

**SIMULATIONS MOLÉCULAIRES  
DE PROCESSUS D'INTERET  
BIOLOGIQUE**

# Échelles de temps

Vibration des liaisons	$10^{-14}$ s
------------------------	--------------

Plissement des sucres	$10^{-12}$ s
-----------------------	--------------

Courbure de l'ADN	$10^{-9}$ s
-------------------	-------------

Ouverture d'une paire de bases	10 ms
--------------------------------	-------

Transcription	2.5 ms / base
---------------	---------------

Synthèse Protéinique	6.5 ms / résidu
----------------------	-----------------

Repliement des Protéines	10 s
--------------------------	------

Durée de vie d'un ARN	300 s
-----------------------	-------

# Plan

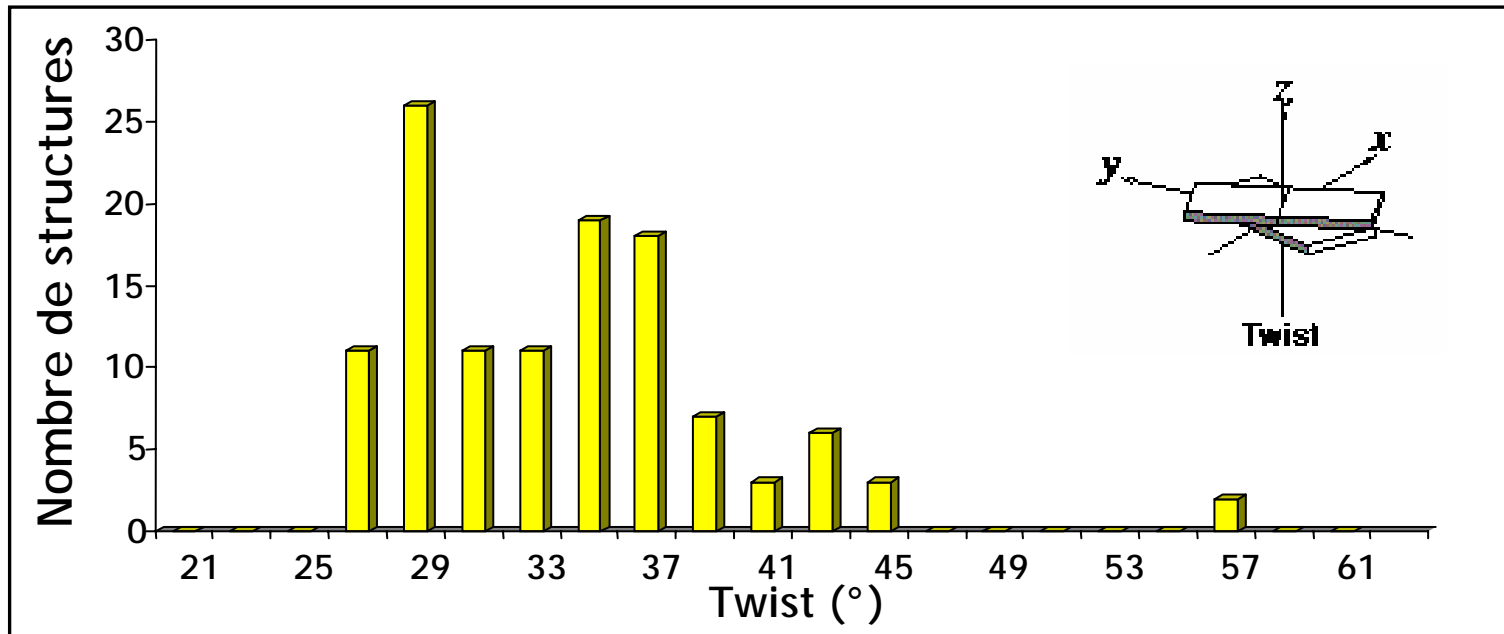
- Étude systématique des effets de séquence:  
Le projet ABC
- Étude de l'ouverture des paires de bases
- Étude de la réplication d'un Cyclobutane  
Thymine Dimer par DPO4
- Conclusion et Perspectives

# Étude systématique des effets de séquence, le projet ABC



# Intérêt et limites

Histogramme du Twist du pas GpC calculé à partir des structures d'ADN-B de la PDB



- Pas de données expérimentales suffisantes pour paramétrer les effets de séquence
- Problème combinatoire considérable
  - 136 tétramères uniques ( AAAA, AATG, TGAC ... )

# Le projet ABC

- 9 Laboratoires (5 USA, 4 Europe)
- Constituer le premier ensemble de simulations des effets de séquence au sein de l'ADN au delà de l'approximation dinucléotidique
- Introduire l'effet de séquence dans les modèles d'ADN, basse résolution

# Méthode

G-D-ABCD-ABCD-ABCD-G

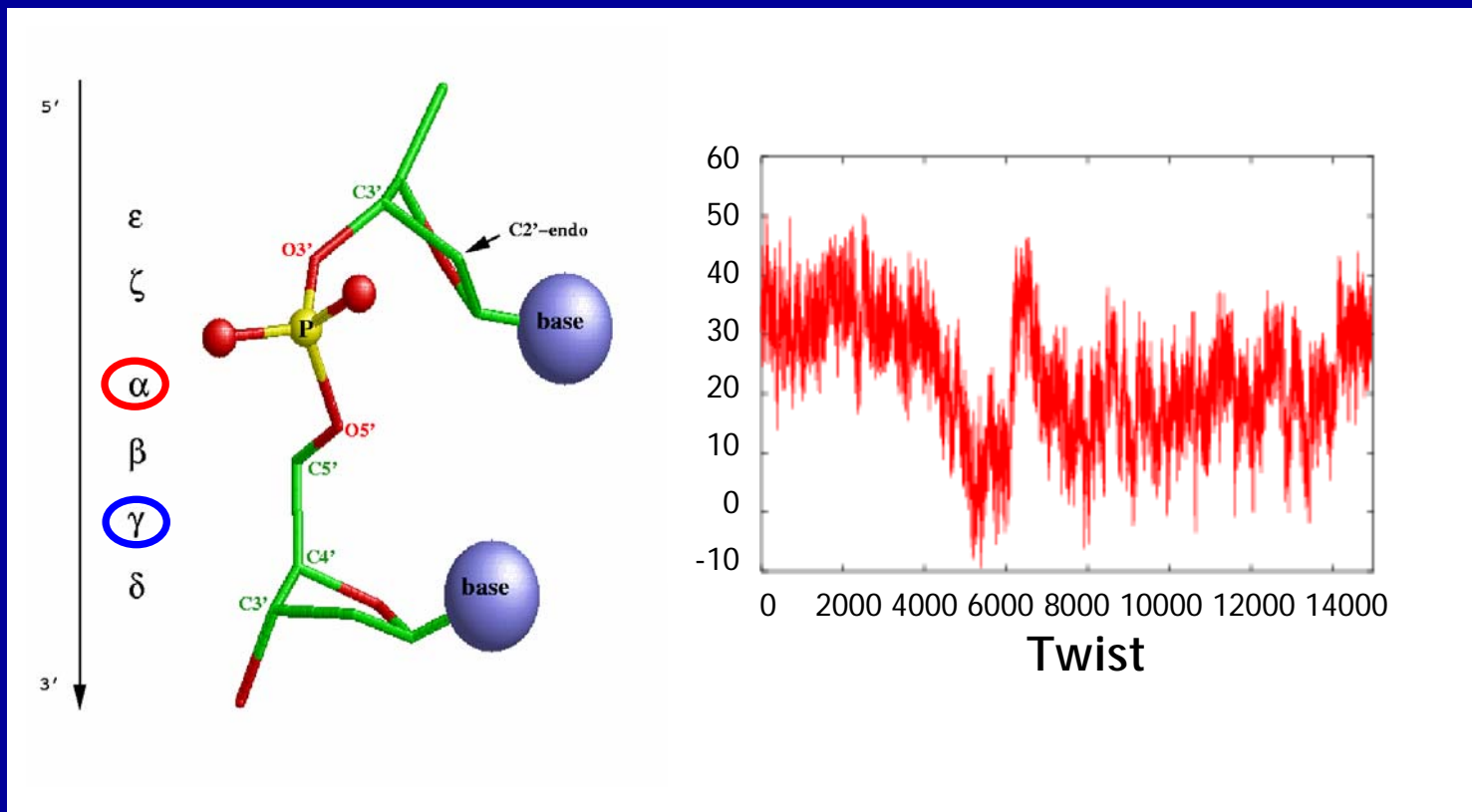
- 15 paires de bases
  - Répétition du pas tétranucléotidique central
  - Ignorer les deux paires de bases à chaque extrémité
- Simulation par dynamique moléculaire de doubles hélices d'ADN en solution
- ~7600 molécules d'eau + 28 K<sup>+</sup> placés aléatoirement autour de l'ADN pour le neutraliser

