **P21 Caractérisation de protéines impliquées dans l'importation nucléaire des snRNPs**

Daniela Lener, Edouard Bertrand et Remy Bordonné

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, 1919 route de Mende, Montpellier, France  
*daniela.lener@igmm.cnrs.fr*

Après assemblage dans le cytoplasme, les snRNPs impliquées dans l'épissage des introns de pre-messagers nucléaires sont importées dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire bipartite formé par la coiffe m<sub>3</sub>G et par un déterminant porté par le complexe des protéines Sm. Nos précédents travaux ont permis de montrer que ce dernier déterminant était représenté par une protubérance basique composée des extensions C-terminales des protéines SmB, SmD1 et SmD3, qui est conservée au cours de l'évolution (Girard et al., 2004). Il est fort probable qu'une telle protubérance représente le site d'ancrage de nombreuses protéines nécessaires à différentes étapes du processus de biogenèse des snRNPs et notamment du récepteur d'importation nucléaire qui est actuellement encore inconnu. En effet, des travaux suggèrent que ce récepteur est représenté par une protéine adaptatrice distincte de l'importine alpha classique mais capable de se lier à l'importine beta (Palacios et al., 1997). Par l'utilisation de fusions GST-CterSmB, GST-CterSmD1 et GST-CterSmD3 et des extraits nucléaires de cellules HeLa, des expériences de co-purification par chromatographie d'affinité nous ont permis d'isoler des protéines se liant aux extensions C-terminales des protéines Sm et possédant des signatures d'importine. L'identification de plusieurs protéines adaptatrices suggère que l'importation nucléaire des snRNPs est un phénomène redondant. Le rôle fonctionnel de ces trois protéines dans l'importation nucléaire des snRNPs est actuellement en cours d'étude.

## **P22 Methylation-dependent accumulation of CIRP in cytoplasmic granules upon cellular stress.**

Frederic De Leeuw, Tong Zhang, Georges Huez, Véronique Kruys, and Cyril Gueydan

Laboratoire de Chimie Biologique, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires, Université Libre de Bruxelles, 6041 Gosselies, Belgium.

*e-mail: fdeleeuw@ulb.ac.be*

Cold inducible RNA-binding protein (CIRP) is composed of an amino-terminal RNAREcognition Motif and a carboxyl-terminal domain containing RGG motifs. Beside its involvement in regulatory mechanisms of cold response, CIRP is induced by several stresses, such as irradiation, osmotic shock and hypoxia. We investigated the expression and the subcellular localization of CIRP in response to various stresses. We demonstrate that oxidative stress induced by arsenite leads to the migration of CIRP to stress granules (SGs). SGs are cytoplasmic foci at which stalled translation initiation complexes accumulate upon cellular stresses. Migration of CIRP into SGs seems a general response to cellular stress as it is induced by several cytoplasmic and endoplasmic reticulum stresses. However, the migration of CIRP into SGs is independent from TIA-1, previously reported as a major mediator of SGs formation, thereby suggesting the existence of multiple pathways leading to SG formation. We also show that both RGG and RRM domains promote CIRP migration into SGs. However, while methylation of arginine residues in the RGG domain is necessary for CIRP recruitment into SGs, RRM addresses CIRP to SGs by its RNA-binding capacity. Altogether, our findings provide new insights into the function of CIRP in the response to environmental stress.

## **P23 Liaison de l'ARNt initiateur par e/aIF5B, l'homologue eucaryote/archéen du facteur d'initiation bactérien IF2.**

Guillon L., Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y.

Laboratoire de Biochimie - UMR7654, Ecole Polytechnique, Route de Saclay, 91128

Palaiseau, France

*laurent@bioc.polytechnique.fr*

Dans les systèmes de traduction eucaryote et archéen, l'ARNt initiateur méthionylé est conduit jusqu'au ribosome par le facteur hétérotrimérique e/aIF2. Ces organismes possèdent également une protéine G homologue au facteur bactérien IF2 appelé e/aIF5B. Plusieurs articles ont montrés que le mode d'action du facteur e/aIF5B ressemble à celui du facteur IF2. D'une part, le facteur e/aIF5B catalyse l'association des sous-unités ribosomales et, d'autre part, des preuves génétiques indiquent que le facteur participerait à la liaison de l'ARNt initiateur méthionylé sur le ribosome. Cependant, aucune interaction entre le facteur e/aIF5B et l'ARNt initiateur méthionylé n'a jamais été montrée.

Dans ce contexte, notre travail a consisté à mettre en évidence une telle interaction par un test de suivi *in vitro* de l'association d'e/aIF5B à l'ARNt initiateur méthionylé. Pour réaliser cette étude, les facteurs aIF5B provenant des archées *Sulfolobus solfataricus* et *Pyrococcus abyssi* ainsi que le facteur eucaryote eIF5B de *Saccharomyces cerevisiae* ont été surproduits et purifiés. De plus, deux formes tronquées du facteur aIF5B de *S. solfataricus* ont également été produites. En outre, l'association de ces différents facteurs avec différents ARNts disponibles au laboratoire a été étudiée afin de tester la spécificité d'e/aIF5B vis-à-vis de l'ARNt initiateur méthionylé.

## **P24 La petite protéine B (SmpB) présente d'autres sites d'interactions avec l'ARN transfert-message (ARNtm) que sur le domaine pseudo-ARNt : les pseudonoeuds et la partie ARN messenger sont de nouveaux domaines d'interactions.**

Laurent Metzinger, Marc Hallier et Brice Felden

Laboratoire de Biochimie, UPRES Jeune Equipe 2311, INSERM ESPRI ERI6, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 2 avenue du Pr. Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes.

L'ARN transfert-message (ARNtm), est un ARN régulateur qui permet de recycler les ribosomes bloqués par des ARNm dépourvus de codon de terminaison. L'ARNtm est tout d'abord aminoacylé (fonction ARNt) puis pénètre dans le site A du ribosome où il se lie à la petite protéine B (Small protein B, SmpB). Après transfert de l'alanine de l'ARNtm à la chaîne peptidique bloquée, le ribosome ré-initie la traduction sur une séquence interne à l'ARNtm. Cela permet ainsi aux ribosomes d'atteindre un codon de terminaison situé sur l'ARNtm et d'être recyclés en traduction. SmpB est essentiel au processus de trans-traduction (reconnaissance du ribosome tronqué, aminoacylation, traduction du cadre ouvert de lecture). Nous avons précédemment montré par cristallographie que SmpB d'*Aquifex aeolicus* lie la partie ARNt de l'ARNtm de la même bactérie au niveau de la région en forme de coude. La partie ARNt est maintenue par SmpB à un angle interhélicale supérieur à celui de l'ARNt<sup>Phe</sup>. De plus, par rapport à l'ARNt<sup>Phe</sup>, le complexe subit une rotation de 90° autour de l'axe principal, orientant SmpB vers le centre de décodage du ribosome. A la suite de ce travail, nous avons utilisé des techniques de protections chimiques et enzymatiques pour étudier précisément les interactions entre l'ARNtm complet d'*Aquifex aeolicus* et SmpB. En plus de son interaction avec la partie ARNt, nous avons montré que SmpB induisait des changements de conformations dans plusieurs pseudonoeuds y compris le PK1, essentiel à la fonction de l'ARNtm. Certaines empreintes entre la protéine et l'ARN encadrent le cadre ouvert de lecture, ce qui suggère que SmpB participe à l'insertion de ce cadre de lecture dans le centre de décodage lors de la transition de la fonction ARNt vers la fonction ARNm. Des expériences de Résonance Plasmonique de Surface (technologie Biacore) ont permis de montrer que la stoechiométrie était de trois molécules de SmpB pour une molécule d'ARNtm, ce qui indique qu'il existe, en plus de la partie ARNt, deux autres sites de fixation. Pour les identifier, nous avons produit sept ARN reproduisant divers domaines de l'ARNtm et mesuré leur interaction avec SmpB par retard sur gel et « filter-binding assays ». Les sites présentant la plus forte affinité pour SmpB, en plus de la partie ARNt, sont les pseudonoeuds PK1 et PK4. Ces résultats suggèrent que SmpB adopte différentes interactions avec l'ARNtm et est capable de se mouvoir sur l'ARN durant les étapes du processus de trans-traduction.

## **P25 Manipulation de l'expression génétique dans les mitochondries de plante par l'import de séquences passagères associées à une structure de type ARNt**

Val Romain(1), Valentin Clarisse(1), Bouasker Samir(1), Dreher Théo(2), Dietrich André(1)

(1) Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS et Université Louis Pasteur, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

(2) Department of Microbiology, 220 Nash Hall, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331-3804, USA

[romain.val@ibmp-ulp.u-strasbg.fr](mailto:romain.val@ibmp-ulp.u-strasbg.fr)

Les mitochondries assurent des fonctions vitales dans les cellules eucaryotes. Elles possèdent leur propre génome dont les mutations sont à l'origine de nombreuses maladies dégénératives incurables. Chez les plantes, les mutations de l'ADN mitochondrial se traduisent principalement par la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) qui est très utilisée en agronomie. Les mécanismes moléculaires qui assurent le maintien du système génétique mitochondrial et qui contrôlent son expression sont peu connus chez les animaux et les plantes en raison de l'impossibilité de manipuler ce génome avec les méthodologies conventionnelles. Dans les cellules végétales, les mitochondries importent depuis le cytosol jusqu'à la moitié de leurs ARNt. Nous utilisons ce mécanisme pour introduire dans les organelles *in vivo* des séquences d'intérêt associées à l'extrémité 5' d'un ARNt. Ces ARN chimériques sont exprimés à partir de transgènes nucléaires. Le *cis*-ribozyme du virus de l'hépatite delta (HDV) permet de libérer l'extrémité 3' de l'ARNt après transcription par l'ARN polymérase II.

Nous avons montré qu'un ARNt naturel ne peut pas servir de navette d'import, la séquence passagère étant clivée par la RNase P. En revanche, l'import mitochondrial de séquences passagères a été obtenu à l'aide de l'extrémité 3' "tRNA-like" (ou TLS pour "tRNA-like structure") de l'ARN génomique du virus de la mosaïque jaune du navet (ou TYMV pour "*Turnip yellow mosaic virus*"). La TLS du TYMV est aminoacylable par la valine et de ce fait elle mime un ARNt naturellement importé dans les mitochondries des plantes. La séquence située immédiatement en amont de la TLS dans le génome viral adopte une structure en pseudo-nœud (UPSK pour "upstream pseudoknot") qui jouerait un rôle dans la présentation de la TLS à la valyl-ARNt synthétase. Cette reconnaissance étant potentiellement importante pour l'import des ARNt dans les mitochondries des plantes, nous utilisons l'ensemble UPSK-TLS (PKTLS, 120 nucléotides) comme navette d'import.

Par cette approche, nous avons commencé à valider l'import *in vivo* de séquences d'ARNm de différentes tailles d'origine virale ou végétale et à vérifier leur fonctionnalité dans les mitochondries en recherchant leur édition. L'import mitochondrial de séquences passagères d'une taille allant jusqu'à 150 nucléotides a ainsi été démontré dans des cellules de tabac (*Nicotiana tabacum*) transformées. A terme, l'objectif est d'exprimer de nouvelles fonctions dans les mitochondries des plantes mais également d'étudier le contrôle de l'expression génétique mitochondriale en provoquant une "dérégulation positive" (import d'ARNm) ou une "dérégulation négative" (import de *trans*-ribozymes contre des ARNm) de protéines codées par le génome mitochondrial.

## **P26 5'NTR du VHC dimérise par le mécanisme de «kissing loop» complexe similaire à celui de 5'NTR du VIH-1**

Marie Menade, Sandrine Papazian, Larissa Balakireva  
Novocib sas, 115 av Lacassagne 69003 Lyon  
*lbalakireva@novocib.com*

Dans le cadre d'études d'affinité d'IRES pour les protéines cellulaires, nous avons remarqué que, contrairement à l'IRES Con-1 (cloné par R. Bartenschlager), l'IRES184, cloné par nos efforts à partir d'un échantillon clinique, migre comme deux bandes distinctes de taille apparents de 300 et 600kb qui pourrait correspondre aux formes mono- et dimériques ou à deux conformations différentes.

De domaines II, IIIabc et IIIefIV synthétisés séparément et incubés avec l'IRES entier radiomarké, le domaine IIIefIV a été le seul capable de former des hétérodimères. Ces résultats non seulement supportent l'hypothèse de la dimérisation d'IRES mais permettent de localiser la séquence de dimérisation à l'intérieur de ce domaine.

Une de trois mutations qui distinguent la séquence d'IRES 184 de celle de Con-1 est localisé à l'intérieur du domaine IIIefIV, en boucle IV notamment. Grâce à cette mutation la séquence ACCAUGA localisé dans la partie apicale de boucle IV forme un palindrome AUCAUGA qui pourrait être à la base d'interaction homotypiques via la formation de «kissing loop» complexe.

Cette hypothèse a été renforcé par les résultats de deux approches indépendants. De 11 oligonucléotides testés, seul oligonucléotide complémentaire à la région 344-321 a été inhibiteur efficace de la dimérisation. De plus, la substitution de U340->C340 au sein de IRES184 par mutagenèse dirigé est suffisant pour inhiber la dimérisation, alors que la mutation C340>U au sein de IRES Con-1 la déclenche.

Par sa séquence palindrome et la localisation asymétrique dans la boucle IV, la séquence de dimérisation du VHC ressemble fortement celle du VIH-1 (*Skripkin E et al PNAS 1994, 91, 4945*). Cependant, contrairement au VIH-1 où la séquence de dimérisation est très conservée, celle de VHC est présente seulement chez 20-28% de souches (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp/>).

Sachant que les nucléotides 40-372 de la région 5' non codant du VHC forme un IRES, nous avons étudié l'impacte de la dimérisation sur l'efficacité de la traduction dans le lysat de réticulocytes. En cas de transcrits dimériques (IRESU340-luciferase), sa traduction est 2-fois inférieur par rapport au transcrits- monomères (IRES C340-luciferase).

Ainsi, nous avons décrit pour la première fois le phénomène dimérisation de 5' NTR du VHC et identifié la séquence impliquée, dont le rôle pour le cycle viral reste à élucider.



## **P27 Interactions ARN/protéines au niveau de l'ARN SECIS : variations autour du motif L7A/L30 et des ARN en K-turn**

Laurence Wurth (1), Antoine Cléry (2), Christiane Branlant (2), Alain Krol (1) et Christine Allmang (1)

(1) Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

(2) Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR UHP CNRS 7567, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[c.allmang@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:c.allmang@ibmc.u-strasbg.fr)

La sélénocystéine, forme biologique majeure du sélénium, est incorporée dans les sélénoprotéines en réponse à un codon UGA<sub>Sec</sub>. La protéine SBP2 joue un rôle clé dans ce processus en établissant des interactions protéine/ARN et protéine/protéine multiples. Elle se lie à la région 3'UTR de l'ARNm des sélénoprotéines au niveau d'une tige-boucle (l'élément SECIS). SBP2 semble avoir une origine évolutive commune avec certaines protéines impliquées dans l'assemblage des particules ribonucléoprotéiques (ou RNP) telles les snoRNP et snRNP. Son domaine de liaison à l'ARN appartient à la famille des protéines ribosomiques L7A/L30 comprenant notamment les protéines 15.5/Snu13p et L7Ae. Toutes les protéines de cette famille reconnaissent des ARN cibles capables de se structurer en « K-turn » ou hélice-bulle interne- hélice composée d'un tandem de paires de bases non canoniques G.A/A.G. Le domaine L7A/L30 et le repliement en K-turn sont des motifs structuraux anciens impliqués dans des fonctions aussi variées que l'épissage des pré-ARNm et la traduction. Nous proposons que l'ARN SECIS est un variant de motif K-turn. Trois structures cristallographiques de complexes ARN-protéine contenant le domaine L7A/L30 et un K-turn canonique ont été résolues. Elles nous ont permis d'établir que des principes d'interaction communs gouvernent la formation des complexes U4 snRNA-15.5 et SECIS-SBP2.

Nous avons examiné comment s'effectue la reconnaissance spécifique de l'ARN SECIS par SBP2. Une expérience de SELEX a révélé de nouveaux déterminants de spécificité au niveau de l'ARN SECIS. Nous avons montré que les protéines Snu13p et L7Ae, de la famille L7A/L30, sont capables de reconnaître l'ARN SECIS *in vitro*. En revanche, SBP2 répond à des critères de spécificité stricts et est incapable de reconnaître les motifs en K-turn des ARN cibles de ces protéines. Par dissection fonctionnelle de SBP2 nous avons montré que son domaine de liaison à l'ARN SECIS s'étend bien au delà du module conservé L7A/L30. Des contacts additionnels semblent exister entre SBP2 et l'ARN SECIS par rapport aux autres protéines de la famille L7A/L30. Ceux-ci sont vraisemblablement renforcés par la présence d'autres facteurs au niveau de la RNP de l'élément SECIS. Afin d'identifier les partenaires protéiques de SBP2, nous avons mis en au point des conditions d'immunopurification des complexes qui lui sont associés tant dans le noyau que dans le cytoplasme. Par ailleurs nous avons également mis en évidence des facteurs requis pour l'assemblage de la RNP SECIS communs aux autres complexes impliquant les protéines de la famille L7A/L30.

## **P28** Contrôle de l'état d'adénylation des ARNm maternels lors du développement de *Xenopus Tropicalis*.

Antoine Graindorge, H.B. Osborne, Yann Audic

CNRS UMR6061 Génétique et Développement, groupe REG, Université de Rennes1, IFR 140, Faculté de médecine, 2 avenue du professeur Léon Bernard CS34317, 35043 Rennes cedex.

yann.audic@univ-rennes1.fr

La régulation de la stabilité et de la traduction des ARNm est critique pour l'expression des protéines au bon endroit et au bon moment à la fois lors de la gaméto-genèse ou du développement embryonnaire et dans les cellules somatiques.

Au cours du développement, la transcription est souvent éteinte de la fin de l'ovogénèse jusqu'à plusieurs heures après la fécondation. Dans les grenouilles *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* cette inhibition transcriptionnelle dure de la fin de l'ovogénèse jusqu'à la transition mid-blastulienne (MBT, embryons à 4000 cellules). Durant cette période, l'activation traductionnelle ou la répression des ARNm maternels stockés permet une expression des gènes contrôlée. Les changements d'activité traductionnelle sont généralement corrélés à l'état d'adénylation des ARNm. Les ARNm polyadénylés étant efficacement traduits et les ARN désadénylés cessant de l'être.

Afin d'identifier de nouveaux gènes spécifiquement régulés au niveau post-transcriptionnel, nous avons réalisé un crible à grande échelle portant sur l'identification des ARNm dont l'état d'adénylation change au cours de l'ovogénèse et du développement précoce (de la méiose I à la MBT). Par l'utilisation de puces à ADN dédiés à *Xenopus tropicalis*, nous avons identifié environ 500 ARNm (sur 3000 analysés) dont l'état d'adénylation fluctue au cours de la période étudiée. Les résultats de ces expériences ont été validés par PCR quantitative et par l'analyse directe de l'état d'adénylation de plusieurs ARNm endogènes aux différents stades étudiés.

Parmi ces ARNm, une centaine sont spécifiquement polyadénylés après la fécondation et pourraient correspondre à des ARNm codant pour des protéines requises pour les rapides divisions cellulaires et/ou pour la définition des territoires présomptifs de l'embryon. Afin de vérifier l'implication de ces ARNm nouvellement traduits après la fécondation, une approche d'inactivation par oligonucleotides antisens est en cours de mise au point.

Par ailleurs, les informations de séquences disponibles grâce au séquençage du génome de *Xenopus tropicalis* permettent d'envisager une approche bioinformatique pour la définition des séquences régulatrices impliquées dans la polyadénylation ou la désadénylation des ARNm maternels.

## **P29 Méthylations ciblées de l'ARN ribosomique comme outil pour étudier les évènements de décodage non conventionnels chez *Saccharomyces cerevisiae***

Baudin-Baillieu A. (1), Fournier M.J. (2), Decatur W. (2), Rousset J.P.( 1)

(1)Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

(2) Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Massachusetts,

Amherst Massachusetts 01003, USA

*abaillieu@igmors.u-psud.fr*

La transmission de l'information génétique repose sur deux étapes essentielles, la transcription d'une séquence ADN en ARN messager (ARNm), et la traduction de cet ARNm en une séquence correspondante d'acides aminés. Ces différentes étapes doivent être réalisées avec une fidélité optimale, afin de respecter l'information contenue dans la séquence nucléotidique. Si des erreurs de lecture du code génétique se produisent, la fonction des protéines synthétisées est compromise. Cependant, dans certains cas, ces erreurs sont nécessaires pour l'expression correcte de la protéine. Un nombre grandissant d'exemples ont été décrits dans lesquels les règles universelles pour décoder les ARNm sont transitoirement altérées par l'action de signaux spécifiques contenus dans les séquences des ARNm. Ainsi, pour certains gènes, la plupart de leur séquence est interprétée de façon conventionnelle, mais à certains sites, la machinerie de traduction est reprogrammée pour lire le code différemment. Cette reprogrammation de la traduction, appelée "recodage", inclut principalement trois différents types d'évènements: (i) le saut de ribosome, ou "hopping", qui implique un glissement complet du ribosome sur une plus ou moins grande distance sans incorporation d'acides aminés; (ii) le décalage de cadre, ou "frameshift", où le ribosome glisse d'un nucléotide en amont (frameshift 1) ou en aval (frameshift +1), et continue la traduction dans le nouveau cadre de lecture; et (iii) la translecture, où l'incorporation d'un acide aminé conventionnel ou d'une sélénocystéine est permise à certains codons stop.. Ces évènements peuvent être utilisés comme moyen de réguler spécifiquement la synthèse d'une protéine (il va être possible d'obtenir une nouvelle protéine, portant une nouvelle activité biologique) et sont des outils appropriés pour étudier le fonctionnement du ribosome.

Par ailleurs, l'ARN ribosomique des eucaryotes est soumis à des modifications post-transcriptionnelles dont la méthylation du ribose de certains nucléotides. Cette modification est ciblée par un petit ARN guide qui va s'apparier sur la séquence complémentaire de l'ARNr. En modifiant la séquence d'un petit ARN guide naturel, B. Liu et M.J. Fournier ont réussi à introduire des méthylations à des sites non canoniques. Nous utilisons cette stratégie pour étudier les mécanismes de recodage (translecture et décalage de phase) chez la levure *S. cerevisiae*.

