



**Responsable : DELEPIERRE Muriel ([muriel@pasteur.fr](mailto:muriel@pasteur.fr))**

## Résumé

La thématique de l'Unité concerne l'étude structurale et dynamique des macromolécules biologiques en solution en relation avec leur fonction ainsi que l'étude des interactions impliquées dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire de type DNA-protéine, protéine-protéine ou encore peptide-macromolécules. Les approches sont celles de la Biochimie et de la Biophysique avec comme méthode de choix mais sans exclusive la Résonance Magnétique Nucléaire. Les thèmes développés le sont en étroite collaboration avec les équipes de l'Institut Pasteur

## Rapport d'activité

**Étude structurale et fonctionnelle des protéines bactériennes impliquées dans l'acquisition de l'hème** (Célia Caillet, Clarisse Deniau, Nadia Izadi-Pruneyre, Anne Lecroisey, Nicolas Wolff)

Le fer, impliqué dans de nombreux processus biologiques, est indispensable pour les êtres vivants. Bien que très abondant, il est quasiment insoluble dans les milieux biologiques. Les bactéries ont donc développé différentes voies d'acquisition du fer qui peuvent coexister chez une même espèce. L'existence et l'utilisation de ces différentes voies dépendent de la biodisponibilité du fer dans l'organisme hôte. Ainsi des pathogènes opportunistes (*Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*) et l'agent responsable de la peste (*Yersinia pestis*) secrètent en condition de carence en fer des protéines, appelées hémophores (HasA pour Heme Acquisition system), qui leur permettent d'accéder à la plus grande source potentielle de fer chez l'homme, l'hème de l'hémoglobine. Les hémophores HasA, une fois dans le milieu extra cellulaire, captent l'hème sous sa forme libre ou liée à l'hémoglobine et le délivrent ensuite à un récepteur membranaire spécifique. Les hémophores HasA partagent une grande homologie et forment une nouvelle famille de protéines sans homologie avec d'autres protéines connues.

Afin de comprendre le mécanisme d'action de ces hémophores, nous avons étudié HasASM (19 kDa) sécrété par *S. marcescens*, le premier membre découvert de cette famille. La structure tridimensionnelle de HasASM a été déterminée, par diffraction aux rayons X pour la forme hém- et par RMN hétéro nucléaire multidimensionnelle pour la forme apo-. Trois résidus sont impliqués dans la fixation de l'hème : une histidine et une tyrosine directement liées au fer de l'hème et une autre histidine via la tyrosine. L'importance et le rôle de chacun de ces résidus dans l'activité de la protéine ont été évalués à partir de l'étude de l'état de protonation des histidines en absence et en présence du ligand mais aussi de l'étude des propriétés physico-chimiques et moléculaires de mutant dans lesquels ces résidus avaient été remplacés par d'autres résidus. L'ensemble de ces travaux nous a permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes de capture et de délivrance de l'hème de cette nouvelle famille de protéines. (Collaborations : Unité des membranes bactériennes, Institut Pasteur ; AFMB & BIP, CNRS Marseille ; Faculté de Pharmacie, Marseille. Department of Microbiology & Immunology, Emory, University, Atlanta, USA, Université de Florence, Italie).

**Structure tridimensionnelle de toxines** (Karine Frénel, Damien Garnier, Iñaki Guizarro, Muriel Delepierre, Karine Wecker)

L'étude de la structure des canaux ioniques a été rendue possible par l'utilisation de ligands spécifiques de chacun des canaux étudiés. Ces ligands sont souvent des toxines animales isolées à partir de venins de vertébrés et d'invertébrés et représentent des outils très puissants pour étudier la structure et comprendre la pharmacologie moléculaire de ces canaux. Bien que les bases moléculaires de la spécificité des toxines envers les espèces et/ou envers les différents types de canaux ioniques aient été beaucoup étudiées, il reste encore beaucoup à faire pour appréhender totalement les caractéristiques structurales et fonctionnelles de ces molécules. Il est donc important de continuer à caractériser les toxines au fur et à mesure de leur découverte non seulement pour les problèmes de santé publique causés par les piqûres d'espèces venimeuses mais aussi parce qu'un grand nombre de nouvelles familles de canaux ioniques sont sans pharmacologie faute de ligand spécifique. Actuellement la détermination des structures de trois toxines est en cours: (i) Pi4 qui comporte 4 ponts disulfure et devrait permettre de comprendre l'organisation des ponts disulfure dans cette nouvelle sous-famille de toxines actives sur les canaux potassium (collaboration Lourival Possani Mexique et Jean-Marc Sabatier Marseille) (ii) la toxine erg qui non seulement constitue à elle seule une nouvelle sous-famille mais qui en plus possède un mode d'action original (collaboration Lourival Possani) (iii) et enfin La toxine Pa9 de nature non peptidique et qui est la première molécule active sur la nouvelle famille de canaux potassium de type 2P (collaboration Michel Ladzunski Nice).