# 1<sup>ère</sup> Étape

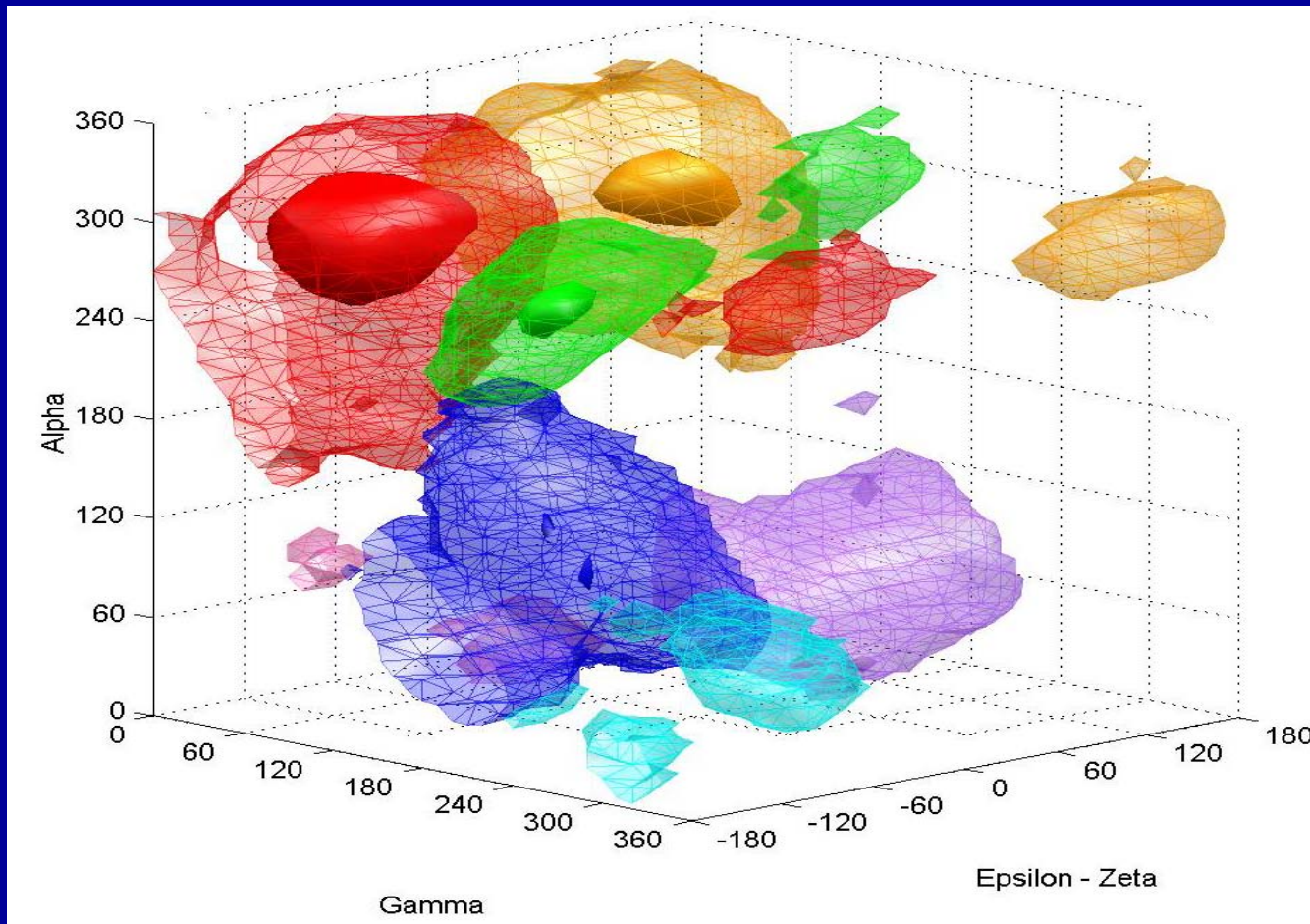
- 150 mois de temps CPU
- 0.6 ms de simulation
- 600,000 jeux de coordonnées
- 272 pas dinucléotiques
- 400 Gb de données



# Convergence des paramètres hélicoidaux le long de la séquence GA



# Distribution des angles $\alpha/\gamma/(\varepsilon-\zeta)$ pour l'entière banque de données (11.7 millions de points)



# Effet de séquence sur les paramètres hélicoidaux inter-paires de bases du pas CpG

Tetranuc.	Time	<Shift>	<Slide>	<Rise>	<Tilt>	<Roll>	<Twist>
<b>GCGG</b>	<b>0.0</b>						
	2.4	-0.2	-1.0	2.8	0.4	7.6	24.9
ACGG	10.0	0.0	-1.0	3.2	-0.1	7.0	33.9
	10.0	-0.0	-1.1	3.1	0.1	8.1	30.2
ACGA	10.0	0.3	-1.5	3.7	1.5	7.4	31.4
	10.0	0.1	-1.2	3.4	0.9	8.9	29.1
GCGA	10.0	0.0	-0.8	3.0	1.3	9.9	26.7
	10.0	-0.0	-0.9	3.0	0.8	11.2	25.1
ACGT	10.0	0.1	-1.2	3.5	0.3	7.0	33.9
	10.0	-0.1	-1.4	3.5	-0.3	7.4	32.6
GCGC	10.0	0.0	-1.1	3.5	0.1	8.8	31.3
	10.0	-0.2	-1.6	3.8	0.4	10.1	33.3
GCGT	10.0	0.2	-1.2	3.4	1.0	8.6	32.4
	10.0	0.1	-1.4	3.5	0.9	7.7	32.1
<b>TCGG</b>	<b>0.0</b>						
	10.0	-0.0	-0.9	3.0	-0.9	10.0	25.6
CCGG	10.0	0.0	-0.8	2.8	0.0	8.3	27.6
	10.0	0.0	-1.0	2.9	-0.4	7.9	28.6
TCGA	7.3	0.0	-0.9	3.2	-0.2	11.4	29.3
	5.6	-0.3	-1.5	3.6	0.6	8.3	26.1