### **P 30 L'enzyme MnmC, codée par le gène *yfcK* d'*Escherichia coli* catalyse les deux dernières étapes de la biosynthèse de $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ , une uridine hypermodifiée en position *wobble* de certains ARNt**

Yamina Oudjama<sup>1</sup>, Martine Roovers<sup>1</sup>, Joël Caillet<sup>2</sup>, Janusz M. Bujnicki<sup>3</sup> and Louis Droogmans<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherches Microbiologiques Jean-Marie Wiame, avenue E. Gryson 1, B-1070 Bruxelles, Belgique.

<sup>2</sup>CNRS UPR9073 Institut de Biologie Physico-Chimique, rue P. et M. Curie 13, F-75005 Paris, France.

<sup>3</sup>Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering, International Institute of Molecular and

Cell Biology, ul. ks. Trojdena 4, PL-02-109 Varsovie, Pologne

<sup>4</sup>Laboratoire de Microbiologie, Université Libre de Bruxelles, avenue E. Gryson 1, B-1070 Bruxelles, Belgique.

[caillet@ibpc.fr](mailto:caillet@ibpc.fr) et [ldroogma@ulb.ac.be](mailto:ldroogma@ulb.ac.be)

Le nucléoside hypermodifié 5-méthylaminométhyl-2-thiouridine ( $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) est trouvé à la position *wobble* de certains ARNt bactériens. Sa biosynthèse est complexe. Les produits des gènes *mnmA*, *iscS*, *tusA-E*, *mnmE* et *mnmG* sont impliqués dans la formation de 5-carboxyméthylaminométhyl-2-thiouridine ( $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ ). L'enzyme bifonctionnelle MnmC démodifie  $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$  en 5-aminométhyl-2-thiouridine ( $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$ ) et méthyle  $\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$  en  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ .

Par une approche bioinformatique faisant intervenir la reconnaissance de repliement protéique, nous avons prédit que le produit du gène *yfcK*, localisé à 52,6 min sur le chromosome d'*E.coli*, comprenait un domaine méthyl-transférase et un domaine oxydo-réductase dépendant du FAD, deux activités enzymatiques susceptibles de rendre compte de la formation de  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ . Nous avons montré que la protéine YfcK est capable de catalyser *in vitro* les deux dernières étapes de la biosynthèse de  $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$  et ceci indépendamment de la présence du groupement 2-thio (Bujnicki *et al.*, 2004). Dès lors ce gène a été appelé *mnmC*.

Dans le présent travail nous avons approfondi la caractérisation de cette enzyme. Nous avons généré, par mutagenèse dirigée des résidus supposés être importants pour l'activité de l'enzyme, des mutants dans les domaines prédits méthyl-transférase et oxydo-réductase. Par des tests de complémentation fonctionnelle *in vitro* nous avons associé ces domaines à ces activités et montré l'indépendance fonctionnelle de ces activités. Nous avons également démontré l'implication du FAD comme cofacteur de l'activité oxydo-réductase.

Ref.:

J. M. Bujnicki, Y. Oudjama, M. Roovers, S. Owczarek, J. Caillet, L. Droogmans (2004) "Identification of a bifunctional enzyme MnmC involved in the biosynthesis of a hypermodified uridine in the *wobble* position of tRNA." RNA, 10 : 1236-1242

## **P31 Etude du gène *IMP3* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Cosnier Bruno<sup>(1)</sup>, Hermann Sylvie<sup>(2)</sup>, Rousset Jean-Pierre<sup>(1)</sup>, Fabret Céline<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratoire Génétique Moléculaire de la Traduction, Université Paris XI, Orsay, France

<sup>(2)</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire, Département de Biologie, ENS, Paris, France

*bruno.cosnier@igmors.u-psud.fr*

La translecture est une reprogrammation transitoire de la traduction conduisant à l'incorporation d'un acide aminé à la place de certains codons stop. Plusieurs gènes cibles ont été identifiés au laboratoire dont le gène *IMP3* qui présente une organisation génomique compatible avec un mécanisme de translecture. Ce gène essentiel code une protéine du complexe U3snoRNP qui intervient dans les étapes précoces de la maturation de l'ARN ribosomique 18S, constituant la petite sous-unité 40S des ribosomes. L'efficacité de passage du codon stop du gène *IMP3* a été estimée à 5%. La protéine de fusion produite possède une extension carboxy-terminale de 80 acides aminés.

Une souche n'exprimant que la forme longue (Imp3L) de la protéine (mutation du codon stop du gène en un codon sens) présente un déficit en sous unité 40S ainsi qu'une croissance ralentie. Une augmentation d'un facteur 5 de l'efficacité de passage du codon stop du gène *IMP3* est observée dans cette souche. Cela suggère une auto-régulation du passage du codon stop d'*IMP3* par la forme longue de la protéine. Une analyse par Northern Blot a été réalisée sur cette même souche afin d'étudier la maturation de l'ARN ribosomique en présence de la forme longue de la protéine Imp3 et a révélé un léger retard de maturation confirmant les phénotypes identifiés précédemment (défaut de production de sous-unités 40S et une croissance ralentie par rapport au sauvage). Des expériences de double-hybride ont également été effectuées pour analyser les interactions entre la forme longue et le partenaire connu d'Imp3p, la protéine Mpp10. Enfin la présence in vivo de la forme longue de la protéine a été recherchée par Western Blot.

**P32 Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR/TIA-1 RNA-binding proteins.**

Tong Zhang, Nathalie Delestienne, Georges Huez, Véronique Kruys, and Cyril Gueydan.  
Laboratoire de Chimie Biologique, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires,

*cgueydan@ulb.ac.be*

**Résumé de votre communication :**

TIAR and TIA-1 are two closely related RNA binding proteins (RNA-BP) which possess three RNA recognition motifs (RRMs) followed by a 100 amino acid-long auxiliary region. These proteins are involved in several mechanisms of RNA metabolism, including alternative hnRNA splicing and regulation of mRNA translation. In the present study, we characterized the subcellular localization of these proteins in somatic cells. We demonstrate that TIAR and TIA-1 continuously shuttle between the cytoplasm and the nucleus and belong to the class of shuttling RNA-BPs whose nuclear import is transcription-dependent. We identified RRM2 and the first half of the C-terminal region as important determinants for the TIAR/TIA-1 nuclear accumulation. In contrast, the nuclear export of TIAR/TIA-1 is mediated by RRM3. Both RRM3 contribute to TIAR/TIA-1 nuclear accumulation or export by their RNA-binding capacity. Indeed, whereas mutations of RRM2 most conserved RNP2 octa- or RNP1 hexapeptides redistribute TIAR to the cytoplasm, similar modifications in RRM3 abolish TIAR nuclear export. We also show that TIAR/TIA-1 nuclear accumulation is a Ran-GTPdependent pathway, in contrast to its nuclear export which is unaffected by Ran-GTP depletion and which is independent of the major CRM1 exportin pathway. Altogether, this study demonstrates the importance of TIAR/TIA-1 RNA-binding domains for their subcellular localization and provides the first evidence for distinct functions of TIAR/TIA-1 second and third RRM3.

### **P33 La méthylation de eRF1 chez *Saccharomyces cerevisiae* nécessite la présence d'un hétérodimère, composé de l'enzyme Ydr140w et d'une protéine à doigt de zinc, Ynr046w**

Valérie Heurgué-Hamard, Nathalie Scrima et Richard H. Buckingham

CNRS, UPR9073, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris  
*heurgue@ibpc.fr*

La méthylation des facteurs de terminaison de la traduction semble être un phénomène très conservé, malgré une évolution indépendante des facteurs procaryotes (RF1 et RF2) et eucaryote (eRF1). Cette modification post-traductionnelle se fait sur la glutamine (Q) de l'unique motif conservé GGQ qui interagit avec le centre peptidyl-transférase du ribosome.

Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation du gène codant la protéine Ydr140w, homologue de la méthylase PrmC d'*E. coli*, ralentit la croissance et entraîne la production d'une protéine eRF1 non modifiée (1). Nous montrons aujourd'hui que Ydr140w est effectivement l'enzyme qui méthyle eRF1, mais la catalyse nécessite la présence d'une petite protéine à doigt de zinc appelée Ynr046w (également nommée Trm112p).

Lors de l'analyse systématique des complexes protéiques par la technique de Tandem Affinity Purification (TAP-tag), il avait été montré que Ynr046w pouvait interagir avec 4 protéines dont les fonctions sont maintenant connues : la méthylase Ydr140w, deux méthylases d'ARNt (Trm9p et Trm11p) et une deshydrogénase de structure voisine (2). Cette interaction a été récemment confirmée comme étant nécessaire à la méthylation des ARNt par l'enzyme Trm11p (3).

Nos expériences montrent qu'il existe une interaction fonctionnelle essentielle entre Ydr140w et Ynr046w. Le système complet de méthylation de eRF1 a ainsi pu être reconstitué *in vitro* après la surproduction des protéines chez *E. coli* et leur purification. Nous confirmons dans ce système le rôle essentiel de eRF3 sous sa conformation liant le GTP. Le rôle de Ynr046w sera également discuté.

(1) Heurgué-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Merkulova-Rainon, T., Kisselev, L.L. and Buckingham, R.H. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 2439-2445

(2) Gavin et al. (2002). *Nature*, **415**, 141-147

(3) Purushothaman, S.K., Bujnicki, J.M., Grosjean, H. and Lapeyre, B. (2005). *Mol. Cell Biol.*, **25**, 4359-4370.

### **P34 Les facteurs de traductions dans le génome de l'oursin.**

Julia Morales, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé, Bertrand Cosson, Emmanuelle Morin\*, Patrick Cormier

Equipe Cycle cellulaire et Développement, UMR7150, et \* Service Informatique et Génomique, Station Biologique BP74, 29680 Roscoff.

[morales@sb-roscoff.fr](mailto:morales@sb-roscoff.fr)

L'embryon d'oursin est un modèle de choix pour l'étude de la traduction au cours du développement précoce et du cycle cellulaire. La fécondation de l'oeuf d'oursin provoque une reprise de l'activité de synthèse protéique et des divisions cellulaires du développement précoce. De plus, la régulation de l'expression des gènes se fait au niveau post-transcriptionnel durant les premières étapes du développement. Nous avons récemment montré que la mise en place du complexe d'initiation eIF4 joue un rôle crucial dans ce processus. Nous avons participé au consortium international pour l'annotation du génome de l'oursin, récemment mis à disposition de la communauté scientifique, et nous avons identifié les gènes codant pour les facteurs de traduction. Nous présenterons les données obtenues lors de l'analyse du génome.



**P35** Caractérisation de la poly(A) polymérase XGld2 et de son interacteur RBM9, une protéine liant l'ARN chez le Xénope.

Catherine Papin, Christel Rouget, Elisabeth Mandart

CRBM-CNRS, FRE 2593, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5 Catherine.Papin@crbm.cnrs.fr

La polyA polymérase (PAP) est l'enzyme responsable de la polymérisation de l'ATP au niveau de la queue poly(A) des ARN. Outre les PAP canoniques, catalysant notamment la polyadénylation nucléaire, une nouvelle classe de nucléotidyl transférase possédant une activité PAP (famille Gld2/Cid1,13/Trf4) a été identifiée chez plusieurs organismes. La séquence de ces protéines diverge fortement de celle des PAPs canoniques. Comme elles, elles possèdent des domaines catalytique et central mais ne présentent pas de motifs de liaison à l'ARN. Nous avons choisi d'étudier le rôle de Gld2 dans la régulation de l'expression génique par polyadénylation cytoplasmique au moment de la reprise de la méiose dans l'ovocyte de xénope. En effet, ce modèle présente l'avantage que seule l'activité de polyadénylation cytoplasmique est présente puisque, du fait de l'absence de transcription dépendante de la RNA polymérase II, il n'existe pas de polyadénylation nucléaire. D'autre part, la reprise de la méiose est dépendante, entre autre, de la polyadénylation cytoplasmique de plusieurs ARNm maternels.

XGld2 présente une localisation cytoplasmique et nucléaire dans l'ovocyte. L'inactivation de XGld2 par injection des anticorps anti-XGld2 dans les ovocytes mène à une inhibition de la polyadénylation de l'ARNm de la protéine kinase Mos. Ceci suggère que l'activité PAP de XGld2 est primordiale pour la polyadénylation dans l'ovocyte. Cependant, l'injection des anticorps anti-XGld2 accélère la maturation méiotique en parallèle avec une apparition de Mos et l'activation de la cascade MAPK plus précoce. Ceci suggère que XGld2 fasse partie du complexe de masquage des ARNm présents dans le cytoplasme. Le masquage de l'ARNm à la machinerie de traduction par ce complexe est levé par la polyadénylation cytoplasmique. L'injection de l'anticorps anti-XGld2 déstabiliserait ce complexe et permettrait la synthèse précoce de Mos sans nécessité de la polyadénylation de son messenger.

Nous avons aussi recherché des partenaires de Gld2 chez les vertébrés par la technique du double hybride. Ce crible nous a permis d'isoler plusieurs interacteurs potentiels. Une protéine de liaison à l'ARN, RBM9, a notamment été identifiée. Cette protéine est exclusivement cytoplasmique et est présente dans l'ovocyte dès le début de l'ovogenèse. Des expériences de co-immunoprécipitation montrent que cette protéine fait partie du complexe de polyadénylation avec Gld2 et CPEB une protéine spécifique de la polyadénylation cytoplasmique. Cependant, l'inactivation de XRBM9 par injection des anticorps spécifiques n'affecte ni la maturation méiotique ni la polyadénylation de l'ARNm de mos. Les résultats que nous avons obtenus vont donc permettre d'affiner et d'approfondir le rôle de Gld2 chez le xénope.

## **P36 Détermination de la voie de formation du Gln-tRNA<sup>GLN</sup> dans les mitochondries et les chloroplastes chez *Arabidopsis thaliana***

Pujol Claire (1), Bailly Marc (2), Maréchal-Drouard Laurence (1), Becker Hubert (2), Duchêne Anne-Marie (1).

(1) Département de Biogenèse des Mitochondries Végétales, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg, France.

(2) Laboratoire d'évolution et d'adaptation des machineries traductionnelles, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire Strasbourg, France.

*claire.pujol@ibmp-ulp.u-strasbg.fr*

Chez les plantes, la synthèse des protéines se fait dans le cytosol, les chloroplastes et les mitochondries. Tous les facteurs intervenant dans la traduction doivent être présents dans ces trois compartiments. Ainsi, chaque machinerie traductionnelle doit posséder des jeux complets d' aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) et d'ARN de transfert (ARNt).

Cependant, au cours de l'évolution, les génomes mitochondriaux et chloroplastiques ont perdu de nombreux gènes. Ainsi, la totalité des aaRS sont maintenant codées par des gènes nucléaires. Au niveau des ARNt tous les ARNt cytosoliques sont codés par le génome nucléaire et tous les ARNt chloroplastiques par le génome plastidial. Par contre, il n'en est pas de même pour les ARNt mitochondriaux : certains sont codés par le génome mitochondrial, d'autres sont codés par le génome nucléaire et importés dans les mitochondries, à partir du cytosol où ils sont également utilisés pour la traduction.

Cette étude s'intéresse à l' aminoacylation de ces ARNt de différentes origines, et au cas particulier de l'ARNt<sup>GLN</sup>. En effet, si cette étape est généralement obtenue par la liaison directe d'un acide aminé sur son ARNt grâce à l'aaRS correspondante, pour l'ARNt<sup>GLN</sup>, différents cas sont possibles : voie de synthèse traditionnelle chez les eucaryotes avec l'utilisation de la glutaminyl ARNt synthétase (GlnRS), voie de transamidation pour la plupart des bactéries, ou encore importation à la fois des l'ARNt<sup>GLN</sup> cytosoliques et de la GlnRS dans les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*. Il est donc intéressant de déterminer clairement la voie de synthèse du Gln-tRNA<sup>GLN</sup> dans les mitochondries et les chloroplastes végétaux.

Des travaux effectués au laboratoire ont démontré chez *Arabidopsis thaliana* l'expression des tRNA<sup>GLU</sup> et <sup>GLN</sup> codés par le génome mitochondrial ainsi que l'absence d'importation dans cet organite des ARNt<sup>GLN</sup> codés par le génome nucléaire. De plus, la double localisation, mitochondriale et chloroplastique, de la GluRS, ainsi que son activité dans les mitochondries a également été mise en évidence. A l'inverse, aucune activité GlnRS n'a été mesurée. Enfin, des tests d'importation *in vitro* sont actuellement en cours afin de déterminer la localisation cellulaire de trois protéines, GatA, B et C, sous unités potentielles d'une amidotransferase d'*A. thaliana*.

## **P37 Régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles des ARN messagers d'*Igf2*.**

Frank Court, Hélène Hagège, Roudaïna Nasser, Michaël Weber, Caroline Braem, Thierry Forné, Guy Cathala (1)

(1) *IGMM, UMR5535 CNRS-Université Montpellier II, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier.*

*cathala@igmm.cnrs.fr*

*Igf2* est un gène soumis à l’empreinte génomique parentale (mécanisme épigénétique qui réprime l’expression de certains gènes sur l’un des deux allèles selon l’origine parentale). Cette empreinte est établie par une séquence intergénique d’ADN appelée ICR (Imprinting-Control Region) qui correspond à une Région Différemment Méthylée (DMR) sur chacun des deux allèles parentaux. Cette région détermine l’organisation supérieure de la chromatine sur chacun des allèles imprimant ainsi un véritable « formatage » tissu-spécifique. Elle contrôle en effet d’autres DMR situées à l’intérieur du gène : DMR0 (placenta), DMR1 (tissus mésodermiques) et DMR2 (tissus endodermiques).

*Igf2* code pour un facteur de croissance embryonnaire et est exprimé à partir de l’allèle paternel méthylé sur les DMR1 et DMR2. Il est étroitement co-régulé avec le gène adjacent *H19* qui possède une empreinte opposée et produit un ARN non-traduit.

Nous avons utilisé la PCR quantitative en temps réel pour quantifier les transcrits d’*Igf2* tout au long de la molécule d’ARN sur des échantillons d’origines mesodermique (Cœur) ou endodermique (Foie) issus de souris sauvages ou porteuses des délétions suivantes :  $\Delta U2\text{-DMR1}$ ,  $\Delta DMR2$ ,  $H19^{SilK}$ ,  $H19\Delta 3$  et  $H19\Delta 13$ .

Nous montrons que les séquences décrites pour être impliquées dans le maintien de l’empreinte génomique parentale d’*Igf2* sur l’allèle maternel sont également requises pour réguler l’expression du gène sur l’allèle paternel. Ces régulations s’effectuent non seulement au niveau transcriptionnel mais surtout au niveau post-transcriptionnel. Nos résultats indiquent que des séquences d’ADN impliquées dans le « formatage » des loci peuvent conditionner les régulations post-transcriptionnelles de certains ARN messagers.

### **P38 The ARE-associated factor AUF1 binds the poly(A) *in vitro* in competition with PABP.**

Francis Sagliocco<sup>1,2</sup>, Benoît Laloo<sup>1,2</sup>, Bertrand Cosson<sup>3</sup>, Laurence Laborde<sup>1,2</sup>, Michel Castroviejo<sup>2,4</sup>, Jean Rosenbaum<sup>1,2</sup>, Jean Ripoche<sup>1,2</sup> and Christophe Grosset<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>INSERM, E362, F-33076 Bordeaux, France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France.

<sup>2</sup>IFR66, F-33076 Bordeaux, France.

<sup>3</sup>CNRS UMR 6061; Université Rennes I, F-35043 Rennes, France.

<sup>4</sup>CNRS, UMR 5097, F-33076 Bordeaux, France; Université Victor Segalen Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France.

Address for correspondence: Christophe Grosset, GREF, INSERM E362, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 Rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, FRANCE. Tel. (33) 557 57 46 30; FAX (33) 556 51 40 77; E-mail: [christophe.grosset@gref.u-bordeaux2.fr](mailto:christophe.grosset@gref.u-bordeaux2.fr)

The AU-rich element (ARE) is a post-transcriptional element controlling both mRNA turnover and translation initiation by primarily inducing the poly(A) tail shortening. The mechanisms by which the ARE-associated proteins induce deadenylation are still obscure. One possibility amongst others would be that an ARE/ARE-binding protein complex intervenes on the PABP/poly(A) tail association and facilitates poly(A) tail accessibility to deadenylases. Here we show by several experimental approaches that AUF1/hnRNP D, an mRNA-destabilizing ARE-binding protein, can bind a poly(A) sequence. First, endogenous AUF1 proteins specifically bind the poly(A), independently of PABP. Second, using polyadenylated RNA probes, we show that (i) the four recombinant AUF1 isoforms bind the poly(A) *in vitro* as efficiently as PABP, (ii) the AUF1 binding to poly(A) does not change when the polyadenylated probe contains the GM-CSF ARE, suggesting that the AUF1/poly(A) association is independent of the ARE sequence *per se*. The binding of AUF1 isoforms to poly(A) displayed oligomeric and cooperative properties and the four AUF1 isoforms efficiently displaced the PABP from the poly(A) tail *in vitro*. Finally, the molar concentration of AUF1 in HeLa cytoplasm is only twice lower than that of PABP, whereas in the nucleus, its molar concentration is slightly higher than that of PABP, supporting the idea that these two proteins may compete *in vivo* for the poly(A). All these data support a role for AUF1 in controlling PABP/poly(A) tail association and therefore in the initiation of the mRNA degradation.

## **P39 La sur-expression d'une nouvelle protéine contrôlant la stabilité des ARN mitochondriaux est capable de compenser des défauts d'assemblage des complexes respiratoires dus à des mutations dans *OXA1* chez *Saccharomyces cerevisiae*.**

Nouet Cécile., Hlavacek Otakar., Bourens Myriam, Marsy Sophie, Lemaire Claire and Dujardin, Geneviève.  
Centre de Génétique Moléculaire, Avenue de la Terrasse, 91198-Gif sur Yvette, France.  
[nouet@cgm.cn.rs-gif.fr](mailto:nouet@cgm.cn.rs-gif.fr)

Oxa1p est une protéine membranaire nécessaire à l'insertion co-traductionnelle de certaines sous-unités des complexes respiratoires mitochondriaux I, III, IV et V dans la membrane. Oxa1p est conservée de *S. cerevisiae* à l'homme. Chez la levure, les mutations dans le gène *OXA1* ont un effet pléiotrope sur les complexes respiratoires avec un défaut majeur sur le complexe IV. Chez les champignons filamenteux qui sont des organismes aérobies stricts, la protéine est essentielle. Nous avons précédemment généré des mutants ponctuels d'Oxa1p de levure entraînant des défauts respiratoires. Nous avons ensuite recherché des gènes dont la surexpression est capable de compenser les défauts dus à ces mutations. Les gènes suppresseurs identifiés peuvent être rangés en deux groupes. Le premier regroupe des gènes codant des protéines localisées dans le noyau ou le cytosol et jouant un rôle dans la régulation des fonctions mitochondriales (Hap4p, Hlavacek O. *et al.*, 2005) ou dans la signalisation. (Ras2p). Le second groupe est constitué de gènes codant des protéines mitochondriales comme Oms1p qui code une protéine membranaire avec un domaine méthyl transférase ce qui suggère un rôle dans des modifications post-traductionnelles au cours de l'insertion dans la membrane (Lemaire C. *et al.*, 2004).