**Étude structurale de déterminants antigéniques reconnus par un anticorps monoclonal protecteur dans le cadre du développement d'un vaccin contre la shigellose** (Marie-Jeanne Clément, Catherine Simenel, Muriel Delepierre)

*Shigella flexneri* est une bactérie à gram négatif responsable de la forme endémique de la shigellose, une infection recto-colique aiguë dont les principales victimes sont les enfants de moins de cinq ans dans les pays en voie de développement. L'augmentation, du nombre de souches de *Shigella* résistantes aux antibiotiques, rend la vaccination l'unique moyen d'éradication de la maladie. Le développement d'un vaccin contre la shigellose fait partie des priorités de l'O.M.S. dans le cadre du développement de vaccins entériques. La protection contre une infection par *Shigella* repose essentiellement sur la réponse humorale locale dirigée contre la partie polysidique du lipopolysaccharide appelée antigène-O (Ag-O). De plus, les anticorps conférant cette protection sont spécifiques du sérotype de la souche de *Shigella* défini par la structure de l'Ag-O. Une stratégie possible pour la vaccination humaine consiste donc à développer des vaccins synthétiques chimiquement définis avec des molécules simples capables de mimer l'Ag-O et d'induire la synthèse d'anticorps protecteurs. Deux approches ont été développées qui consistent à utiliser soit des oligosaccharides synthétiques représentatifs des épitopes osidiques reconnus par des anticorps protecteurs soit des séquences peptidiques mimant les épitopes protecteurs. Le développement de chacune de ces deux options requiert une étude structurale de l'interaction des oligosaccharides et des peptides avec des anticorps protecteurs afin d'appréhender les bases moléculaires impliquées dans la reconnaissance antigène-anticorps et à définir ainsi la structure optimale mimant l'Ag-O. Les structures en solution des oligosaccharides synthétiques et des séquences peptidiques immunogéniques ont été étudiées par RMN soit sous forme libre soit sous forme liée à des anticorps protecteurs. Ainsi plusieurs fragments issus de l'Ag-O ont été synthétisés qui vont de fragments di- à penta-saccharidiques. Les structures de ces fragments ainsi que celle de l'antigène-O du sérotype 5a de *Shigella Flexneri* ont été déterminées et comparées au modèle structural établi pour l'antigène-O de *Shigella Flexneri* Y. Cette étude comparative a permis de montrer que la ramification due à la présence du résidu glucosyl était responsable de la forme hélicoïdale de l'antigène-O du sérotype 5a. Des nonapeptides mimant l'épitope polysidique reconnu par des anticorps protecteurs et capables d'induire la synthèse d'anticorps dirigés contre l'Ag-O de *Shigella*, quand ils sont utilisés comme immunogènes chez la souris ont été développés et leur structure déterminée

### Structure du domaine III de la protéine d'enveloppe du virus de la dengue (Iñaki Guijarro Collaboration Hugues Bedouelle)

Les infections par le virus de la dengue posent un problème majeur de santé publique qui nécessite du développement d'agents antiviraux. L'anticorps murin 4E11 est capable de neutraliser l'infection de cellules cibles par les quatre sérotypes connus du virus. Le mécanisme de reconnaissance des protéines ED des quatre sérotypes viraux par l'anticorps 4E11 est étudié afin d'améliorer son pouvoir protecteur. L'anticorps reconnaît le domaine III de la glycoprotéine majeure d'enveloppe du virus (ED). Nous avons initié l'étude structurale du domaine ED-III afin d'une part, de mieux comprendre l'interaction de ce domaine avec l'anticorps 4E11 et d'aider à l'amélioration de cet anticorps, et d'autre part afin d'étudier l'interaction de ce domaine avec les héparans de la surface des cellules cibles. Nous avons déjà montré par RMN que la protéine recombinante ED-III (sérotipe 1) au sein d'un hybride avec la protéine transporteuse du maltose (MalE), est un domaine globulaire structuré.

### Étude structure-fonction de la protéine TgDRE, une enzyme de réparation de l'ADN exprimée par le parasite *Toxoplasma gondii* (Karine Frénel, Nicolas Wolff)

Le protozoaire *Toxoplasma gondii* est un parasite pathogène opportuniste appartenant au même phylum que le *Plasmodium falciparum* et responsable de la toxoplasmose chez l'homme. Son infection est asymptomatique dans la plupart des cas, mais le parasite persiste à vie sous forme latente enkystée au niveau des cellules nerveuses, rétinienne et musculaires. Toutefois, chez les personnes immunodéprimées (cancer, sida, greffe), la forme quiescente entre en réplication active, devient virulente et peut causer la mort par encéphalite. L'interconversion entre ces deux formes est donc importante dans la réactivation de l'infection. Il semble que certains stimuli comme l'oxyde d'azote ou l'interféron  $\gamma$  soient impliqués dans le passage de la forme virulente à la forme latente, ce qui pourrait causer un stress pour le parasite et être à l'origine de dommages au niveau de son ADN. Une protéine de réparation de l'ADN a récemment été découverte chez le parasite *Toxoplasma gondii* et nommée TgDRE (*Toxoplasma gondii* DNA Repair Enzyme). Différents résultats suggèrent que cette protéine serait impliquée dans l'interconversion des formes quiescente et virulente du parasite. Constituée de 466 résidus, elle forme avec quatre autres protéines une nouvelle famille caractérisée par la présence de trois domaines : deux domaines de liaison à l'ARN : les G-patch et RRM (RNA Recognition Motif) et un domaine nommé SF45 pour son homologie avec un domaine de la protéine humaine SF45 impliquée dans le spliceosome. Nous avons réalisé des constructions plasmidiques en vue de l'expression et de la purification de protéines mono et multidomaines (de 7 kDa à 25 kDa) afin de déterminer leur structure par RMN conjointement à leur étude fonctionnelle (Collaboration Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris, Jussieu, DIEP, CEA-Saclay, Unité Parasitologie Moléculaire, Université de Lille)