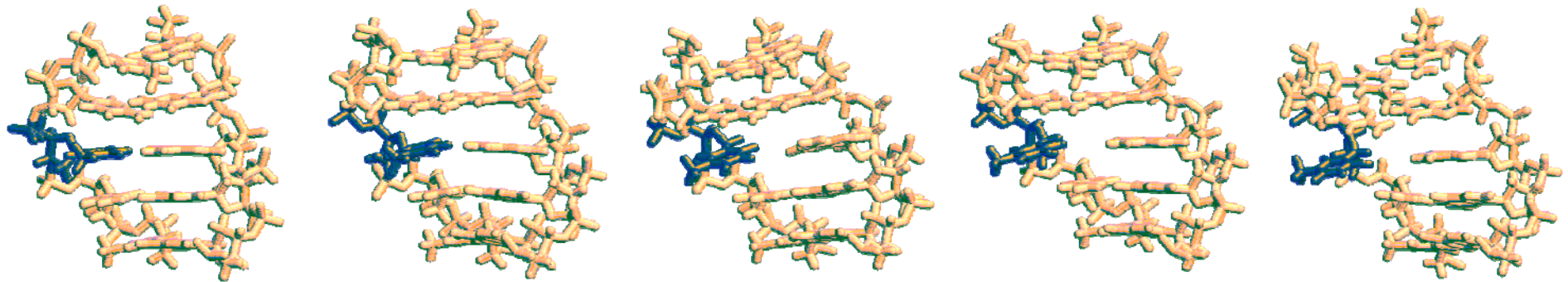
# Bilan et Perspective

- Production d'un ensemble de données jusqu'à présent inaccessible par les méthodes expérimentales.
- La plus part des propriétés structurales et dynamiques des oligomères étudiés ont convergées même si certains changements conformationnels lents empêchent l'échantillonnage complet de l'espace conformationnel.
- Les pas  $\alpha\gamma$  non canoniques ne représentant que 5% de l'ensemble de la banque de données. Malheureusement ils sont présents dans la plus part des séquences étudiées.
- Cet état du squelette n'a été observé expérimentalement que dans les complexes ADN-protéine Est-ce un artéfact ?



Révision générale des champ de force ?

# Étude de l'ouverture des paires de bases



# Échange des protons imino

*Leroy, J-L. Regard sur la Biochimie 5 (1990) 57-65*

- Durée de vie des paires de bases 10-40 ms (à 15°C)

GC            15-25 ms

AT            5-10 ms

A tract      50-100 ms

- Durée de vie de l'état ouvert 10 ns

- Durée de vie des paires voisines distinctes

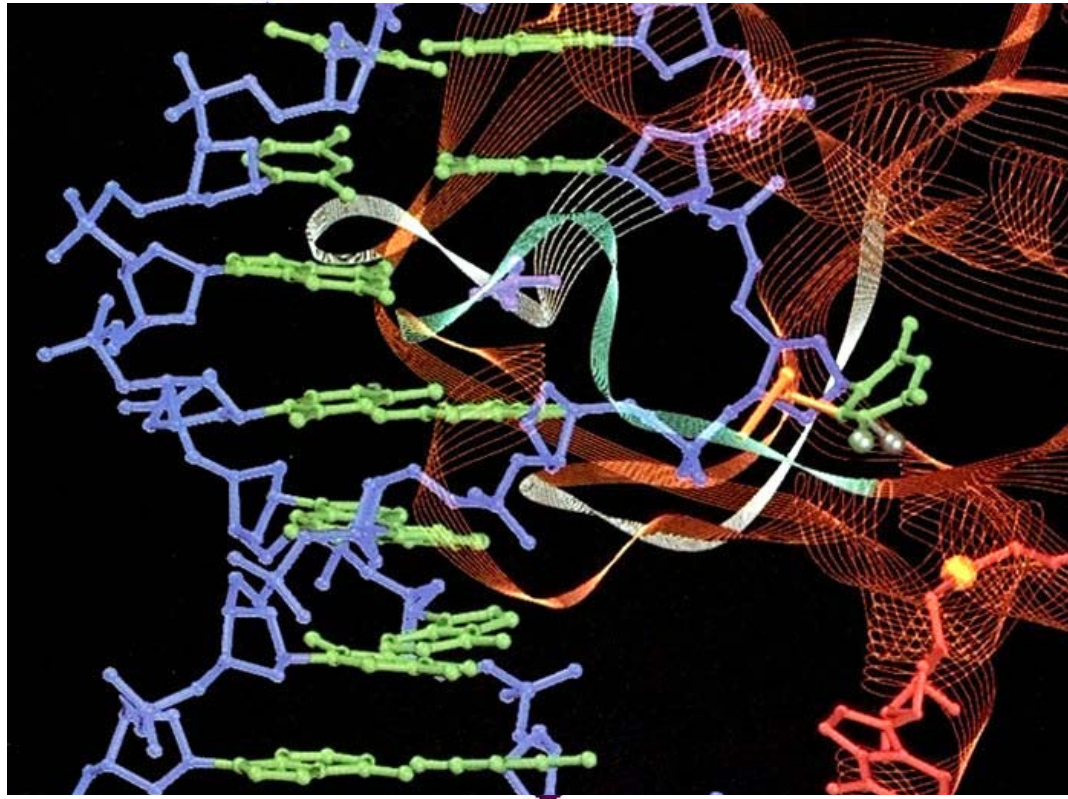
C	G	C	A	A	G	A	A	G	C	G
*	*	4	1	1	23	4	5	4	*	*

→ *Ouverture non coopérative*

- Pas d'information structurale

# Hha1 methyltransferase

*Klimašauskas, S. Kumar, S. Roberts, R. J.  
& Cheng, X. Cell 76 (1994) 357-369*



Cinétique de l'enzyme :  $k_{cat}=0.02s^{-1}$

# Échelles de temps

Échelle de temps de l'ordre de la dizaine de millisecondes

+ Énergie d'activation entre 10 et 20 kcal·mol<sup>-1</sup>

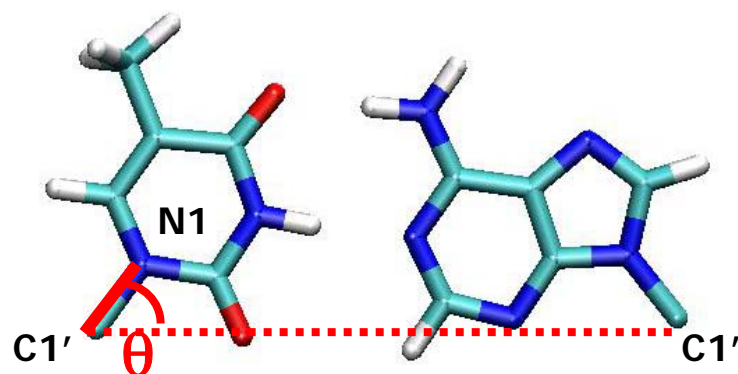
→ Dynamique moléculaire sous contraintes

→ Analyse Statistique pour recalculer le profile d'énergie libre (WHAM)

