HAL
open science

Simulations de dynamique moléculaires d'ARN – Structures et environnements

Pascal Auffinger

To cite this version:

Pascal Auffinger. Simulations de dynamique moléculaires d'ARN – Structures et environnements. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2004. tel-00265627

HAL Id: tel-00265627

https://theses.hal.science/tel-00265627v1

Submitted on 19 Mar 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Faculté des Sciences de la Vie

Université Louis Pasteur - Strasbourg

Habilitation à Diriger des Recherches

présentée par

Pascal Auffinger

Chargé de recherche au CNRS

Membres du Jury :

Dr Richard	LAVERY	*rapporteur externe*
Prof. Dr Wolfram	SAENGER	*rapporteur externe*
Dr Alberto	PODJARNY	*rapporteur interne*
Prof. Martin	KARPLUS	*examinateur*
Prof. Jérémy	SMITH	*examinateur*
Prof. Georges	WIPFF	*invité*
Prof. Eric	WESTHOF	*garant*

Soutenue le 5 Février 2004 à Strasbourg

SOMMAIRE

CURRICULUM VITAE 1

Fonction actuelle : 1

Positions post-doctorales : 1

Formation universitaire : 3

Enseignement : 5

Encadrement : 5

Rapporteur dans des revues à comité de lecture : 5

Membre de sociétés savantes : 5

Liste de publications 7

Articles soumis à comité de lecture : 9

Articles de revue, actes de conférences et ouvrages : 10

Communications orales : 11

Affiches : 12

Résumés de réunions scientifiques : 14

Activités de recherche 15

Cadre général 17

Simulations de DM d'ARN menées au sein de l'équipe d'Eric WESTHOF 19

Aspects méthodologiques 19

Validation des protocoles de simulations : 19

Traitement des interactions électrostatiques : 20

Aspects conformationnels 21

Importance des interactions faibles dans le maintien de la structure tertiaire d'ARN : 21

Préférences conformationnelles des riboses : 22

Stabilité d'architectures tertiaires complexes : 23

Les nucléotides modifiés dans les ARN : 24

Rôles des interactions bifurquées : 24

Caractérisation de motifs d'ARN : 25

Hydratation 26

Effets structurants des interactions à longue distance faisant intervenir le solvant : 26

Hydratation des groupements C-H : 27

Hydratation des sites hydrophiles du bras de l'anticodon de l'ARNt^{Asp} : 27

Solvatation d'appariements Watson-Crick : 28

Nucléotides modifiés : les pseudouridines (Ψ) 29

Nucléotides modifiés : les riboses méthylés (Nm) 29

Fusion d'ARN "in silico" : 30

Interactions ARN/K^+ : systèmes modèles 31

La boucle E de l'ARN ribosomique 5S d'Escherichia coli 32
Interactions ARN/Mg^{2+} : 32
Interactions ARN/K^+ : 33
Interactions ARN/Anions (Cl^-, SO_4^{2-},…) : 34

Projets de recherche 35

Méthodologie : 37

Hydratation : 39
Etude approfondie de l'hydratation de doublets de plateaux de bases 39
Hydratation d'appariements non-canoniques (G•U, …) 39
Poursuite des investigations concernant les nucléotides modifiés 40

Interactions ARN/ions 40
Interactions ARN/Mg^{2+} 40
Interactions ARN/M^+ 40

Reconnaissance moléculaire 40
Interactions ARN/protéines 41
Interactions ARN/antibiotiques 41
Interactions ARN/polyamines 41

Références 43

Quelques publications : 47

P6 - 1996 49

P11-1997 61

P14-1998 73

P17-2000 89

P18-2001 111

P20-2001 129

P22-2003 135

P23-2004 149

P24-2004 169

R12-2000 195

R15-2004 207

Pascal AUFFINGER
né le 24 Août 1961 à Strasbourg

Adresse professionnelle :
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC)
UPR 9002
15 rue René Descartes
67084 Strasbourg Cedex

tél : 03 88 41 70 49
fax : 03 88 60 22 18
p.auffinger@ibmc.u-strasbg.fr

Adresse personnelle :
24 Avenue du Général de Gaulle
67000 Strasbourg
tél : 03 88 61 19 37
mob : 06 16 98 55 07

Fonction actuelle :

Depuis Septembre 1997 :

CR1 attaché à l'équipe "Modélisation et Simulation des Acides Nucléiques"
dirigée par Eric WESTHOF (UPR 9002 – dir : Bernard EHRESMANN)

Positions post-doctorales :

1996 – 1997 Attaché à l'équipe d'Eric WESTHOF
(UPR 9002 – dir: Bernard EHRESMANN)
Bourse : Fondation pour la recherche médicale

1995 – 1996 Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (Enseignement de Biophysique). Affecté à l'équipe d'Eric WESTHOF (UPR 9002 – dir : Bernard EHRESMANN)

1993 – 1995 Attaché à l'équipe d'Eric WESTHOF
(UPR 9002 – dir : Bernard EHRESMANN)
Bourse : CM_2AO ORGANIBIO

1992 – 1993 Attaché au laboratoire du Professeur David BEVERIDGE
à l'Université de Wesleyan, CT - USA pour une durée de 18 mois

---

Formation universitaire :

1988 – 1991	Thèse en Chimie Informatique et Théorique: “Simulations de la dynamique moléculaire de cryptands et cryptates cationiques: de la phase gazeuse à la phase liquide.” effectuée dans l’équipe de “Modélisation et Simulation Moléculaire” de Georges WIPFF de l’URA 422 dirigée par Jean-Marie LEHN à l’Université Louis Pasteur de Strasbourg (ULP). *Mention “Très Honorable” et félicitations du Jury* *Bourse du Ministère de le Recherche et de la Technologie (MRT)*
1987 – 1988	Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Chimie Théorique et Informatique (ULP - Strasbourg)
1986 – 1987	Maîtrise de Chimie Physique (ULP - Strasbourg)
1985 – 1986	Licence de Chimie Physique (ULP - Strasbourg)
1982 – 1985	Congé "longue maladie"
1979 – 1982	DEUG A (ULP - Strasbourg)
1978 – 1979	Baccalauréat, série C

Enseignement et encadrement

Enseignement :

Depuis Septembre 1997 :
Cours de simulation de dynamique moléculaire du module de "Bioinformatique" (resp : Eric WESTHOF) de la maîtrise de biochimie structurale et du magistère de Chimie-Biologie
(*≈16 h/an* - ULP – Strasbourg)

Depuis Janvier 2003 :
Cours de modélisation en troisième année d'IUP (Institut Universitaire Professionnalisé) biotechnologie et bio-industrie – spécialité : technologie avancées des sciences du vivant
(*≈ 4h* - ULP – Strasbourg)

Encadrement :

1995 – 1996 Encadrement (75%) du stagiaire post-doctoral Shirley LOUISE-MAY
(quatre articles et deux revues publiés en commun)

1997 – 1998 Encadrement (20%) du stagiaire post-doctoral Thomas HERMANN
(deux articles publiés en commun)

1998 – 1999 Encadrement (90%) d'un étudiant en DEA "Analyse du génome et modélisation moléculaire (AG_2M)". Obtention du DEA avec mention AB. Sujet: "*Simulation de la boucle E de l'ARNr 5S en phases aqueuse et cristalline*".

2001 – 2003 Encadrement (90%) du stagiaire postdoctoral Lukasz BIELECKI (boursier Marie Curie)
(trois article publiés en commun et un article en préparation)

Depuis juin 2003 : Encadrement (70%) du stagiaire postdoctoral Andrea VAIANA
(une revue publié en commun)

Rapporteur dans des revues à comité de lecture :

Biophysical Journal
Chemical Physics Letters
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics
Nucleic Acids Research
RNA

Membre de sociétés savantes :

Société Française de Biophysique (SFB)
Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM)

Liste de publications

les fichiers « pdf » des articles publiés peuvent être consultés à l'adresse suivante :

http://www-ibmc.u-strasbg.fr/upr9002/westhof/biblio_pascal

Articles soumis à comité de lecture :

P1. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. (1990). High temperature annealed molecular dynamics simulations as a tool for conformationnal sampling. Application to the bicyclic "222" cryptand. *J. Comp. Chem.*, **11**, 19-31.

P2. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. (1991). Hydration of the "222" cryptand and cryptates studied by molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5976-5988.

P3. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. (1991). Molecular dynamics simulations on the protonated 222,H^+ and 222,2H^+ cryptands in water: *endo* versus *exo* conformations. *J. Incl. Phenom.,* **11**, 71-81.

P4. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. (1991). Quantitative studies on molecular recognition: free energy perturbation studies on M^+/222 cryptates in water and in methanol. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.,* **88**, 2525-2534.

P5. **AUFFINGER P.** et BEVERIDGE D.L. (1995). A simple test for evaluating the truncation effects in simulation of systems involving charged groups. *Chem. Phys. Lett.*, **234**, 413-415.

P6. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et WESTHOF E. (1995). Multiple molecular dynamics simulations of the anticodon loop of $tRNA^{Asp}$ in aqueous solution with counterions. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6720-6726.

P7. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et WESTHOF E. (1996). Molecular dynamics simulations of the anticodon hairpin of $tRNA^{Asp}$: structuring effects of C-H…O hydrogen bonds and of long-range hydration forces. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1181-1189.

P8. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et WESTHOF E. (1996). Hydration of C-H groups in tRNA. *Farad. Discuss.* **103**, 151-173.

P9. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1996). H-bond stability in the $tRNA^{Asp}$ anticodon hairpin: 3 ns of multiple molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, **71**, 940-954.

P10. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1997). RNA hydration: three nanoseconds of multiple molecular dynamics simulations of the solvated $tRNA^{Asp}$ anticodon hairpin. *J. Mol. Biol.*, **269**, 326-341.

P11. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1997). Rules governing the orientation of the 2'-hydroxyl group in RNA. *J. Mol. Biol.*, **274**, 54-63.

P12. HERMANN T., **AUFFINGER P.**, SCOTT W.G. et WESTHOF E. (1997). Evidence for a hydroxide ion bridging two magnesium ions at the active site of the hammerhead ribozyme. *Nucleic Acids Res.,* **25**, 3421-3427.

P13. HERMANN T., **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1998). Molecular dynamics investigations of hammerhead ribozyme RNA. *Eur. Biophys. J.*, **27**, 153-165.

P14. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1998). Hydration of RNA base pairs. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **16**, 693-709 *(en l'honneur du 60ème anniversaire du Prof. David Beveridge).*

P15. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et E. WESTHOF (1999). Molecular dynamics simulations of the solvated yeast $tRNA^{Asp}$. *Biophys. J.*, **76**, 50-64.

P16. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1999). Singly and bifurcated hydrogen-bonded base-pairs in tRNA anticodon hairpins and ribozymes. *J. Mol. Biol.*, **292**, 467-483.

P17. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (2000). Water and ion binding around RNA and DNA (C,G) oligomers. *J. Mol. Biol.*, **300**, 1115-1133.

P18. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (2001). Water and ion binding $r(UpA)_{12}$ and $d(TpA)_{12}$ oligomers – Comparison with RNA and DNA $(CpG)_{12}$ duplexes. *J. Mol. Biol.*, **305**, 1057-1072.

P19. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (2001). An extended structural signature for the tRNA anticodon loop. *RNA*, **7**, 334-341.

P20. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (2001). Hydrophobic groups stabilise the hydration shell of 2'-O-methylated RNA duplexes. *Angew. Chem. Int. Ed.,* **40**, 4648-4650.

P21. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (2002). Melting of the solvent structure around a RNA duplex: a molecular dynamics simulation study. *Biophys. Chem.*, **95**, 203-210.

P22. **AUFFINGER P.**, BIELECKI L. et WESTHOF E. (2003) The Mg^{2+} binding sites of the 5S rRNA loop E motif investigated by molecular dynamics simulations. *Chem. Biol.*, **10**, 551-561.

P23. **AUFFINGER P.**, BIELECKI L. et WESTHOF E. (2004) Symmetric K^+ and Mg^{2+} ion binding sites in the 5S rRNA loop E inferred from molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.*, **335**, 551-571.

P24. **AUFFINGER P.**, BIELECKI L. et WESTHOF E. (2004) Anion binding to nucleic acids. *Structure*, (*sous presse*).

P25. **AUFFINGER P.**, BIELECKI L. et WESTHOF E. (2004) Determination of B-factors and residence times from molecular dynamics simulations. (*en préparation*).

Articles de revue, actes de conférences et ouvrages :

R1. LOUISE-MAY S., **AUFFINGER P.**, et WESTHOF E. (1996). RNA structure through molecular dynamics simulation. Dans *Biological Structure and Dynamics - Proceedings of the Ninth Conversation - State University of New-York*, Albany, NY, Vol. 2, édité par R.H. Sarma et M.H. Sarma, Adenine Press, 73-89.

R2. LOUISE-MAY S., **AUFFINGER P.**, et WESTHOF E. (1996). Calculation of nucleic acid conformation. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **6**, 289-298.

R3. RAVISHANKER G., **AUFFINGER P.**, LANGLEY D.R., JAYARAM B., YOUNG M.A. et BEVERIDGE D.L. (1997). Treatment of counterions in computer simulations of DNA. Dans *Reviews of Computational Chemistry*, édité par K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd, VCH Publishers, Vol. 11, pp. 317-372.

R4. WESTHOF E., **AUFFINGER P.** et GASPIN C. (1997). DNA and RNA structure prediction. Dans *DNA and Protein Sequence Analysis - A Practical Approach*, édité par M. Bishop et C. Rawlings, IRL press, pp. 256-278.

R5. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1998). Molecular dynamics simulations of nucleic acids. Dans *Encyclopedia of Computational Chemistry*, Vol. 5, édité par P. von Ragué Schleyer, Willey & Sons, pp. 1629-1640.

R6. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1998). Effects of pseudouridylation on tRNA hydration and dynamics: a theoretical approach. Dans *Modification and Editing of RNA*, édité par H. Grosjean et R. Benne, ASM Press, 103-112.

R7. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1998). Location and distribution of modified nucleotides in tRNA. Dans *Modification and Editing of RNA*, édité par H. Grosjean et R. Benne, ASM Press, 569-576.

R8. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1998). Simulation of the molecular dynamics of nucleic acids., *Curr. Op. Struct. Biol.*, **8**, 227-236.

R9. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1999). Roles of hydration on the structure and dynamics of nucleic acids. Dans *Water Management in the Design and Distribution of Quality Food*, édité par Y.H. Ross, R.B. Leslie et P.J. Lillford, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster -Basel, 165-198.

R10. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (1999). Conformational preferences in RNA molecules as inferred from molecular dynamics simulations. Dans *Perspective in Structural Biology - A Volume in Honour of G.N. Ramachandran*, édité par M. Vijayan, N. Yathindra, et A.S. Kolaskar, University Press (India), Hyderabad, 545-555.

R11. WESTHOF E. et **AUFFINGER P.** (2000). RNA tertiary structure. Dans *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, édité par R.A. Meyers, Wiley & Sons Ltd (Chichester), 5222-5232.

R12. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (2000). RNA solvation: a molecular dynamics simulation perspective. *Biopolymers*., **56**, 266-274.

R13. WESTHOF E. et **AUFFINGER P.** (2001). tRNA structure. Dans *Encyclopedia of Life Sciences*, http://www.els.net, Nature Publishing group.

R14. **AUFFINGER P.**, MASQUIDA B. et WESTHOF E. (2002). Structural and dynamical characterisation of the nucleic acid water and ion binding sites. Dans *Computational Methods for Macromolecules: Challenges and Applications* - Lecture Notes in Computational Science & Engineering (LNCSE), Vol. 24, Springer Verlag, Heidelberg, édité par T. Schlick et H.H. Gan, pp. 61-70.

R15. **AUFFINGER P.** et VAIANA A.C. (2004) Molecular dynamics simulations of RNA systems. Dans *Handbook of RNA biochemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, édité par E. Westhof, Bindereif, Schön et Hartmann. *(sous presse)*.