Nous avons récemment caractérisé un nouveau gène suppresseur codant une protéine mitochondriale de fonction inconnue. L'inactivation de ce gène entraîne un défaut respiratoire et une accumulation de mutants de délétions de l'ADN mitochondrial (*rho-*). Nous avons examiné le rôle de ce nouveau gène en analysant les différentes étapes de la biogénèse des complexes respiratoires : le niveau d'assemblage par des spectres de cytochromes et des BN-PAGE, les protéines mitochondriales par immunodétection, les produits de transcription, de traduction. L'ensemble des résultats obtenus montre que ce gène est impliqué dans la stabilité/maturation de plusieurs ARN mitochondriaux. Nous discuterons comment la surexpression d'un gène contrôlant la stabilité des ARN mitochondriaux peut compenser un défaut d'insertion dans la membrane des sous-unités codées par ces ARN.

## **P40 La stimulation de RegB par son co-facteur, la protéine ribosomique S1, nécessitent une séquence conservée de 10-12 nucléotides**

Sylvain Durand<sup>1</sup>, Graziella Richard<sup>1</sup>, Marco Bisaglia<sup>2</sup>, Soumaya Laalami<sup>1</sup>, François Bontems<sup>2</sup> et Marc Uzan<sup>1</sup>

(1) Institut Jacques Monod, CNRS, Universités Paris VI et VII. 2, Place Jussieu, 75251 Paris cedex 05

(2) Antenne de l'ICSN à l'Ecole Polytechnique, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau

durand@ijm.jussieu.fr

La dégradation des ARNm est une étape clef de la régulation de l'expression génétique. Chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, la stabilité de certaines classes d'ARNm est contrôlée par des endoribonucléases spécifiques d'une séquence. Ce type d'enzyme nécessite un ou plusieurs co-facteurs pour être actif.

L'endoribonucléase RegB, codée par le bactériophage T4, fait partie de ces nucléases. En effet, elle clive spécifiquement au milieu des séquences intergéniques GGAG/U des ARNm viraux synthétisés précocement au cours du développement du phage. De plus, l'activité de cette endonucléase requiert un co-facteur, la protéine ribosomique S1, connue pour s'associer à l'ARNm.

Cependant, tous les ARN portant le motif GGAG/U ne sont pas coupés. Des études préliminaires suggèrent l'existence d'autres éléments, en *cis*, indispensables pour une bonne reconnaissance par le système RegB/S1. Afin de les identifier, nous avons réduit progressivement la taille d'un ARNm substrat. Nous avons ainsi déterminé, *in vitro*, qu'un ARN doit comporter le motif GGAG/U suivi de 6 à 8 nucléotides pour être clivé efficacement par RegB et stimulée par la protéine S1. La comparaison des séquences clivées et non clivées par RegB/S1 nous a permis d'observer que cette région de 6 à 8 nucléotides était relativement bien conservée et riche en A. Enfin, l'insertion/substitution de cette séquence riche en A en aval d'un motif GGAG, *in vitro* et *in vivo*, nous a permis de convertir des ARN non-substrats en ARN substrats et inversement. Cette dernière analyse a montré que la protéine ribosomique S1 nécessite cette région riche en A pour stimuler l'activité de RegB et que l'enzyme seule est incapable de différencier entre un transcrit substrat et non substrat.

Nos travaux ont ainsi permis d'une part de montrer que le système RegB/S1 requiert, au total, une séquence consensus de 10 à 12 nucléotides : GGAGAAUAAA(AU) pour une coupure efficace de l'ARN. Ce type de spécificité étendue se retrouve pour d'autres endonucléases, procaryotes et eucaryotes. D'autre part, nous démontrons pour la première fois qu'une endoribonucléase n'identifie son ARNm substrat qu'en présence de son co-facteur via une interaction spécifique avec une séquence conservée de 10 à 12 nucléotides.

## **P41 NPM-ALK cytoplasmic granules: A functional relevance to oncogenesis ?**

Mohamad-Ali FAWAL, Henri DUPONT and Dominique MORELLO

Centre de Biologie du Développement, UMR CNRS – 5547, 31 062 TOULOUSE

[Fawal@cict.fr](mailto:Fawal@cict.fr)

Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) is a chimeric protein expressed in a subset of cases of anaplastic large cell lymphomas (ALCLs) whose constitutive overexpression represents a key oncogenic event. Even though several signaling pathways activated by NPM-ALK have been described, the specific oncogenic characteristics of NPM-ALK have not yet been completely elucidated. The search for additional interacting partners of NPM-ALK that may be involved in mediating oncogenesis led to the discovery of AUF1/hnRNP D, a protein implicated in the decay of AU-rich-containing mRNAs. Indeed, AUF1 was immunoprecipitated with ALK in both ALCL-derived cells and NIH3T3 cells stably expressing NPM-ALK. Moreover, AUF1 and NPM-ALK were found concentrated in the same cytoplasmic foci in these cells. Furthermore, these foci (hereafter designed as AGs, for ALK granules) did not co-localize with the processing bodies (P. bodies) or stress granules (SG), which are both known as centres of mRNA storage and degradation. In order to understand the functional relevance of these new cytoplasmic foci, several stimuli known to interfere with PB and SG composition/assembly were applied to NPM-ALK expressing cells. The results reveal a spatial link between the AGs and both P.bodies and SGs, suggesting a role of AGs in mRNA metabolism. These data and the fact that the stability of several ARE-containing mRNAs is increased in NPM-ALK expressing cells imply a possible function of NPM-ALK/AUF1 granules in mediating NPM-ALK oncogenicity.

## **P42 Relationships between premature termination, NMD, and the poly(A)-binding protein**

Kervestin S. (1), and Jacobson A. (2)

(1) UPR-CNRS 9073, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France

(2) MGM Department, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA

[Stephanie.Kervestin@ibpc.fr](mailto:Stephanie.Kervestin@ibpc.fr)

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a surveillance pathway that eliminates mRNAs containing premature nonsense codons. The "faux" 3'UTR model postulates that the 3'-UTR created by a premature termination codon (PTC) lacks factors normally present on a proper 3'-UTR and thus diminishes the efficiency of translation termination and activates mRNA decay. We have shown that activation of NMD is linked to the intrinsically aberrant nature of translation termination at a PTC. Tethering Pab1p (Poly(A)-binding protein) or Sup35p (the translation termination factor eRF3) in the vicinity 3' of a PTC abrogates NMD, presumably by orchestrating the assembly of factors normally present on a legitimate 3'-UTR. To identify the latter factors, we analyzed the composition of the mRNP created by tethered Pab1p or Sup35p and showed that Pab1p, Sup35p, and Sup45p (translation termination factor eRF1) co-immunoprecipitate with the mRNP created by the tethered factors. Tethering of Sup45p did not affect the stability of nonsense-containing mRNAs, suggesting that Pab1p and Sup35p are the key players promoting mRNA stabilization. Further tethering and immunoprecipitation analyses of the mRNP structure created by different forms of Sup35p that have either lost their ability to interact with Pab1p or been defective in the GTPase activity required for translation termination showed that mRNA stabilization by tethered Sup35p was dependent on its interaction with Pab1p but not its function in translation termination. These data suggest that the interaction of Pab1p and Sup35p in a normal 3'-UTR could be a key event discriminating proper from improper termination.

Since Sup35p interacts with Upf1p, as well as with Pab1p, we are considering the possibility that differential binding of these two interactors to Sup35p may be a critical determinant of the status of an mRNA as an NMD substrate. To understand how aberrant translation termination could lead to the recruitment of the UPF factors, we are investigating the interactions of purified Pab1p, Sup35p, and Upf1p *in vitro*. We find that purified GST-Sup35p has different affinity for purified Pab1-His6p or FLAG-Upf1p and are now investigating whether Pab1p and Upf1p compete for binding to GST-Sup35p.



## **P44 Les dicistrons tsnoARNs chez les plantes, étude *in vivo in vitro*, du gène à la particule ribonucléoprotéique.**

Nicolas Barbezier, Katarzyna Kruska, Julio Saèz-Vasquez, Steffen Schiffer<sup>1</sup>, Anita Marchfelder<sup>1</sup> et Manuel Echeverria.

Laboratoire Génome et développement des plantes, université de Perpignan UMR 5096 CNRS-IRD, avenue Paul Alduy 66000 Perpignan. <sup>1</sup>Molekulare Botanik, Universität Ulm, 89069 Ulm, Germany.

*nicolas.barbezier@univ-perp.fr*

Les snoARNs de la famille C/D sont présents dans le nucléole sous forme de structures ribonucléoprotéiques : les C/D snoRNPs. Chacun de ces complexes assure la méthylation d'un nucléotide sur l'ARN ribosomique grâce à son snoARN qui lui permet de cibler le résidu à modifier. Chez *Arabidopsis thaliana* les snoARNs constituent un groupe de plus d'une centaine de membres. Ceux-ci sont le plus souvent regroupés en cluster dans le génome, leur expression se fait alors majoritairement sous la forme de précurseurs polycistroniques qui subissent des activités de type endo et exonucléase pour libérer leurs snoARNs matures. Les dicistrons constitués d'un ARN de transfert glycine et d'un C/D snoARN sont un autre mode d'organisation génomique, qui est spécifique des plantes. Pour étudier *in vivo* la transcription et la maturation de ce dicistron, nous avons créé des plantes transgéniques exprimant différents mutants d'un tsnoARN. Nous avons ainsi montré que son expression est dépendante du promoteur de l'ARN de transfert qui est un promoteur de l'ARN polymérase de type III. Le transcrite est un long et unique précurseur qui subit différentes activités de maturation et notamment un clivage endonucléolytique qui sépare le snoARN de l'ARN de transfert. Pour étudier cette étape nous avons mis au point un système de maturation *in vitro* à partir d'extraits nucléaires d'inflorescences de choux-fleurs. Ce système permet de maturer le précurseur dicistronique en libérant l'ARN de transfert et le snoARN. De plus, ces extraits semblent capables de reproduire l'assemblage de la particule ribonucléoprotéique autour du snoARN, ce qui est indispensable à la stabilité et à l'activité du snoARN. Grâce à ces deux approches *in vivo* et *in vitro* nous poursuivons la caractérisation des étapes menant du gène du tsnoARN jusqu'à l'obtention de la particule snoRNP active.

## **P45 Effet de siRNA vectorisés par des nanocapsules dirigés contre l'oncogène EWS-Fli1 dans un modèle de sarcome d'Ewing chez la souris**

Toub N<sup>1,2</sup>, Bertrand JR<sup>2</sup>, Malvy C<sup>2</sup>, Couvreur P<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, 92286 Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup> UMR CNRS 8121, Institut Gustave Roussy 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France

*jrb@igr.fr*

Le sarcome d'Ewing est un cancer de l'os de l'enfant et du jeune adulte. Il se caractérise par l'expression d'une protéine chimérique EWS-Fli1 résultant d'un réarrangement chromosomique t(11;22)(q24;12). Cette protéine agit comme un facteur de transcription aberrant et entraîne la transformation maligne des cellules. Nous avons montré que si l'expression de ce gène dans des cellules NIH/3T3 les rend tumorales chez la souris "nude" xénogreffée, l'inhibition de ce gène par des oligonucléotides antisens permet de bloquer la progression tumorale (Maximenco *et al.* Ann N Y Acad Sci. 2005, 1058:52-61).

L'utilisation de siRNA comme agents inhibiteurs est une voie très prometteuse pour développer des stratégies thérapeutiques ciblées. Nous avons étudié l'action d'un siRNA dirigé contre le point de jonction du gène EWS-Fli1 impliqué dans le sarcome d'Ewing de type I (60% des tumeurs d'Ewing). Ce siRNA a été utilisé soit libre, soit encapsulé dans le cœur aqueux de nanocapsule de polybutylcyanoacrylate récemment développé avec le concours du laboratoire du Pr P. Couvreur (Université de pharmacie, Chatenay Malabry).

Nous avons obtenu un taux d'encapsulation de l'ordre de 97 % dans les conditions optimum de préparation. Par des études de microscopie confocale, nous avons observé que ces nanocapsules sont capables de délivrer efficacement les siRNA dans les cellules avec une localisation cytoplasmique. Ces siRNA vectorisés par des nanocapsules ont alors été testés pour leur capacité à inhiber la croissance de tumeurs exprimant l'oncogène EWS-Fli1 xénogreffées chez la souris "nude". Nous avons observé une inhibition de la croissance de la tumeur après injection intratumorale des complexes siRNA-nanocapsules (Toub *et al.* Pharm Res. 2006, sous presse).

Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation de ces complexes dans le cadre du traitement du sarcome d'Ewing et plus généralement pour d'autres cancers dus à des oncogènes de jonction.

## **P46 The K-loop, a general feature of the *Pyrococcus* C/D guide RNAs, is an RNA structural motif related to the K-turn**

Sophie Nolivos, Agamemnon J. Carpousis and Béatrice Clouet-d'Orval\*

*Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, CNRS-UMR 5100, Université Paul Sabatier,*

*118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 9, France  
clouet@ibcg.biotoul.fr*

The C/D guide RNAs predicted from the genomic sequences of three species of *Pyrococcus* delineate a family of small non-coding archaeal RNAs involved in the methylation of ribosomal and transfer RNA. The C/D guides assemble into ribonucleoprotein (RNP) that contains the methyl-transferase. The protein L7Ae, a key structural component of the RNP, binds to a K-turn formed by the C/D motif. The K-turn is a structure that consists of two RNA stems separated by a short asymmetric loop with a characteristic sharp bend (kink) between the two stems. The majority of the *pyrococcal* C/D guides contain a short 3nt-spacer between the C'/D' motifs. We show that conserved terminal stem-loops formed by the C'/D' motif of the *Pyrococcus* C/D RNAs are also L7Ae binding sites. These stem-loops are related to the K-turn by sequence and structure, but they consist of a single stem closed by a terminal loop. We have named this structure the K-loop. We show that conserved non-canonical base pairs in the stem of the K-loop are necessary for L7Ae binding. For the C/D guides with a 3nt-spacer we show that the sequence and length is also important. The K-loop could improve the stability of the C/D guide RNAs in *Pyrococcal* species, which are extreme hyperthermophiles.

## **P47 Functional analysis of genes coding for Argonaute/Piwi proteins in *Paramecium Tetraurelia***

Khaled Bouhouch and Eric Meyer  
*Laboratoire de Génétique Moléculaire, CNRS UMR 8541*  
*Ecole Normale Supérieure, 46, rue d'Ulm*  
*75005 Paris, France*  
*bouhouch@biologie.ens.fr*

The genome rearrangements that occur during development of the *Paramecium* macronucleus are regulated by homology-dependent maternal effects. Recent data obtained in *P. tetraurelia* and *Tetrahymena thermophila* suggest that small RNAs (scnRNAs) produced by the germline genome during meiosis are used to compare the genome of the developing macronucleus to the previously rearranged maternal genome. It was previously shown in *Tetrahymena* that some actors of the RNAi machinery (Dicer and Argonaute/PIWI proteins) are required in genome rearrangement and involved in the production or maintenance of the scnRNAs. The *P. tetraurelia* macronuclear genome contains 15 genes coding for PIWI proteins. Such a large number of genes suggests that PIWI proteins may be involved in several different processes during the *Paramecium* life cycle. A preliminary functional analysis using the 'feeding' technique for RNAi shows that : (i) two of these genes are expressed only during sexual events, and are involved in developmental genome rearrangements: their inactivation impairs the excision of IESs and the maternal inheritance of macronuclear deletions, resulting in lethality after autogamy; (ii) three other genes are involved in the vegetative silencing of endogenous genes by injected transgenes; (iii) three genes are expressed at late stages of sexual processes, but, intriguingly, are expressed at much earlier stages if the cells are grown on bacteria producing double-stranded RNA.

**P48** Identification d'Aptamères dirigés contre une protéine de la matrice extracellulaire, la metalloprotéase matricielle, MMP-9. Applications Diagnostiques

Sonia Da Rocha Gomes, Eric Dausse, Jean-Jacques Toulmé

INSERM U386, Université Victor Segalen, 33076 Bordeaux, France  
Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Escarpit, 33600 Pessac, France  
[sonia.darocha@bordeaux.inserm.fr](mailto:sonia.darocha@bordeaux.inserm.fr)

La sélection *in vitro* de séquences ADN ou ARN par une approche combinatoire SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) permet d'identifier parmi une population aléatoire de candidats, des ligands structurés de type acide nucléique spécifiques d'une cible définie. Ces molécules appelées aptamères sont capables de reconnaître une grande variété de cibles (protéines, petites molécules, acides nucléiques) avec une haute affinité et une haute spécificité. Ces aptamères sont obtenus après plusieurs cycles de sélection et amplification.

La stratégie SELEX a été appliquée dans le but d'exploiter le potentiel diagnostique des aptamères. D'une part, il s'agit d'isoler et de caractériser des aptamères spécifiques et affins de marqueurs biochimiques de l'accident vasculaire cérébral (AVC) dans le but de participer à la mise en œuvre et au développement d'une plateforme diagnostique pour les AVC, en utilisant des bio-capteurs sur lesquels seraient conjugués des aptamères ou des anticorps. D'autre part, il a également été envisagé d'utiliser les aptamères comme outil de reconnaissance moléculaire de la malignité tumorale pour l'imagerie multi-modalité IRM (Imagerie par résonance Magnétique) et TEP (Tomographie par Emission de Positions) pour l'imagerie de tumeurs cérébrales.

Par conséquent, 3 protéines ont été ciblées pour ces projets appartenant à la famille des Métalloprotéases matricielles ou MMPs, les MMP-2, -7 et -9. Ces protéines interviennent lors de différentes étapes de la progression tumorale comme l'angiogenèse et sont surexprimées dans les tumeurs cérébrales. Ces protéines possèdent une activité protéolytique jouant un rôle prépondérant lors de l'ischémie cérébrale ou AVC.

Un aptamère dirigé contre la MMP-9 a été identifié, sa spécificité et son affinité déterminées. L'utilisation de l'aptamère comme sonde moléculaire de détection est en cours d'analyse.

## **P49 Etude fonctionnelle d'ARN régulateurs exprimés par le *Staphylocoque doré*.**

*Christophe Pichon, Thomas Dubrunfaut, Ambre Jousselein, Svetlana Chabelskaya, Laurent Metzinger et Brice Felden.*

Université de Rennes, Biochimie Pharmaceutique, Inserm ESPRI ERI6, Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur JE 2311, 2 Avenue du Prof. Léon Bernard, 35043 Rennes, France. E mail: [bfelden@univ-rennes1.fr](mailto:bfelden@univ-rennes1.fr).

Des gènes exprimant des ARN non traduits en protéines sont identifiés dans l'ensemble des organismes vivants, agissant principalement en tant que régulateurs de la stabilité d'ARNm cibles et/ou de la synthèse de protéines dont l'expression doit être régulée en réponse à des variations de l'environnement cellulaire. De nouveaux petits ARN, certains en copies multiples, sont exprimés à partir du génome du *Staphylocoque doré* (*S. doré*), certains à partir d'îlots de pathogénicité conférant des propriétés de virulence et de résistance aux antibiotiques. Certains de ces ARN présentent des variations importantes d'expression parmi différentes souches bactériennes issues de prélèvements cliniques, suggérant leur implication dans la régulation de la virulence de la bactérie (*Pichon C & Felden B, Proc Natl Acad Sci USA. 2005, 102:14249-54*).

Afin d'élucider la fonction de ces nouveaux ARN, nous avons entrepris de (i) définir leurs extrémités 5' et 3', (ii) de déterminer leur localisation subcellulaire, (iii) d'interrompre ou de stimuler leur expression cellulaire par différentes approches expérimentales (iv) et de définir ceux interagissant avec la protéine Hfq qui favorise, chez *E. coli*, l'interaction du régulateur avec sa cible et intervient dans sa dégradation ciblée, par différentes approches (biopuces, expériences de retard sur gel, expériences de rétention sur filtres). Aussi, lors de ces études fonctionnelles, deux nouveaux ARN ont été identifiés et leur caractérisation fonctionnelle est en cours.

## **P50 Experimental study of the secondary structure of the A-repeat region of the Xist RNA implicated in X chromosome silencing in female mammals.**

Maenner Sylvain<sup>1</sup>, Marchand Virginie<sup>1</sup>, Clerc Philippe<sup>2</sup>, Visvikis Athanase<sup>1</sup> and Branlant Christiane<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MAEM UMR 7567 CNRS-UHP Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques, Bvd des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès Nancy, France.

<sup>2</sup> Génétique Moléculaire Murine, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

*visvikis@maem.uhp-nancy.fr*

Dosage compensation of X-linked genes between male and female mammals is achieved by transcriptional inactivation of one X chromosome in female cells during early development. The X chromosome inactivation is initiated by accumulation on the X chromosome that will be inactivated, of a 17- to 19- kb long non coding RNA, Xist. The Xist RNA is thought to recruit specific protein partners which are responsible for the transcriptional silencing of the genes on the inactive X chromosome. Genetic evidence has established the absolute requirement for the silencing process, of an approximately 500-nt long conserved region in the 5' terminal region of the Xist RNA. This conserved region is called the "A-repeat" because depending on the mammalian species, it is composed of 7 or 8 repetitions of a 24 nt long GC-rich element. These repeats are separated by spacers containing long U-rich sequences. Based on computer structure prediction, it was proposed that each repeat folds into two stem loop structures. However, the proposed structure seems unstable and the computational prediction did not integrate the spacer sequences. Therefore we undertook an experimental analysis of the 2D structure of the A-repeat region of both mouse and human Xist RNAs.

By using chemical and enzymatic probes of the RNA structure, we found that the A-repeat region can be folded into two long irregular stem-loop structures. The repeats are involved in base pair interactions either with another repeat or with nucleotides of the spacer sequence. However, most of the second element of each repeat is in a single stranded conformation. Bulges and loops in each stem loop are mostly composed by U-rich sequences and part of the second element of the repeats. A comparison of the mouse and human A-repeat regions with those of other mammals supports the proposed secondary structure, since in spite of strong sequences variations in the spacer regions, a similar structure can be proposed. By foot-printing assay in a nuclear extract, we showed that U-rich spacer sequences and some nucleotides of the repeats bind proteins from a HeLa nuclear extracts. Identification of these proteins is currently under investigation.

The proposed model will be very useful for further *in vivo* functional studies of the A-repeat region and for characterisation of proteins partners that participate in the establishment of the transcriptionally inactive state.