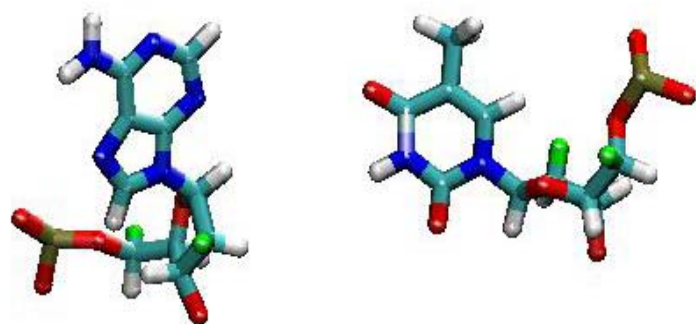


# Définir le chemin réactionnel ?

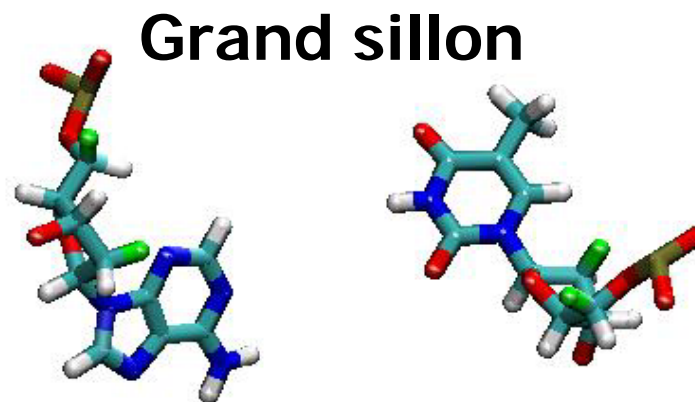
*Bernet, J. Zakrzewska, K. & Lavery, R. J. Mol. Struc. (Theochem) 398 (1997) 473-482*



■ Angle d'ouverture formé entre le vecteur C1'-C1' et la liaison glycosidique projetée dans le plan contenant le vecteur C1'-C1' et perpendiculaire à l'axe hélicoïdal local