R16. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. (2004) Progress in molecular dynamics simulation of nucleic acids. *Rep. Progr. Phys., (en cours de rédaction)*.

Communications orales :

C1. Importances des problèmes de troncature des interactions à longues distances dans les simulations de systèmes chargés. *Université Louis Pasteur*. Strasbourg - France, 12 Janvier **1993**.

C2. Dynamique moléculaire d'acides ribonucléiques. *Journées de Modélisation Moléculaire CNRS-INSERM*. Strasbourg - France, 17 Mars **1994**.

C3. Mise en évidence de la dépendance vis-à-vis des conditions initiales de simulations de dynamiques moléculaires par analyse de trajectoires multiples. *Groupe Graphique Moléculaire*. La Londe les Maures - France, 22-24 Mai **1995**.

C4. Multiple molecular dynamics (MMD) simulations of RNA molecules. *CECAM Workshop*. Lyon - France, 3-5 Septembre **1997**.

C5. Aspects of the molecular dynamics simulations of RNA molecules. *IGBMC*. Illkirch - France, 15 Janvier **1999**.

C6. Simulations de dynamique moléculaire: hydratation et dynamique d'ARN de transfert . *11ème Rencontres du GGMM*. Lyon - France, 10-12 Mai **1999**.

C7. Etudes structurales d'ARN par simulations de dynamique moléculaire. *ICSN*. Gif-sur-Yvette - France, 10 Décembre **1999**.

C8. La quatrième dimension de l'ARN. *IBMC*. Strasbourg - France, 7 Janvier **2000**.

C9. tRNA anticodon loop signature and single hydrogen bonded base pairs. *3ème Colloque SIFRArn*. Toulouse - France, 19-21 Janvier **2000**.

C10. Molecular dynamics simulations of hydrated RNA molecules. *NIBH*. Tsukuba - Japon, 10 Mars **2000**.

C11. Exploration of the fourth dimension of RNA. *Computational Science Workshop 2000*. Tsukuba - Japon, 13-15 Mars **2000**.

C12. Molecular dynamics simulations of the hydration of tRNA molecules. *Kyoto University*. Kyoto - Japon, 23 Mars **2000**.

C13. Molecular dynamics simulations of tRNA molecules. *Chiba University*. Chiba - Japon, 6 April **2000**.

C14. Simulations of RNA in condensed phase: relevance and limitations. *Molecules of biological interest in the gas phase – Euresco conferences*. Les Houches - France, 13-18 Mai **2000**.

C15. Sequence and environmental effects on RNA structures. *Séminaire algorithmique et biologie – Structures et interactions macromoléculaires*. Institut Pasteur de Paris - France, 13-17 Septembre **2000**.

C16. Ion binding and hydration sites around nucleic acid base-pairs. A molecular dynamics study. *Karolinska Intitutet*. Stockholm - Suède, 23 Novembre **2000**.

C17. Hydrophobic methyl groups stabilize the hydration shell of 2'-O-methylated RNA duplexes. *RNA meeting*. Banff - Canada, 29 Mai – 3 Juin **2001**.

C18. RNA molecular dynamics simulations and crystallography. *50th memorial meeting of the Society of Crystal Chemistry*. Tokyo - Japon, 8 Décembre **2001**.

C19. Insights into the hydration shell structure of nucleic acids by molecular dynamics simulations. *Development of New Structural Biology Including Hydrogen and Hydration*. Tsukuba - Japon, 10-12 Décembre **2001**.

C20. High resolution molecular dynamics simulations. *Institut Charles Sadron* - Strasbourg – France, 6 Mars **2002**.

C21. RNA: reconstruction of their hydration shells and detection of mono- and polyatomic ion binding sites. *BioGeometry Meeting*. INRIA Sophia-Antipolis – France, 19-20 Mars **2002**.

C22. Structure and dynamics of the nucleic acid solvation shell viewed by molecular dynamics simulations. *ACS meeting*. Orlando - USA, 10-12 Avril **2002**.

C23. Hydrogen bonding in RNA systems viewed by molecular dynamics simulations. *XIX Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography - Horizons in Hydrogen Bond Research*. Genève – Suisse, 6-15 Août **2002**.

C24. Dynamical behavior of the magnesium ions bound to the 5S rRNA loop E motif. *4ème Colloque SIFRArn*. Nancy - France, 14-17 Octobre **2002**.

C25. Molecular recognition phenomena in RNA investigated through molecular dynamics simulations. *CARBONA meeting*. Strasbourg - France, 28 Février - 1 Mars **2003**.

C26. Metal ion binding to the 5S rRNA loop E motif investigated by molecular dynamics simulations. *RNA structure, function and ligand interactions.* Francfort – Allemagne, 30 Octobre - 1 Novembre **2003**.

C27. Molecular dynamics simulations of RNA systems. *Horizons in Molecular Biology*. Göttingen – Allemagne, 4-5 Décembre **2003**.

Affiches :

A1. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. Modélisation d'un récepteur macrocyclique et de ses complexes avec des dications organiques - Aspects statiques et dynamiques. *Groupe Graphique Moléculaire*. Carry le Rouet - France, 3-4 Novembre **1988**.

A2. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. High temperature annealed molecular dynamics simulations as a tool for conformationnal sampling. Application to the bicyclic "222" cryptand. *Modelling of Molecular Structure and Properties in Physical Chemistry and Biophysics*. Nancy - France, 11-15 Septembre **1989**.

A3. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. Hydration of the "222" cryptand and cryptates studied by molecular dynamics simulations. *Journées de Chimie "Alsace - Suisse"*. Strasbourg, 22/23 Mars **1990** - Présenté également au *6th Symposium on Molecular Recognition and Inclusion*. Berlin - Allemagne, 10 Septembre **1990**.

A4. **AUFFINGER P.** et WIPFF G. Quantitative studies on molecular recognition: free energy perturbation studies on M^+/222 cryptates in water and in methanol. Obernai - France, 12-14 Mars **1991**.

A5. AUFFINGER P., **LOUISE-MAY S.** et WESTHOF E. A solvated molecular dynamics investigation of the thymine arm of $tRNA^{Asp}$: dynamical loop topology and effect of D-loop interactions. *Groupe Graphique Moléculaire*. La Londe les Maures - France, 22-24 Mai **1995**.

A6. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et WESTHOF E. Solvated molecular dynamics studies of $tRNA^{Asp}$ fragments - Part I: structuring effects of long-range hydration forces on the anticodon loop. *Ninth Conversation on Biomolecular Stereodynamics*. Albany - NY - USA, 20-24 Juin **1995**.

A7. AUFFINGER P., **LOUISE-MAY S.** et WESTHOF E. Solvated molecular dynamics studies of $tRNA^{Asp}$ fragments - Part II: dynamical loop topology and interactions of the thymine arm. *Ninth Conversation on Biomolecular Stereodynamics*. Albany - NY - USA, 20-24 Juin **1995**.

A8. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et WESTHOF E. Studies of $tRNA^{Asp}$ dynamics and interactions - Part I: effects of long-range hydration forces on the anticodon loop. *Advanced Computer Simulation of Materials - CCP5 Annual Meeting*. Daresbury - UK. 20-22 Septembre **1995**.

A9. AUFFINGER P., **LOUISE-MAY S.** et WESTHOF E. Studies of $tRNA^{Asp}$ dynamics and interactions - Part II: conserved interactions in solvated molecular dynamics simulations of the thymine arm. *Advanced Computer Simulation of Materials - CCP5 Annual Meeting*. Daresbury - UK. 20-22 Septembre **1995**.

A10. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et WESTHOF E. MD simulations of the $tRNA^{Asp}$ molecule including an explicit solvent and counterion environment. *RNA'96: The First Annual Meeting of the RNA Society*. Madison - USA, 28 Mai - 2 Juin **1996**.

A11. **AUFFINGER P.**, LOUISE-MAY S. et WESTHOF E. A 500 ps MD simulation of the $tRNA^{Asp}$ molecule including an explicit solvent and counterion environment. *ACS Meeting - Molecular Modeling and Structure Determination of Nucleic Acids*. San Francisco - USA, 13-17 Avril **1997**.

A12. **HERMANN T.**, AUFFINGER P. et WESTHOF E. Molecular dynamics simulations point to a new mechanism for hammerhead cleavage. *RNA Structure Symposium*. Santa-Cruz - USA, 25-29 Juin **1997**.

A13. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. Structural role of post-transcriptionnally modified nucleotides in RNA investigated by molecular dynamics simulations: the example of pseudouridines. (Premier Prix) - *Computational Chemistry and the Living World - From Sequence to Function*. Chambery - France, 20-24 Avril **1998**.

A14. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. Structural role of post-transcriptionnally modified nucleotides in RNA investigated by molecular dynamics simulations: the example of pseudouridines. *SIFRArn*. Strasbourg - France, 28-30 Avril **1998**.

A15. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. Single hydrogen bonded base pairs in tRNAs. *RNA'99*. Edinburgh - Ecosse, UK, 23-27 Juin **1999**.

A16. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. Molecular dynamics simulations of tRNA molecules: structure and hydration. *37th IUPAC Congress*. Berlin - Allemagne, 14-19 Août **1999**.

A17. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. Water and ion binding around RNA and DNA (C,G)-oligomers. *Computational Biology 2000 – From Macromolecules to Drugs*. Nice - France, 13-15 Juin **2000**.

A18. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. Water and ion binding around RNA and DNA oligomers. *Gordon Conferences – Biopolymers*. Salve Regina University, Newport, RI - USA, 18-23 Juin **2000.**

A19. **AUFFINGER P.** et WESTHOF E. Hydrophobic methyl groups stabilize the hydration shell of 2'-O-methylated RNA duplexes. *Gordon Conferences – Biopolymers*. Salve Regina University, Newport, RI - USA, 24-29 Juin **2001**.

A20. **AUFFINGER P.**, BIELECKI L., WESTHOF E., The 5S rRNA loop E motif investigated by molecular dynamics simulations. Part I. The Mg^{2+} binding site. *RNA meeting 2003*. Vienne – Autriche, 1-6 Juillet **2003.**

A21. **AUFFINGER P.**, BIELECKI L., WESTHOF E., The 5S rRNA loop E motif investigated by molecular dynamics simulations. Part II. Stabilization by K^+ ions. RNA meeting 2003. Vienne – Autriche, 1-6 Juillet **2003**.

Résumés de réunions scientifiques :

R17. **AUFFINGER P.**, BORDONNE R., FAGEGALTIER D. et WALTER P. (1999) Compte rendu de la 4e réunion de la "RNA Society" Edimbourg (Ecosse) du 23 au 27 juin 1999. *Regards sur la biochimie*, (4), 18-23.

R18. **AUFFINGER P.**, BANROQUES J., BEHM-ANSMANT I., CAVAILLE J., CHAROLLAIS J. FELDEN B., FRUGIER M., JAEGER S., LESCOUTE A., MARGEOT A., MARTIN F., MOUGIN A., RIBET C., RYCKELYCK M. et SOHM B. (2003) Compte rendu de la 6e réunion de la "RNA Society" Vienne (Autriche) du 1 au 6 juin 2003. *Regards sur la biochimie*, *(sous presse)*.

Activités de recherche

*Dans la suite les références aux articles et revues dont je suis co-auteur seront respectivement notées **Pn** et **Rn** (voir liste de publications).*

Cadre général

Entre 1987 et 1991, j'ai effectué mon DEA et ma thèse de doctorat dans l'équipe de "Modélisation et Simulation Moléculaire" du Prof. Georges WIPFF au sein de l'URA422 dirigée par le Prof. Jean-Marie LEHN où je me suis intéressé à la dynamique, la solvatation et les propriétés de reconnaissance de cryptands de synthèse. Puis, de 1991 à 1993, j'ai gagné le laboratoire du Prof. David BEVERIDGE dans lequel j'ai abordé l'étude des acides nucléiques.

Ceci m'a permis de rejoindre en 1993 l'équipe du Prof. Eric WESTHOF au sein de l'UPR9002 dirigé par le Prof. Bernard EHRESMANN d'abord en tant que chercheur post-doctoral puis, en 1997, en tant que CR1 (CNRS). L'activité de cette équipe consiste essentiellement à développer une plate-forme intégrant différentes approches expérimentales et théoriques dans le but de mieux comprendre les règles structurales sous-jacentes au repliement tertiaire de l'ARN et aux phénomènes de reconnaissance associés. Une partie de ces approches théoriques comprend la construction et la modélisation tridimensionnelle d'ARN par des méthodes de modélisation moléculaire et infographiques (Westhof et al. 1996) sur la base de données de protection obtenues à l'aide de sondes chimiques et enzymatiques (fournies majoritairement par d'autres laboratoires et équipes), ainsi que sur la base de données obtenues par analyse comparative de séquences (Michel et Westhof 1990). Ceci a donné lieu au sein de l'équipe au développement d'un certain nombre de logiciels en bioinformatique (recherches de covariations) et de logiciels de manipulation de structures tridimensionnelles dédiés à l'ARN (Massire et Westhof 1998). A côté de ces aspects de modélisation, une activité de cristallogenèse de fragments d'ARN a conduit à la résolution de la structure d'un nonamère d'ARN à 0.98 Å (Masquida et al. 1999) et de divers complexes entre le site A ribosomique et des antibiotiques de la classe des aminoglycosides (Vicens et Westhof 2001; 2002; 2003).

Mon activité au sein de cette équipe consiste à explorer à l'aide des techniques de simulation de dynamique moléculaire (DM) les propriétés structurales et dynamiques de molécules d'ARN dans le but de mieux comprendre et de compléter les informations fragmentaires obtenues par d'autres approches théoriques et expérimentales.

Simulations de dynamique moléculaire d'ARN menées au sein de l'équipe d'Eric WESTHOF

Lorsque j'ai intégré l'équipe d'Eric WESTHOF en Septembre 1993 en tant que chercheur post-doctoral, les protocoles de simulation de DM existant conduisaient systématiquement à des résultats très insatisfaisant pour les ARN. Les premiers essais de simulation de DM entrepris au laboratoire (Rubin-Carrez 1992) avaient montré que ces protocoles de simulation ne permettaient pas d'obtenir de trajectoires stables pour les molécules d'ARN beaucoup plus sensibles au traitement des interactions électrostatique que celles d'ADN. Ces instabilités se manifestaient entre autres par la désagrégation rapide (< 50 ps) d'un certain nombre de contacts tertiaires essentiels au maintien de ces structures alors que des données RMN indiquent que la stabilité de ces interactions est de l'ordre de la micro voire de la milliseconde. Une étude plus approfondie a révélé que des erreurs associées à la troncature des interactions électrostatiques, telles que celles mises en évidence au cours de mon stage post-doctoral à partir d'études menées sur d'autres systèmes (***P5-1995*** et ***R3-1997***), apparaissaient dans ces simulations.

Les priorités de recherche étaient donc clairement définies : *(i)* mettre au point un protocole de simulation minimisant les artefacts évoqués plus haut et permettant d'obtenir des trajectoires stables de DM d'ARN ; *(ii)* développer des tests permettant de vérifier la qualité des simulations générées à l'aide de ces nouveaux protocoles. Il était prioritaire d'atteindre ces objectifs avant de pouvoir envisager des études d'intérêt biochimique plus large.

De manière plus générale, mes activités de recherche au sein de l'équipe d'Eric WESTHOF au cours de ces 10 dernières années, d'abord en tant que chercheur post-doctoral puis CR1 (depuis 1997), se sont articulés autour de quatre thèmes majeurs : *(i)* développements méthodologiques ; *(ii)* aspects conformationnels ; *(iii)* hydratation des acides nucléiques ; *(iv)* interactions entre ARN et ions.

Aspects méthodologiques

De ce qui précède, il apparaît que la mise au point de simulations réalistes de systèmes biologiques requiert des développements méthodologiques constants. En effet, il existe une corrélation très forte entre le niveau de description utilisé pour calculer les forces interatomiques et la qualité de la simulation produite. Cette corrélation s'exprime par une dérive au cours du temps des propriétés du système théorique par rapport à celles du système réel. Il est donc important de systématiquement repérer les points faibles des simulations en vue de trouver des solutions réalistes permettant d'améliorer leur degré de fiabilité. En parallèle, il est également essentiel de mettre au point des méthodes de validation des protocoles utilisés. Ces différents aspects méthodologiques sont abordés dans les revues suivantes : ***R2-1996, R5-1998, R15-2004*** et ***R16-(en préparation)***.