### Génomique structurale de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae* (Ada Prochnicka-Chalufour, Muriel Delepierre)

L'Institut Pasteur est impliqué dans un projet de génomique fonctionnelle et structurale des génomes de *Mycobacterium tuberculosis* et *Leprae*, projet coordonné par Stewart Cole. L'objectif principal est le développement de nouvelles drogues pour combattre la menace sans cesse croissante de la tuberculose mais aussi la lèpre à partir d'une approche post-génomique. En effet, la lèpre, maladie humaine neurologique chronique, est due à une infection par un agent pathogène intracellulaire, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), un proche parent du bacille tuberculeux (*M. tuberculosis*). Les génomes de *M. leprae* et *M. tuberculosis* sont aujourd'hui séquencés. Ils possèdent plus de 80 % d'identité et contiennent des gènes spécifiques à chacun d'entre eux, 136 et 470 respectivement chez *M. leprae* et *M. tuberculosis*. Parmi ceux-ci 156 sont de fonction inconnue. À court terme, l'étude des gènes spécifiques de *M. leprae* devrait permettre une meilleure compréhension de son fonctionnement donc de sa pathogénicité, en particulier neurologique, et pourrait fournir des outils-diagnostic précieux pour des tests cutanés de détection de la maladie, d'autant mieux traitée qu'elle est décelée précocement. À moyen terme, il s'agira d'identifier de nouvelles cibles pour de nouveaux antibiotiques, de mettre au point de nouveaux médicaments pour éviter les neuropathies et de rechercher un vaccin en identifiant des protéines fonctionnelles jouant un rôle dans l'immunité. Parmi les 156 gènes de fonction inconnue nous avons choisi ceux qui exprimaient des protéines dont la taille n'excède pas les 150 acides aminés afin de conduire une étude structurale par RMN hétéronucléaire multidimensionnelle (Collaboration Stewart Cole, Jean-Michel Betton et Pedro Alzari)

**Mots-clés:** Biophysique, RMN, structure, interactions, biomolécules, modélisation moléculaire

## Site Web de l'unité

> [Plus d'informations sur notre site web](#)

## Publications de l'unité

> [Toutes les publications sur notre base de données](#)

## Personnel

Secrétariat	Chercheurs	Stagiaires	Autre personnel
ROUX Cécile, <a href="mailto:croux@pasteur.fr">croux@pasteur.fr</a>	DELEPIERRE Muriel, CNRS, <a href="mailto:murield@pasteur.fr">murield@pasteur.fr</a>  GUIJARRO Inaki, IP, <a href="mailto:guijarro@pasteur.fr">guijarro@pasteur.fr</a>  IZADI-PRUNEYRE Nadia, CNRS, <a href="mailto:nizadi@pasteur.fr">nizadi@pasteur.fr</a>  LECROISEY Anne, IP, <a href="mailto:alecrois@pasteur.fr">alecrois@pasteur.fr</a>  WOLFF Nicolas, IP, <a href="mailto:wolff@pasteur.fr">wolff@pasteur.fr</a>	BEN AISSA Manel, DEA, <a href="mailto:manelba@pasteur.fr">manelba@pasteur.fr</a>  CAILLET Célia, DEA, <a href="mailto:ccaillet@pasteur.fr">ccaillet@pasteur.fr</a>  CLEMENT Marie-Jeanne, thèse, <a href="mailto:mjeanne@pasteur.fr">mjeanne@pasteur.fr</a>  FRENAL Karine, thèse, <a href="mailto:kfrenal@pasteur.fr">kfrenal@pasteur.fr</a>  STOVEN Véronique, CNRS, <a href="mailto:vstoven@pasteur.fr">vstoven@pasteur.fr</a>	PROCHNICKA-CHALUFOUR Ada, IP, <a href="mailto:ada@pasteur.fr">ada@pasteur.fr</a>  SIMENEL Catherine, IP, <a href="mailto:simemel@pasteur.fr">simemel@pasteur.fr</a>  WECKER Karine, CNRS, <a href="mailto:wecker@pasteur.fr">wecker@pasteur.fr</a>

*En cas de problèmes, de remarques, ou de questions concernant cette page Web écrire à [rescom@pasteur.fr](mailto:rescom@pasteur.fr)*