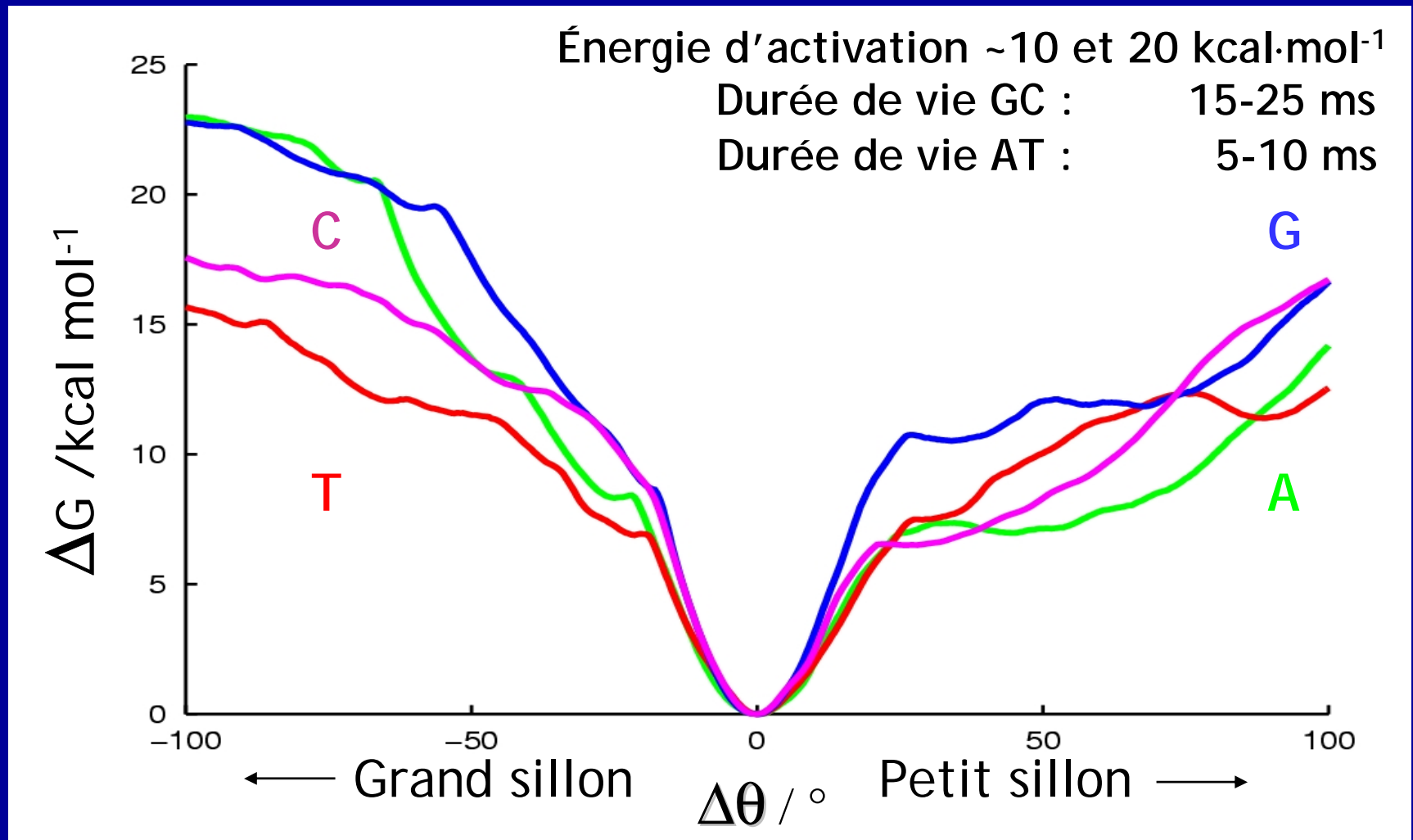
Petit sillon



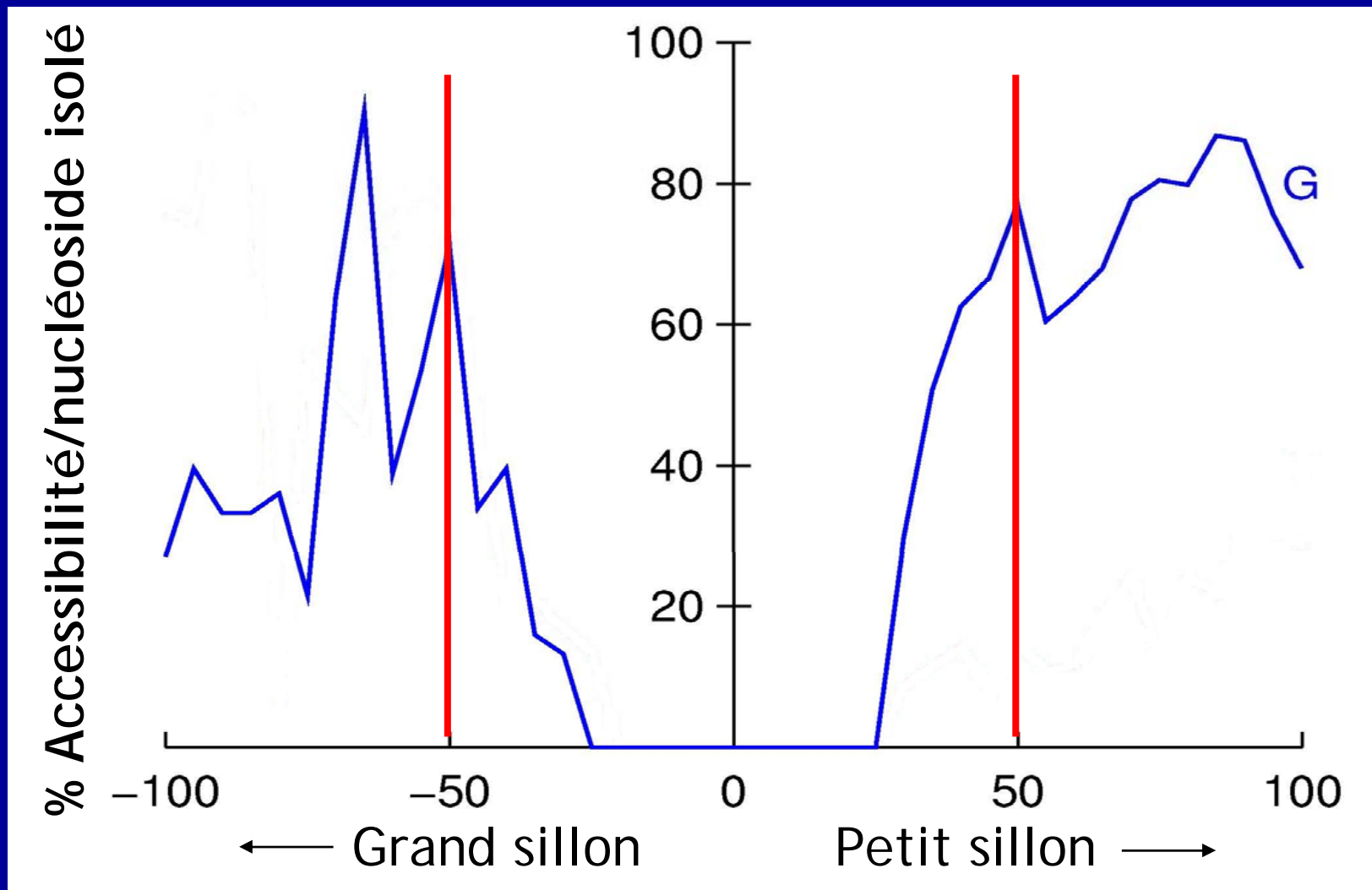
Grand sillon

# Résultats de l'étude de l'ouverture des paires de bases

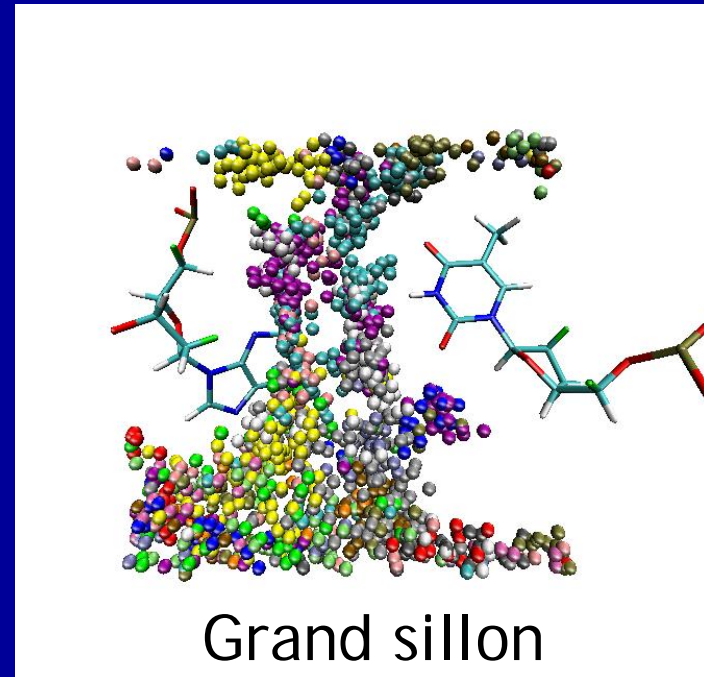
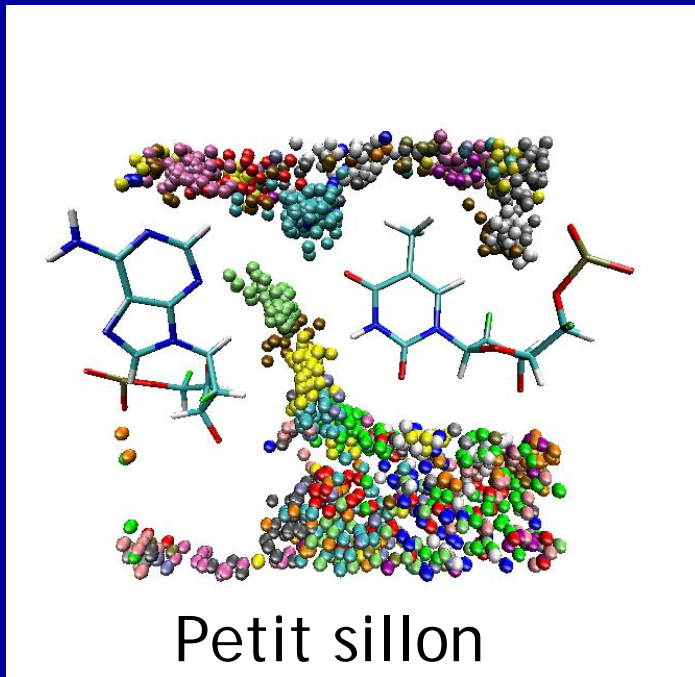
# Énergie libre de l'ouverture des bases A, T, G et C