Validation des protocoles de simulations :
Utilisation du caractère stochastique des trajectoires de dynamique moléculaire

Dans le but d'estimer la qualité de nos protocoles, j'ai développé une approche utilisant le caractère stochastique des simulations de DM. La nature chaotique de ces simulations se manifeste par une très forte dépendance vis-à-vis des conditions initiales. Le simple fait de modifier, même de manière infinitésimale, les conditions de départ conduit rapidement à produire des trajectoires

complètement décorrélées les unes des autres. Cette propriété a été utilisé pour produire un ensemble de plusieurs trajectoires indépendantes, toutes issues de la même structure cristallographique du bras de l'anticodon de l'ARNt^{Asp} (Westhof et al. 1985). La divergence très forte des écarts quadratiques moyens (RMS par rapport à la structure de référence) en fonction du temps d'un ensemble de trajectoires **(Fig. 1, haut)** a été directement reliée à la non prise en compte des interactions électrostatiques à longue distance. Par la suite, nous avons pu montrer que l'écart entre différentes trajectoires produites à partir d'un même protocole se réduisait considérablement en fonction de la précision avec laquelle les interactions électrostatiques à longue distance étaient évaluées ***(P6 & P7-1995, R2-1996)***.

Cette stratégie originale de simulations multiples permet ainsi (i) de tester la stabilité des trajectoires générées sur une base statistique en comparant leurs déviations respectives par rapport à la structure initiale et (ii) d'effectuer un échantillonnage de l'espace conformationnel "théorique" basé sur un ensemble de trajectoires de DM plutôt que sur une trajectoire unique.

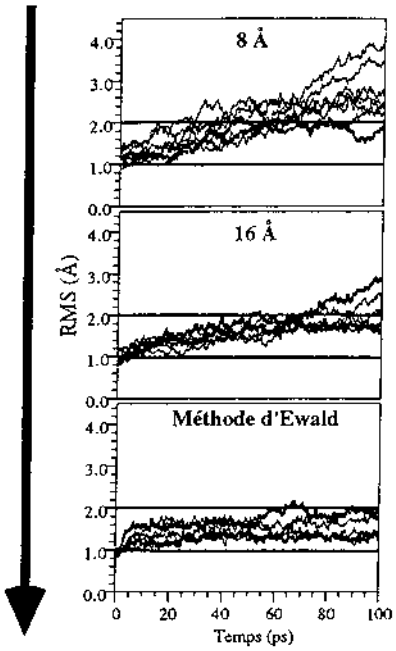

Fig. 1 : Déviations quadratique moyennes (RMS) calculées pour un ensemble de trajectoires ***(R2-1996)*** utilisant une distance de troncature de 8 Å (haut), de 16 Å (milieu) et la méthode d'Ewald (bas).

Traitement des interactions électrostatiques :
La méthode d'Ewald

Comme les trajectoires obtenues en utilisant des distances de troncature de 8 Å ne présentaient pas les critères de stabilité requis **(Fig. 1, haut)**, nous avons augmenté (de 8 à 16 Å) la distance de troncature associée aux interactions électrostatiques faisant intervenir le solvant ***(P7-1996)***. L'augmentation de ce paramètre a nécessité un investissement informatique important (le temps de calcul a quadruplé). Toutefois, cet investissement s'est révélé utile puisque l'inclusion dans le calcul de ces interactions électrostatiques a permis de réduire significativement les écarts quadratiques moyens calculés entre les six trajectoires de 100 ps produites au cours de cette étude **(Fig. 1, milieu)**. Il apparaît donc que ces interactions à longue distance, qui prises une à une sont très faibles, exercent collectivement un fort effet coopératif. Il a été montré que cet effet coopératif joue un rôle essentiel dans la préservation de la structure tertiaire du fragment d'ARNt étudié ***(P7-1996)***.

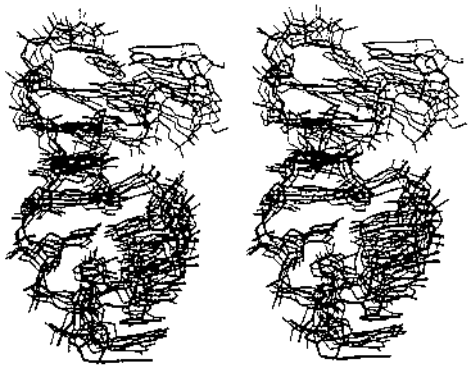

Fig. 2 : Vue stéréoscopique d'une superposition des structures finales issues de six simulations de 500 ps du bras de l'ARNt^{Asp} obtenues en utilisant la méthode d'Ewald ***(P9-1996)***.

Toutefois, malgré les gains très nets en stabilité observés avec l'augmentation de ces distances de troncature, les trajectoires générées présentaient encore quelques signes de divergence **(Fig. 1, milieu)** nécessitant la poursuite des investigations méthodologiques. Nous avons cette fois-ci utilisé la méthode d'Ewald qui permet une évaluation de toutes les interactions électrostatiques à longue distance en évitant les problèmes de troncature. Ces

méthodes de calcul permettent d'estimer les interactions électrostatiques entre une particule et toutes ses images dans un réseau périodique. Elles ont été développées à l'origine pour calculer les constantes de Madelung dans des cristaux ioniques (Ewald 1921) et ont été très récemment introduites dans le domaine de la simulation des macromolécules biologiques (Pearlman et al. 1995; Sagui et Darden 1999). A nouveau, nous avons observé un gain significatif de stabilité pour un ensemble de six trajectoires de 100 ps ***(R2-1996)*** avec, cette fois-ci, une absence totale de dérive vers des valeurs élevées des écarts quadratique moyens **(voir Fig. 1, bas).** Par conséquent, nous avons décidé d'étendre la durée de chacune de ces simulations à 500 ps, générant ainsi un total de 3 ns de DM pour cette tige-boucle ***(P9-1996)***. L'utilisation d'une stratégie de DM multiple a ainsi conduit à la caractérisation de micro-états conformationnels mettant en évidence la complexité dynamique de ces systèmes **(Fig. 2)**.

Aspects conformationnels

Les avancées méthodologiques évoquées précédemment ont permis d'atteindre une résolution dynamique tout à fait satisfaisante ce qui a conduit à la caractérisation précise d'un certains nombre d'aspects conformationnels jouant un rôle fondamental dans la structure des ARN. Parmi ceux-ci, on trouve : *(i)* les liaisons C-H…O/N ; *(ii)* l'orientation des groupements 2'-OH des riboses ; *(iii)* l'étude des interactions triples présentes au cœur des ARN de transfert ; *(iv)* une analyse de la distribution des nucléotides modifiées ; (v) une caractérisation des liaisons bifurquées dans les ARN (vi) et finalement une signature structurale et phylogénétique exhaustive de la boucle de l'anticodon des ARNt intégrant l'ensemble des points évoqués plus haut. Par ailleurs, les aspects conformationnels et dynamiques des ARN sont détaillés dans les revues suivantes : ***R1-1996, R5 & R8-1998, R10-1999, R11-2000*** et ***R13-2001.***

Importance des interactions faibles dans le maintien de la structure tertiaire d'ARN :
Rôle structural des liaisons C-H…O

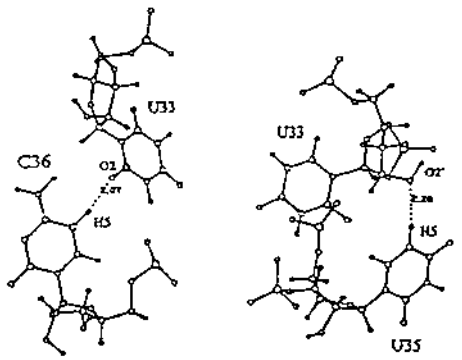

Fig. 3 : Deux liaisons C-H…O observées dans la structure cristallographique de l'ARNt^{Asp} au niveau de la boucle de l'anticodon ***(P7-1996)***.

En 1995, l'existence d'interactions faibles du type C-H…O/N était encore sujette à de très vives controverses (Desiraju 1991), en particulier en ce qui concerne les systèmes biologiques. Des simulations de DM ont permis de suggérer la présence de telles interactions au sein de la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Asp} ***(P7 & P9-1996)***. Ces liaisons C-H...O, déjà observables dans les structures cristallographiques d'ARNt^{Asp} existantes, n'avaient pas été décrites dans la littérature les concernant **(Fig. 3)**. Par la suite, de nombreuses structures cristallographiques d'acides nucléiques et de protéines, dont certaines obtenues à très haute résolution, ont confirmé l'existence de ce type d'interactions qui ont fait l'objet d'une monographie récente (Desiraju et Steiner 1999) dans laquelle il est fortement suggéré qu'elles contribuent significativement au maintien de la structure de la majorité des systèmes biochimiques connus. Par ailleurs, il a été proposé qu'elles jouent un rôle important au sein de certains centres catalytiques (Derewenda et al. 1994) et sont impliquées dans divers phénomènes de reconnaissance (Engh et al. 1996; Klaholz et Moras 2002).

Ces travaux ont débouché sur la prise en compte des liaisons C-H…O/N dans la classification systématique des différents modes d'interaction possibles entre nucléotides entreprise au laboratoire (Leontis et al. 2002; Leontis et Westhof 1998b; 2001). Il est maintenant admis que ces liaisons doivent être prises en compte dans la construction de modèles tridimensionnels et l'évaluation de structures cristallographiques.

Préférences conformationnelles des riboses :
Orientation des groupements 2'-OH

Les groupements 2'-OH sont les principaux éléments structuraux permettant de différencier les ARN des ADN et sont responsables (avec les modifications des U en T) des propriétés particulières associées aux molécules d'ARN (repliement tridimensionnel compact, activités catalytiques, …). Il est connu que la présence de ce groupement hydroxyle conduit à une stabilisation préférentielle du plissement C3'-*endo* du sucre (ARN) par rapport au plissement C2'-*endo* (ADN). Mais ces groupements sont également impliqués dans certains contextes dans des interactions internucléotides. De ce fait, il est essentiel d'étudier leurs propriétés conformationnelles.

Comme aucune méthode expérimentale (cristallographie et RMN) ne permet à ce jour de caractériser avec précision les orientations adoptées par ce groupement, il a été pendant longtemps supposé (Saenger 1984) que les groupements 2'-OH sont impliqués dans la stabilisation de structures hélicales par l'intermédiaire de liaisons O2'-H*(n)*...O4'*(n+1)*. Autrement dit, le groupement 2'-OH interagit avec l'oxygène cyclique O4' du sucre suivant. Cette hypothèse a été infirmée par nos simulations ***(P11-1997)*** qui ont montré que ces groupements peuvent adopter préférentiellement trois types d'orientations lorsque le sucre est dans sa conformation C3'-*endo* **(Fig. 4)**. Sur la base de ces résultats, il a été particulièrement surprenant de constater que le groupement 2'-OH

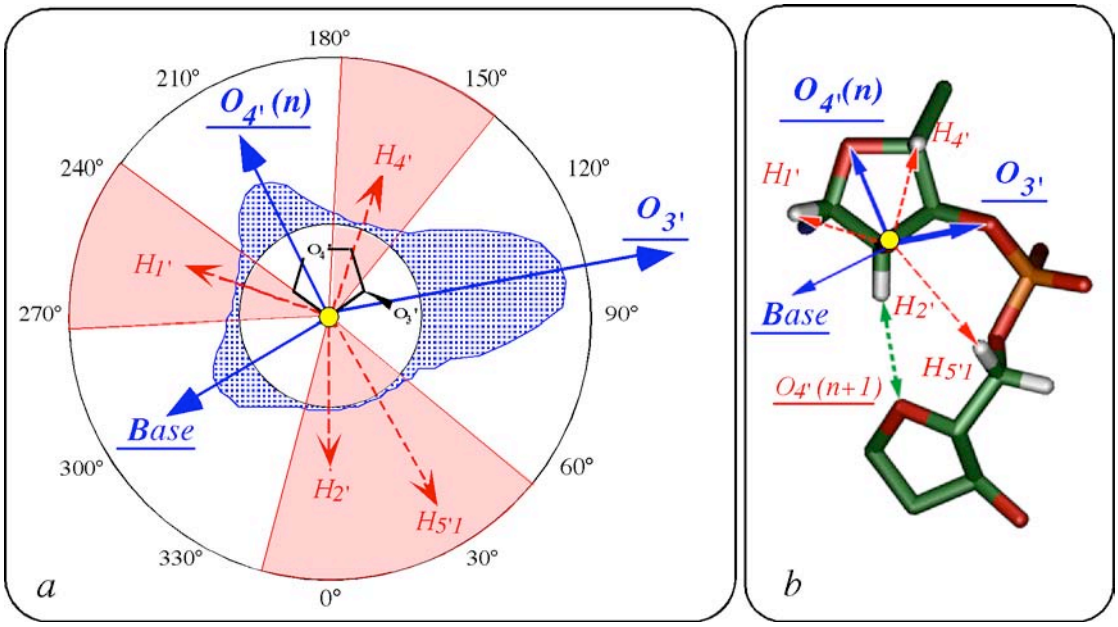

Fig. 4 : **(a)** Représentation des trois orientations possibles (flèches bleues) et des trois orientations interdites (flèches rouges) du groupement hydroxyle d'un ribose dans sa conformation C3'-*endo*. L'axe C2'-O2' est perpendiculaire au plan de la feuille (pastille jaune). La surface bleue correspond à la probabilité de trouver le groupement 2'-OH dans une orientation donnée. Les quadrants rouges correspondent aux orientations très rarement adoptées par ce groupe hydroxyle. **(b)** Représentation d'un fragment d'un squelette d'ARN dans la conformation préférentiellement adoptée dans les parties hélicoïdales. Les deux sucres sont dans la conformation C3'-*endo* et l'axe C2'-O2' est perpendiculaire au plan de la feuille (pastille jaune). Dans cette conformation, c'est le groupement C2'-H (plutôt que O2'-H) qui peut établir une liaison C-H…O avec l'atome O4' du ribose en 3' ***(P11-1997)***.

n'adopte que très rarement une orientation lui permettant d'établir une interaction intrahélicale du type O2'-H*(n)*...O4'*(n+1)*. Plusieurs raisons conduisent probablement à ce phénomène. La plus importante est reliée au fait que les interactions O2'-H*(n)*...O4'*(n+1)* entrent en compétition avec d'autres interactions impliquant le groupement hydroxyle et les atomes hydrophiles proches. Il apparaît donc que le groupement 2'-OH préfère interagir avec des groupements accepteurs forts (p.e. : Ow) plutôt qu'avec des groupements accepteurs faibles (O4' du ribose *n+1*). Il est à noter que les simulations de DM sont parmi les seules techniques disponibles permettant d'estimer la résultante des contributions enthalpiques et entropiques (en solution aqueuse) conduisant à cet équilibre de forces.

Ces simulations ont permis de proposer des règles conduisant à la description d'un espace conformationnel réduit permettant de décrire la structure des molécules d'ARN. Ce travail s'insère dans le cadre des travaux entrepris au laboratoire visant à proposer des règles permettant de conceptualiser l'ensemble des interactions possibles entre nucléotides (Leontis et al. 2002; Leontis et Westhof 1998b; 2001) sur la base d'une analyse exhaustive des structures cristallographiques existantes. Toutefois, l'analyse des propriétés conformationnelles des groupements 2'-OH n'est actuellement envisageable qu'à l'aide de simulations de DM. Les règles qui ont été proposées sont comparables aux cartes délimitant l'espace conformationnel des aminoacides établies par Ramachandran. Ce travail a ainsi fait l'objet d'un article de revue paru dans un livre publié en l'honneur de ce dernier ***(R10-1999)***.