## **P51 L'ARN C/D HBII-52 et la maturation de l'ARNm 5-HT2c**

Vitali Patrice, Martyr Virginie et Cavaillé Jérôme.

Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote du CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

*vitali@ibcg.biotoul.fr*

Les ARN C/D représentent une grande famille d'ARN non codants comprenant environ une centaine de membres chez les mammifères. La plupart des ARN C/D interagissent avec d'autres ARN cellulaires grâce à de longs segments antisens et dirigent l'ajout d'une méthylation en 2'-O-ribose sur certaines positions nucléotidiques. Ces ARN C/D se divisent en trois groupes : (1) les snoARN (pour « small nucleolar RNA) qui s'accumulent dans le nucléole où ils modifient l'ARN ribosomique (ARNr) et le snARN U6 du spliceosome (2) les scaARN (pour « small Cajal specific ARN ») s'accumulant dans les corpuscules de Cajal, au sein duquel ils modifient les snARN U1, U2, U4 et U5 du spliceosome (3) les ARN C/D orphelins, qui ne présentent aucune complémentarité avec les ARNr ou les snARN du spliceosome. Aujourd'hui encore, la fonction de ces ARN C/D orphelins reste à élucider.

Chez l'homme, le locus 15q11-q13 (ou locus Prader-Willi) héberge des gènes d'ARN C/D orphelins -en particulier HBII-52- qui sont transcrits uniquement à partir de l'allèle paternel et fortement exprimés dans le cerveau.

Etonnamment, l'ARN C/D HBII-52 possède une longue complémentarité conservée de 18 nt avec un ARN messager spécifique du cerveau, codant pour le récepteur à la sérotonine 5-HT2c. La séquence reconnue par l'ARN C/D sur l'ARNm est un important site de régulations post-transcriptionnelles, puisque cette région est alternativement épissée et subit cinq événements d'édition (déamination de 5 adénosines en inosines). L'ARN C/D HBII-52 pourrait donc réguler l'épissage alternatif et/ou l'édition de l'ARNm 5-HT2c participant ainsi au contrôle de la réponse sérotoninergique. De manière remarquable, le nucléotide potentiellement 2'-O-méthylé par HBII-52 est précisément l'un des sites d'édition -le site C- qui joue un rôle crucial dans la transduction du signal par la sérotonine. Bien qu'une preuve formelle *in vivo* de la fonction de HBII-52 reste à établir, nous avons récemment montré que l'expression de ce petit ARN inhibe spécifiquement la déamination de l'adénosine au site C de 5-HT2c.

Pour déterminer la fonction *in vivo* de l'ARN C/D HBII-52 deux axes de recherche sont actuellement poursuivis au sein du laboratoire : (1) des pertes de fonction, chez la souris, grâce à l'injection dans le cerveau d'oligonucléotides antisens (LNAs pour «locked nucleic acids») (2) des gains de fonction, par l'élaboration de souris transgéniques exprimant de façon ectopique l'ARN HBII-52. Ces études seront suivies de tests moléculaires (maturation de l'ARNm 5-HT2c en présence et en absence de HBII-52) et comportementaux.



## **P52 Etude des mécanismes de synthèse de l'ARN du virus de l'hépatite C par la RNA polymérase RNA dépendante du virus.**

Kathleen Mahias, Pantxika Bellecave, Cyril Masante, Simon Litvak, Michel Ventura et Thérèse Astier-Gin, CNRS UMR5097, Université Victor Ségalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex. [Therese.astier@reger.u-bordeaux2.fr](mailto:Therese.astier@reger.u-bordeaux2.fr)

Le virus de l'hépatite C (VHC) est l'agent étiologique de la plupart des hépatites non A et non B. C'est un virus à ARN simple brin de polarité positive appartenant à la famille des flaviviridae. La synthèse de l'ARN viral dans les cellules est effectuée par un complexe protéique localisé dans des structures dérivées du réticulum endoplasmique. Ce complexe de réplication est constitué de protéines virales et de protéines cellulaires non encore identifiées. Le core catalytique de ce complexe est constitué par la protéine virale non-structurale (NS5B) qui porte une activité ARN polymérase RNA dépendante. Au cours de la réplication, la polymérase virale synthétise un brin complémentaire de polarité négative qui servira ensuite de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN viral. La NS5B recombinante purifiée est capable d'initier la synthèse d'ARN à l'extrémité 3' des ARN viraux *de novo* en absence d'amorce. Nous avons étudié le rôle des séquences de l'extrémité 3' de l'ARN brin négatif du VHC dans l'initiation de la synthèse de l'ARN viral par la NS5B *in vitro*. La structure secondaire de la région 3' du brin négatif a été déterminée par deux groupes (Schuster et al., et Smith et al., 2002). Ce fragment contient deux domaines : le domaine I (région 3') et le domaine II (région 5'). Les 228 nucléotides du domaine I possèdent 5 tiges boucles stables (SL-A1 à SL-E1) tandis que le domaine II est organisé de façon moins stable. Nous avons étudié l'effet de changements de nucléotides trouvés naturellement dans les virus de différents génotypes ou introduits par mutagenèse dirigée dans la synthèse d'ARN *in vitro* par la NS5B. Nous avons montré que la délétion de la tige boucle SL-A1 ou des changements de nucléotides dans la boucle apicale réduisent significativement le taux de synthèse d'ARN tandis que les modifications de la tige boucle SL-B1 augmentent la synthèse d'ARN. Les mutations dans la boucle apicale de SL-E1 homologue à la boucle de SL-II présente à l'extrémité 3' de l'ARN positif n'ont pas d'effet sur la synthèse d'ARN par la NS5B *in vitro* alors que les mutations induisant une déstabilisation de la base de SL-E1 diminuent fortement la synthèse de l'ARN. Les résultats d'expériences de gels retard indiquent que les 3 boucles SL-A1, SL-B1 et SL-E1 ne sont pas les domaines essentiels pour la liaison de la région 3' de l'ARN négatif du VHC à la polymérase virale.

Nos résultats suggèrent fortement que plusieurs domaines de la région de 341 nucléotides de l'extrémité 3' du brin négatif interagissent avec la polymérase du VHC lors de la synthèse d'ARN *in vitro*.

## **P53 La protéine FMRP est associée au complexe SMN *in vivo* grâce à son interaction directe avec la protéine SMN**

Nathalie Piazzon (1), Florence Schlotter (1), Hervé Moine (2), Christiane Branlant (1) et Séverine Massenet (1)

(1) Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP NancyI, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France  
[nathalie.piazzon@maem.uhp-nancy.fr](mailto:nathalie.piazzon@maem.uhp-nancy.fr)

(2) Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, CU de Strasbourg, France

L'amyotrophie spinale (ou SMA, Spinal Muscular Atrophy) est une maladie génétique autosomale récessive, due à un taux réduit de protéine SMN (Survie des MotoNeurones) dans les cellules. Elle se caractérise par la dégénérescence des motoneurones de la moelle épinière. La protéine SMN est associée à plusieurs autres protéines (Gemin2-8 et Unrip) pour former un large complexe macromoléculaire essentiel à la survie des cellules. Ce complexe joue un rôle clé dans l'assemblage et le métabolisme des UsnRNP spliceosomales (1). Il interviendrait également dans l'assemblage d'autres RNP dans les cellules et pourrait ainsi jouer un rôle général de machinerie d'assemblage pour divers complexes ARN-protéines. Bien que la protéine SMN soit ubiquitaire, la pathologie SMA est exclusivement liée à un défaut des motoneurones. Certaines données suggèrent que le complexe SMN puisse avoir des fonctions spécifiques dans les neurones et notamment dans le transport des ARN le long des neurites (2). La protéine FMRP, dont l'absence provoque le syndrome de l'X-fragile, est une protéine de liaison à l'ARN dont le rôle présumé est de participer à la régulation de la traduction, au transport et à la localisation d'ARNm cibles (3). De ce fait, la protéine FMRP pourrait jouer un rôle clé dans les neurones, où la synthèse protéique locale au niveau des synapses est essentielle à la plasticité synaptique et à la fonction neuronale. La protéine FMRP est capable d'interagir directement avec certains de ses ARNm cibles. Elle pourrait également être guidée vers ses ARNm cibles par des ARN non codants, tels les miRNA auxquels elle est associée. Nos travaux révèlent que le complexe SMN est co-immunosélectionné avec la protéine FMRP dans les cellules 293T. Par des expériences d'interaction *in vitro* entre la protéine FMRP, fusionnée à la protéine GST, et les différents composants du complexe SMN produits séparément dans des réticulocytes de lapin, nous avons montré que c'est la protéine SMN au sein du complexe SMN qui interagit de manière directe et spécifique avec la protéine FMRP. Des protéines FMRP tronquées ont été produites chez *E. coli* et leur capacité d'interaction avec la protéine SMN a été testée. Ainsi, nous avons montré qu'une région localisée à l'extrémité C-terminale de la protéine FMRP est essentielle à son interaction avec la protéine SMN. Nous avons donc caractérisé un nouveau domaine d'interaction protéine/protéine au sein de la protéine FMRP. De manière intéressante, nous avons également montré que l'interaction FMRP/SMN est inhibée si la protéine SMN porte certaines mutations existant chez des patients SMA. De plus, des expériences d'immunofluorescence ont révélé que l'expression du mutant dominant négatif SMN $\Delta$ N27 dans des cellules HeLa relocalise la protéine FMRP dans de larges agrégats cytoplasmiques. L'ensemble de nos résultats suggèrent donc fortement l'existence d'un lien fonctionnel entre le complexe SMN et la protéine FMRP et une implication possible du complexe SMN dans la régulation de la traduction, dans la stabilité et/ou le transport des ARNm. La possibilité que le complexe SMN intervienne dans la fixation de la protéine FMRP sur ses ARNm cibles sera discutée.

(1) for review, Paushkin *et al.*, Current Opinion in Cell Biology, 2002, 14, 305-312

(2) Rossoll *et al.*, Journal of Cell Biology, 2003, 163, 801-812; Zhang *et al.*, Neuroscience, 2003, 23, 6627-6637

(3) for review, Schaeffer *et al.*, Biology of the cell, 2003, 95, 221-228; Siomi *et al.*, Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review, 2004, 10, 68-74

## **P54 Interaction Spécifique entre la protéine de nucléocapside du VIH-1 et le bras T de l'ARNt<sup>Lys3</sup>**

Pierre Barraud, Frédéric Dardel & Carine Tisné

Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques  
Faculté de Pharmacie  
4, avenue de l'Observatoire – 75270 Paris Cedex 06

*pierre.barraud@univ-paris5.fr*

Pour amorcer la polymérisation du brin (-), la reverse transcriptase du VIH-1 utilise un ARNt cellulaire (l'ARNt<sup>Lys3</sup>), qui est complémentaire d'une région de l'ARN viral appelée PBS (*primer binding site*) située dans la partie 5' non-traduite. L'hybridation de ces deux ARN aboutit à un remodelage structural important et nécessite l'intervention de la nucléocapside virale (NC) qui agit comme chaperon moléculaire. Une approche RMN, dans laquelle la réaction est ralentie en contrôlant la température, nous a permis de suivre les détails de ce processus de remodelage et de mettre en évidence un état intermédiaire. Cet intermédiaire est bloqué par les interactions tertiaires entre les boucles T→C et D situées au cœur de l'ARNt amorce (Tisné, C., Roques, B.P. & Dardel, F. The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome. *J Biol Chem* **279**, 3588-95 (2004)).

La NC est connue pour se lier sélectivement aux structures en tige-boucle situées dans la région 5' non traduite de l'ARN viral. Deux structures des complexes correspondants ont été résolues dans le laboratoire de M. Summers. Il existe une parenté structurale entre ces structures sur l'ARN viral et la tige-boucle T→C sur l'ARNt qui suggère qu'une reconnaissance du même type pourrait exister avec cette région de l'ARNt.

Actuellement, un complexe entre la NC et une tige-boucle d'ARN qui mime le bras T de l'ARNt<sup>Lys3</sup> est étudié par RMN. L'empreinte de cette tige-boucle T→C sur la NC montre une interaction spécifique qui pourrait expliquer le processus d'ouverture de l'ARNt amorce.

## **P55 Aptamères : nouveaux outils pour le diagnostic prénatal non invasif**

Daguer Jean Pierre, Toulmé Jean-Jacques

Laboratoire Modulation artificielle des gènes eucaryotes, U386 INSERM. Université Victor Segalen, Bordeaux II, Bordeaux, France

Institut Européen de Chimie et Biologie. 2 rue Robert Escarpit. 33600. Pessac. France

*jp.daguer@iecb.u-bordeaux.fr*

De nos jours, la médecine est capable de diagnostiquer un grand nombre d'anomalies génétiques chez le fœtus. Les techniques utilisées pour le prélèvement de tissus ou de cellules fœtaux, sont des techniques invasives qui impliquent un risque d'infection et d'interruption de grossesse. Depuis plusieurs années il a été démontré la présence de cellules fœtales tels que des érythroblastes, des trophoblastes et des cellules placentaires dans la circulation périphérique maternelle. L'identification et l'isolement de ces cellules permettrait l'application de techniques de diagnostic prénatal avec un risque minimal pour la santé de la femme ou du fœtus. Malheureusement aucun marqueur spécifique de cellules fœtales humaines n'a été encore identifié. Nous avons mis en oeuvre une approche combinatoire (SELEX) permettant la sélection *in vitro* d'oligonucléotides de forte affinité à partir d'une bibliothèque de  $10^{15}$  séquences aléatoires.

Un protocole de sélection *in vitro* d'aptamères a été mis au point pour l'obtention de ligands de haute affinité contre des cellules fœtales. Des aptamères résistants aux RNAses, spécifiques des cellules fœtales ont été obtenus et leur capacité de fixation sur des cellules d'origine fœtale a été évalué. Nous avons identifié deux aptamères, D61 et D53 sur lesquels ont été menées des études d'interaction avec des membranes des cellules ciblées. Des travaux visant à déterminer les ligands reconnus par ces aptamères sont en cours. L'application de la technologie SELEX à la recherche de nouveaux marqueurs cellulaires ouvre la porte à l'application de cette stratégie pour l'identification d'autres types cellulaires comme des cellules cancéreuses ou des cellules souches.

## **P56 La régulation post-transcriptionnelle dépendante D'EDEN-BP est nécessaire à la segmentation somitique de *Xenopus laevis***

Carole Gautier-Courteille, Christophe Le Clainche, Carine Barreau, Yann Audic, Antoine Graindorge, Dominique Maniey, H. Beverley Osborne, Luc Paillard

CNRS UMR6061 Génétique et Développement Groupe REG Université de Rennes1 IFR 140  
2 av du Pr Léon Bernard CS34317 35043 Rennes cedex  
[carole.gautier@univ-rennes1.fr](mailto:carole.gautier@univ-rennes1.fr)

EDEN-BP est une protéine de liaison aux ARNm qui entraîne la déadénylation et ainsi la répression traductionnelle et la dégradation d'un certain nombre d'ARNm maternels juste après la fécondation chez le Xénope. Nous avons démontré précédemment que cette protéine se lie spécifiquement aux ARNm via un élément de séquence dans la région 3' non-traduite (3'UTR). Nous avons observé que ce facteur est aussi exprimé dans le mésoderme présomitique d'embryons plus âgés. Le mésoderme présomitique se situe dans la partie la plus caudale de l'embryon et est le siège de la formation des somites. Les somites sont des structures transitoires de l'embryon qui donneront naissance à de nombreux tissus incluant les muscles et les os. Elles sont formées d'une série d'unités métamériques, quasi-identiques, le long de l'axe antéro-postérieur selon un processus appelé segmentation. L'inhibition de la fonction d'EDEN-BP provoque des défauts sévères de la segmentation somitique qui sont associés à des défauts dans l'expression des marqueurs de segmentation dans le mésoderme présomitique. Par des expériences de cross-link aux UV et l'analyse de la déadénylation d'ARNm rapporteurs, nous avons montré que l'ARNm codant pour XSu(H), une protéine jouant un rôle central dans la voie de transduction du signal Notch, est déadénylé de façon EDEN-BP dépendante. De plus cette protéine XSu(H) est surexprimée dans des embryons déplétés en EDEN-BP. Finalement, nous avons montré que la surexpression de XSu(H) produit des défauts de segmentation similaires à ceux causés par l'inhibition d'EDEN-BP. Ces résultats montrent qu'au moins un facteur impliqué dans la voie de signalisation Notch est réprimé par une régulation post-transcriptionnelle dépendante d'EDEN-BP et que ce mécanisme est nécessaire à la segmentation somitique.

## **P57 Identification d'inhibiteurs de la traduction du Virus de l'Hépatite C par la stratégie des Eléments Génétiques Suppresseurs (GSE)**

JAFFRELO Loïc (1), CHABAS Sandrine (1), PFLIEGER Aude (1), WYCHOWSKI Czeslaw (2), CAHOUR Annie (3), STAEDDEL Cathy (1) et TOULME Jean-Jacques (1).

(1) U386 INSERM, Université Victor Segalen, Bordeaux, France.

(2) CNRS-UPR 2511, IBL/Institut Pasteur de Lille, Lille, France.

(3) Laboratoire de Virologie, CERVI, UPRES EA 2387, Pitie-Salpetriere, Paris, France.

*jaffrelo@bordeaux.inserm.fr*

Le virus de l'hépatite C (VHC) est l'agent majoritairement responsable des hépatites chroniques, évoluant dans 5 à 10 % des cas à un carcinome hépatocellulaire. Plus de 170 millions d'individus dans le monde sont infectés, ce qui représente un problème de santé publique important. Puisqu'il n'existe aucun vaccin et que les traitements antiviraux actuels ont une efficacité limitée, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques reposant sur l'approfondissement des connaissances des différentes étapes du cycle viral, et notamment la traduction de l'ARN génomique.

La région 5' non codante (NC) du génome du VHC constitue un site d'entrée interne du ribosome (IRES). Cette région très structurée en tige boucle permet la fixation directe de la sous-unité 48S du ribosome (40S, eIF3, eIF2 :GTP :Met-tRNA<sub>i</sub>) à proximité du codon d'initiation. Cette initiation se fait donc de manière indépendante de la coiffe et ne nécessite pas l'intervention des nombreux facteurs d'initiation de la traduction. Ce mécanisme étant différent de celui de la plupart des ARN messagers cellulaires, et la région 5'NC étant très conservée parmi les différents génotypes, ceci fait de l'IRES une cible antivirale de choix.

Ainsi afin d'identifier des molécules capables d'inhiber la traduction du VHC, nous avons mis en œuvre d'une stratégie combinatoire dans un environnement cellulaire basée sur la stratégie des GSE (Gudkov *et al.*, 1994).

Une banque de fragments ADNc aléatoires de 100-200 pb du génome du VHC de génotype 1a a été générée par digestion à la DNaseI, et construite de manière à ce que les fragments puissent être exprimés dans les cellules sous forme d'ARN sens ou antisens, ou sous forme de peptides. La banque est introduite sous forme de rétrovirus dans des cellules cibles HepG2 exprimant de manière stable la HSVTK (*Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase*) sous dépendance de l'IRES du VHC. L'expression de l'HSVTK dans les cellules les rend sensibles à un traitement au Ganciclovir (GCV). Ainsi, après infection par la banque et traitement au GCV, seules les cellules ayant incorporé un élément inhibiteur de l'IRES survivront. Après deux tours de sélections au GCV, nous avons isolé 28 clones HepG2-IRES-HSVTK résistant au GCV, desquels nous avons pu récupérer, par PCR, les fragments VHC intégrés. Ces fragments ont été identifiés par séquençage et comparaison avec le génome du VHC.

Parmi les 6 éléments VHC majoritaires identifiés au cours de ce processus de sélection, l'un d'eux situé dans la région codante d'une protéine virale inhibe individuellement la traduction IRES-dépendante. De plus, le peptide codé par cet élément est capable d'inhiber de façon drastique l'infectivité du virus de l'Hépatite C dans le modèle cellulaire d'infection par le VHC développé depuis peu par l'équipe de Wakita (Wakita *et al.*, 2005).

Il reste maintenant à déterminer précisément le mode d'action de ce peptide qui pourrait agir sur différentes étapes du cycle viral.

## **P58 Etude de la fixation du facteur de régulation d'épissage MBNL1 sur ses ARN cibles et sur les ARN à répétitions CUG anormalement longues, présents dans les cellules de malades atteints de Dystrophie Myotonique de type 1.**

MARMIER-GOURRIER Nathalie, VAUTRIN Audrey, MANIVAL Xavier, LECLERC Fabrice, AIGUEPERSE Christelle et BRANLANT Christiane.

Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UHP Nancy I, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, Entrée 4A, 5<sup>ème</sup> étage, Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France

*nathalie.gourrier@maem.uhp-nancy.fr*

Deux maladies génétiques graves, les dystrophies myotoniques de type 1 et 2, sont respectivement liées à l'amplification en grand nombre de copies de triplets CTG et de quadruplets CCTG. De ce fait, dans le cas de la DM1, un long enchaînement de triplets CUG est présent dans la région 3'-UTR de l'ARNm de la kinase DMPK et dans le cas de la DM2, un enchaînement de quadruplets CCUG est présent dans l'intron 1 de la protéine à doigts de zinc ZNF9. La présence de ces répétitions de séquences conduit à une dérégulation de l'épissage alternatif de plusieurs pré-ARNm, dont ceux de la troponine T cardiaque et de la protéine Tau. Les séquences répétées forment des structures hélicoïdales au sein des pré-ARNm (1) et un des facteurs régulant les processus d'épissage alternatif des transcrits de l'ARN pol II (MBNL1) est retrouvé associé aux ARN contenant les répétitions au sein de foci nucléaires. D'où l'idée que ce facteur pourrait être piégé dans ces foci et ne jouerait plus son rôle dans l'épissage alternatif (2). Un des objectifs de ce travail est de comprendre comment MBNL1 s'associe d'une part aux pré-ARNm dont il régule l'épissage, et d'autre part, aux répétitions CUG ou CCUG, ceci afin de développer des molécules qui puissent bloquer l'interaction avec les répétitions, sans bloquer celle avec les séquences cibles des pré-ARNm. Pour cela, différentes approches sont mises en œuvre : analyse expérimentale par emploi de sondes enzymatiques de la structure secondaire de séquences cibles de MBNL1 dans les pré-ARNm (exon 5 de la troponine T cardiaque) et étude par empreinte des complexes formés avec MBNL1. Les complexes formés par MBNL1 et des ARN contenant des nombres différents de répétitions CUG sont étudiés par la même approche. Pour cela, la protéine MBNL1 entière et des protéines MBNL1 tronquées dans la région C-terminale ont été produites chez *E. coli* et purifiées. Dans l'objectif d'établir la structure 3D de la protéine MBNL1 libre et en association avec l'ARN par radiocristallographie, des essais de cristallisation ont été débutés. Par ailleurs, la technique SELEX est mise en œuvre afin de définir avec précision la spécificité de reconnaissance des ARN par MBNL1. Toutefois, MBNL1 n'est sans doute pas la seule protéine se liant aux répétitions de triplets CUG et quadruplets CCUG. Pour identifier les autres protéines, la technique de fractionnement des RNP, basée sur la production d'un ARN fusionné au motif de l'ARN du phage MS2 fixant la protéine d'enveloppe, est utilisée. L'état de ces différents travaux en cours sera présenté.