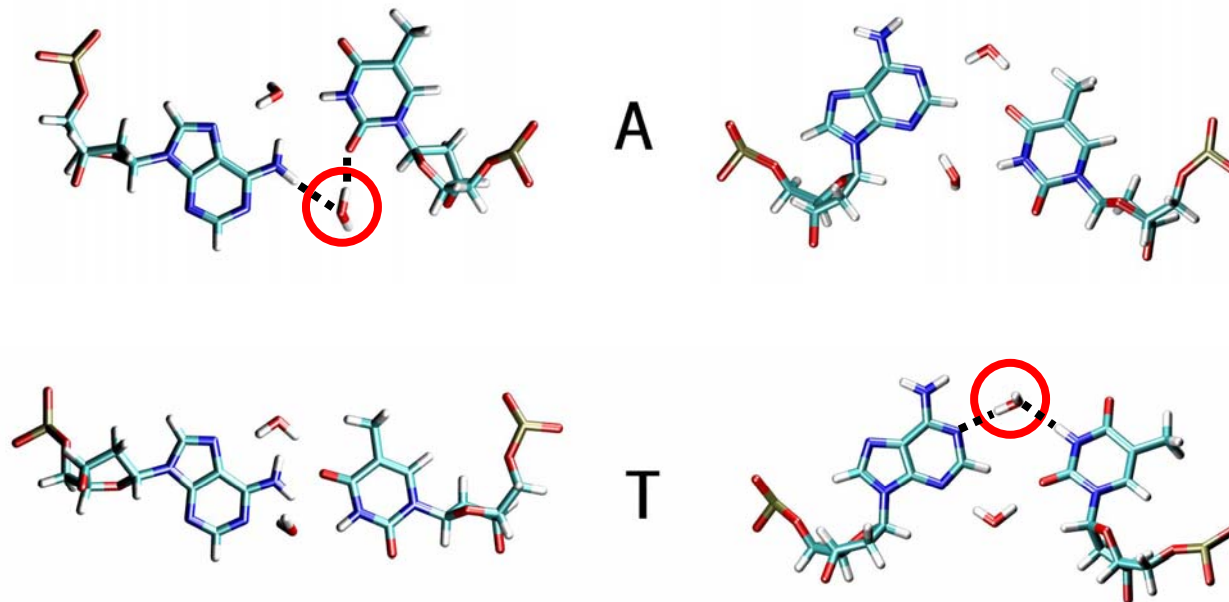
# Accessibilité des protons imino



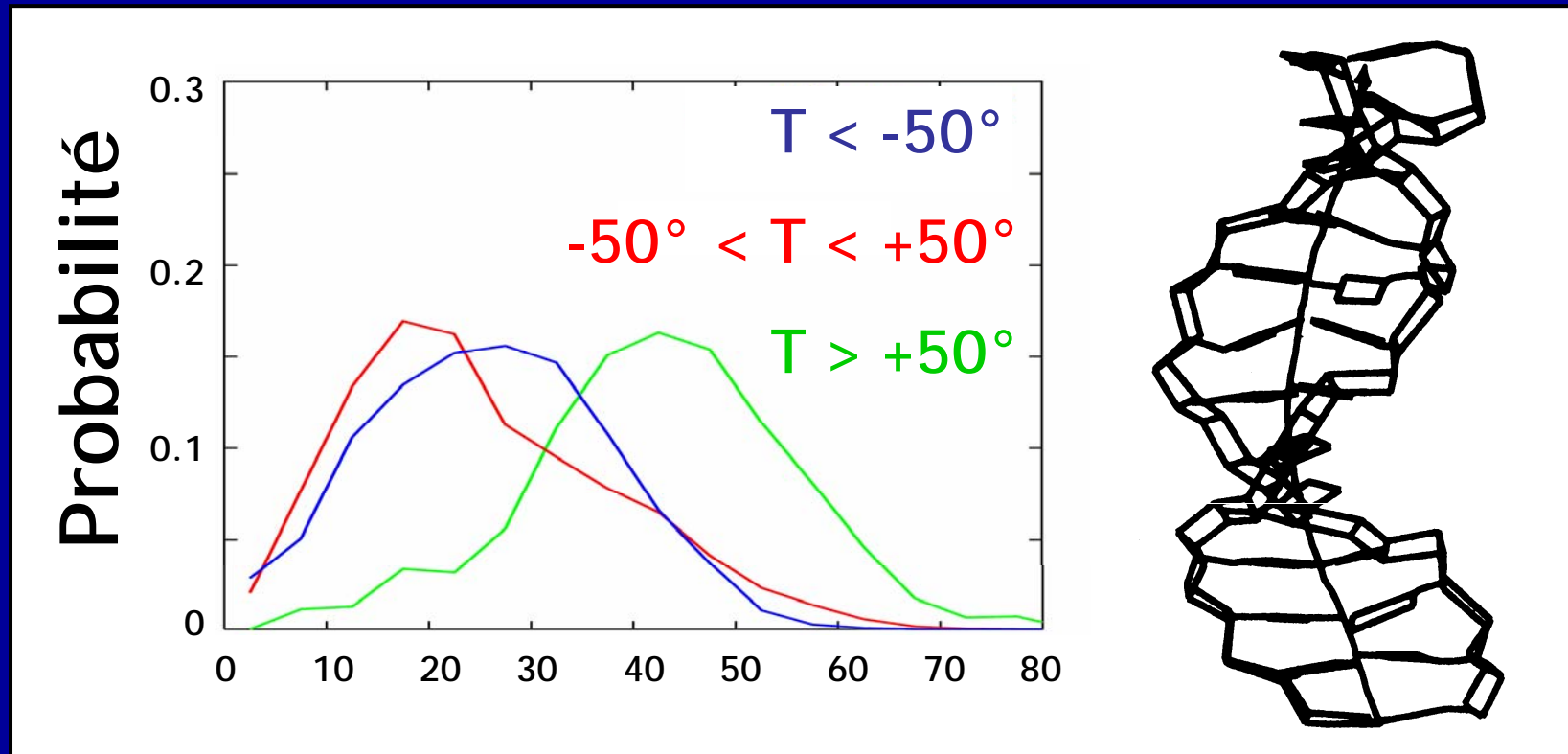
# Réorganisation des molécules d'eau autour d'une paire de bases ouverte



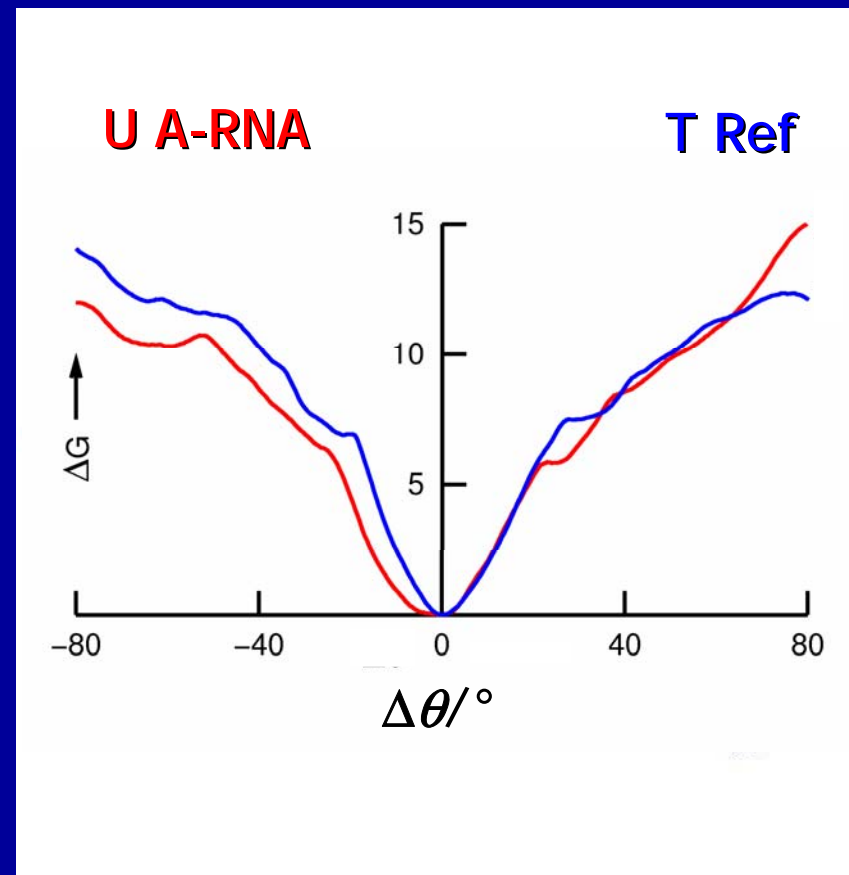
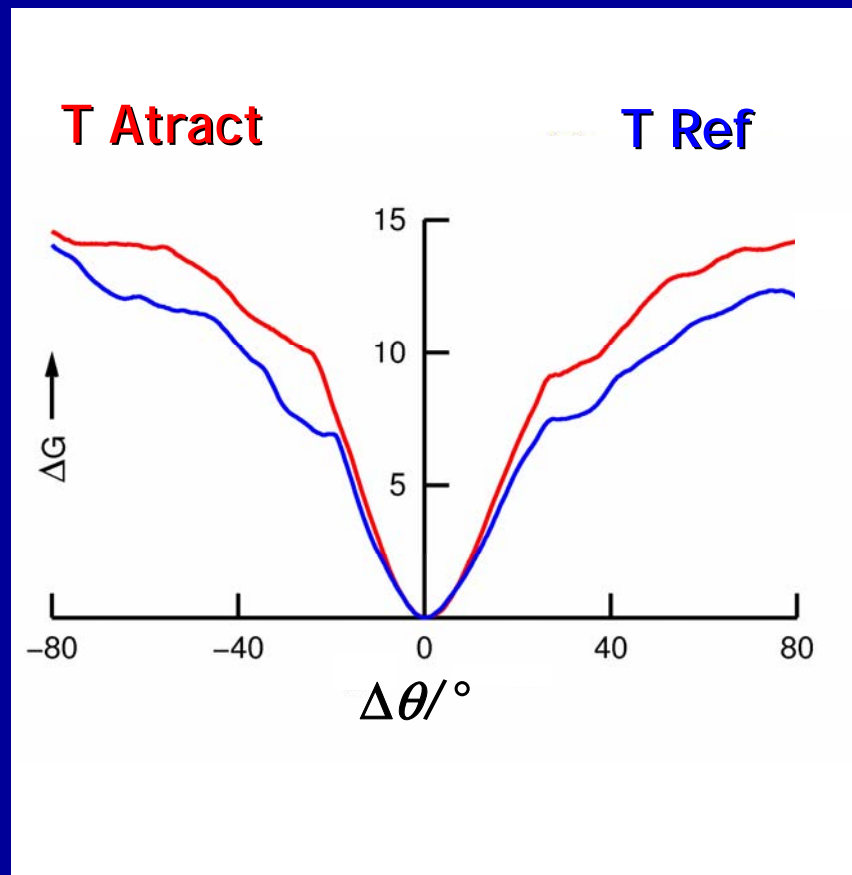
# Molécules d'eau pontées