Stabilité d'architectures tertiaires complexes :
Dynamique moléculaire de l'ARNt^{Asp} de levure

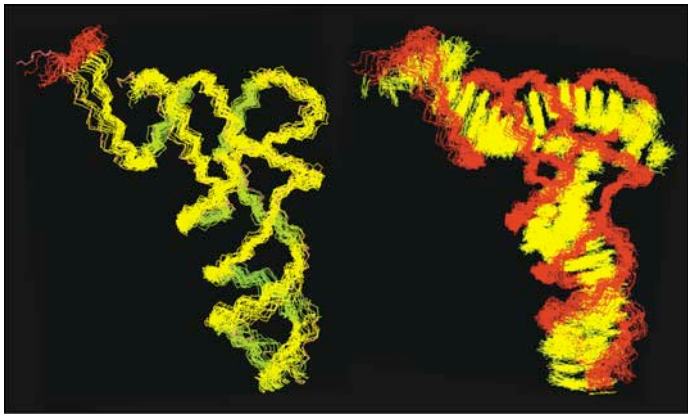

Fig. 5 : Vues cumulées de structures extraites d'une simulation de 500 ps de l'ARNt^{Asp} de levure ***(P15-1999)***.

Après avoir validé nos protocoles de simulations sur un fragment de l'ARNt^{Asp} (la boucle de l'anticodon), il nous a semblé approprié de les tester sur une molécule de grande taille : l'ARNt^{Asp} dans son intégralité ***(P15-1999)***. Le système simulé comprenait les 75 nucléotides de l'ARN de transfert ainsi que 8055 molécules d'eau et 74 contre-ions NH_4^+ **(Fig. 5)**. La trajectoire totalisait 500 ps et la méthode d'Ewald a été utilisée pour calculer les interactions électrostatiques à longue distance. Cette simulation représentait au moment de sa réalisation un record au niveau de la taille du système et de la longueur de la trajectoire. A ce jour, aucune simulation concernant des molécules d'acides nucléiques de taille supérieure et tenant compte explicitement du solvant n'a été publiée. Mis à part les aspects méthodologiques de cette étude, un certain nombre de points relatifs à la stabilité des architectures complexes adoptées par ces ARN en solution ont pu être abordés. On peut citer : *(i)* la stabilité des interactions tertiaires et des interactions triples localisées dans le cœur de cet ARN de transfert ; *(ii)* les effets structuraux induits par l'absence d'ions Mg^{2+} dans notre modèle. D'autres aspects relatifs à la stabilité d'interactions tertiaires et au rôles structuraux d'ions Mg^{2+} ont été décrits dans deux publications concernant le ribozyme à tête de marteau ***(P12-1997, P12-1998)***.

Cette publication représente une étape importante dans le développement de simulations de DM d'acides nucléiques. Toutefois, une étude récente a suggéré que le résidu A46 participant à une interaction triple située dans le cœur de cet ARN serait protoné (Csaszar et al. 2001) ce qui n'a pas été pris en compte dans ce modèle mais devra bien évidemment être inclus dans les suivants.

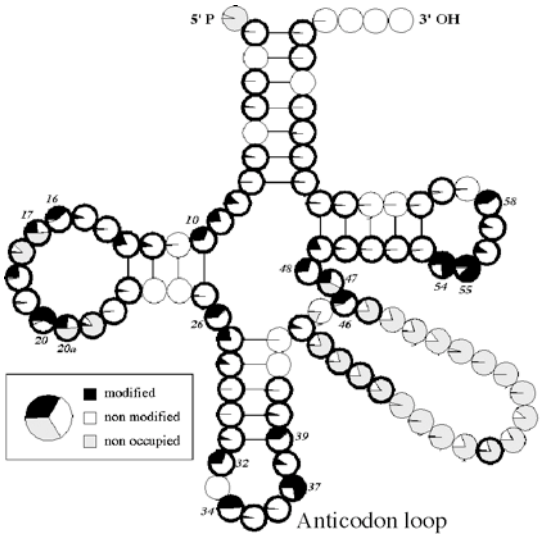

Fig 6 : Distribution des nucléotides modifiés et non modifiés des ARNt à partir d'une compilation de 548 séquences ***(R7-1998)***.

Les nucléotides modifiés dans les ARN :
Une classification systématique

La structure et la fonction des ARN de transfert et d'une large majorité d'autres ARN sont associées à la présence de bases modifiées en des positions clés de ces molécules (Grosjean et Benne 1998). Ces bases modifiées ont bien évidemment été incluses dans les simulations des différents fragments d'ARNt^{Asp} que nous avons entreprises. Ceci nous a conduit à confronter nos résultats de DM concernant les pseudouridines (une des modifications les plus fréquemment observée) avec les données biochimiques, phylogénétiques et structurales disponibles dans la littérature ***(R6-1998)***.

Par ailleurs, une compilation **(Fig. 6)** *précisant les types de modifications apparaissant en différentes positions des ARN de transfert a été réalisée* ***(R7-1998)****. Cette compilation servira de base à de futurs travaux concernant les rôles des nucléotides modifiées.*

Rôles des interactions bifurquées :
L'interaction 32•38 au sein de la boucle de l'anticodon

L'ensemble des simulations de la boucle de l'anticodon qui ont été entreprises a révélé que les bases 32 et 38 qui, respectivement commence et termine la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Asp}, interagissent par l'intermédiaire d'une liaison bifurquée **(Fig. 7)**. Comme il était généralement admis que les appariements entre bases nécessitent au minimum deux liaisons hydrogène fortes pour être stables (cette hypothèse trouvait principalement son origine dans le faible nombre de structures tertiaires existantes et par conséquent dans l'absence de données statistiques concernant les appariements impliquant une liaison hydrogène unique) ce résultat était particulièrement intriguant et nous a incité à étudier cette interaction sur la base de l'ensemble des données phylogénétiques et structurales existantes ***(P16-1999)***.

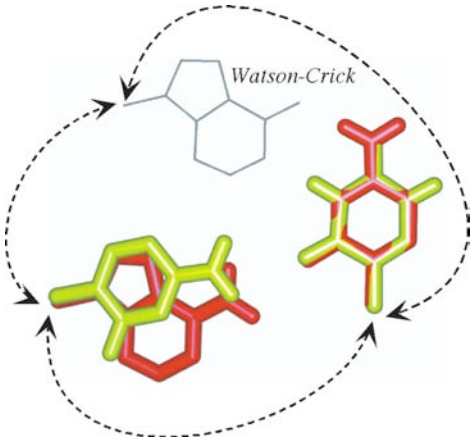

Fig. 7 : Superposition d'un appariement C32•A38 (ARNt^{Phe}, en rouge), Ψ32•C38 (ARNt^{Asp}, en jaune) et A-U (Watson-Crick) ***(P16-1999)***.

Il a été montré que des appariements du type C•A, U•U et U•A pouvaient être isostériques (autrement dit, les liaisons glycosidiques des deux bases sont superposables) à l'appariement U•C (ou Ψ32•C38) présent dans la boucle de l'anticodon de

l'ARNt^{Asp} **(voir Fig. 7 et 8 panneau 2)**, ce qui a permis d'étendre notre compréhension des éléments intervenant dans la structuration de cet élément fonctionnel majeur.

Cette étude a conduit à proposer que dans la majorité des cas, un appariement non-Watson-Crick était présent en début de boucle (ou en fin de tige) quel que soit le motif d'ARN considéré (les motifs faisant exception à cette règle devant être considérés comme exceptionnels). Par ailleurs, il est apparu que les appariements entre deux résidus A et U en fin de tige n'étaient pas forcément du type Watson-Crick mais pouvaient adopter une conformation particulière **(voir Fig. 8 panneau 2)** *propre à initier le tournant de la boucle.*

Caractérisation de motifs d'ARN :
La boucle de l'anticodon des ARN de transfert

La caractérisation d'éléments structuraux conservés (motifs) à l'intérieur de molécules d'ARN se trouve au cœur des préoccupations de l'équipe (Leontis et Westhof 1998a; 2002; Westhof et Fritsch 2000; Westhof et al. 1996). Dans cette étude ***(P19-2001)***, les différents éléments conservés (de nature phylogénétiques et structuraux) spécifiques à la boucle de l'anticodon des ARNt ont été regroupés de manière à proposer une signature cohérente de ce motif **(Fig. 8)**. Cette signature intègre à la fois des conservations de séquence (uridine en position 33, pyrimidine en position 32, …), des conservations d'interactions tertiaires connues (U-turn, …) et des interactions tertiaires mises en évidence précédemment par nos travaux tel que l'appariement conservé entre les bases 32

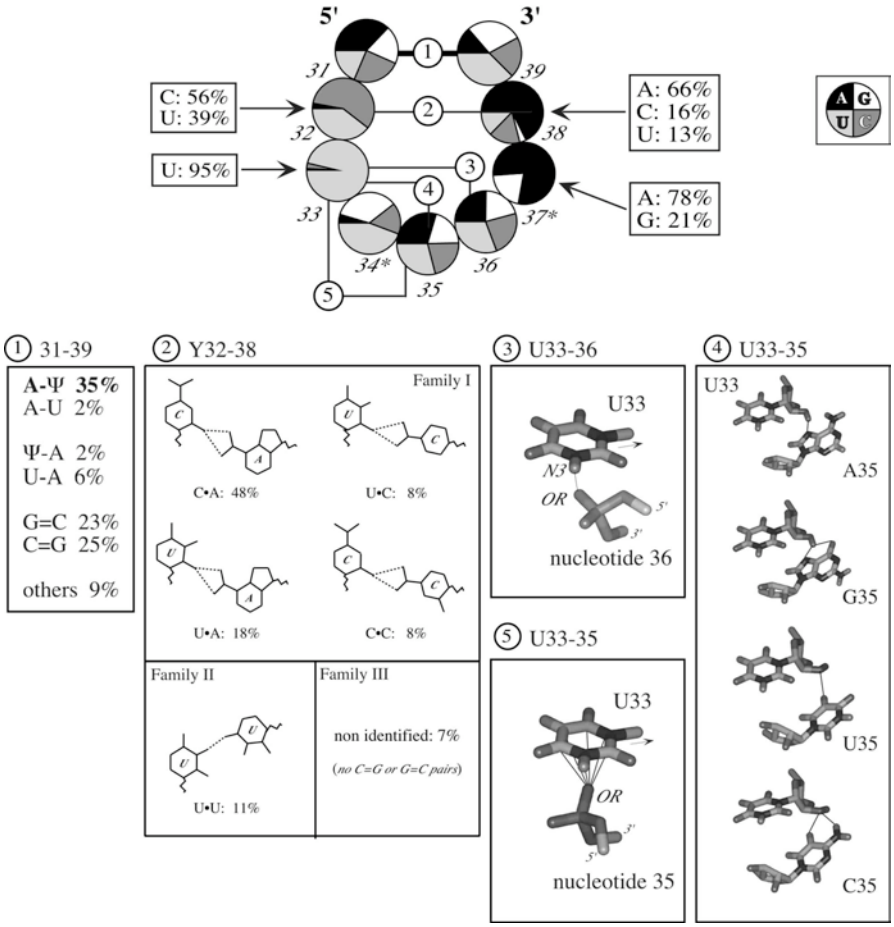

Fig. 8 : Signature phylogénétique et structurale de la boucle de l'anticodon (ARNt) incluant une interaction conservée et non-spécifique entre U33 et le nucléotide en position 35 ***(P19-2001)***.

et 38 ***(P16-1999)***. Un nouvel élément a été ajouté à ceux déjà répertoriés. Il s'agit d'une interaction non-spécifique entre le groupement 2'-OH de l'uridine 33 et la base centrale de l'anticodon (position 35). Cette interaction est non-spécifique puisqu'elle utilise alternativement le caractère accepteur et donneur du groupement 2'-OH pour établir soit *(i)* une liaison O2'-H…N7 avec une purine en position 35, soit *(ii)* une liaison O2'…H-C5 avec une pyrimidine en position 35 **(Fig. 8 panneau 4)**. L'existence d'une interaction non spécifique à ce niveau de la boucle est rendue nécessaire par le fait que la position médiane de l'anticodon doit accommoder approximativement 25% de chacune des quatre bases. De telles interactions non-spécifiques sont particulièrement rares (mais nécessaires) au sein de systèmes biologiques.

Hydratation

Sur la base de nombreuses études biophysiques, il a été établi que l'eau joue un rôle structurant essentiel dans les systèmes biologiques en général et dans les acides nucléiques en particulier en interagissant de manière spécifique avec les sites hydrophiles de ces derniers (Westhof 1988; 1990; Westhof et Beveridge 1990). Les simulations de DM ont également démontré que la prise en compte du solvant dans les modèles d'acides nucléiques en solution était essentielle pour maintenir la structure tertiaire de ces molécules. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux modèles tenant compte de manière "explicite" des effets de solvant. Dans la suite, un certain nombre de points relatifs à l'hydratation des ARN et des biomolécules en général vont être évoqués : *(i)* l'effet structurant des interactions à longue distance ; *(ii)* l'hydratation des groupements C-H ; *(iii)* l'hydratation de certains sites hydrophiles de molécules d'ARN ; *(iv)* l'hydratation d'appariements Watson-Crick appartenant à des hélices d'ARN et d'ADN ; *(v)* l'hydratation de structures contenant des nucléotides modifiés ; et *(vi)* le rôle de l'eau dans les processus de fusion d'hélices. Cet aspect de mes recherches a donné lieu à la rédaction de trois articles de revue : ***R9-1999, R12-2000*** et ***R14-2002***.

Effets structurants des interactions à longue distance faisant intervenir le solvant :
Importance des forces d'hydratation

Il a été montré plus haut que l'inclusion d'interactions électrostatiques à longue distance dans les simulations de DM permettait d'accroître considérablement la stabilité de la trajectoire générée **(Fig. 1)**. Ceci a permis de démontrer l'importance des interactions, faisant intervenir le solvant, dans le maintien des structures tertiaires. Sur la base de ces résultats, nous avons suggéré que les interactions à longue distance impliquant le solvant, autrement dit les forces d'hydratation (Israelachvili et Wennerström 1996; Leckband et Israelachvili 2001), exercent un rôle important dans les phénomènes de repliement de macromolécules biologiques ainsi que dans les phénomènes de reconnaissance moléculaire ***(P7-1996)***. L'omission de ces interactions, en modifiant de façon subtile l'équilibre entre les forces hydrophiles et hydrophobes assurant le repliement de ces ARN, conduit à la déstabilisation de leur structure tertiaire.

Hydratation des groupements C-H :
Caractérisation de liaisons C-H...Ow

L'existence et la stabilité de liaisons C-H...Ow ont été discutées à partir de l'analyse de six trajectoires de 500 ps du bras de l'anticodon de l'ARNt^{Asp} ainsi que d'une trajectoire de 500 ps de l'ARNt^{Asp} dans son intégralité ***(P8-1996)***. Nous avons montré que certaines molécules d'eau établissent des ponts entre des atomes OR de groupements phosphate adjacents ainsi que des contacts de longue durée avec des atomes H3' des sucres et H5 des bases pyrimidiques **(Fig. 9)**. Le comportement hydrophile de certains groupes C5-H a été noté, en accord avec leur caractère légèrement acide déterminé par remplacement isotopique H/D. Des interactions C-H...Ow du même type que celles décrites précédemment, et qui n'avaient pas été relevées dans la littérature concernant les acides nucléiques, ont ensuite été mises en évidence dans certaines structures cristallographiques extraites de la Nucleic acid DataBase (NDB, Berman et al. 1992), confirmant les conclusions de nos simulations.

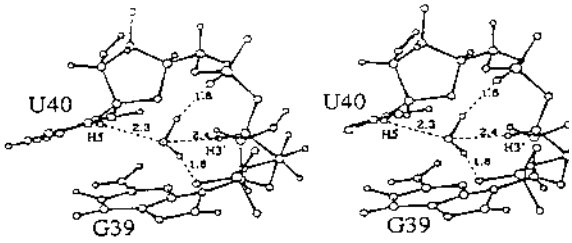

Fig. 9 : Vue stéréoscopique montrant une molécule d'eau pontant deux oxygènes anioniques OR ayant un temps de résidence élevé ***(P8-1996)***.