(1) Napierala et Krzyzosiak, 1997

(2) Miller *et al.*, 2000 ; Ho *et al.*, 2004

## **P59 Trafficking of HIV Genomic RNA**

Dorothee Molle, Cedric Espenel, Carolina Segura-Morales, Eugenia Basyuk and Edouard Bertrand

Institut de Genetique Moleculaire de Montpellier (IGMM) UMR 5535  
1919 route de Mende  
34293 montpellier cedex 5

[dorothee.molle@igmm.cnrs.fr](mailto:dorothee.molle@igmm.cnrs.fr)

**During the late stages of the HIV-1 life cycle, formation and release of new retroviral particles out of infected cells require trafficking of viral genomic RNA to the cell surface and its assembly with viral proteins like Env and Gag. Env is a transmembrane protein that reaches the plasma membrane via the secretory pathway, whereas Gag is a cytosolic protein that directly binds cellular membranes through a myristoyl anchor. Gag expressed alone is sufficient to assemble budding virus-like particles (VLPs).**

**The standard model for retrovirus production describes assembly and budding of particles at the plasma membrane. Previously in the lab, it was shown that MLV Env and Gag tether the RNA onto endosomal vesicles, allowing the resulting complex to be routed to the cell surface. By imaging single RNA molecules in living cells, we have found that genomic RNAs of HIV-1 are also transported on endosomes to the cell surface. However, contrary to MLV, this transport doesn't require the presence of viral envelope. Surprisingly, HIV Gag release was stimulated after the treatment with drugs disrupting endosomal trafficking pathway. Our data suggest that HIV Gag and RNA travel on endosomes to the plasma membrane by a pathway different from MLV.**



## **P60 Sélection *in vitro* de ribozymes « hairpin » adénine-dépendants pour cibler des gènes impliqués dans la progression du cancer du sein.**

Yanli Li , Claire Torchet, Jacques Vergne, Marie-Christine Maurel  
*Laboratoire de Biochimie de l'Évolution et Adaptabilité Moléculaire.*  
*Institut Jacques Monod. 2 place Jussieu, Tour 42, 75005 Paris.*  
[li@ijm.jussieu.fr](mailto:li@ijm.jussieu.fr)

La découverte au laboratoire de ribozymes adénine-dépendants, obtenus par sélection *in vitro* (méthode SELEX) (Méli *et al.* 2003), nous permet aujourd'hui de rechercher de telles molécules présentant un intérêt thérapeutique. Pour cela, nous utilisons comme ARN de départ, un ribozyme 'hairpin' modifié, capable de réaliser une réaction d'auto-coupeure. Ce ribozyme 'hairpin' contient une partie catalytique et une partie substrat, et il a été montré qu'il pouvait fonctionner aussi bien en *cis* qu'en *trans* (Hampel 1990). Nous avons inséré dans la partie substrat de ce ribozyme, une séquence cible provenant du gène Tpl2/cot. Le gène Tpl2/cot code pour la sérine/thréonine kinase, enzyme qui active la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) (Salmeron 1996). En 1999, Sourvinos *et al.* ont montré qu'il y avait une surexpression de l'ARNm du gène Tpl2/cot dans 40% des tumeurs du sein. La surexpression du gène Tpl2/cot est statistiquement associée à l'étape I des cancers, cette surexpression du gène Tpl2/cot peut donc être un événement moléculaire précoce pendant le développement de la maladie. La surexpression du gène Tpl2/cot active NFκB (*Nuclear Factor-kappa B*), qui inhibe l'expression du récepteur de progestérone (Sourvinos *et al.* 1999), contribuant ainsi à la formation tumorale chez les patientes. Le gène Tpl2/cot a deux produits protéiques, Proto-Cot et Cot, qui sont traduits à partir de deux codons de démarrage différents. Notre séquence cible se situe après le deuxième codon de démarrage afin d'inhiber l'expression des deux produits.

Dans un premier temps, les ribozymes 'hairpin' ont été sélectionnés pour leur capacité à s'auto-cliver en présence d'adénine sur la séquence cible Tpl2/cot. Dans un deuxième temps, ils devront reconnaître le substrat *en trans*, et le couper au site requis, en présence d'adénine.

Références :

Hampel A, Tritz R, Hicks M, Cruz P. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(2):299-304.

Méli M, Vergne J, Maurel MC. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 9835-9842.

Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP and Ley SC. *EMBO J* 1996; 15: 817-826

Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA. *Oncogene* 1999; 18(35): 4968-4973.

**P61 The nucleolar localization of Ilf3 and NF90 *trans*-acting factors requires an alternatively-spliced signal sequence and is regulated by posttranslational modifications**

Viranaicken Wildriss (1,2), Gasmi Laila (1), Denoulet Philippe (1) Larcher Jean-Christophe (1)

(1) Biochimie cellulaire, UMR 7098 UPMC-CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

(2) Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

*wviranai@snv.jussieu.fr*

mRNA localization in eukaryotic cells is a key mechanism to maintain cellular integrity. In previous studies, we have shown that Ilf3 and NF90, two proteins generated by alternative splicing of a common premessenger, act as *trans*-acting factors for the axonal targeting element of Tau mRNA that is localized in the proximal region of axons. The specific neuronal distribution of Tau proteins may participate to the acquisition and the maintenance of the asymmetrical morphology essential for neuronal functions.

Ilf3 and NF90, as others mRNA binding proteins, are involved in several cellular functions, possibly related to their extensive heterogeneity. Their polymorphism is generated by a combination of alternative splicing events and posttranslational modifications (phosphorylation and arginine methylation). For example, the alternatively-spliced exon 3, located in mature mRNA just downstream the translation initiation codon, codes for a N-terminal sequence of 13 residues (ALYHHHFITRRRR) leading to the expression of one long and one short isoform of each protein.

Combining biochemical fractionation experiments and subcellular localization studies, we showed that this N-terminal sequence acts as an efficient nucleolar localization signal (NoS) and allows also the nuclear entry. Moreover, Ilf3 and NF90 long isoforms colocalized with nucleophosmin (B23), a well-defined nucleolar carrier protein recovered in the granular component. 2D-PAGE analysis of Ilf3 and NF90 present in the purified nucleolar, nucleoplasmic and cytosolic fractions showed that only long unmodified Ilf3 isoforms and long phosphorylated NF90 isoforms are recovered in the nucleolus.

These results clearly show that the nucleolar localization of some isoforms of Ilf3/NF90 requires the presence of small peptide signal encoded by the alternatively-spliced exon 3 and is regulated by their posttranslational modifications. Altogether, our results suggest that Ilf3 and NF90 are involved in one or several nucleolar function(s) (mRNP biogenesis, regulation of RNA polymerase I transcription, rRNA maturation, preribosome assembly, ...). Experiments are in progress to elucidate this key question.

## **P62 Une seule mutation dans le motif IV peut bloquer l'hélicase Ded1 dans une conformation inactive**

Josette Banroques<sup>°</sup>, Monique Doere\*, Olivier Cordin<sup>‡</sup>, Patrick Linder\* et Kyle Tanner\*

[banroques@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:banroques@cgm.cnrs-gif.fr)

<sup>°</sup> Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, 91198, France ; \* Département de Microbiologie et Médecine Moléculaire, Centre Médical Universitaire, Genève, 1211, Suisse ; <sup>‡</sup> Wellcome Trust Centre for Cell Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

Les hélicases putatives à ARN à motif DEAD sont des protéines ubiquitaires impliquées dans tous les processus cellulaires impliquant l'ARN. Ces protéines sont caractérisées par la présence de 9 motifs conservés qui forment le coeur structural de l'hélicase, et qui participent à la liaison de l'ATP et de l'ARN, ainsi qu'aux changements conformationnels induits par l'hydrolyse de l'ATP.

Dans le but de mieux comprendre ces changements conformationnels ainsi que les relations qui s'établissent entre la protéine et l'ARN, nous avons entrepris une analyse détaillée des motifs conservés des hélicases. L'hélicase Ded1 a été choisie pour cette étude, car c'est une protéine essentielle de la levure *S. cerevisiae*, relativement facile à purifier et qui présente de très bonnes activités enzymatiques *in vitro*. Nous avons d'abord concentré notre étude sur le motif IV qui a été précédemment décrit comme pouvant participer à la liaison protéine-ARN. Nous avons analysé *in vivo* l'importance de la phénylalanine très conservée de ce motif, puis nous avons caractérisé biochimiquement certaines des protéines mutantes obtenues : activité ATPase et capacité à fixer l'ARN et à dérouler des substrats ARN double brin. Nous avons toujours trouvé une corrélation parfaite entre les résultats *in vivo* et *in vitro*. De façon assez surprenante, nous avons observé sur gel retard, que ces protéines mutées sont incapables de réaliser les changements de conformation induits par la fixation de l'ADP ou de l'ATP. Ainsi, le changement d'un seul acide aminé peut bloquer la protéine dans une conformation inactive. Ces protéines sont pourtant toujours capables de fixer ces nucléotides (pontages aux UV).

Enfin, la recherche de suppresseurs intragéniques de ces mutants nous a permis d'obtenir des informations supplémentaires sur les régions d'interaction physiquement proches de cette phénylalanine, et de montrer qu'il existait une réelle inter-communication entre les motifs, mais aussi entre les deux domaines structuraux.

## **P63 Sélection *in vitro* de complexes boucle-boucle ARN-ARN de haute affinité.**

Dausse, E.<sup>1</sup>, Ferry-Dumazet, H.<sup>2</sup>, Maurel, S.<sup>1</sup>, Magnin, N.<sup>2</sup>, Watrin, M.<sup>1</sup>, Di Primo, C.<sup>1</sup>,  
De Daruvar A.<sup>2</sup> et Toulmé, J.J.<sup>1</sup>

1. INSERM U386 and Institut Européen de Chimie et Biologie, Université Victor Segalen,

2. Centre de Bioinformatique de Bordeaux, Université Victor Segalen, Bordeaux, France ;  
jean-jacques.toulme@bordeaux.inserm.fr

Les interactions ARN-ARN boucle-boucle jouent un rôle important dans la régulation de différentes étapes de l'expression des gènes (dimérisation des ARN rétroviraux, nombre de copies de plasmides, etc...)<sup>1</sup>. De tels complexes ont été identifiés par sélection *in vitro* (SELEX)<sup>2,3</sup>. Il existe des exemples naturels et artificiels de ces interactions qui peuvent être rangés en 2 classes : boucle apicale-boucle apicale (embrassement) ou boucle apicale-boucle interne (A.L.I.L).

Nous avons recherché les déterminants favorables à la formation des complexes d'embrassement :

- ◆ Taille de la boucle.
- ◆ Nombres de bases engagées dans l'interaction.
- ◆ Séquences préférentielles impliquées dans les interactions.
- ◆ Jonctions tiges-boucles préférentielles.

Pour répondre à ces questions de façon expérimentale nous avons réalisé une sélection *in vitro* de complexes d'embrassement à partir d'une banque d'oligonucléotides ARN pré-structurés en tige-boucles comportant une boucle aléatoire. Les tiges-boucles sélectionnées par E.M.S.A (Electrophoretic Mobility Shift Assay) pour leur aptitude à former des complexes d'embrassement ont été clonées et séquencées à l'issue de quatre tours de sélection. 110 séquences ont été analysées. Une étude informatique de cette population a permis de mettre en évidence des motifs consensus entre ces différentes tiges-boucles et d'éventuels motifs de complémentarité boucle-boucle. Afin de vérifier la formation de complexes d'embrassement, des techniques de mobilité électrophorétique retardée, de Biacore et d'absorption UV ont été mises en œuvre. Des complexes de très haute affinité (nM) ont été identifiés et caractérisés. Les bases adjacentes préférentielles à ces motifs, présentes aux jonctions tige-boucle ont été caractérisées. Enfin nous avons étudié la reconnaissance de ces complexes d'embrassement par la protéine Rom d'*E.coli* (RNA one modulated).

Ces sélections *in vitro* ont permis d'aboutir à la sélection de complexes de haute stabilité et à la mise en évidence de déterminants communs favorable à la formation de complexes d'embrassement.

1. Brunel, C., Marquet, R., Romby, P., and Ehresmann, C. (2002) RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs *Biochimie* **84**, 925-44.

2. Ducongé, F., Di Primo, C., and Toulmé, J. J. (2000) Is a closing "GA pair" a rule for stable loop-loop RNA complexes? *J. Biol. Chem.* **275**, 21287-21294.

3. Aldaz-Carroll, L., Tallet, B., Dausse, E., Yurchenko, L., and Toulmé, J.-J. (2002) Apical loop-Internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through *in vitro* selection against RNA hairpins of the Hepatitis C Virus mRNA *Biochemistry* **41**, 5883-5893.

## **P64 Caractérisation de la structure de complexes boucle-boucle ARN de type « ALIL » impliqués dans la régulation de l'expression des gènes**

Lebars I. (1) et Toulmé J.J. (2)

- (1) I.E.C.B, Institut Européen de Chimie et de Biologie, UMR 5144-CNRS, Université Bordeaux1, 2 rue Robert Escarpit, 33600 PESSAC.
- (2) I.E.C.B, Institut Européen de Chimie et de Biologie, U386-INSERM, Université Victor Segalen, 2 rue Robert Escarpit, 33600 PESSAC.

De nombreuses structures d'ARN ont une fonction régulatrice, soit parce qu'elles constituent un signal de reconnaissance pour leur partenaire, soit parce qu'elles sont le site de liaison de protéines ou d'acides nucléiques. Les boucles des structures en tige-boucle présentent un riche potentiel pour établir des interactions intra- ou intermoléculaires. Elles peuvent former des complexes avec d'autres boucles de séquence complémentaire. Ces complexes sont connus pour réguler des processus aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Durant les vingt dernières années, de nombreuses stratégies utilisant des oligonucléotides synthétiques (antisens, ribozymes, ARN interférant) ont été développées pour contrôler l'expression des gènes. Quand la structure de l'ARN joue un rôle majeur dans un processus biologique, de tels ligands peuvent servir de modèles pour le développement d'agents thérapeutiques dans la mesure où ils sont susceptibles d'interférer avec ce même processus. Des oligomères capables de reconnaître une structure d'ARN peuvent être identifiés par des méthodes combinatoires. Une procédure de choix est la technique SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Cette méthode permet l'identification de séquences d'ADN ou d'ARN comportant jusqu'à une centaine de nucléotides dans une bibliothèque de  $10^{14}$ - $10^{15}$  séquences.

Dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs aptamères contre des motifs en tige boucle de l'IRES et de la région 3'X de l'ARNm du Virus de l'Hépatite C (VHC), les aptamères identifiés comportent une boucle interne partiellement complémentaire de la boucle apicale de la cible. L'aptamère et la cible forment donc un complexe au travers de cette interaction boucle apicale-boucle interne (ALIL). Plusieurs exemples d'interactions ALIL ont été identifiés dans différents organismes, notamment chez la drosophile. Le complexe formé par l'interaction entre les boucles interne IIIa et apicale IIIb de l'ARN messager bicoïde produit donc un dimère via deux interactions ALIL qui intervient dans la régulation de l'expression des gènes lors du développement embryonnaire.

Notre étude concerne la caractérisation structurale des interactions boucle-boucle des ARN, mises en jeu d'une part dans des complexes naturels de régulation de l'expression des gènes (cas de l'ARN bicoïde chez la drosophile), et d'autre part, dans des complexes artificiels entre ligands (aptamères) et cibles (cas de la région IRES du VHC). Les informations recueillies lors de ces études permettront d'optimiser des ligands synthétiques (aptamères) intéressants à la fois comme outils d'investigation des mécanismes fonctionnels, et comme agents thérapeutiques (modulateurs synthétiques) lorsque les tiges-boucle ciblées constituent des sites cruciaux dans un contexte pathologique.

## **P65 Etude structurale par diffraction des rayons et mutagenèse dirigée des particules H/ACA d'archaea**

Manival X., Charron C., Charpentier B., Fourmann JB., Muller S. and Branlant C.

Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire – UMR 7567, Université Henri Poincaré Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

*Xavier.Manival@maem.uhp-nancy.fr*

Les travaux de notre équipe ont permis de montrer que chez les archaea, comme chez les eucaryotes, la conversion des uridines en pseudouridines dans les ARN ribosomiques est catalysée par des particules ARN-protéines contenant un sRNA à boîtes H/ACA et quatre protéines (L7Ae, aCBF5, aNOP10 et aGAR1) (1). La protéine aCBF5 qui porte la signature des ARN :  $\psi$  synthase se lie directement à l'ARN guide (sRNA H/ACA) et recrute la protéine aNOP10. Cet ensemble constitue la structure minimale capable de recruter l'ARN substrat et ayant une activité catalytique (1). Nous avons cristallisé le complexe formé par les protéines aCBF5 et aNOP10 (produites séparément chez *E. coli*) et établi sa structure tridimensionnelle à 2,1 Å de résolution par diffraction des rayons X (2). La protéine aCBF5 est composée de deux domaines, un domaine catalytique contenant l'acide aspartique catalytique et un domaine appelé PUA («PseudoUridine synthase and Archaeosine transglycosylase»), identifié dans différentes protéines impliquées dans la modification des ARN. Par délétion du domaine PUA de aCBF5, nous avons montré son rôle très important pour l'activité. Les données suggèrent qu'il interagit avec le triplet conservé ACA des sRNA H/ACA. Le domaine N-terminal de la protéine aNOP10 renferme un site de fixation du  $Zn^{2+}$ . D'après nos données de mutagenèse, ce domaine pourrait participer à la fixation du substrat. Le domaine C-terminal de aNOP10 se replie en hélice  $\alpha$ . Son interaction avec aCBF5 est suffisante pour révéler l'activité ARN :  $\psi$  synthase de cette protéine (2). Par ailleurs, nous avons montré que cette hélice  $\alpha$  permet la dimérisation de aNOP10 et des complexes aNOP10-aCBF5 en solution. Dans le cristal, deux types de dimères de l'hétérodimère aNOP10-aCBF5 sont présents. Ils diffèrent par l'orientation relative de chaque hélice  $\alpha$  (parallèles ou perpendiculaires). Par mutagenèse dirigée nous avons montré que c'est l'interaction parallèle des hélices qui a lieu en solution. L'importance possible de cette dimérisation pour l'activité des particules sera discutée.

1. Charpentier, B., Muller, S. and Branlant, C. (2005) Reconstitution of archaeal H/ACA small ribonucleoprotein complexes active in pseudouridylation. *Nucleic Acids Res*, **33**, 3133-3144.
2. Manival, X., Charron, C., Fourmann, J.B., Godard, F., Charpentier, B. and Branlant, C. (2006) Crystal structure determination and site-directed mutagenesis of the *Pyrococcus abyssi* aCBF5-aNOP10 complex reveal crucial roles of the C-terminal domains of both proteins in H/ACA sRNP activity. *Nucleic Acids Res*, **34**, 826-839.

## **P66 Analysis of the binding of the N-terminal conserved domain of yeast Cbf5p to a box H/ACA snoRNA**

Christophe Normand<sup>1</sup>, Régine Capeyrou<sup>1</sup>, Sophie Quevillon-Chéruef<sup>2</sup>, Annie Mougin<sup>1</sup>, Yves Henry<sup>1</sup> and Michèle Caizergues-Ferrer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Equipe Labellisée Ligue Nationale contre le Cancer, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR5099, CNRS-Université Paul Sabatier, IFR 109, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 09, France    henry@ibcg.biotoul.fr

<sup>2</sup>Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 8619, Université Paris-Sud 11, Faculté des Sciences d'Orsay, Orsay, France

During ribosome biogenesis, the RNA precursor to mature rRNAs undergoes numerous post-transcriptional chemical modifications of bases, including conversions of uridines to pseudouridines. In archaea and eukaryotes, these conversions are performed by box H/ACA small ribonucleoprotein particles (box H/ACA RNPs), that contain a small guide RNA responsible for the selection of substrate uridines and four proteins, including the pseudouridine synthase, Cbf5p. So far, no *in vitro* reconstitution of eukaryotic box H/ACA RNPs from purified components has been achieved, principally due to difficulties in purifying recombinant eukaryotic Cbf5p. In this study, we present the purification of a truncated derivative of yeast Cbf5p (Cbf5<sup>D</sup>p) that retains the highly conserved TRUB and PUA domains. We have used band retardation assays to show that Cbf5<sup>D</sup>p on its own binds specifically to box H/ACA small nucleolar (sno)RNAs. We demonstrate that the conserved H and ACA boxes enhance the affinity of the protein for the snoRNA. Furthermore, like its archaeal homologues, Cbf5<sup>D</sup>p can bind to a single stem-loop-box ACA RNA. Finally, we report the first enzymatic footprinting analysis of a Cbf5-RNA complex. Our results suggest that two molecules of Cbf5p interact with a binding platform constituted by the 5' end of the RNA, the single-stranded hinge domain containing the conserved H box and the 3' end of the molecule, including the conserved ACA box.

## P67 Criblage de ligands de l'ARNtLys3 par RMN à flux continu.

Tisné C. (1), Chung F. (2), Micouin L. (2), Dardel F. (1)

(1) *Cristallographie et RMN biologiques, UMR 8015 CNRS, Université René Descartes, Paris, France*

(2) *Chimie Thérapeutique, UMR 8638 CNRS, Université René Descartes, Paris, France*

*carine.tisne@univ-paris5.fr*

Le virus VIH-1 encapside sélectivement l'ARNtLys3 des cellules hôtes, celui-ci servant d'amorce à la transcription inverse de l'ARN génomique viral. Dans les virions, les 18 nucléotides à l'extrémité 3'-terminale de l'ARNtLys3 sont hybridés à une séquence complémentaire située dans la région 5' non-traduite (U5) du génome viral, appelée PBS (*Primer Binding Site*). En parallèle des aspects fonctionnels sur la formation du complexe d'initiation ARNtLys3/ARN viral (Tisné *et al.*, 2004), nous avons développé une recherche systématique de ligands spécifiques de l'ARNtLys3.