# Amplitude de courbure (°)



# Impact de la séquence et de la structure sur l'ouverture des paires de bases

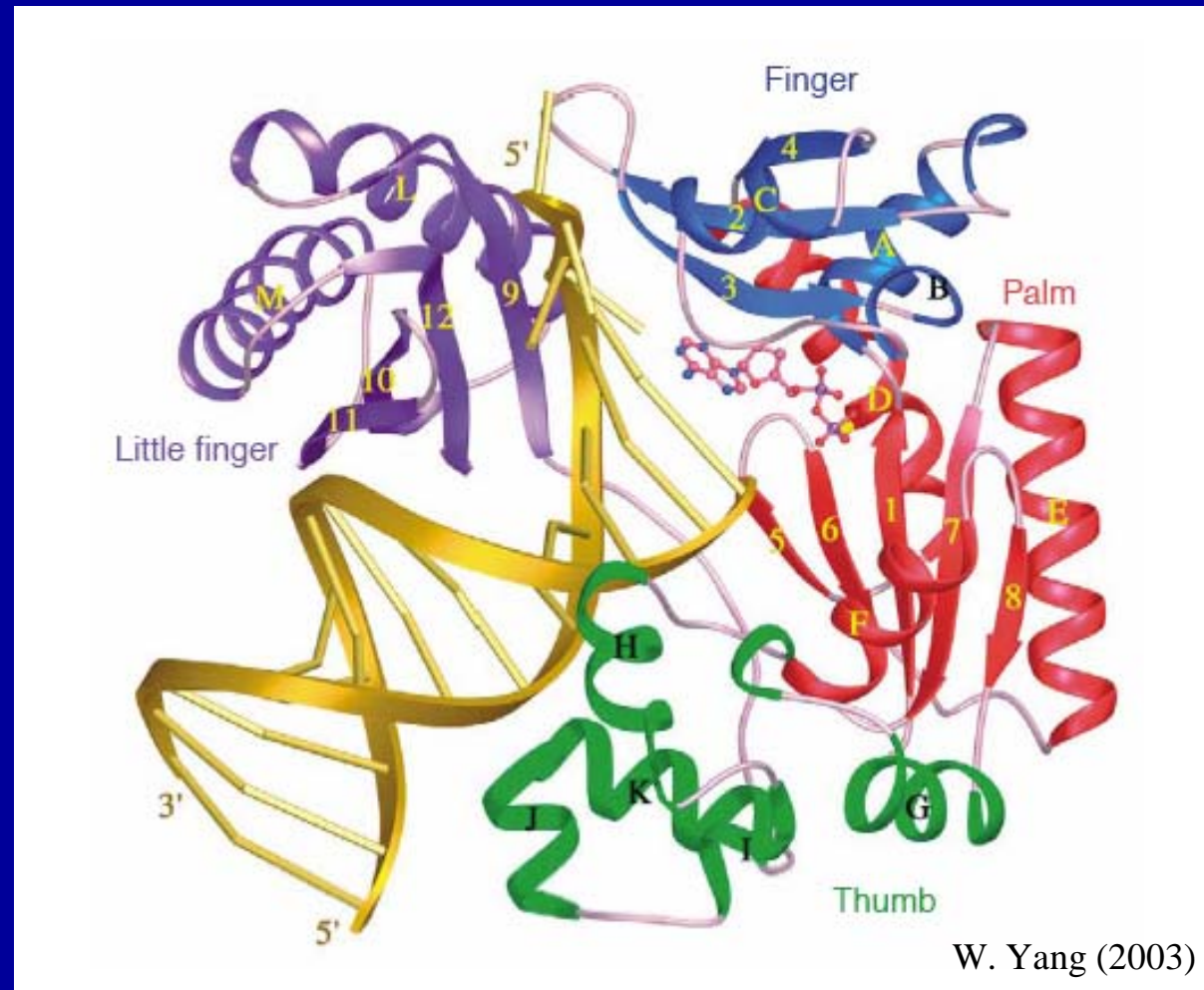




# Bilan

- Profils d'énergie libre en accord avec les précédentes études théoriques et les résultats expérimentaux
- Existence de sites d'hydratation préférentielle associés aux principaux groupes donneurs et accepteurs de liaison hydrogène
  - Stabilise peut-être un état intermédiaire de l'ouverture
- Accessibilité significative observée après seulement 50° d'ouverture
- L'ouverture facilite la courbure et cette courbure est orientée vers le grand sillon
- La durée de vie particulièrement longue des paires AT dans les A-tracs est le reflet de la contrainte additionnelle imposée par le petit sillon étroit et rigide