Hydratation des sites hydrophiles du bras de l'anticodon de l'ARNt^{Asp} :
Temps de résidence de molécules d'eau

Un des grands intérêts des méthodes de simulation de DM est de pouvoir fournir une vue détaillée de l'hydratation de ces macromolécules pour lesquelles il n'existe que des informations expérimentales fragmentaires (Westhof et al. 1988). A côté de l'étude de l'hydratation des groupements C-H décrite plus haut, une analyse de l'hydratation des groupements hydrophiles du bras de l'anticodon a été effectuée ***(P10-1997)***. De nombreuses molécules d'eau possédant des temps de résidence supérieurs à 500 ps et intervenant dans la stabilisation d'interactions tertiaires ont été mises en évidence **(Fig. 10)**. Les réseaux de molécules d'eau les plus stables ont été observés autour de deux bases modifiées, la pseudouridine 32 (Ψ32) et la 1-méthylguanine 37 (m^1G37). Ce résultat suggère fortement qu'un des rôles de certains nucléotides modifiés est de contribuer à la stabilisation de ces ARN par une forte structuration de leur couche d'hydratation. Par ailleurs, les temps de résidence des molécules d'eau en contact direct avec les groupements hydroxyles des riboses sont très faibles. Cela implique que les molécules d'eau interagissant avec les groupements hydroxyles peuvent être facilement déplacées rendant ainsi les groupes 2'-OH disponibles pour l'établissement d'interactions tertiaires ARN/ARN et ARN/protéines ***(P11-1997)***, telles que celles observées dans la structure cristallographique d'un fragment d'un intron catalytique du groupe I (Cate et al. 1996) ou de structures cristallographiques de complexes ARNt/synthétase.

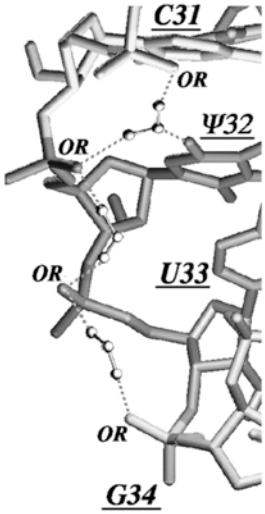

Fig. 10 : Molécules d'eau pontant des oxygènes anioniques et ayant des temps de résidence estimés supérieurs à 500 ps ***(P10-1997)***.

D'une manière générale, nos simulations confirment que les molécules d'eau constituent une partie intégrante de la structure des ARN et démontrent que les deux parties (ARN et eau) forment ensemble l'unité structurale fonctionnelle. La mise en évidence de motifs récurrents d'hydratation pourrait fort bien avoir des répercussions

importantes au niveau de la construction de modèles tridimensionnels. Par ailleurs, ces simulations permettent de différencier entre deux types d'hydratation : (i) celui, relativement labile, associé à des molécules d'eau ayant des temps de résidence courts (<100 ps) ; et (ii) celui associé à des molécules d'eau ayant des temps de résidence élevés.

Solvatation d'appariements Watson-Crick :
Etude de systèmes modèles

Mis à part l'intérêt évident d'étudier des molécules biologiquement actives, un certain nombre d'aspects relatifs à la structure et à la solvatation de molécules d'ARN peuvent être abordé avec bien plus de pertinence et de fiabilité à travers l'étude de systèmes modèles. Des simulations de double-hélices régulières d'ARN du type $r(CpG)_{12}$ et $r(UpA)_{12}$ ont ainsi été entreprises avec pour but de rassembler des données statistiquement significatives concernant les appariements Watson-Crick C=G et U-A ***(P17-2000, P18-2001)***. Les sites d'hydratation entourant les appariements Watson-Crick **(Fig. 11)** ont ainsi pu être caractérisés avec précision et sont en bon accord avec ceux dérivés d'une étude statistique de structures cristallographiques d'ARN à haute résolution ***(P14-1998)***. Par ailleurs, la dynamique des molécules présentes dans la première couche de solvatation a été caractérisée. Les molécules d'eau les plus fortement liées sont attachées aux groupements phosphates et présentent des temps de résidence supérieur à 700 ps. D'autres atomes d'ARN tels que les groupements hydroxyles n'établissent pas de liaisons de longue durées (<100 ps) avec les molécules de solvant. A partir de ces données, il devient possible de classer les sites d'hydratation calculés en fonction des temps de résidence des molécules d'eau associées.

Ces résultats peuvent être extrapolés aux sites d'hydratation observés par cristallographie pour lesquels il n'est pas possible de distinguer les sites associés à des molécules d'eau forte-

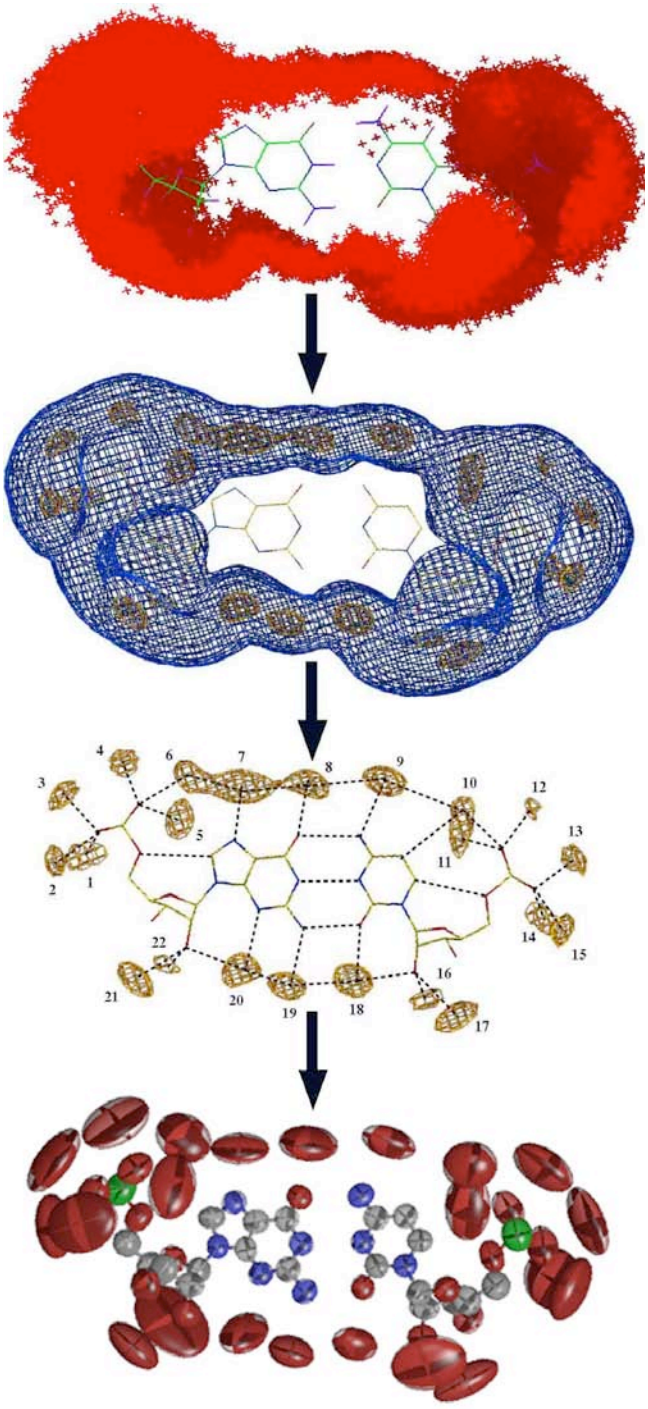

Fig. 11 : Différentes représentations de la couche de solvatation d'un appariement r(C=G) calculée par DM ***(R12-2000, R14-2002)***

ment liées ou à des molécules d'eau plus labiles. De tels résultats devraient permettre de mieux comprendre les phénomènes d'association puisque toute interaction directe entre deux molécules implique le déplacement de molécules d'eau situées à l'interface. Par ailleurs, il est observé que peu de différences existent entre les propriétés dynamiques des molécules de solvant associées aux appariements r(C=G) et r(U-A). Par contre des différences apparaissent nettement lorsque l'on compare les séquences équivalentes d'ADN qui ont été incluses dans ces études.

Nucléotides modifiés : les pseudouridines (Ψ)
Un complexe nucléotide/eau

Certaines de nos simulations ont permis de cerner quelques rôles structuraux associés à la présence de pseudouridines qui sont les modifications apparaissant les plus fréquemment dans les ARN de transfert. Il a ainsi pu être montré que ces dernières modifications sont utilisées pour stabiliser des régions fragilisées d'ARN, telles que des jonctions tige-boucle, en fixant leur couche d'hydratation **(Fig. 12)**. Bien que ceci semble être un rôle majeur de ces pseudouridines, d'autres fonctionnalités ne sont sans doute pas à exclure. Toutes les informations relatives au rôles des pseudouridines dans les ARN de transfert ont été regroupées dans une revue ***(R6-1998)***.

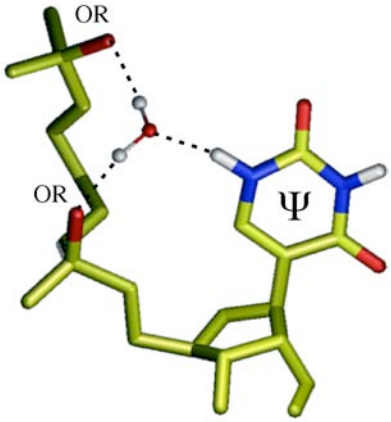

Fig. 12 : Une molécule d'eau piégée entre la base et les groupements phosphates participe à la formation d'un complexe nucléotide/eau ***(R12-2000)***.

Nucléotides modifiés : les riboses méthylés (Nm)
L'addition de groupements hydrophobes peut stabiliser la couche d'hydratation d'un ARN

La structure et la fonction de la majorité des ARN, incluant les ARN de transfert et les ARN ribosomaux, sont fortement liés à la présence de nucléotides modifiés en des positions clés de ces molécules. Toutefois, les fonctions associées à ces nucléotides modifiés sont encore mal connues (Grosjean et Benne 1998).

A côté des pseudouridines décrites plus haut, on trouve les nucléotides méthylés en position 2' du ribose (ou Nm). Leur rôle biologique n'est pas encore bien connu. Il a toutefois été établi que certains enzymes de modifications appartiennent à la classe des "heat shock proteins" (Bügl et al. 2000). Ces nucléotides semblent donc constituer un élément de réponse aux agressions, ce qui peut s'expliquer de deux manières (non exclusives) : *(i)* elles peuvent augmenter la capacité de résistances des ARN modifiés aux enzymes de dégradation ; *(ii)* elles peuvent augmenter la stabilité thermique de ces ARN. Ce dernier point est confirmé par le fait que ces modifications sont extrêmement fréquentes dans les organismes thermophiles (Bügl et al. 2000). Par ailleurs, il est établi que la température de fusion des ARN modifiés est significativement plus élevée que celles des ARN natifs.

Pour essayer de comprendre ce surcroît de stabilité, des simulations d'une séquence entièrement méthylée d'ARN : $r(CmpGm)_{12}$ ont été effectuées ***(P20-2001)*** sur la base de celles décrites précédemment ***(P17-2000)***. Ces simulations ont montré que, contrairement à l'hypothèse communément admise, les méthylations ne stabilisent pas l'ARN par l'intermédiaire d'une rigidification des riboses puisque les structures moyennes de l'ARN modifié et natif sont similaires, mais par l'intermédiaire d'une stabilisation de la couche d'hydratation en contact avec les deux sillons. En

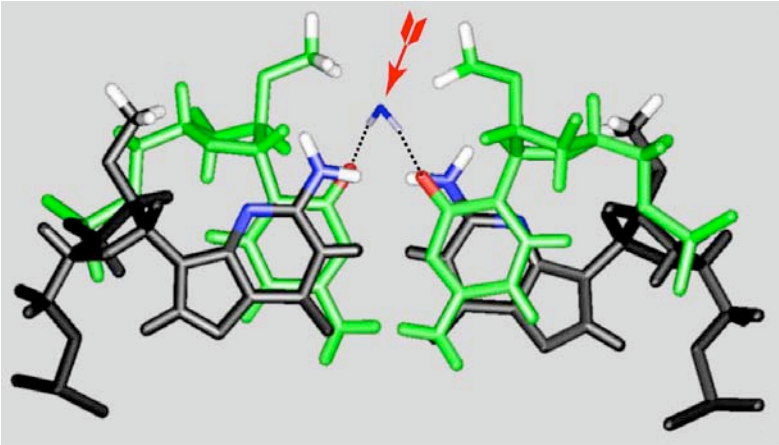

Fig. 13 : Molécule d'eau présentant des temps de résidence élevés (> 1 ns) et piégée dans une poche délimitée par deux groupements méthyles ***(P20-2001)***.

effet, l'addition de groupements méthyles contribue à la création de poches d'hydratation du côté du sillon peu profond **(Fig. 13)** et à la capture de molécules d'eau présentant des temps de résidence élevés. Ce résultat inattendu permet de décrire une situation apparemment paradoxale : *l'addition de groupement hydrophobe stabilise la structure de la couche d'hydratation de ces ARN*. En fait, on n'est pas ici en présence d'un effet strictement hydrophobe mais d'une combinaison complexe d'effets hydrophobe, hydrophile et stérique qui induisent l'effet observé.

Ces résultats montrent que les simulations de DM peuvent être utilisées avec succès pour caractériser des processus structuraux et dynamiques encore inobservables par les techniques expérimentales actuellement disponibles. Elles permettent également d'appréhender des effets complexes qui peuvent difficilement être interprétés à l'aide des techniques expérimentales classiques.

Fusion d'ARN "in silico" :
Le rôle du solvant

L'étude du repliement des ARN est une thématique de première importance. Une étape essentielle sera atteinte lorsque l'on sera capable de simuler et donc de comprendre au niveau atomique des phénomènes simples tels que le repliement d'une tige boucle ou l'association de deux simples brins. Dans un premier temps, plutôt que de simuler de tels processus, nous avons abordé certains aspects des phénomènes biophysiques sous tendant la fusion d'ARN. Pour cela, des simulations de DM de l'hélice modèle $r(CpG)_{12}$ ont été menées à trois températures : 5°C, 25°C et 37°C ***(P21-2002)***. Dans ce domaine de températures, la structure de l'hélice choisie est extrêmement stable. Par contre, comme dans le cas de l'ARN méthylé, des changements importants des propriétés dynamiques de la première couche de solvatation ont été observés ***(P20-2001)***. Comme on pouvait s'y attendre, les molécules d'eau sont beaucoup plus fortement associées à l'ARN à basse qu'à haute tempé-

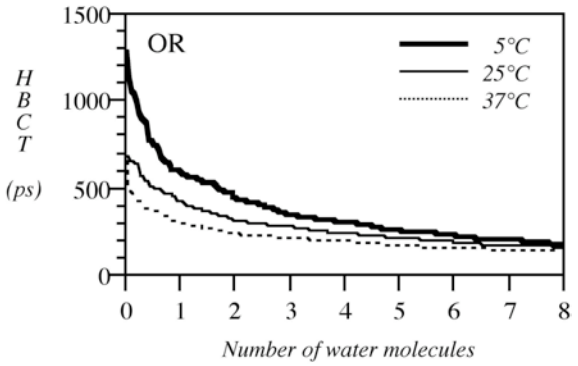

Fig. 14 : Estimation des temps de résidence de molécules d'eau liées à l'atome OR des groupements phosphates d'ARN en fonction de la température ***(P21-2002)***.

rature **(Fig. 14)**. Ce résultat, qui au premier abord peut sembler trivial, suggère que préalablement à la fusion de l'hélice d'ARN (rupture des appariements Watson-Crick), la structure du solvant s'altère et devient plus labile.