Nous avons choisi une stratégie originale: Le criblage par RMN à flux continu au moyen d'un système robotisé. Son principe consiste, à partir de banques de taille modérée de pharmacophores relativement simples, à identifier ceux d'entre eux qui sont capables de se lier à la cible. Le crible RMN présente deux avantages intéressants : (1) il permet de connaître directement le site de fixation du ligand sur la cible. (2) il permet de détecter des ligands de faible affinité mais possédant néanmoins un site de fixation spécifique qui échapperaient aux méthodes traditionnelles. L'intérêt de cette approche est de permettre l'identification des déterminants élémentaires de reconnaissance qui peuvent ensuite être assemblés au sein d'une structure plus complexe. La première partie de notre travail a consisté à mettre en œuvre et à valider les approches proposées :

- Une méthode d'optimisation combinatoire de la chimiothèque pour le criblage par RMN a été développée. La banque est composée pour partie de peptides simples (Tisné *et al.*, 2002), qui ont été synthétisés, et pour partie de petites molécules organiques sélectionnées.
- Un premier criblage a été réalisé contre l'amorce de la transcriptase inverse du virus VIH-1. Une dizaine de touches primaires ont ainsi été obtenue (Tisné *et al.*, 2005).

Parmi ces dernières, deux familles de molécules nous semblent particulièrement intéressantes, la première pour sa liaison spécifique sur le bras D de l'ARNtLys3 et la deuxième pour sa fixation au bras T de l'ARNtLys3, bras qui doit s'ouvrir pour l'hybridation à l'ARN viral.

Nous sommes maintenant dans une phase d'optimisation et d'assemblage des ligands de l'ARNtLys3 obtenus et les derniers résultats seront présentés.

C. Tisné & F. Dardel, **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, 5(2002), p513-518.

C. Tisné, B. P. Roques & F. Dardel, **J. Biol. Chem.**, 279 (2004), p. 3588-3595.

C. Tisné, F. Guillièrre & F. Dardel, **Biochimie**, 87(2005), p. 885-888.



## **P68 Analyse Génomique de petits ARN accumulés au cours de la réponse hypersensible chez *Arabidopsis thaliana***

Boccaro<sup>1,2</sup> M., Sarrazin<sup>2</sup> A., Billoud<sup>2</sup> B., Martienssen<sup>3</sup>, R., Baulcombe<sup>4</sup>, D. and Colot<sup>1</sup> V.

<sup>1</sup> URGV, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

<sup>2</sup> ABI, Université Paris 6, 12 rue Cuvier 75005 Paris, France boccaro@ccr.jussieu.fr

<sup>3</sup> Cold Spring Harbor, NY, USA<sup>4</sup> Sainsbury Laboratory, Norwich, UK

La réaction hypersensible (HR), une forme de mort cellulaire programmée, est une réponse de la plante soumise à l'attaque d'un pathogène. Des travaux antérieurs montrent qu'au cours de la HR des gènes codant des activités anti-oxydantes sont sous-exprimés par un mécanisme impliquant la dégradation de l'ARNm alors que l'ARNm d'un rétroélément s'accumule (1,2). Ces observations et d'autres (3) suggèrent l'implication de l'ARN interférence (ARNi) dans la HR. Nous avons donc construit deux banques d'ADNc de petits ARN accumulés au cours de la HR ou dans des plantes témoins. Pour analyser ces banques nous avons développé une technique d'hybridation sur puce chromosomique. Nous avons marqué et hybridé les banques d'ADNc avec cette puce qui contient des fragments d'environ 1kb qui couvrent la totalité des séquences du chromosome 4 d'*A. thaliana*. Environ 200 fragments hybrident de manière reproductible avec la banque issue de plantes au cours de la HR. Les hybridations faites avec la banque témoin révèlent moins de signaux (une centaine) et peu de recouvrement entre les deux banques. Nous poursuivons l'analyse de ces résultats par bioinformatique pour identifier les microARN et les siARN qui s'accumulent spécifiquement au cours de la HR, ainsi que leurs cibles. Ces nouveaux exemples de petits ARN devraient nous permettre d'enrichir les modèles prédictifs destinés à l'annotation génomique.

(1) Garmier et al. 2002 Changes in antioxidant expression and harpin-induced hypersensitive response in a *Nicotiana glauca* mitochondrial mutant. *Plant Physiol. Biochem.* 40 p561-566.

(2) Pouteau S, Grandbastien M-A, Boccaro M (1994). Microbial elicitors of plant defense responses activate transcription of a retrotransposon. *Plant J* 5: 535-542

(3) Baulcombe (2004) RNA silencing in plants *Nature* 431 p358-363.

## **P69 fast DB : une plateforme d'outils bioinformatiques pour étudier l'expression des produits des gènes humains**

de la Grange P, Dutertre M, Auboeuf D

Unité INSERM U685, Equipe AVENIR, Centre G. Hayem, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

*delagrang@stlouis.inserm.fr*

Le principal mécanisme permettant l'augmentation de la diversité du protéome codé par un nombre limité de gène est l'épissage alternatif qui est utilisé par plus de 70% des gènes pour produire plusieurs transcrits. Afin de fournir un support bioinformatique aux biologistes travaillant dans les domaines de la transcription et de l'épissage, nous avons développé fast DB (« Friendly Alternative Splicing and Transcripts DataBase »). Pour chacun des 18 008 gènes présents dans la base, les informations suivantes sont disponibles :

1. Une représentation graphique du gène permet de visualiser sa structure, le contenu exonique de ses transcrits ainsi que les différents évènements d'épissage alternatif qu'ils définissent. De nombreux liens sont disponibles et fournissent des informations générales sur les transcrits ainsi que des analyses, notamment sur la force des sites d'épissage.
2. Une représentation graphique des CDS connus ainsi que la prédiction de l'ORF de chaque transcrit permettent de prédire les conséquences fonctionnelles d'un évènement d'épissage donné. En effet, pour chacun des exons épissés alternativement, il est possible de prédire les éventuels domaines protéiques codés. De plus, fast DB indique pour chaque transcrit si celui-ci est potentiellement candidat pour suivre la voie du NMD.
3. Un multi-alignement des séquences des transcrits du gène permet de visualiser rapidement les différences entre séquences. Il est alors facile de choisir ses amorces de PCR directement sur cet alignement et une « PCR in silico » permet de prédire la taille et la séquence des produits de PCR attendus pour chaque transcrit.
4. Pour chaque évènement d'épissage, une représentation graphique de la répartition tissulaire des transcrits permet de prédire si cet évènement est spécifique d'un tissu ou d'un groupe de tissus donné.
5. Enfin, de nombreux liens externes sont disponibles et permettent diverses analyses bioinformatiques telles que la prédiction de promoteur, l'analyse des UTR ou la fixation de facteurs d'épissage.

fast DB est librement accessible à l'adresse <http://www.fast-db.com>.

Parallèlement, nous développons un nouvel outil bioinformatique qui permettra aux généticiens d'estimer l'impact d'une mutation sur l'épissage des produits d'un gène. En effet, il a été montré que des mutations peuvent affecter des sites d'épissage et/ou des séquences régulatrices de l'épissage et entraîner ainsi la synthèse de transcrits aberrants, souvent responsables de pathologies. Cet outil, appelé iMESS (« Interactive Mutation Effect on Splicing Search »), est développé à partir des données de fast DB et devrait être mis à la disposition de la communauté scientifique à la fin de l'année 2006.

## **P70 Approche transcriptomique pour identifier des protéines impliquées dans le fonctionnement de la symbiose *Riftia pachyptila* : résultats de banques soustractives tissu-spécifiques.**

Sanchez Sophie (1), Hourdez Stéphane (1) et Lallier François H. (1)

(1) Equipe Ecophysiologie : Adaptation et Evolution Moléculaires, UMR 7144 CNRS-UPMC, Station Biologique, BP 74, 29680 Roscoff, France  
*sanchez@sb-roscoff.fr*

Le ver tubicole géant des sources hydrothermales profondes *Riftia pachyptila* est probablement l'un des organismes les plus étudiés de par sa symbiose avec des bactéries chimioautotrophes sulfo-oxydantes. Logés à l'intérieur du corps de l'animal dans un organe interne spécialisé, le trophosome, ces symbiontes dépendent exclusivement de l'hôte pour leur approvisionnement en O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S à partir du milieu environnant. L'acquisition de ces composés par le panache branchial du ver puis leur acheminement jusqu'aux symbiontes ont été intensivement étudiés (Goffredi et al., 1997a ; Goffredi et al., 1997b ; Arp et al., 1987) mais certains points restent encore mal connus.

Nous avons utilisé une approche moléculaire globale pour tenter d'identifier des protéines impliquées dans les échanges de métabolites non mises en évidence par les méthodes d'études classiques. Deux tissus importants dans ces échanges ont été choisis : les filaments branchiaux et le trophosome. Les transcrits codant ces protéines spécifiques devraient être préférentiellement présents dans ces tissus, directement impliqués dans le mode de vie symbiotique. Par l'utilisation de l'hybridation soustractive suppressive (SSH), nous avons identifié les séquences exprimées dans ces tissus lorsque ces derniers sont comparés à un tissu de référence, ici la paroi du corps, non impliquée dans les échanges de métabolites chez cette espèce. Quatre banques ont ainsi été constituées : i) branchie par rapport à la paroi du corps (Br/Pc), ii) sa réciproque Pc/Br, iii) trophosome par rapport à la paroi du corps (Tr/Pc), iv) sa réciproque Pc/Tr.

Nous avons obtenu un total de plus de 700 séquences avec une moyenne d'environ 50 ADNc différents par banque. Sur la totalité des ADNc obtenus environ la moitié montre des homologues avec des séquences de fonction connue dans les bases de données. En théorie, les séquences identiques entre les tissus-clés et le tissu de référence (séquences codant en particulier des protéines constitutives de tout type cellulaire) devraient être ainsi éliminées par SSH. Ainsi, seulement trois ADNc apparaissent à la fois dans la banque de branchie et celle de la paroi du corps. Nous exposons ici les résultats des banques rassemblant entre autres des séquences codant des protéines impliquées dans le métabolisme, la détoxification, les échanges de métabolites...

Goffredi S., Childress J., Desaulniers N., Lee R., Lallier F. H. et Hammond D., 1997a. *J. Exp. Biol.*, 200(5) : 883-896.

Goffredi S., Childress J. J., Desaulniers N. T. et Lallier F. H., 1997b. *J. Exp. Biol.* 200(20) : 2609-2616.

Arp A., Childress J. et Vetter R. D., 1987. *J. Exp. Biol.*, 128 : 139-158.



# **Index des auteurs**



**A**

AGUISSA TOURE A O1  
 AIGUEPERSE C O6 P58  
 ALIPRANDI P O13  
 ALLAIN FHT O48  
 ALLMANG C P27  
 ANASTASI C O52  
 ANDERSEN CBF O57  
 ANDERSEN GR O57  
 ANQUETIL V O46 P10,  
 ARAYA A. P7  
 ASTIER-GIN T O33 P52  
 ATZORN V O26  
 AUBOEUF D O45 P8 P69  
 AUCHYNNIKAVA T. P13,  
 AUDIC Y O30 O50 P28  
 P56  
 AUFFINGER P O25  
 AURY JM O49  
 AYADI L. P11

**B**

BAGDIUL I. P4  
 BAGUET A O51  
 BAILLAT V O37  
 BAILLY M. P36  
 BALAKIREVA L. P26  
 BALLUT L O57 P15  
 BAN N O18  
 BANROQUES J. P62  
 BARBEZIER N. P44,  
 BARBIER J O45  
 BARBRY P O23 O37  
 BARLOY-HUBLER F O24  
 BARRANDON C O43  
 BARRAS F O44  
 BARRAUD P. P54  
 BARREAU C. P56  
 BASYUK E O39 O59 P59  
 BAUDIN-BAILLIEU A. P29  
 BAULCOMBE D. P68  
 BECKER H. P36  
 BECKERT B O22  
 BEGGS J.D. P12 P13  
 BÉGIS G O17  
 BÉGU D. P7  
 BEHM-ANSMANT I. O2  
 BELAIR C O9  
 BELLE R. P34  
 BELLECAVE P. P52  
 BENDRIDINI O40  
 BENEDETTO A O35  
 BENITO Y O40  
 BENKIRANE M O37  
 BENNASSER Y O37

BENOÎT P O4  
 BENSAUDE O O43  
 BERNACCHI S O28  
 BERTRAND E O39 O59 P20  
 P21 P59  
 BERTRAND JR P45  
 BÉTERMIER M O49  
 BILLOUD B. P68  
 BISAGLIA M. P40  
 BISBAL C O56  
 BITTENCOURT D O45 P8  
 BLANQUET S O7 O16 P23  
 BOCCARAM. P68  
 BOHN C O38  
 BOIREAU S O59  
 BOISSET S O40  
 BONHOMME J O35  
 BONNET C. P19  
 BONNET F O43  
 BONTEMS F O13 P40  
 BOON K.L. P13  
 BORDONNE R. P20 P21  
 BOS J O44  
 BOUASKER S. P25  
 BOUHOUCHE K. P47  
 BOULOC P O38  
 BOULON S. P20  
 BOURENS M. P39  
 BOURGEOIS CF O48  
 BRAEM C. P37  
 BRANLANT C. O2 O44 P11  
 P16 P17 P27  
 P50 P53 P58  
 P65  
 BUCKINGHAM R.H. P33  
 BUJNICKI J.M. P30

**C**

CAHOUR A O33 P57  
 CAILLET J. P30  
 CAIZERGUES-FERRER M. P5 P66  
 CAPEYROU R. P66  
 CARDINAUD B O23 O37  
 CARPOUSIS P46  
 CASTROVIEJO M. P38  
 CATHALA G. P37  
 CAVAILLE J O39 P14 P43  
 P51  
 CAVAILLE M.L. P14 P43  
 CHABAS S O9 P57  
 CHABELSKAYA S. P49  
 CHABLE-BESSIA C O37  
 CHABOSSEAU P. P6  
 CHARPENTIER B. O2 O44 P65  
 CHARRON C. O2 P17 P65

CHÉRON A	O24	DUPONT H.	P41
CHIARUTTINI C	O11	DURAND S	O53 P40
CHOONEE N.	P1	DURET L	O49
CHOURY D.	P7	DURIEU S	O9
CHUNG F	O17 P67	DUTERTRE M	O45 P8 P69
CLERC P.	P50		
CLÉRY A.	P16 P27	<b>E</b>	
CLOUET-D'ORVAL B.	P46	EASTON LE	O8
COGNET JAH	O27	ECHEVERRIA M.	P44
COHEN J	O49	EDWALDS-GILBERT G.	P13
COLOT V.	P68	ELLIOTT DJ	O48
CORBEAU P	O37	ELLOUZE S.	P19
CORDIN O.	P12 P62	ENNIFAR E	O20
CORMIER P.	P34	ESPENEL C.	P59
CORRAL-DEBRINSKI M.	P19	EVEN S	O54 P1
COSNIER BRUNO	P31	EXPERT-BEZANÇON A	O47
COSSON B.	P34 P38		
COURT F.	P37	<b>F</b>	
COUVREUR P.	P45	FABRET C.	P31
CROWE M	O52	FAWAL M.A.	P41,
		FECHTER P	O40
<b>D</b>		FELDEN B	O14 O15
DA ROCHA GOMES S.	P48		O19 P24 P49
DAGUER J.P.	P55	FERRY-DUMAZET H.	P63
DARDEL F	O17 O19	FLEURY H	O33
	O21 P54 P67	FLISIAK S	O36
DARFEUILLE F	O41	FORNÉ T.	P37
DARZACQ X	O58	FOURMANN J.-B.	O2 P65
DAUSSE E.	P48 P63	FOURNIER M.J.	P29
DAUTRY F	O6 O34	FRADOT V.	P19
DE DARUVAR A.	P63	FRANCIN M	O36
DE LA GRANGE P.	P69	FRANK J	O15
DE LEEUW F.	P22	FRIBOURG S.	O1
DECATUR W	P29	FROMONT-RACINE M	O3 P2
DECIMO D	O10		
DEGOT S	O51	<b>G</b>	
DELAGE L	O60	GAGLIARDI D	O55
DELESTIENNE N.	P32	GALLARDO F.	P6
DELFOUR O	O26	GASMI L.	P61
DEMOINET E	P2	GASPIN C	O40
DENOULET P.	P61	GAUGAIN C	O34
DI PRIMO C.	P63	GAUTHERET D	O23
DIETRICH A.	P25	GAUTIER-COURTEILLE C	O30 P56
DOERE M.	P62	GAY B	O31
DORMOY-RACLET V	O34	GEISSMANN T	O40
DOUCHIN V	O38	GELUGNE J.P.	P5
DREHER T.	P25	GILLET R	O14 O15
DREYFUS M	O12 P3. P4	GIRARD C.	P20
DROOGMANS L.	P30	GLEIZES PE.	O1 P6
DUBRUNFAUT T.	P49	GONTIER G.	P3
DUCHÊNE A.M.	O60 P36	GOUT JF	O49
DUHARCOURT S	O42	GRAINDORGE A	O50 P28 P56
DUJARDIN G.	P39	GRATADOU L	O45
DUMAS E	O33		
DUMAS P	O20		



GREGORY A.L.	O1	KIELKOPF CL	P9
GRELLSCHEID SUSHMA-N.	O48	KISTER L	O48
GROSSET C.	P38	KRESS M	O6
GUEYDAN C.	P22 P32	KROL A	P27
GUILLOIN L.	P23	KRUSKA K.	P44
GUITTET E.	P11	KRUYS V.	P22 P32

## H

HAENTJENS J	O11
HAGEGE H.	P37
HALLAY H.	P11
HALLIER M	O15 P24
HAMON S	O46
HARDY S	O46 P10
HASHEM Y	O25
HÉBERT A	O54
HENRIET S	O28
HENRY Y.	P66
HERBRETEAU CH	O10
HERMANN S.	P31
HERMANN-LE DENMAT S	O12 O14
HEURGUE-HAMARD V.	P33
HLAVACEK O.	P39
HOAREAU M.	P14 P43
HOLEC S	O55
HOURDEZ S.	P70
HOUZET L	O31
HUEZ G.	P22 P32
HUNTZINGER E	O40

## I

IOST I.	P3 P4
---------	-------

## J

JACOBSON A.	P42
JACQUEMIN-SABLON H	O34
JACQUIER A	O3 O40
JAFFRELO L.	P57
JAILLON O	O49
JAMES L	O10
JAUBERT S	O35
JEANG KT	O37
JOHANSEN J	O57
JOHANSEN S	O22
JOUSSELIN A.	P49

## K

KALTIMBACHER V.	P19
KAMINSKA M	O36
KAUR S	O15
KERVESTIN S	P42
KHOOBARRY K	O32

## L

LAALAMI S.	P40
LABORDE L.	P38
LALLIER F.H.	P70
LALOO B.	P38
LANGE H	O55
LARCHER J.C.	P61
LE CAER J.P.	P9
LE CLAINCHE C.	P56
LE HIR H	O51 O57 P15
LE MOUËL A	O49
LE ROY F	O56
LE SOMMER C	O46
LE TRIONNAIRE G	O35
LEBARS I.	P64
LEBRETON A	O3
LEBRIGAND K	O37
LECLERC F.	O2 P58
LEDAN-SCHUESTER E	O9
LEFEBVRE S	O32
LEGENDRE M	O23
LÉGER-SILVESTRE I.	O1
LEIBUNDGUT M	O18
LEMAIRE C.	P39
LENER D.	P21
LENORMAND P	O3
LEPÈRE G	O42 O49
LERIVRAY H	O46
LETERME-PRUNIER N	O35
LI W	O15
LI Y.	P60
LIN YL	O37
LINDER P.	P62
LITVAK S.	P52
LOCKER N	O8 P11
LOPEZ F	O23
LOURENÇO S	O33
LUKAVSKY PJ	O8
LUTFALLA G.	P2

## M

MAENNER S.	P50
MAGNIN N.	P63
MAHIAS K	O33 P52
MALVY C.	P45
MANCEAU V.	P9
MANDART E	O5 P35

MANIEY D. P56  
 MANIVAL X. O2 P58 P65  
 MARCELLO A O59  
 MARCHADIER B. P15  
 MARCHAND V. P50  
 MARCHFELDER A. P44  
 MARÉCHAL-DROUARD L O60 P36  
 MARI B O37  
 MARIE J O47  
 MARKOVITS J O34  
 MARMIER-GOURRIER N. P16 P58  
 MARQUES M O39  
 MARQUET R 028 O31  
 MARQUIS J O29 O30  
 MARSY S. P39  
 MARTIENSSEN R. P68  
 MARTY V. P14 P43 P51  
 MASANTE C O33 P52  
 MASQUIDA B O22  
 MASSENET S. P53  
 MAUCUER A. P9,  
 MAUREL M.C. P60  
 MAUREL S. P63  
 MAURICE F O17  
 MECHULAM Y O7 O16 P23  
 MENADE M. P26  
 MERCENNE G O28  
 MEREAU A O46 P10  
 METZINGER L. P24, P49  
 MEYER E O42 O49 P47  
 MEYER K O29  
 MICHOT B O26  
 MICOUIN L O17 P67  
 MINVIELLE-SEBASTIA L. P18  
 MIRANDE M O36  
 MOINE H. P53  
 MOLLE D. P59  
 MORALES J. P34  
 MORELLO D. P41  
 MORICHAUD Z O31  
 MORIN E. P34  
 MOTORIN Y. P17  
 MOUGEL M O31  
 MOUGIN A. P5 P66  
 MULLER S. O2 P65  
 MULNER-LORILLON O. P34

## N

NAMANE A O3  
 NASSER R. P37  
 NEEL H P20  
 NGUYEN VT O43  
 NIELSEN K O57  
 NOËL B O49  
 NOLIVOS S. P46

NONIN-LECOMTE S O19  
 NORMAND C. P66  
 NOUET C. P39  
 NOWACKI M O42 O49

## O

OHLMANN T O10  
 OSBORNE HB O30 O50 P28  
 P56  
 OUDJAMA Y. P30

## P

PAILLARD L O30 P56  
 PAILLART JC O20 O28  
 O31  
 PAKLEZA C O27  
 PANVERT M O16  
 PAPAZIAN S. P26  
 PAPIN C O5 P35  
 PAUL C. P20  
 PELLEGRINI O O54  
 PEREZ J O13  
 PFLIEGER A. P57  
 PIAZZON N. P53  
 PICHON C. P49  
 PINAUD N. O1  
 POLLET N O50  
 PONCHON L O21  
 PORCEL BM O49  
 POSSEDKO M O40  
 POWNER M O52  
 PRADET-BALLADE B. P20  
 PROUX F O12  
 PUJOL C. P36  
 PUTZER H O54 P1

## Q

QUEVILLON-CHERUEL S. P66

## R

REIGADAS S O9  
 RENVOISÉ B O32  
 REYNES J O37  
 RICHARD G O53 P40  
 RICHER D O28  
 RIO MC O51  
 RIPOCHEAND J. P38  
 RITCHIE W O23  
 ROLAND F O20  
 ROMBY P O40  
 ROOVERS M. P 30  
 ROPERS D. P11

ROSENBAUM J O34 P38  
ROUGET C O5  
ROUGET C. P35  
ROUSSELLE JC O3  
ROUSSET J.P. P29 P31  
ROYO H O39

## S

SABATER-MUÑOZ B O35  
SAEZ-VASQUEZ J. P44  
SAGLIOCCO F. P38  
SAGUY M O14  
SAHEL J.A. P19  
SALEHZADA T O56  
SALINAS T O60  
SALIOU J.M. P11  
SANCHEZ G O45  
SANCHEZ S. P70  
SANTINI GPH O27  
SARGUEIL B O10  
SARRAZIN A. P68  
SAULIÈRE J O47  
SAVEANU C O3  
SCHÄCHTER V O49  
SCHIFFER S. P44  
SCHLOTTER F. P16 P53  
SCHMITT E O7 O16 P23  
SCHOLL R O29  
SCHÜMPERLI D O29  
SCRIMA N. P33  
SEGURA-MORALES C. P59  
SENTY-SÉGAULT V. P16  
SÉRAPHIN B O57 P15  
SHALAK V O36  
SHAV-TAL Y O58  
SILHOL M O56  
SIMMONUTTI M. P19  
SIMON JC O35  
SIMONELIG M O4  
SINGER RH O58  
SIZUN C O13  
SKORSKI P O12 O14  
SKRISOVSKA L O48  
SMAGULOVA F O31  
SOBEL A. P9  
SOUDET J. P5  
SPERLING L O49  
SPRINGER M O11  
STAEDEL C. P57  
STAHL G. P6  
STÉVENIN J O48  
SUREAU A O47  
SUTHERLAND J O52  
SWENSON M. P9

## T

TAGU D O35  
TANNER K. P62  
THORE S O18  
THOUVENOT B O44  
THURET R O50  
TISNÉ C O17 P54 P67  
TOMASETTO C O51  
TORCHET C P60  
TOUB N P45  
TOULMÉ JJ O9 P48 P55  
P57 P63 P64  
TRÉMOULET P O33  
TRIBOULET R O37

## U

UDEKWU K O41  
ULVÉ VM O24  
UNOSON C O41  
URBAN A. P17  
UZAN M O13 O53 P40

## V

VAL R P25  
VALENTIN C. P25  
VANDENESCH F O40  
VAUTRIN A. P58  
VENTURA M O33 P52  
VERGNE J. P60  
VERHEGGEN C. P20  
VICTORERO G O23  
VILANOVA D O26  
VIOLLET L O32  
VIPHAKONE N. P18  
VIRANAICKEN W. P61  
VISVIKIS A. P50  
VITALI P. P14 P43 P51  
VOGEL J O41

## W

WAGNER G O41  
WATRIN M. P63  
WEBER M. P37  
WEIL D O6  
WEILL L O10  
WENDLING C O51  
WESTHOF E O22  
WILCZYNSKA A O6  
WINCKER P O49  
WURTH L. P27  
WYCHOWSKI C. P57

**Y**

YATIME L  
YÉTÉRIAN E.

O7  
P5

**Z**

ZAEPFEL M  
ZHANG T.  
ZIG L

O60  
P22 P32  
O54 P1

# Liste des noms et adresses des participants



**AGUISSA TOURE Almass-Houd**  
LBME CNRS  
Université Paul Sabatier  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.58.84  
[aguissa@ibcg.biotoul.fr](mailto:aguissa@ibcg.biotoul.fr)

**AIGUEPERSE Christelle**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy  
Tél : 03.83.68.43.14  
[Christelle.Aigueperse@maem.uhp-nancy.fr](mailto:Christelle.Aigueperse@maem.uhp-nancy.fr)

**ALIPRANDI Pascale**  
CNRS  
Ecole Polytechnique  
Route de Saclay  
91128 Palaiseau  
Tél : 01.69.33.48.55  
[pascale.aliprandi@icsn.cnrs-gif.fr](mailto:pascale.aliprandi@icsn.cnrs-gif.fr)

**ALLMANG-CURA Christine**  
UPR 9002 CNRS  
IBMC, 15 rue R. Descartes  
67084 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.70.80  
[c.allmang@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:c.allmang@ibmc.u-strasbg.fr)

**ANASTASI Carole**  
University of Manchester  
The School of Chemistry, Oxford Road  
M13 9PL Manchester, Royaume-Uni  
Tél : 44 (0)161.275.4620  
[anastasicarole@yahoo.fr](mailto:anastasicarole@yahoo.fr)

**ANQUETIL Vincent**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.48.67  
[vincent.anquetil@univ-rennes1.fr](mailto:vincent.anquetil@univ-rennes1.fr)

**ARLOT Yannick**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.46.96  
[yannick.arlot@univ-rennes1.fr](mailto:yannick.arlot@univ-rennes1.fr)

**ASTIER-GIN Thérèse**  
UMR 5097  
Université Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux  
Tél : 05.57.57.17.42  
[therese.astier@reger.u-bordeaux2.fr](mailto:therese.astier@reger.u-bordeaux2.fr)

**AUDIC Yann**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.44.75  
[yann.audic@univ-rennes1.fr](mailto:yann.audic@univ-rennes1.fr)

**AUFFINGER Pascal**  
UPR 9002 CNRS  
IBMC  
15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg Cédex  
Tél : 03.88.61.19.37  
[p.auffinger@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:p.auffinger@ibmc.u-strasbg.fr)

**AYADI-BEN MENA Lilia**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences, B.P 239  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.11  
[lilia.Ayadi@maem.uhp-nancy.fr](mailto:lilia.Ayadi@maem.uhp-nancy.fr)

**BAGUET Aurélie**  
UMR 7104 CNRS - IGBMC  
Université Louis Pasteur  
1 rue Laurent Fries  
67404 Illkirch Cédex  
Tél : 03.88.65.34.23  
[abaguet@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:abaguet@igbmc.u-strasbg.fr)

**BALAKIREVA Larissa**  
Société Novocib  
115 avenue Lacassagne  
69003 Lyon  
Tél : 04.78.53.63.95  
[lbalakireva@novocib.com](mailto:lbalakireva@novocib.com)

**BANROQUES Josette**  
UPR CNRS 2167  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.38.00  
[banroques@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:banroques@cgm.cnrs-gif.fr)

**BARBEZIER Nicolas**  
UMR 5096 CNRS - LGDP  
52 avenue Paul Alduy  
66860 Perpignan  
Tél : 04.68.66.21.20  
[nicolas.barbezier@univ-perp.fr](mailto:nicolas.barbezier@univ-perp.fr)

**BARRANDON Charlotte**  
UMR 8541 CNRS  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.44.32.39.42  
[cbarrand@wotan.ens.fr](mailto:cbarrand@wotan.ens.fr)

**BARRAS Frédéric**  
IBSM CNRS 31  
Chemin Joseph Aiguier  
13009 Marseille  
Tél : 04.91.16.45.79  
[barras@ibsm.cnrs-mrs.fr](mailto:barras@ibsm.cnrs-mrs.fr)

**BARRAUD Pierre**  
UMR 8015  
Faculté de Pharmacie  
4 avenue de l'Observatoire  
75270 Paris Cédex 06  
Tél : 01.53.73.15.72  
[pierre.barraud@univ-paris5.fr](mailto:pierre.barraud@univ-paris5.fr)

**BASYUK Eugénia**  
UMR 5535 CNRS  
IGMM  
1919 route de Mende  
34293 Montpellier  
Tél : 04.67.61.36.46  
[eugenia.basyuk@igmm.cnrs.fr](mailto:eugenia.basyuk@igmm.cnrs.fr)

**BAUDIN-BAILLIEU Agnès**  
UMR 8621 CNRS  
Université Paris Sud  
91405 Orsay Cédex  
Tél : 01.69.15.72.64  
[agnes.baudin-baillieu@igmors.u-psud.fr](mailto:agnes.baudin-baillieu@igmors.u-psud.fr)

**BECKERT Bertrand**  
UPR 9002 CNRS  
IBMC, 15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg Cédex  
Tél : 03.88.41.70.53  
[b.beckert@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:b.beckert@ibmc.u-strasbg.fr)

**BEGU Dominique**  
UMR 5097 CNRS  
Université Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux  
Tél : 05.57.57.17.45  
[dominique.begu@reger.u-bordeaux2.fr](mailto:dominique.begu@reger.u-bordeaux2.fr)

**BENOIT Perrine**  
UPR 1142 CNRS  
141 rue de la Cardonille  
34396 Montpellier  
Tél : 04.99.61.99.00  
[perrine.benoit@igh.cnrs.fr](mailto:perrine.benoit@igh.cnrs.fr)

**BERTRAND Edouard**  
UMR 5535 CNRS  
IGMM, 1919 route de Mende  
34293 Montpellier  
Tél : 04.67.61.36.47  
[Edouard.bertrand@igmm.cnrs.fr](mailto:Edouard.bertrand@igmm.cnrs.fr)

**BERTRAND Jean-Rémi**  
CNRS UMR 8121  
Institut Gustave Roussy  
39 rue Camille Desmoulins  
94805 Villejuif  
Tél : 01.42.11.50.45  
[jrb@igr.fr](mailto:jrb@igr.fr)

**BITTENCOURT Danielle**  
INSERM U 685  
Hôpital Saint Louis  
1 avenue Claude Vellefaux  
75010 Paris  
Tél : 01.53.72.21.30  
[daniellebittencourt@hotmail.com](mailto:daniellebittencourt@hotmail.com)

**BOCCARA Martine**  
UMR INRA 1165  
URGV, CNRS 8114  
2 rue Gaston Crémieux  
91057 Evry Cédex  
Tél : 01.60.87.45.25  
[boccar@ccr.jussieu.fr](mailto:boccar@ccr.jussieu.fr)

**BOS Julia**  
IBSM CNRS 31  
Chemin Joseph Aiguier  
13009 Marseille  
Tél : 04.91.16.46.59  
[bos@ibsm.cnrs-mrs.fr](mailto:bos@ibsm.cnrs-mrs.fr)



**BOUHOUCHE Khaled**  
UMR 8541 CNRS  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.44.32.36.09  
[bouhouch@biologie.ens.fr](mailto:bouhouch@biologie.ens.fr)

**BOURGEOIS Cyril**  
INSERM U 596  
1 rue Laurent Fries  
67404 Illkirch Cédex  
Tél : 03.88.65.33.55  
[cyril@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:cyril@igbmc.u-strasbg.fr)

**CAILLET Joël**  
IBPC  
13 rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris  
Tél : 01.58.41.51.24  
[caillet@ibpc.fr](mailto:caillet@ibpc.fr)

**CATHALA Guy**  
CNRS  
IGMM, 1919 route de Mende  
34293 Montpellier  
Tél : 04.67.61.36.84  
[cathala@igmm.cnrs.fr](mailto:cathala@igmm.cnrs.fr)

**CAVILLE Jérôme**  
UMR 5099 CNRS  
Université Paul Sabatier  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.59.34  
[cavaille@ibcg.biotoul.fr](mailto:cavaille@ibcg.biotoul.fr)

**CHARPENTIER Bruno**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences, B.P 239  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.16  
[bruno.charpentier@maem.uhp-nancy.fr](mailto:bruno.charpentier@maem.uhp-nancy.fr)

**CHARRON Christophe**  
UMR 7567 CNRS  
Université Henri Poincaré Nancy 1  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy  
Tél : 03.83.68.42.79  
[christophe.charron@maem.uhp-nancy.fr](mailto:christophe.charron@maem.uhp-nancy.fr)

**CHOONEE Nasslie**  
CNRS  
13 rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris  
Tél : 01.58.41.51.33  
[nasslie.choonee@ibpc.fr](mailto:nasslie.choonee@ibpc.fr)

**CLOUET D'ORVAL Béatrice**  
LMGM CNRS  
Université Paul Sabatier  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.59.75  
[clouet@ibcg.biotoul.fr](mailto:clouet@ibcg.biotoul.fr)

**COGNET Jean**  
UMR 7033 CNRS  
Université Pierre et Marie Curie  
5 rue Henri Desbruères  
91030 Evry Cédex  
Tél : 01.69.87.43.53  
[cognet@ccr.jussieu.fr](mailto:cognet@ccr.jussieu.fr)

**CORDIN Olivier**  
ICMB  
University of Edinburgh, Mayfield Road  
EH9 3JR, Ecosse  
Tél : 44.131.650.70.87  
[cordin-olivier@hotmail.com](mailto:cordin-olivier@hotmail.com)

**COSNIER Bruno**  
UMR 8621 CNRS  
Université Paris Sud  
91405 Orsay Cédex  
Tél : 01.69.15.46.34  
[bruno.cosnier@igmors.u-psud.fr](mailto:bruno.cosnier@igmors.u-psud.fr)

**COUGOT Nicolas**  
UMR 5535 CNRS  
1919 route de Mende  
34293 Montpellier  
Tél : 04.67.61.36.64  
[cougot@igmm.cnrs.fr](mailto:cougot@igmm.cnrs.fr)

**DAGUER Jean-Pierre**  
INSERM U 386  
IECB, 2 rue Robert Escarpit  
33607 Pessac  
Tél : 05.40.00.30.77  
[pdaguer@gmail.com](mailto:pdaguer@gmail.com)

**DARFEUILLE Fabien**  
INSERM U 386  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.57.57.10.11  
[fabien.darfeuille@bordeaux.inserm.fr](mailto:fabien.darfeuille@bordeaux.inserm.fr)

**DA ROCHA GOMES Sonia**  
INSERM U 386  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.57.57.10.14  
[sonia.darocha@bordeaux.inserm.fr](mailto:sonia.darocha@bordeaux.inserm.fr)

**DARDEL Frédéric**  
UMR 8015 CNRS  
Faculté de Pharmacie  
4 avenue de l'Observatoire  
75270 Paris Cédex 06  
Tél : 01.53.73.15.76  
[frederic.dardel@univ-paris5.fr](mailto:frederic.dardel@univ-paris5.fr)

**DARZACQ Xavier**  
UMR 8541 CNRS  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.44.32.34.62  
[darzacq@ens.fr](mailto:darzacq@ens.fr)

**DAUGERON Marie-Claire**  
CNRS  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.38.30  
[daugeron@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:daugeron@cgm.cnrs-gif.fr)

**DAUSSE Eric**  
INSERM U 386  
IECB, 2 rue Robert Escarpit  
33607 Pessac  
Tél : 05.40.00.30.50  
[eric.dausse@bordeaux.inserm.fr](mailto:eric.dausse@bordeaux.inserm.fr)

**DE LA GRANGE Pierre**  
INSERM U 685  
Hôpital Saint Louis  
1 avenue Claude Vellefaux  
75010 Paris  
Tél : 01.53.72.21.30  
[pierre.delagrang@gmail.com](mailto:pierre.delagrang@gmail.com)

**DELAMARCHE Christian**  
UMR 6026 CNRS  
Campus de Beaulieu  
35042 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.68.46  
[christian.delamarche@univ-rennes1.fr](mailto:christian.delamarche@univ-rennes1.fr)

**DELEEUW Frédéric**  
IBBM  
12 rue des Pr Jeener et Brachet  
6041 Gosselies (Belgique)  
Tél : 32 2.650.98.05  
[fdeleeuw@ulb.ac.be](mailto:fdeleeuw@ulb.ac.be)

**DEMOINET Emilie**  
UMR 5124  
Université Montpellier II  
Place Eugène Bataillon  
34095 Montpellier Cédex 5  
Tél : 04.67.16.34.14  
[edemoine@univ-montp2.fr](mailto:edemoine@univ-montp2.fr)

**DESERT Colette**  
INRA  
65 rue de Saint Briec  
35042 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.48.54.67  
[desert@agrocampus-rennes.fr](mailto:desert@agrocampus-rennes.fr)

**DOUCHIN Véronique**  
UMR 8621 CNRS  
Université Paris Sud  
91405 Orsay  
Tél : 01.69.15.46.53  
[Veronique.Douchin@igmors.u-psud.fr](mailto:Veronique.Douchin@igmors.u-psud.fr)

**DREYFUS Marc**  
UMR 8541  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.44.32.35.26  
[mdreyfus@wotan.ens.fr](mailto:mdreyfus@wotan.ens.fr)

**DUBRUNFAUT Thomas**  
UPRES JE 2311  
Faculté de Pharmacie, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
[thomas.dubrunfaut@etudiant.univ-rennes1.fr](mailto:thomas.dubrunfaut@etudiant.univ-rennes1.fr)

**DURAND Sylvain**  
UMR 7592 CNRS  
2 place Jussieu  
75251 Paris  
Tél : 01.44.27.79.73  
[durand@ijm.jussieu.fr](mailto:durand@ijm.jussieu.fr)

**DUTERTRE Martin**  
INSERM U 685  
1 avenue Claude Vellefaux  
75010 Paris  
Tél : 01.53.72.22.04  
[dutertre@stlouis.inserm.fr](mailto:dutertre@stlouis.inserm.fr)

**EDWALDS-GILBERT Gretchen**  
W.M keck Science Center  
925 N. Mills Ave Claremont  
91711 California, USA  
Tél : (00)1.909.607.7068  
[gedwalds@jjsd.claremont.edu](mailto:gedwalds@jjsd.claremont.edu)

**ENNIFAR Eric**  
CNRS UPR 9002  
15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.71.01  
[e.ennifar@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:e.ennifar@ibmc.u-strasbg.fr)

**EZRATY Benjamin**  
IBSM CNRS 31  
Chemin Joseph Aiguier  
13009 Marseille  
Tél : 04.91.16.44.08  
[ezraty@ibsm.cnrs-mrs.fr](mailto:ezraty@ibsm.cnrs-mrs.fr)

**FALENTIN Hélène**  
UMR STLO  
65 rue de Saint Briec  
35042 Rennes Cédex

**FAWAL Mohamad Ali**  
UMR 5547 CNRS  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.55.64.24  
[FAWAL@Cict.fr](mailto:FAWAL@Cict.fr)

**FAYET Eléonore**  
CNRS - Université Paul Sabatier  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.59.91  
[eleonore.fayet@ibcg.biotoul.fr](mailto:eleonore.fayet@ibcg.biotoul.fr)

**FELDEN Brice**  
UPRES JE 2311  
Faculté de Pharmacie, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.48.51  
[brice.felden@univ-rennes1.fr](mailto:brice.felden@univ-rennes1.fr)

**FINOUX Anne-Laure**  
CNRS  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.38.22  
[finoux@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:finoux@cgm.cnrs-gif.fr)

**FLISIAK Sebastian**  
CNRS FRE 2930 – LEBS  
1 avenue de la Terrasse  
91190 Gif sur Yvette  
Tél : 01.69.82.34.83  
[flisiak@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:flisiak@lebs.cnrs-gif.fr)

**FOURMANN Jean-Baptiste**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences, B.P 239  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.42.77  
[jean-baptiste.fourmann@maem.uhp-nancy.fr](mailto:jean-baptiste.fourmann@maem.uhp-nancy.fr)

**FROMONT-RACINE Micheline**  
CNRS  
Institut Pasteur  
25 rue du Dr Roux  
75724 Paris Cédex 15  
Tél : 01.40.61.34.32  
[mfromont@pasteur.fr](mailto:mfromont@pasteur.fr)

**GAUTIER-COURTEILLE Carole**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.45.22  
[carole.gautier@univ-rennes1.fr](mailto:carole.gautier@univ-rennes1.fr)

**GEISSMANN Thomas**  
UPR 9002 CNRS – ULP  
15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg Cédex  
Tél : 03.88.41.71.51  
[t.geissmann@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:t.geissmann@ibmc.u-strasbg.fr)

**GILLET Reynald**  
UPRES JE 2311  
Faculté de Pharmacie, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.45.07  
[reynald.gillet@univ-rennes1.fr](mailto:reynald.gillet@univ-rennes1.fr)

**GIRARD Cyrille**  
UMR 5535 CNRS  
IGMM  
1919 route de Mende  
34293 Montpellier Cédex 5  
Tél : 04.67.61.36.46  
[cyrille.girard@igmm.cnrs.fr](mailto:cyrille.girard@igmm.cnrs.fr)

**GONTIER Gwendoline**  
CNRS UMR 8541  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.44.32.39.50  
[gontier@biologie.ens.fr](mailto:gontier@biologie.ens.fr)

**GRAINDORGE Antoine**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.45.67  
[antoine.graindorge@univ-rennes1.fr](mailto:antoine.graindorge@univ-rennes1.fr)

**GROSSET Christophe**  
INSERM U 362  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.57.57.46.30  
[christophe.grosset@gref.u-bordeaux2.fr](mailto:christophe.grosset@gref.u-bordeaux2.fr)

**GUEYDAN Cyril**  
IBBM  
12 rue des Pr Jeener et Brachet  
6041 Gosselies (Belgique)  
Tél : 32 2.650.98.05  
[cgueydan@ulb.ac.be](mailto:cgueydan@ulb.ac.be)

**GUILLON Laurent**  
UMR 7654 CNRS  
Ecole Polytechnique, Route de Saclay  
91128 Palaiseau  
Tél : 01.69.33.41.81  
[laurent@bioc.polytechnique.fr](mailto:laurent@bioc.polytechnique.fr)

**HAENTJENS Julie**  
CNRS UPR 9073  
11 rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris  
Tél : 01.58.41.51.46  
[julie.Haentjens@ibpc.fr](mailto:julie.Haentjens@ibpc.fr)

**HARDY Serge**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.44.78  
[serge.hardy@univ-rennes1.fr](mailto:serge.hardy@univ-rennes1.fr)

**HENRAS Anthony**  
UMR 5099 CNRS  
LBME, 118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.59.55  
[henras@ibcg.biotoul.fr](mailto:henras@ibcg.biotoul.fr)

**HEURGUE-HAMARD Valérie**  
IBPC  
13 rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris  
Tél : 01.58.41.51.29  
[valerie@ibpc.fr](mailto:valerie@ibpc.fr)

**HOAREAU Magali**  
UMR 5099 CNRS  
Université Paul Sabatier  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.59.45  
[magali.hoareau@ibcg.biotoul.fr](mailto:magali.hoareau@ibcg.biotoul.fr)

**HOLEC Sarah**  
IBMP  
12 rue du Général Zimmer  
67000 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.72.00  
[sarah.holec@ibmp-ulp.u-strasbg.fr](mailto:sarah.holec@ibmp-ulp.u-strasbg.fr)

**HOUZET Laurent**  
UMR 5121 CNRS  
Institut de Biologie  
4 bd Henri IV  
34000 Montpellier  
Tél : 04.67.60.02.30  
[lhouzet@univ-montp1.fr](mailto:lhouzet@univ-montp1.fr)