Sur la base de ces données, il est donc proposé que lorsque la température augmente, les interactions établies entre l'ARN et le solvant ne sont plus assez forte pour contribuer au maintien de la structure de cet édifice moléculaire. A nouveau, les techniques de simulation ont montré leur potentialité à traquer des effets fins associés à la structure du solvant.

Interactions ARN/K^+ : systèmes modèles

Depuis la publication de simulations de DM d'hélices d'ADN par le groupe de David Beveridge (Young et al. 1997), il est apparu que les ions monovalents pouvaient interagir de manière spécifique avec les atomes des grands et petits sillons d'hélices d'ADN. Grâce à l'intérêt suscité par cette étude, les techniques expérimentales existantes (RMN et cristallographie) ont été affinées en vue de caractériser des sites de fixation d'ions monovalents au sein de systèmes réels (Egli 2002; Hud et Polak 2001). Il a ainsi été démontré que de nombreuses poches de fixation d'ions monovalents existent dans les ARN et jouent un rôle structural non négligeable (Conn et al. 2002; Shiman et Draper 2000). Ces dernières avaient pendant longtemps été "noyées" dans la couche d'hydratation entourant ces molécules (en cristallographie, les pics de densité électronique sont majoritairement attribués à des molécules d'eau alors que de nombreux sites d'hydratation peuvent être partiellement occupés pas des ions monovalents). Une étude récente décrit un certain nombre d'erreurs qui peuvent résulter d'une mauvaise interprétation des pics de densité électronique (Das et al. 2001).

A partir des simulations de DM d'hélices d'ADN et d'ARN entreprises au laboratoire ***(P17-2000, P18-2001)***, il a pu être montré qu'environ 0.5 ion K^+ pénètre la première couche de solvata-

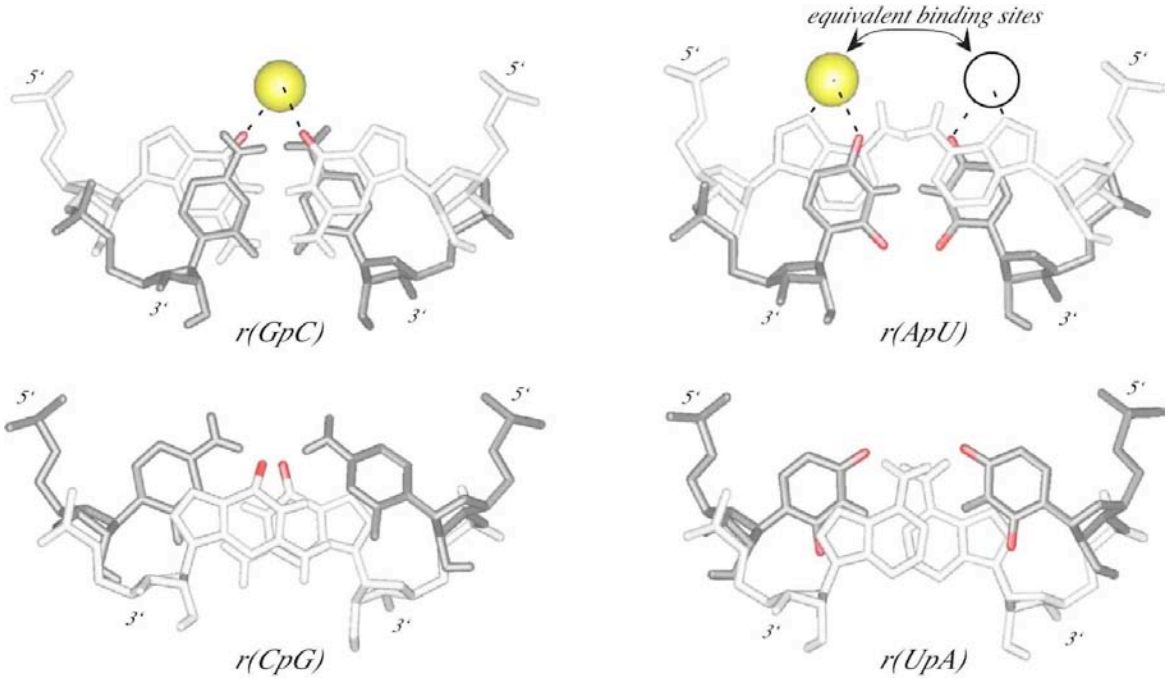

Fig. 15 : Vues extraites de simulations de DM de deux duplexes d'ARN ***(P17-2000, P18-2001)*** montrant des sites de fixation d'ions K^+ au niveau du sillon profond de l'hélice. Aucune fixation d'ions n'est observée pour les séquences r(CpG) et r(UpA).

tion d'appariements Watson-Crick et neutralise partiellement (par contact direct) la charge –2 portée par ces derniers. Des sites de fixation d'ions monovalents ont pu être localisé du côté du sillon profond **(Fig. 15)**. De manière plus détaillée, il a pu être montré qu'il existe des effets nets de séquence en ce qui concerne la fixation d'ions dans le sillon profond de l'ARN. En effet, un site de fixation est présent dans le sillon profond de $r(GpC)_2$ et de $r(ApU)_2$ mais pas de $r(CpG)_2$ et $r(UpA)_2$ ce qui peut s'expliquer par un empilement différent pour les séquences du type YpR par rapport aux séquences de type RpY conduisant à un autre arrangement des sites de fixation et des groupements à caractère répulsif, p.e. : $–NH_2$ **(Fig. 15)**. *Il a aussi été montré que certains sites d'hydratation peuvent être partiellement occupés pas des ions monovalents au sein d'hélices Watson-Crick.*

La boucle E de l'ARN ribosomique 5S d'Escherichia coli

Interactions ARN/Mg^{2+} :
Différences dynamiques entre ions penta- et hexahydratés

A côté du rôle encore mal connu joué par les ions Mg^{2+} dans les mécanismes catalytiques de certains ribozymes, les ions Mg^{2+} participent de manière active à la structuration (Misra et Draper 1998) et au repliement de la plupart des molécules d'ARN (Misra et Draper 2002). Des simulations de la boucle de l'anticodon de l'$ARNt^{Asp}$ entreprises en 1996 (travaux non publiés) ont montrées que l'inclusion d'un ion Mg^{2+} dans le modèle permettait de stabiliser la structure de l'ARN en ralentissant la dynamique des molécules d'eau entourant l'ion. Dans le but de mieux comprendre les interactions ARN/Mg^{2+}, nous avons entrepris des simulations de la boucle E de l'ARN ribosomique 5S d'*Escherichia coli*. Cette boucle se compose d'un empilement de sept appariements non-Watson-Crick qui lui permet de reconnaître de manière spécifique la protéine ribosomique L25 (Lu et Steitz 2000). La structure cristallographique de cet ARN dans sa forme non complexée montre cinq ions Mg^{2+} interagissant avec l'ARN par l'intermédiaire de contacts directs et de molécules d'eau au sein du sillon profond de l'hélice (Correll et al. 1997).

Les simulations entreprises au laboratoire avec l'aide de Lukasz Bielecki (chercheur post-doctoral) ont permis de confirmer que la boucle E était plus stable en présence d'ions Mg^{2+} ***(P22-2003)***. Elles ont également permis de mettre en évidence différents comportements dynamiques associés aux ions magnésium hydratés **(Fig. 16)**. Dans les grandes lignes, il apparaît que au maximum deux des cinq sites détectés par cristallographie correspondent à un site de fixation fort et participent de manière active à la structuration de la boucle, confirmant des données

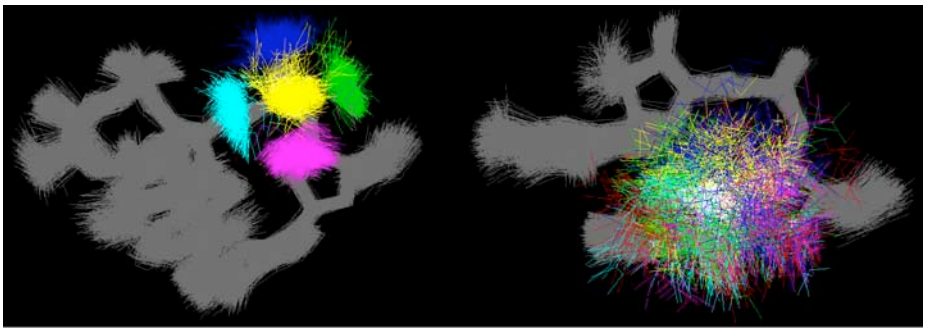

Fig. 16 : Comportement de la couche d'hydratation de deux ion Mg^{2+} liés à la boucle E de l'ARNr 5S ***(P22-2003)***. L'ion pentahydraté (gauche) interagit directement avec un groupement phosphate ce qui a pour effet de limiter ses mouvements de réorientations. Il est associé à un site de fixation fort. L'ion hexahydraté (droite) interagit avec l'ARN uniquement par l'intermédiaire de molécules d'eau. Sa mobilité est beaucoup plus importante et il est associé à un site de fixation faible (une couleur particulière est attribuée à chaque molécule d'eau appartenant à la couche d'hydratation de ces deux ions).

expérimentales obtenues au laboratoire (Serra et al. 2002). L'occupation des autres sites est reliée à au moins deux facteurs d'ordre environnemental : *(i)* l'empilement cristallin qui utilise un des ions Mg^{2+} pour stabiliser des interactions interhélicales ; *(ii)* la concentration en ions Mg^{2+} beaucoup plus élevée dans la phase cristal que dans les conditions physiologiques.

Cette étude par DM va permettre d'approfondir d'autres aspects structuraux et dynamiques associés à ce motif comme : (i) l'hydratation d'appariements non-Watson-Crick ; (ii) les interactions ARN/protéines ; (iii) la dynamique de ce fragment en phase cristalline.

Interactions ARN/K^+ :
La boucle E possède un fort caractère ionophorique

Des simulations de DM menées à des concentrations de 0.2 et 1.0 M en KCl ***(P23-2004)*** ont permis de mettre en évidence sept régions distinctes de fixation d'ions K^+ au sein du sillon profond de cette boucle interne **(Fig. 17)**. Ces régions impliquent essentiellement les atomes N7/O6 des guanines. Il a ainsi été montré que cette boucle possède un potentiel attracteur d'ions monovalent plus important que celui des double-hélices "Watson-Crick" étudiées jusqu'à présent ***(P17-2000 et P18-2001)***. De plus, il est apparu que certaines des régions de fixation d'ions monovalents étaient très proches des sites de fixation d'ions Mg^{2+} déterminés par cristallographie. Ceci indique que ces régions électronégatives peuvent accueillir un grand nombre de cations différents.

Ces résultats, ainsi que ceux évoqués dans le paragraphe suivant, ont permis d'obtenir une vue plus précise mais en même temps bien plus complexe de l'environnement ionique de ces acides nucléiques qui devraient permettre, entre autre, de mieux interpréter les données cristallographiques associées au solvant.

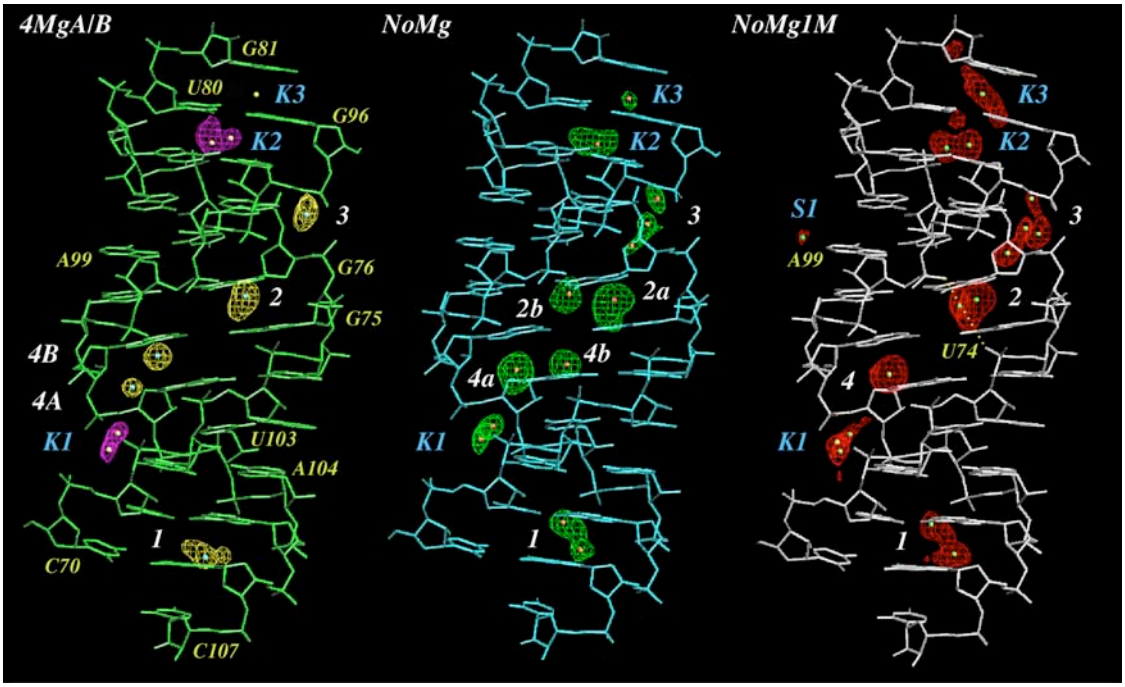

Fig. 17 : Régions de fixation d'ions K^+ et Mg^{2+} associées au sillon profond de la boucle E de l'ARNr 5S d'*Escherichia coli* calculées à partir de simulations de DM de 10 ns menées dans trois conditions différentes : (gauche : *4MgA/B*) modèle incluant des ions Mg^{2+} (jaune) occupant initialement leurs positions cristallographiques et K^+ (mauve) à 0.2 M en KCl ; (milieu : *NoMg*) 0.2 M en KCl sans Mg^{2+} ; (droite : *NoMg1M*) 1.0 M en KCl sans Mg^{2+} ***(P23-2004)***.

Interactions ARN/Anions (Cl^-, SO_4^{2-},…) :
Les anions peuvent pénétrer la première couche d'hydratation des acides nucléiques

Les simulations de DM entreprises sur la boucle E de l'ARNr 5S à 1.0 M en KCl évoqués plus haut ***(P23-2004)*** ont mis en évidence une propension des anions Cl^- à établir des contacts directs avec certains sites électropositifs de la double hélice tels que la face Watson-Crick de guanines non-appariées ***(P24-2004)***. Ce résultat, à priori surprenant, nous a conduit à explorer les bases de données structurales existantes (NDB : Nucleic acid DataBase et CSD : Cambridge Structural Database) à la recherche d'autres exemples d'interactions directes entre anions et acides nucléiques. Il a ainsi pu être établi, d'un point de vue statistique, que les anions les plus fréquemment rencontrés dans les solutions de cristallisation (Cl^-, SO_4^{2-}, …) pouvaient pénétrer la première couche d'hydratation d'acides nucléiques **(Fig. 18)**. En particulier, certains d'entre eux ont été observés par cristallographie dans le grand sillon d'appariements Watson-Crick. Les grands sillons de ces acides nucléiques ne devraient donc pas être uniquement considérés comme des régions à caractère électronégatif.

Ces résultats indiquent que les acides nucléiques qui sont des polyanions, n'interagissent pas uniquement avec des cations, comme il est communément admis, mais peuvent, dans certains contextes interagir de manière spécifique avec des anions. Certaines structures cristallographiques ont montré par exemple que des anions pouvaient (comme les cations et les molécules d'eau) médiés des interactions ARN/protéines.