**IOST Isabelle**  
CNRS  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.44.32.35.41  
[iost@biologie.ens.fr](mailto:iost@biologie.ens.fr)

**JACQUEMIN-SABLON Hélène**  
INSERM U 362  
GREF, Université Bordeaux2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.57.57.48.21  
[helene.jacquemin-sablon@gref.u-bordeaux2.fr](mailto:helene.jacquemin-sablon@gref.u-bordeaux2.fr)

**JAFFRELO Loïc**  
INSERM U 386  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.57.57.10.14  
[jaffrelo@bordeaux.inserm.fr](mailto:jaffrelo@bordeaux.inserm.fr)

**JAMES Laurie**  
UPR 2167 CNRS  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.31.54  
[james@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:james@cgm.cnrs-gif.fr)

**KALTIMBACHER Valérie**  
INSERM U 592  
184 rue du Faubourg Saint Antoine  
75012 Paris  
Tél : 01.40.01.13.66  
[kaltimbacher\\_valerie@st-antoine.inserm.fr](mailto:kaltimbacher_valerie@st-antoine.inserm.fr)

**KERVESTIN Stéphanie**  
UPR CNRS 9073  
13 rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris  
Tél : 01.58.41.51.29  
[Stephanie.Kervestin@ibpc.fr](mailto:Stephanie.Kervestin@ibpc.fr)

**KROL Alain**  
UPR 9002 CNRS  
IBMC, 15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg Cédex  
Tél : 03.88.41.70.50  
[a.krol@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:a.krol@ibmc.u-strasbg.fr)

**LAALAMI Soumaya**  
UMR 7592 CNRS, Institut Jacques Monod  
75251 Paris Cédex 05  
Tél : 01.44.27.69.53  
[laalami@ijm.jussieu.fr](mailto:laalami@ijm.jussieu.fr)

**LACOUX Caroline**  
CNRS-IBCG  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse Cédex  
Tél : 05.61.33.59.55  
[lacoux@ibcg.biotoul.fr](mailto:lacoux@ibcg.biotoul.fr)

**LEBARS Isabelle**  
UMR 5144 CNRS  
2 rue Robert Escarpit  
33600 Pessac  
Tél : 05.40.00.30.48  
[i.lebars@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:i.lebars@iecb.u-bordeaux.fr)

**LE GAC Florence**  
INRA SCRIBE  
Campus de Beaulieu  
35042 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.48.50.17  
[Florence.legac@rennes.inra.fr](mailto:Florence.legac@rennes.inra.fr)

**LE HIR Hervé**  
CNRS UPR 2167  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.38.30  
[herve.lehir@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:herve.lehir@cgm.cnrs-gif.fr)

**LENER Daniela**  
UMR 5535 CNRS  
1919 route de Mende  
34293 Montpellier Cédex 5  
Tél : 04.67.61.36.62  
[daniela.lener@igmm.cnrs.fr](mailto:daniela.lener@igmm.cnrs.fr)

**LEPERE Gersende**  
UMR 8541 CNRS  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.44.32.39.47  
[lepere@biologie.ens.fr](mailto:lepere@biologie.ens.fr)

**LERIVRAY Hubert**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.44.64  
[hubert.lerivray@univ-rennes1.fr](mailto:hubert.lerivray@univ-rennes1.fr)

**LEROY Florence**  
CNRS FRE 2937  
Institut André Lwoff  
7 rue Guy Moquet  
94801 Villejuif Cédex  
Tél : 01.49.58.33.80  
[leroyfg@vjf.cnrs.fr](mailto:leroyfg@vjf.cnrs.fr)

**LEROY Prune**  
ICM  
BMC, Uppsala  
Box 596  
Suède  
Tél : 46.18.471.46.51  
[prune.leroy@icm.uu.se](mailto:prune.leroy@icm.uu.se)

**LE RUMEUR Elisabeth**  
UMR 6026 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.46.27  
[elisabeth.lerumeur@univ-rennes1.fr](mailto:elisabeth.lerumeur@univ-rennes1.fr)

**LOCKER Nicolas**  
MRC  
Hills Road, CB2 2QH  
Cambridge, Angleterre  
Tél : 44 (0)1223.402.356  
[locker@mrc-lmb.cam.ac.uk](mailto:locker@mrc-lmb.cam.ac.uk)

**MAHIAS Kathleen**  
UMR 5097  
Université Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux  
Tél : 05.57.57.17.42  
[katmahia@yahoo.fr](mailto:katmahia@yahoo.fr)

**MANDART Elisabeth**  
CNRS  
CRBM, 1919 route de Mende  
34295 Montpellier  
Tél : 04.67.61.33.39  
[elisabeth.mandart@crbm.cnrs.fr](mailto:elisabeth.mandart@crbm.cnrs.fr)

**MANIVAL Xavier**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.10  
[xavier.manival@maem.uhp-nancy.fr](mailto:xavier.manival@maem.uhp-nancy.fr)

**MARCHADIER Brice**  
CGM/CNRS  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.38.83  
[marchadi@cgm-gif.fr](mailto:marchadi@cgm-gif.fr)

**MARIE Joëlle**  
UPR CNRS 2167  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.38.00  
[marie@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:marie@cgm.cnrs-gif.fr)

**MARMIER-GOURRIER Nathalie**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.05  
[nathalie.gourrier@maem-uhp-nancy.fr](mailto:nathalie.gourrier@maem-uhp-nancy.fr)

**MARQUET Roland**  
UPR 9002 CNRS  
IBMC, 15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg Cédex  
Tél : 03.88.41.70.54  
[R.Marquet@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:R.Marquet@ibmc.u-strasbg.fr)

**MARQUIS Julien**  
University of Bern  
Institute of Cell Biology  
Baltzerstrasse 4  
1700 Bern  
Tél : 41.031.631.46.74  
[marquis@izb.unibe.ch](mailto:marquis@izb.unibe.ch)

**MASANTE Cyril**  
UMR 5097  
Université Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux  
Tél : 05.57.57.17.42  
[cyrilliryc@yahoo.fr](mailto:cyrilliryc@yahoo.fr)

**MASSENET Séverine**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.08  
[severine.massenet@maem.uhp-nancy.fr](mailto:severine.massenet@maem.uhp-nancy.fr)

**MAUCUER Alexandre**  
INSERM U 706  
17 rue du Fer à Moulin  
75005 Paris  
Tél : 01.45.87.61.39  
[maucuer@fer-a-moulin.inserm.fr](mailto:maucuer@fer-a-moulin.inserm.fr)

**MAUREL Marie-Christine**  
Université Paris VI  
Tour 43, 2 place Jussieu  
75251 Paris  
Tél : 01.44.27.40.21  
[maurel@ijm.jussieu.fr](mailto:maurel@ijm.jussieu.fr)

**MAURICE Frédérique**  
UMR 8015 CNRS  
4 avenue de l'Observatoire  
75006 Paris  
Tél : 01.53.73.15.72  
[frederique.maurice@univ-paris5.fr](mailto:frederique.maurice@univ-paris5.fr)

**MECHULAM Yves**  
CNRS  
Ecole Polytechnique  
91128 Palaiseau  
Tél : 01.69.33.48.85  
[yves@botrytis.polytechnique.fr](mailto:yves@botrytis.polytechnique.fr)

**MEREAU Agnès**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.38.02  
[agnes.mereau@univ-rennes1.fr](mailto:agnes.mereau@univ-rennes1.fr)

**METZINGER Laurent**  
UPRES JE 2311  
Faculté de Pharmacie, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.48.53  
[laurent.metzinger@univ-rennes1.fr](mailto:laurent.metzinger@univ-rennes1.fr)

**MEYER Eric**  
UMR 8541 CNRS  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75230 Paris  
Tél : 01.42.32.39.48  
[emeyer@biologie.ens.fr](mailto:emeyer@biologie.ens.fr)

**MINVIELLE-SEBASTIA Lionel**  
IBGC CNRS  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
1 rue Camille Saint Saens  
33077 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.56.99.90.08  
[lionel.minvielle@ibgc.u-bordeaux2.fr](mailto:lionel.minvielle@ibgc.u-bordeaux2.fr)

**MIRANDE Marc**  
FRE 2930 CNRS  
LEBS, 1 avenue de la Terrasse  
91190 Gif sur Yvette  
Tél : 01.69.82.35.05  
[marc.mirande@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:marc.mirande@lebs.cnrs-gif.fr)

**MOLLE Dorothée**  
UMR 5535 CNRS  
IGMM, 1919 route de Mende  
34293 Montpellier Cédex 5  
Tél : 04.67.61.36.62  
[dorothee.molle@igmm.cnrs.fr](mailto:dorothee.molle@igmm.cnrs.fr)

**MORALES Julia**  
UPMC 7150 CNRS  
Station Biologique, BP 74  
29680 Roscoff  
Tél : 02.98.29.23.69  
[morales@sb-roscoff.fr](mailto:morales@sb-roscoff.fr)

**MOUGEL Marylène**  
UMR 5121 CNRS  
Institut de Biologie  
4 bd Henri IV  
34000 Montpellier  
Tél : 04.67.60.02.32  
[mmougel@univ-montpl1.fr](mailto:mmougel@univ-montpl1.fr)

**MOUGIN Annie**  
CNRS/UHP 5099  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse Cédex  
Tél : 05.61.33.59.55  
[mougin@ibcg.biotoul.fr](mailto:mougin@ibcg.biotoul.fr)



**NEIL Helen**  
URA 2171 CNRS  
Institut Pasteur  
25 rue du Dr Roux  
75724 Paris Cédex 15  
Tél : 01.40.61.34.39  
[hneil@pasteur.fr](mailto:hneil@pasteur.fr)

**NOMANE Yanoura**  
UMR 8621 CNRS  
IGM, Université Paris Sud  
91405 Orsay  
Tél : 01.69.15.46.55  
[yanoura.nomane@19mars.u-psud.fr](mailto:yanoura.nomane@19mars.u-psud.fr)

**NONIN-LECOMTE Sylvie**  
UMR 8015 CNRS  
Faculté de Pharmacie  
4 avenue de l'Observatoire  
75270 Paris Cédex 06  
Tél : 01.53.73.15.74  
[sylvie.nonin@univ-paris5.fr](mailto:sylvie.nonin@univ-paris5.fr)

**NOUET Cécile**  
CNRS CGM  
Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette Cédex  
Tél : 01.69.82.31.69  
[nouet@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:nouet@cgm.cnrs-gif.fr)

**PAILLARD Luc**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.44.73  
[luc.paillard@univ-rennes1.fr](mailto:luc.paillard@univ-rennes1.fr)

**PAPIN Catherine**  
CRBM-CNRS FRE 2593  
1919 route de Mende  
34293 Montpellier Cédex 5  
Tél : 04.67.61.33.39  
[Catherine.Papin@crbm.cnrs.fr](mailto:Catherine.Papin@crbm.cnrs.fr)

**PHILIPPE Michel**  
UMR 6061 CNRS  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.44.70  
[michel.philippe@univ-rennes1.fr](mailto:michel.philippe@univ-rennes1.fr)

**PIAZZON Nathalie**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.15  
[nathalie.piazzon@maem.uhp-nancy.fr](mailto:nathalie.piazzon@maem.uhp-nancy.fr)

**PONCHON Luc**  
UMR 8015 CNRS  
Faculté de Pharmacie  
4 avenue de l'Observatoire  
75270 Paris Cédex 06  
Tél : 01.53.73.15.72  
[luc.ponchon@univ-paris5.fr](mailto:luc.ponchon@univ-paris5.fr)

**PRADET-BALADE Bérengère**  
UMR 5535  
1919 route de Mende  
34293 Montpellier Cédex 5  
Tél : 04.67.61.36.46  
[berengere.pradet-balade@igmm.cnrs.fr](mailto:berengere.pradet-balade@igmm.cnrs.fr)

**PROUX Florence**  
ENS PARIS  
46 rue d'Ulm  
75005 Paris  
Tél : 01.44.32.39.50  
[proux@biologie-ens.fr](mailto:proux@biologie-ens.fr)

**PUJOL Claire**  
IBMP  
12 rue du Général Zimmer  
67000 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.72.27  
[claire.pujol@ibmp-ulp.u-strasbg.fr](mailto:claire.pujol@ibmp-ulp.u-strasbg.fr)

**PUTZER Harald**  
UPR 9073 CNRS  
IBPC, 13 rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris  
Tél : 01.58.41.51.27  
[putzer@ibpc.fr](mailto:putzer@ibpc.fr)

**REIGADAS Sandrine**  
INSERM U 386  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.57.57.10.14  
[sandrine.reigadas@bordeaux.insERM.fr](mailto:sandrine.reigadas@bordeaux.insERM.fr)



**RENVOISE Benoît**  
UMR 7592 CNRS  
Institut Jacques Monod  
2 place Jussieu  
75251 Paris Cédex 05  
Tél : 01.44.27.69.40  
[renvoise@ijm.jussieu.fr](mailto:renvoise@ijm.jussieu.fr)

**ROMBY Pascale**  
UPR 9002 CNRS  
IBMC, 15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.70.51  
[p.romby@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:p.romby@ibmc.u-strasbg.fr)

**ROUSVOAL Sylvie**  
UMR 7139 CNRS  
Station Biologique  
Place Georges Teissier  
29680 Roscoff  
Tél : 02.98.29.23.44  
[rousvoal@sb-roscoff.fr](mailto:rousvoal@sb-roscoff.fr)

**SAGUY Matthieu**  
UPRES JE 2311  
Faculté de Pharmacie, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.48.41  
[matthieu.saguy@etudiant.univ-rennes1.fr](mailto:matthieu.saguy@etudiant.univ-rennes1.fr)

**SALEHZADA Tamim**  
UPR 1142 CNRS  
IGH, 141 rue de la Cardonille  
34396 Montpellier  
Tél : 04.99.61.99.76  
[Tamim.Salehzada@igh.cnrs.fr](mailto:Tamim.Salehzada@igh.cnrs.fr)

**SALINAS Thalia**  
IBMP  
12 rue du Général Zimmer  
67000 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.72.27  
[thalia.salinas@ibmp-ulp.u-strasbg.fr](mailto:thalia.salinas@ibmp-ulp.u-strasbg.fr)

**SALIOU Jean-Michel**  
UMR 7567 CNRS  
Faculté des Sciences  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.09  
[Jean-Michel.Saliou@maem.uhp-nancy.fr](mailto:Jean-Michel.Saliou@maem.uhp-nancy.fr)

**SANCHEZ Sophie**  
UMR 7144 CNRS  
Station Biologique  
Place Georges Teissier  
29680 Roscoff  
Tél : 02.98.29.23.23  
[sanchez@sb-roscoff.fr](mailto:sanchez@sb-roscoff.fr)

**SARGUEIL Bruno**  
UPR 2167 CNRS  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.31.54  
[sargueil@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:sargueil@cgm.cnrs-gif.fr)

**SAULIERE Jérôme**  
UPR 2167 CNRS  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.38.29  
[sauliere@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:sauliere@cgm.cnrs-gif.fr)

**SAVEANU Cosmin**  
Institut Pasteur  
25 rue du Dr Roux  
75015 Paris  
Tél : 01.40.61.34.31  
[csaveanu@pasteur.fr](mailto:csaveanu@pasteur.fr)

**SCHMITT Emmanuelle**  
CNRS  
Ecole Polytechnique  
91128 Palaiseau  
Tél : 01.69.33.48.85  
[emma@botrytis.polytechnique.fr](mailto:emma@botrytis.polytechnique.fr)

**SHOTAR Eimad**  
Institut Pasteur  
25 rue du Dr Roux  
75015 Paris  
Tél : 01.40.61.34.39  
[eishotar@pasteur.fr](mailto:eishotar@pasteur.fr)

**SIMONELIG Martine**  
UPR 1142 CNRS  
141 rue de la Cardonille  
34396 Montpellier  
Tél : 04.99.61.99.59  
[Martine.Simonelig@igh.cnrs.fr](mailto:Martine.Simonelig@igh.cnrs.fr)

**SKORSKI Patricia**  
UMR 8541 CNRS  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75005 Paris  
Tél : 01.44.32.35.41  
[skorsli@biologie.ens.fr](mailto:skorsli@biologie.ens.fr)

**SOUDET Julien**  
CNRS IFR109  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse Cédex  
Tél : 05.61.33.59.58  
[Julien.Soudet@ibcg.biotoul.fr](mailto:Julien.Soudet@ibcg.biotoul.fr)

**SPILUTTINI Béatrice**  
UMR 8541  
ENS, 46 rue d'Ulm  
75005 Paris  
Tél : 01.44.32.39.42  
[spilutti@biologie.ens.fr](mailto:spilutti@biologie.ens.fr)

**STAHL Guillaume**  
LBME CNRS  
Université Paul Sabatier  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.58.84  
[stahl@ibcg.biotoul.fr](mailto:stahl@ibcg.biotoul.fr)

**TAGU Denis**  
INRA  
BP 35327  
Le Rheu Cédex  
Tél : 02.23.48.51.65  
[Denis.Tagu@rennes.inra.fr](mailto:Denis.Tagu@rennes.inra.fr)

**THORE Stéphane**  
ETH  
Institute of Technology  
HPK Building  
8093 Zurich  
Tél : 41.44.633.40.32  
[thores@mol.biol.ethz.ch](mailto:thores@mol.biol.ethz.ch)

**THURIAUX Pierre**  
CEA  
144 CEA-Saclay  
Tél : 01.69.08.35.86  
[pierre.thuriaux@cea.fr](mailto:pierre.thuriaux@cea.fr)

**TISNE Carine**  
UMR 8015 CNRS  
Faculté de Pharmacie  
4 avenue de l'Observatoire  
75006 Paris  
Tél : 01.53.73.15.72  
[carine.tisne@univ-paris5.fr](mailto:carine.tisne@univ-paris5.fr)

**TOMASETTO Catherine**  
IGBMC  
1 rue Laurent Fries  
67404 Illkirch  
Tél : 03.88.65.35.19  
[cat@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:cat@igbmc.u-strasbg.fr)

**TORCHET-DEVAUX Claire**  
CNRS/Université Paris VI  
2, place Jussieu, Tour 42  
75005 Paris  
Tél : 01.44.27.95.35  
[torchet@ijm.jussieu.fr](mailto:torchet@ijm.jussieu.fr)

**TOULME Jean-Jacques**  
INSERM U 386  
Université Victor Segalen Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.57.57.10.14  
[jean-jacques.toulme@bordeaux.inserm.fr](mailto:jean-jacques.toulme@bordeaux.inserm.fr)

**TRIBOULET Robinson**  
UPR 1142 CNRS  
141 rue de la Cardonille  
34396 Montpellier  
Tél : 04.99.61.99.88  
[robinson.triboulet@igh.cnrs.fr](mailto:robinson.triboulet@igh.cnrs.fr)

**ULVE Vincent**  
UMR 6061 CNRS  
Université de Rennes 1, CS 34317  
35043 Rennes Cédex  
Tél : 02.23.23.38.28  
[vincent.ulve@univ-rennes1.fr](mailto:vincent.ulve@univ-rennes1.fr)

**URBAN Alan**  
UMR 7567 CNRS  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex  
Tél : 03.83.68.43.09  
[alan.urban@maem.uhp-nancy.fr](mailto:alan.urban@maem.uhp-nancy.fr)

**VAL Romain**  
IBMP  
12 rue du Général Zimmer  
67000 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.72.00  
[romain.val@ibmp-ulp.u-strasbg.fr](mailto:romain.val@ibmp-ulp.u-strasbg.fr)

**VAN HERREWEGHE Elodie**  
CNRS/LBME  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse Cédex  
Tél : 05.61.33.59.91  
[evan@crans.org](mailto:evan@crans.org)

**VENTURA Michel**  
UMR 5097  
Université Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat  
33076 Bordeaux  
Tél : 05.57.57.17.42  
[michel.ventura@reger.u-bordeaux2.fr](mailto:michel.ventura@reger.u-bordeaux2.fr)

**VERHEGGEN Céline**  
UMR 5535 CNRS  
1919 route de Mende  
34293 Montpellier Cédex 5  
Tél : 04.67.61.36.62  
[verhegge@igmm.cnrs.fr](mailto:verhegge@igmm.cnrs.fr)

**VIPHAKONE Nicolas**  
UMR 5095 CNRS  
IBGC, 1 rue Camille Saint Saens  
33077 Bordeaux Cédex  
Tél : 05.56.99.90.15  
e-mail : [Nicolas.Viphakone@ibcg.u-bordeaux2.fr](mailto:Nicolas.Viphakone@ibcg.u-bordeaux2.fr)

**VIRANAICKEN Wildriss**  
Université de Montréal  
Faculté de Médecine  
Département de Biochimie  
2900 bd Edouard Montpetit  
QC H3T 1J4 Montréal, Canada  
Tél : 514.343.6111  
[viranaickenwildriss@yahoo.fr](mailto:viranaickenwildriss@yahoo.fr)

**VISVIKIS Athanase**  
UMR 7567 CNRS  
MAEM, Faculté des Sciences  
Bd des Aiguillettes  
54506 Vandoeuvre les Nancy  
Tél : 03.83.68.42.78  
[visvikis@maem.uhp-nancy.fr](mailto:visvikis@maem.uhp-nancy.fr)

**VITALI Patrice**  
UMR 5099 CNRS  
Université Paul Sabatier  
118 route de Narbonne  
31062 Toulouse  
Tél : 05.61.33.59.45  
[vitali@ibcg.biotoul.fr](mailto:vitali@ibcg.biotoul.fr)

**WATRIN Marguerite**  
INSERM U 386  
IECB, 2 rue Robert Escarpit  
33400 Pessac  
Tél : 05.40.00.30.77  
[m.watrin@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:m.watrin@iecb.u-bordeaux.fr)

**WEIL Dominique**  
CNRS FRE 2937  
Institut André Lwoff  
7 rue Guy Moquet  
94800 Villejuif  
Tél : 01.49.58.33.80  
[weil@vjf.cnrs.fr](mailto:weil@vjf.cnrs.fr)

**WEILL Laure**  
UPR 2167 CNRS  
1 avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Tél : 01.69.82.31.04  
e-mail : [weill@cgm.cnrs-gif.fr](mailto:weill@cgm.cnrs-gif.fr)

**WURTH Laurence**  
UPR 9002 CNRS  
15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg  
Tél : 03.88.41.70.69  
[l.wurth@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:l.wurth@ibmc.u-strasbg.fr)

**ZEMAM Kenza**  
Institut Pasteur  
25 rue du Dr Roux  
75015 Paris  
Tél : 01.40.61.34.39  
[kzemam@pasteur.fr](mailto:kzemam@pasteur.fr)



**Notes :**