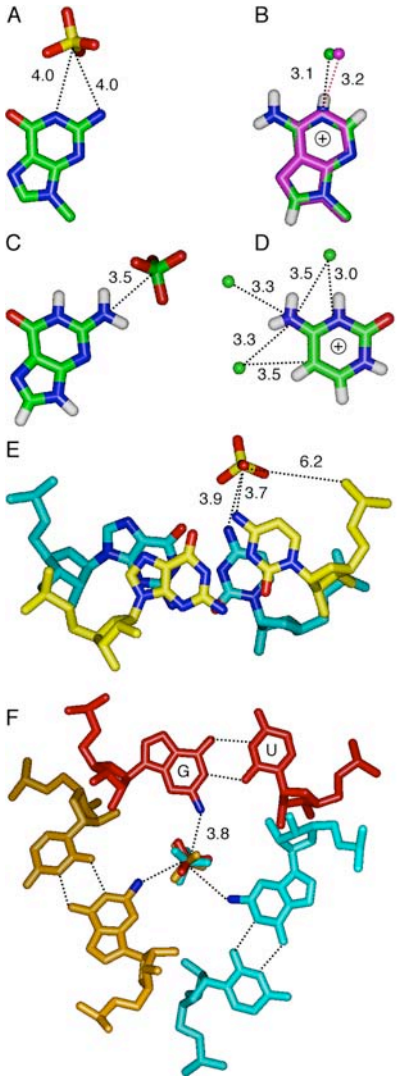

Fig. 18 : Exemples, extraits de la NDB et de la CSD, d'anions interagissant directement avec des fragments d'acides nucléiques ***(P24-2004)***. (A) Ion SO_4^{2-} interagissant avec les sites Watson-Crick d'une guanine. (B) Superposition de deux structures montrant une adenosine protonée interagissant avec un ion Cl^-. (C) Ion ClO_4^- interagissant avec une guanine. (D) Trois ions Cl^- interagissant avec une cytosine protonée. (E) Ion SO_4^{2-} occupant le grand sillon d'une séquence CpC. (F) Ion SO_4^{2-} désordonné piégé dans une cavité formée par trois appariements G•U (Masquida et al. 1999).

★ ★
★ ★
★

Projets de recherche

L'effort actuel des laboratoires de biologie moléculaire se porte essentiellement sur le séquençage et l'analyse de génomes ainsi que sur la caractérisation de structures tridimensionnelles de systèmes macromoléculaires. Toutefois, pour des raisons de complexité croissante et malgré leur importance primordiale, les aspects dynamiques de ces systèmes macromoléculaires sont encore peu étudiés tant du point de vue expérimental que théorique.

Avec le soutien des membres de l'équipe et de l'UPR, j'ai mis au point et développé un ensemble de techniques de simulations de DM qui ont été appliquées avec succès aux ARN au cours de ces dix dernières années et ont ainsi permis d'obtenir des résultats importants concernant la structure de ces molécules et leurs interactions avec l'environnement. Cette approche s'intègre harmonieusement dans l'ensemble des techniques développées au sein de l'équipe telles que : *(i)* l'analyse de séquences et la mise en évidence de covariations (Massire et al. 1998); *(ii)* la modélisation infographique (Massire et al. 1994; Massire et Westhof 1998; Michel et Westhof 1990); *(iii)* la cristallographie (Masquida et al. 1999; Vicens et Westhof 2001; 2002); *(iv)* les techniques de fusion optique (Brion et al. 1999; Serra et al. 2002). Cet effort collectif a pour but de mieux comprendre les relations existantes entre les structures et les fonctions de ces architectures moléculaires complexes ainsi que de cerner certains de leurs aspects dynamiques en se basant sur une approche modulaire propre aux ARN (Leontis et Westhof 1999; Westhof et al. 1996) qui consiste à rechercher des fragments structuraux récurrents et à étudier leurs propriétés. Dans cette perspective, mes axes de recherche se baseront essentiellement sur un certain nombre de points qui visent à étendre de manière significative les travaux précédemment décrits et à aborder les principaux aspects relatifs à la biochimie et la biophysique des ARN tels que :

- le rôle des forces interatomiques et intermoléculaires dans la stabilité des ARN ;
- les problèmes de repliements et de dépliements ;
- les problèmes de reconnaissance moléculaire ;
- la réactivité des ARN.

Dans un premier temps, il s'agira de poursuivre les études visant à mieux comprendre les interactions "acides nucléiques – environnement" étant donné que ce dernier peut considérablement moduler les propriétés conformationnelles et dynamiques des ARN (Saenger 1984). Bien évidemment, les aspects méthodologiques resteront au cœur de mes préoccupations.

Méthodologie :

Aucun progrès d'envergure ne peut-être réalisé si on ne prête pas une attention soutenue aux problèmes méthodologiques. En effet, même si les ressources informatiques disponibles devenaient infinies, notre compréhension actuelle l'équilibre des forces interatomiques à l'œuvre dans les systèmes biochimiques limiterait considérablement la portée des simulations qui pourrait être entreprises. Un objectif primordial est donc de continuer à étendre la fiabilité des simulations de DM en affinant la manière dont les champs de force actuels intègrent les interactions faibles (C-H…O, C-H…π, cation…π, …), en incluant les plus récents développements informatiques et en tenant compte explicitement des effets d'hydratation à courte et longue distance ainsi que des effets

de contre-ions et de co-ions encore trop rarement inclus dans les simulations de DM. Il s'agira également d'augmenter la stabilité des trajectoires sur des temps de simulation toujours plus longs et de poursuivre l'approche statistique de validation basée sur des trajectoires multiples de DM (voir ***R15-2004*** *et* ***R16*** en préparation).

Simulation de la phase cristalline

La boucle E de l'ARNr 5S dans un contexte cristallographique

De nombreuses incertitudes associées aux simulations de DM résultent de la différence existant entre l'environnement modélisé (le plus souvent la phase liquide) et l'environnement duquel est extrait la structure initiale (généralement la phase cristalline). En effet, même si des changements conformationnels de grandes envergures ne sont pas attendus pour les systèmes couramment étudiés et les échelles de temps actuellement accessibles, il existe certainement des différences plus subtiles associées aux interactions de ces systèmes macromoléculaires avec leurs environnements.

Pour cerner ces effets, il semble approprié d'effectuer des simulations dans des contextes comparables à ceux dans lesquels les données expérimentales ont été obtenues : la phase cristalline. Bien évidemment ceci pose de nombreux problèmes méthodologiques. C'est pourquoi de telles simulations, malgré leur intérêt évident, sont encore relativement rares. Des simulations de la maille cristalline de la boucle E de l'ARNr 5S contenant quatre hélices sont en cours de traitement au laboratoire **(Fig. 19)**. Ces simulations permettront une confrontation précise entre résultats théoriques et expérimentaux. Par ailleurs, elles conduiront à une meilleure compréhension des interactions intermoléculaires et de la structure du solvant (eau et ions) en phase cristalline.

Mise au point de nouvelles méthodes d'analyses

A part les techniques de simulation de DM multiples qui continueront à être développées, un travail de fond reste à faire en ce qui concerne la caractérisation des sites d'hydratation et de fixation d'ions associés à ces acides nucléiques. Même si une importante part de ce travail a déjà été effectué par nous ***(R12-2000, R14-2002)*** et d'autres (Feig & Pettitt, 1998; Henchman & McCammon, 2002), de nombreux points restent à clarifier.

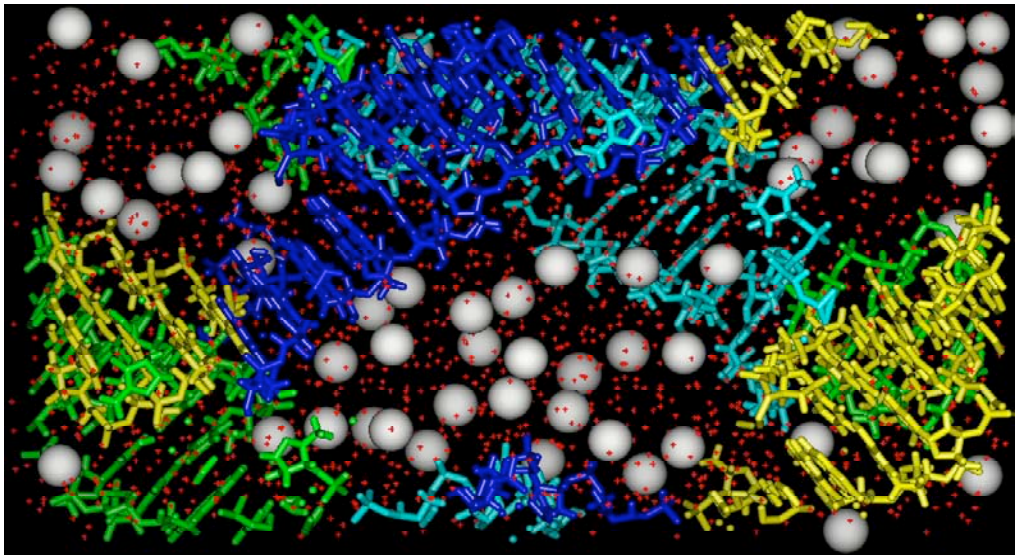

Fig. 19 : Vue de la maille cristalline simulée comprenant quatre duplexes d'ARN, des ions Mg^{2+} ainsi que des ions Na^{+} (en blanc) et des molécules d'eau (en rouge).

Hydratation :

L'étude de l'hydratation de l'ARN a toujours constitué un axe majeur du laboratoire. Toutefois, étant donné la complexité de ce type d'interactions, il reste encore énormément de points à élucider. En particulier ceux concernant : *(i)* l'hydratation des plateau de bases ; *(ii)* l'hydratation des appariements non-Watson-Crick ; *(iii)* l'hydratation de nucléotides modifiés.

Etude approfondie de l'hydratation de doublets de plateaux de bases

Des données concernant les doublets de plateaux de bases $r(CpG)_2$, $r(GpC)_2$, $r(UpA)_2$ et $r(ApU)_2$ ont déjà été recueillies à partir de l'étude des hélices $r(CpG)_{12}$ et $r(UpA)_{12}$ ***(P17-2000, P18-2001)***. Il est apparu que la structure de la couche de solvant est fortement liée à la séquence et peut moduler de manière significative les phénomènes de reconnaissance moléculaire. Ces données offrent une première représentation de la manière dont certaines molécules (protéines, fragments d'ARN, petites molécules, …) peuvent interagir avec des hélices constituées uniquement d'appariements Watson-Crick. Néanmoins, ces données sont fragmentaires. Des simulations d'hélices $r(CpC)_{12}$, $r(UpU)_{12}$, $r(ApC)_{12}$ et $r(ApG)_{12}$ restent à analyser. Elles permettront de constituer une base de données complète concernant la structure de la couche de solvatation (eau et ions) d'hélices "canoniques" d'ARN.

Ces données permettront de mieux comprendre : (i) les interactions ARN/ARN, ARN/protéines et ARN/petites molécules ainsi que le rôle des molécules d'eau interfaciales ; (ii) les relations entre la dynamique de ces molécules et leurs effets structurants ; (iii) elles devraient permettre de mieux interpréter les données de diffraction électronique en fournissant une localisation précise des sites d'hydratation autour de ces séquences de plateaux de bases.

Hydratation d'appariements non-canoniques (G•U, …)

Les molécules d'ARN comprennent également un grand nombre d'appariements non-canoniques, le plus fréquent étant du type "wobble G•U". Beaucoup de structures cristallographiques d'ARN contenant ce type d'appariement sont connues. Ces structures montrent de manière récurrente l'existence d'un site d'hydratation particulièrement bien défini inséré entre les bases G et U dans le sillon peu profond **(Fig. 20)** qui a été décrit dans de nombreuses revues (Masquida et Westhof 2000; Westhof 1988). Le système modèle $r(CpG)_{12}$ a déjà été modifié de façon à intégrer quatre appariements G•U. De cette manière des données statistiquement significatives concernant ces molécules d'eau vont pouvoir être obtenues (temps de résidence, type de liaisons hydrogène établies, …), ainsi que des données concernant l'aptitude de ces appariements à fixer des ions monovalents. Ces données complèteront utilement celles obtenues pour les appariements Watson-Crick.

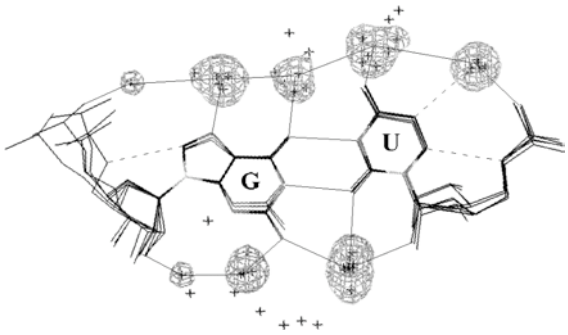

Fig. 20 : Superposition d'appariements G•U et de leurs sites d'hydratation extraits de structures cristallographiques de haute résolution ***(P14-1998)***.

Poursuite des investigations concernant les nucléotides modifiés

Il est envisagé de continuer les études concernant les nucléotides modifiés à la fois dans le contexte de systèmes modèles (différentes simulations d'hélices modèles incluant des nucléotides modifiés du type Ψ, m5C, m5U, ou Nm restent à analyser) et dans le contexte de molécules biologiquement actives telles que les ARNt.

Interactions ARN/ions

Il est maintenant reconnu que les ions mono-, divalents et les anions peuvent influencer de manière significative les propriétés structurales et dynamiques des acides nucléiques et des biomolécules en général (Egli 2002; Hud et Polak 2001). Les relations entre les ARN et leur environnement ionique sont donc devenue un sujet de recherche majeur.

Interactions ARN/Mg^{2+}

Les interactions entre la boucle E de l'ARNr 5S et les ions Mg^{2+} ont déjà été abordées (***P22-2003)***. Toutefois, il est à noter que leur étude pose des problèmes méthodologiques importants associés au fait que ces ions peuvent interagir sous deux formes avec les ARN : *(i)* forme pentahydratée impliquant une interaction directe ; *(ii)* forme hexahydratée impliquant uniquement des interactions médiées par des molécules d'eau. Un problème majeur réside dans le fait que les processus de déshydratation (hexahydraté -> pentahydraté) sont des processus lents (de l'ordre de la microseconde). De tels processus ne sont pas encore bien compris et ne peuvent en aucun cas être simulés avec les techniques actuellement disponibles. Ces problèmes devront absolument être résolus dans le futur.

Interactions ARN/M^{+}

Les interactions impliquant les ions monovalents sont beaucoup plus faciles à simuler que celles impliquant des ions divalents, étant donné que les temps de résidence des molécules d'eau dans leur première couche d'hydratation sont bien plus "raisonnables" (quelques dizaine de picosecondes au maximum). Dans ce cas un bon échantillonnage de l'espace conformationnel associé à ces ions peut-être obtenu. Il va donc être possible, sur la base des simulations de DM d'hélices modèles déjà réalisées (voir plus haut), de caractériser de manière systématique tout les sites de fixation d'ions monovalents autour d'hélices Watson-Crick ***(P17-2000, P18-2001)*** puis autour d'appariements non-Watson-Crick ***(P23-2004)*** et de motifs plus complexes. Ces sites sont certainement superposables au sites de fixation de groupes chargés d'acides aminés tels que la lysine ou l'arginine ***(P23-2004)***. Détecter des sites de fixation d'ions monovalent revient donc à rechercher des sites potentiels de fixation de groupes positivement chargés appartenant à des protéines ou des petites molécules.

Reconnaissance moléculaire

La reconnaissance moléculaire est au centre de tout les problèmes de biologie moléculaire. Cependant, pour une large part les règles sous-jacentes à ces phénomènes de reconnaissance ne peuvent être appréhendés qu'à un niveau phénoménologique puisqu'un équilibre très subtil et complexe existe entre les forces en jeu dans ces processus. Ces aspects ont déjà été abordés par le biais

de l'étude des interactions ARN/eau et ARN/M^+ qui en sont l'expression la plus "simple". Un autre niveau de complexité a été franchi dans l'étude des interactions entre ARN et ions Mg^{2+} hydratés.

Interactions ARN/protéines

La boucle E de l'ARN ribosomique 5S décrite plus haut peut être considérée comme un bon système modèle pour l'étude des interactions ARN/protéines étant donné qu'il existe deux structures cristallographiques de cet ARN interagissant avec des protéines ribosomiques L25 et TL5 (Fedorov et al. 2001; Lu et Steitz 2000). On peut remarquer que la structure de l'ARN n'est pas perturbé par la présence de ces protéines. En particulier tous les appariements non-canoniques conservent leurs structures. Des simulations de ces complexes, basées sur celles effectuées à partir de la boucle E non complexée ***(P22-2003** et **P24-2004)***, devraient permettre de mieux comprendre les interactions ARN/protéines et le rôle joué par l'eau et les ions divalents présents à l'interface. Cela est d'autant plus intéressant que cette boucle est un motif récurrent d'ARN (Leontis et Westhof 1998a) et qu'elle présente une occasion rare d'étudier les interactions entre un même motif d'ARN et deux protéines apparentées. Il va également être possible de comparer les sites de fixation de molécules d'eau et d'ions monovalents calculés pour la boucle E "libre" et les sites de fixation d'acides aminés.

Interactions ARN/antibiotiques

Les ARN ont également été reconnus comme des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes (Hermann et Westhof 1998). Des structures cristallographiques du site A de l'ARN ribosomique 16S complexé avec des antibiotiques de la classe des aminoglycosides **(Fig. 20)** ont été obtenues au laboratoire (Vicens et Westhof 2001; 2002; 2003). D'autres structures (différents antibiotiques – différents motifs) sont en cours de résolution. Des simulations basées sur les structures de ces complexes sont actuellement en cours. Une connaissance plus approfondie des interactions ARN/antibiotiques et du rôle joué par les molécules d'eau dans ces complexes sera précieuse à tous ceux qui sont impliqués dans la création et le développement de nouveaux antibiotiques.

Fig. 20 : Structure cristallographique d'un complexe ARN/Antibiotique montrant deux sites de fixation (Vicens & Westhof, 2001).

Interactions ARN/polyamines

A plus ou moins long terme, les interactions ARN/polyamines seront également abordés. Certains rôles fonctionnels des polyamines sont maintenant relativement bien documentés alors que d'autres commencent juste à être découverts (Igarashi et Kashiwagi 2000). Du point de vue structural les modes d'interactions de ces molécules chargées avec les ARN sont encore très mal connus. Des simulations de DM devraient pouvoir permettre d'étudier ces aspects. Par ailleurs, ces études devraient fournir des compléments d'information utiles sur les modes d'interactions des aminoglycosides (qui peuvent être considérés comme des polyamines fonctionnalisées) avec les ARN.

En conclusion, les approches mises au point au laboratoire mettent en évidence que les simulations de DM peuvent être utilisées avec succès pour étudier les propriétés structurales et dynamiques de nombreux systèmes comprenant des ARN. La stratégie développée consiste à *(i)* utiliser des systèmes modèles (hélices d'ARN, …), *(ii)* augmenter leur degré de complexité en y intégrant des appariements non-Watson-Crick et/ou des nucléotides modifiés (entre autres) puis *(iii)* inclure les informations obtenues dans des fragments de systèmes ayant des fonctions biologiques reconnues (ARNt, fragments d'ARNr, …). Cette approche, en synergie avec celles développées par les autres membres de l'équipe et de l'UPR, devrait fournir nombre d'informations utiles sur ces systèmes moléculaires.

★ ★
★ ★
★

Références

Berman HM, Olson WK, Beveridge DL, Westbrook J, Gelbin A, Demeny T, Hsieh SH, Srinivasan AR. 1992. The nucleic acid database: a comprehensive relational database of three-dimensional structures of nucleic acids. Biophys. J. 63:751-759.

Brion P, Schroeder R, Michel F, Westhof E. 1999. Influence of specific mutations on the thermal stability of the td group I intron *in vitro* and on its splicing efficiency *in vivo*: a comparative study. RNA 5:947-58.

Bügl H, Fauman EB, Staker BL, Zheng F, Kushner SR, Saper MA, Bardwell JC, Jakob U. 2000. RNA methylation under heat shock control. Mol. Cell. 6:349-60.

Cate JH, Gooding AR, Podell E, Zhou KH, Golden BL, Kundrot CE, Cech TR, Doudna JA. 1996. Crystal structure of a group I ribozyme domain - Principles of RNA packing. Science 273:1678-1685.

Conn GL, Gittis AG, Lattman EE, Misra VK, Draper DE. 2002. A compact RNA tertiary structure contains a buried backbone-K^+ complex. J. Mol. Biol. 318:963-73.

Correll CC, Freeborn B, Moore PB, Steitz TA. 1997. Metals, motifs and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. Cell 91:705-712.

Csaszar K, Spackova N, Stefl R, Sponer J, Leontis NB. 2001. Molecular dynamics of the frame-shifting pseudoknot from beet western yellow virus: the role of non-Watson-Crick base-pairing, ordered hydration, cation binding and base mutations on stability and unfolding. J. Mol. Biol. 313:1073-91.

Das U, Chen S, Fuxreiter M, Vaguine AA, Richelle J, Berman HM, Wodak SJ. 2001. Checking nucleic acid crystal structures. Acta Cryst. D57:813-28.

Derewenda ZS, Derewenda U, Kobos PM. 1994. (His)C^{ε}-H...O=C< hydrogen bond in the active sites of serine hydrolases. J. Mol. Biol. 241:83-93.

Desiraju G, Steiner T. 1999. The weak hydrogen bond. New-York: Oxford University Press.

Desiraju GR. 1991. The C-H...O hydrogen bond in crystals: what is it? Acc. Chem. Res. 24:290-296.

Egli M. 2002. DNA-cation interactions: quo vadis? Chem. Biol. 9:277-86.

Engh RA, Brandstetter H, Sucher G, Eichinger A, Baumann U, Bode W, Huber R, Poll T, Rudolph R, von der Saal W. 1996. Enzyme flexibility, solvent and 'weak' interactions characterize thrombin-ligand interactions: implications for drug design. Structure 4:1353-1362.

Ewald P. 1921. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. Ann. Phys. 64:253-287.

Fedorov R, Meshcheryakov V, Gongadze G, Fomenkova N, Nevskaya N, Selmer M, Laurberg M, Kristensen O, Al-Karadaghi S, Liljas A and others. 2001. Structure of ribosomal protein TL5 complexed with RNA provides new insights into the CTC family of stress proteins. Acta. Cryst. D57:968-76.

Grosjean H, Benne R. 1998. Modification and editing of RNA. Washington, DC: ASM Press. xiii, 596 p.

Hermann T, Westhof E. 1998. RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools. Curr. Op. Biotech. 9:66-73.

Hud NV, Polak M. 2001. DNA-cation interactions: the major and minor grooves are flexible ionophores. Curr. Opin. Struct. Biol. 11:293-301.

Igarashi K, Kashiwagi K. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem Biophys Res Commun 271:559-64.

Israelachvili J, Wennerström H. 1996. Role of hydration and water in biological and colloidal interactions. Nature 379:219-225.

Klaholz B, Moras D. 2002. C-H...O hydrogen bonds in the nuclear receptor RARgamma. A potential tool for drug selectivity. Structure 10:1197-204.

Leckband D, Israelachvili J. 2001. Intermolecular forces in biology. Q. Rev. Biophys. 34:105-267.

Leontis NB, Stombaugh J, Westhof E. 2002. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. Nucleic Acids Res. 30:3497-531.

Leontis NB, Westhof E. 1998a. A common motif organizes the structure of multi-helix loops in 16S and 23S ribosomal RNAs. J. Mol. Biol. 283:571-583.

Leontis NB, Westhof E. 1998b. Conserved geometrical base pairing patterns in RNA. Quart. Rev. Biophysics 31:399-455.

Leontis NB, Westhof E. 1999. Recurrent RNA motifs: analysis at the base pair level. In: Barciszewski J, Clark BFC, editors. RNA biochemistry and biotechnology. Boston: Kluwer Academic Publishers. p in press.

Leontis NB, Westhof E. 2001. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. RNA 7:499-512.

Leontis NB, Westhof E. 2002. The annotation of RNA motifs. Comp. Funct. Genom. 3:518-524.

Lu M, Steitz TA. 2000. Structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L25 complexed with a 5S rRNA fragment at 1.8-Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2023-8.

Masquida B, Sauter C, Westhof E. 1999. A sulfate pocket formed by three GoU pairs in the 0.97 Å resolution x-ray structure of a nonameric RNA. RNA 5:1384-1395.

Masquida B, Westhof E. 2000. On the wobble GoU and related pairs. RNA 6:9-15.

Massire C, Gaspin C, Westhof E. 1994. DRAWNA: a program for drawing schematic views of nucleic acids. J. Mol. Graphics 12:201-206.

Massire C, Jaeger L, Westhof E. 1998. Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis. J. Mol. Biol. 279:773-793.

Massire C, Westhof E. 1998. MANIP: An interactive tool for modelling RNA. J. Mol. Graph. 16:197-205.

Michel F, Westhof E. 1990. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. J. Mol. Biol. 216:585-610.

Misra VK, Draper DE. 1998. On the role of magnesium ions in RNA stability. Biopolymers 48:113-35.

Misra VK, Draper DE. 2002. The linkage between magnesium binding and RNA folding. J. Mol. Biol. 317:507-21.

Pearlman DA, Case DA, Caldwell JW, Ross WS, Cheatham TE, DeBolt S, Ferguson D, Seibel G, Kollman P. 1995. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. Comp. Phys. Commun. 91:1-41.

Rubin-Carrez C. 1992. Modélisation Moléculaire et Simulation des Propriétés Conformationnelles et Dynamiques d'Acides Ribonucléiques : Représentation Electrostatique et Influence de l'Environnement.: Université de Strasbourg, France.

Saenger W. 1984. Principles of nucleic acid structure. New-York: Springer-Verlag.

Sagui C, Darden TA. 1999. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-range electrostatic effects. Annu. Rev. Biophys. Struct. 28:155-179.

Serra MJ, Baird JD, Dale T, Fey BL, Retatagos K, Westhof E. 2002. Effects of magnesium ions on the stabilization of RNA oligomers of defined structures. RNA 8:307-323.

Shiman R, Draper DE. 2000. Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations. J. Mol. Biol. 302:79-91.

Vicens Q, Westhof E. 2001. Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. Structure 9:647-658.

Vicens Q, Westhof E. 2002. Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site. Chem. Biol. 9:747-55.

Vicens Q, Westhof E. 2003. Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. J. Mol. Biol. 326:1175-88.

Westhof E. 1988. Water: an integral part of nucleic acid structure. Annu. Rev. Biophys., Biophys. Chem. 17:125-144.

Westhof E. 1990. Structural water of nucleic acids. In: Vasilescu D, Jaz J, Packer L, Pullman B, editors. Water and Ions in Biomolecular Systems - Advances in Life Science. Berlin: Birkäuser Verlag. p 11-18.

Westhof E, Beveridge DL. 1990. Hydration of nucleic acids. In: Franks F, editor. Water Science Reviews. Cambridge: Cambridge University Press. p 24-123.

Westhof E, Dumas P, Moras D. 1985. Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA. J. Mol. Biol. 184:119-145.

Westhof E, Dumas P, Moras D. 1988. Hydration of transfer RNA molecules: a crystallographic study. Biochimie 70:145-165.

Westhof E, Fritsch V. 2000. RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. Structure Fold. Des. 8:R55-R65.

Westhof E, Masquida B, Jaeger L. 1996. RNA tectonics: toward RNA design. Folding & Design 1:R78-R88.

Young MA, Jayaram B, Beveridge DL. 1997. Intrusion of counterions into the spine of hydration in the minor groove of B-DNA: fractional occupancy of electronegative pockets. J. Am. Chem. Soc. 119:59-69.

Quelques publications :

P6 -1996 Auffinger, P., Louise-May, S. et Westhof, E. Molecular dynamics simulations of the anticodon hairpin of $tRNA^{Asp}$: structuring effects of C-H...O hydrogen bonds and of long-range hydration forces., *J. Am. Chem. Soc.* **118,** 1181-1189.

P11-1997 Auffinger P. et Westhof E. Rules governing the orientation of the 2'-hydroxyl group in RNA. *J. Mol. Biol.,* **274**, 54-63.

P14-1998 Auffinger P. et Westhof E. Hydration of RNA base pairs. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **16**, 693-707.

P17-2000 Auffinger P. et Westhof E. Water and ion binding around RNA and DNA (C,G)-oligomers. *J. Mol. Biol.*, **300**, 1113-1131.

P18-2001 Auffinger P. et Westhof E. Water and ion binding around $r(UpA)_{12}$ and $d(TpA)_{12}$ oligomers - Comparison with RNA and DNA $(CpG)_{12}$ duplexes. *J. Mol. Biol.*, **305**, 1057-1072.

P20-2001 Auffinger P. et Westhof E. Hydrophobic groups stabilize the hydration shell of 2'-O-methylated RNA duplexes. *Angew. Chem. Int Ed.*, **40**, 4648-4650.

P22-2003 Auffinger P., Bielecki L. et Westhof E. The Mg^{2+} binding sites of the 5S rRNA loop E motif as investigated by molecular dynamics simulations. *Chem. Biol.*, **10**, 551-561.

P23-2003 Auffinger P., Bielecki L. et Westhof E. Symmetric K^+ and Mg^{2+} ion binding sites in the 5S rRNA loop E inferred from molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.*, **335**, 555-571.

P24-2004 Auffinger P., Bielecki L. et Westhof E. Anion binding to nucleic acids. *Structure,* (sous presse).

R12-2000 Auffinger P. et Westhof E. RNA solvation: a molecular dynamics simulation perspective. *Biopolymers*, **56**, 266-74.

R15-2004 Auffinger P. et Vaiana AC. Molecular dynamics simulations of RNA systems. Dans : Handbook of RNA biochemistry. Editeurs : Westhof, Bindereif, Schön, Hartmann. Manheim: Willey-VCH.

P6-1996

Auffinger, P., Louise-May, S. et Westhof, E.
Molecular dynamics simulations of the anticodon hairpin of $tRNA^{Asp}$: structuring effects of C-H...O hydrogen bonds and of long-range hydration forces.
J. Am. Chem. Soc. **118,** 1181-1189.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P11-1997

Auffinger P. et Westhof E.
Rules governing the orientation of the 2'-hydroxyl group in RNA.
J. Mol. Biol., **274**, 54-63.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P14-1998

Auffinger P. et Westhof E.
Hydration of RNA base pairs.
J. Biomol. Struct. Dyn., **16**, 693-709.
(en l'honneur du 60ème anniversaire du Prof. David Beveridge)

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P17-2000

Auffinger P. et Westhof E.
Water and ion binding around RNA and DNA (C,G) oligomers.
J. Mol. Biol., **300**, 1115-1133.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P18-2001

Auffinger P. et Westhof E.
Water and ion binding around r(UpA)$_{12}$ and d(TpA)$_{12}$ oligomers - Comparison with RNA and DNA (CpG)$_{12}$ duplexes.
J. Mol. Biol., **305**, 1057-1072.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P20-2001

Auffinger P, et Westhof E.
Hydrophobic groups stabilize the hydration shell of 2'-O-methylated RNA duplexes.
Angew. Chem. Int Ed., **40**, 4648-4650.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P22-2003

Auffinger P., Bielecki L. et Westhof E.
The Mg^{2+} binding sites of the 5S rRNA loop E motif as investigated by molecular dynamics simulations.
Chem. Biol., **10**, 551-561.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P23-2004

Auffinger P., Bielecki L. et Westhof E.
Symmetric K^+ and Mg^{2+} ion binding sites in the 5S rRNA loop E inferred from molecular dynamics simulations.
J. Mol. Biol., **335**, 555-571.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

P24-2004

Auffinger P., Bielecki L. et Westhof E.
Anion binding to nucleic acids
Structure, **12**, 379-388.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

R12-2000

Auffinger P. et Westhof E.
RNA solvation : a molecular dynamics simulation perspective
Biopolymers, **56**, 266-274.

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM

R15-2004

Auffinger P. et Vaiana A.C.
Molecular dynamics simulations of RNA systems
Dans : *Handbook of RNA biochemistry*
Editeurs : *Westhof, Bindereif, Schön, Hartmann*
(sous presse)

Voir :
http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Westhof/publ_West/Auffinger_pub.HTM