# Étude de la réplication d'un Cyclobutane Thymine Dimer par DPO4



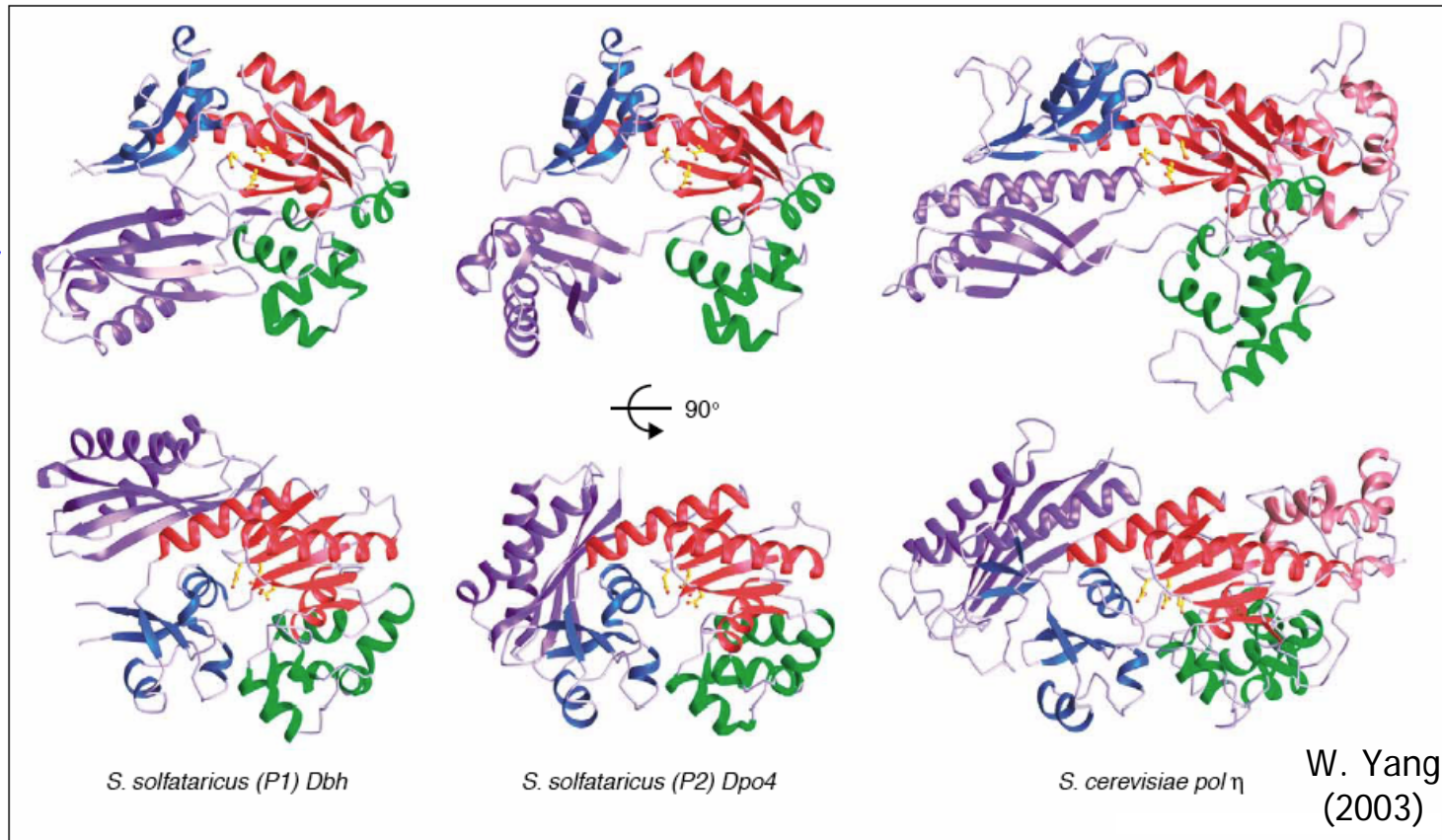
# Famille Y des DNA-Polymérases

palm

finger

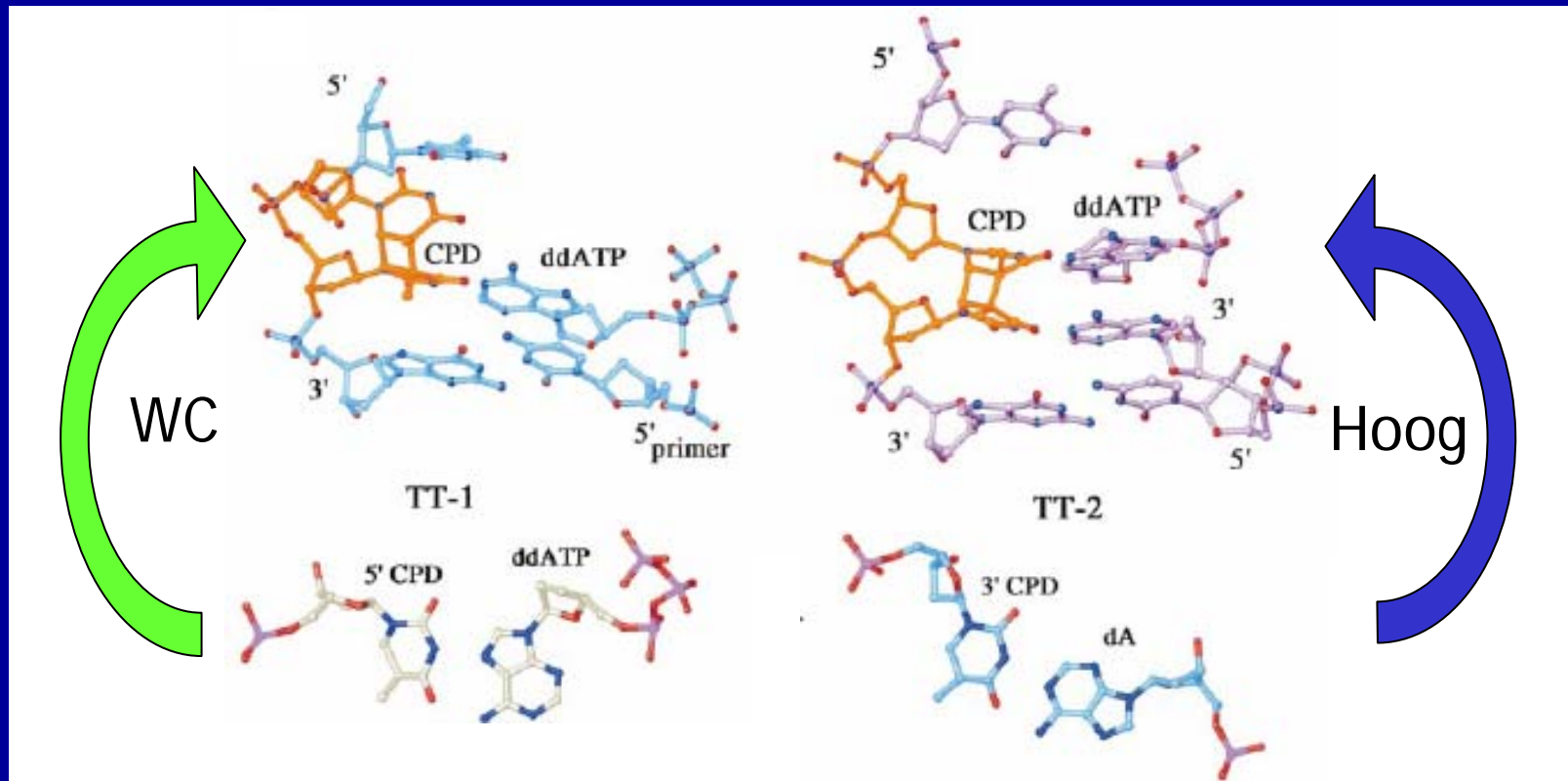
thumb

little  
finger



W. Yang  
(2003)

# Réplication par DPO4 face à un CTD



Ling et al. *Nature* (2003)

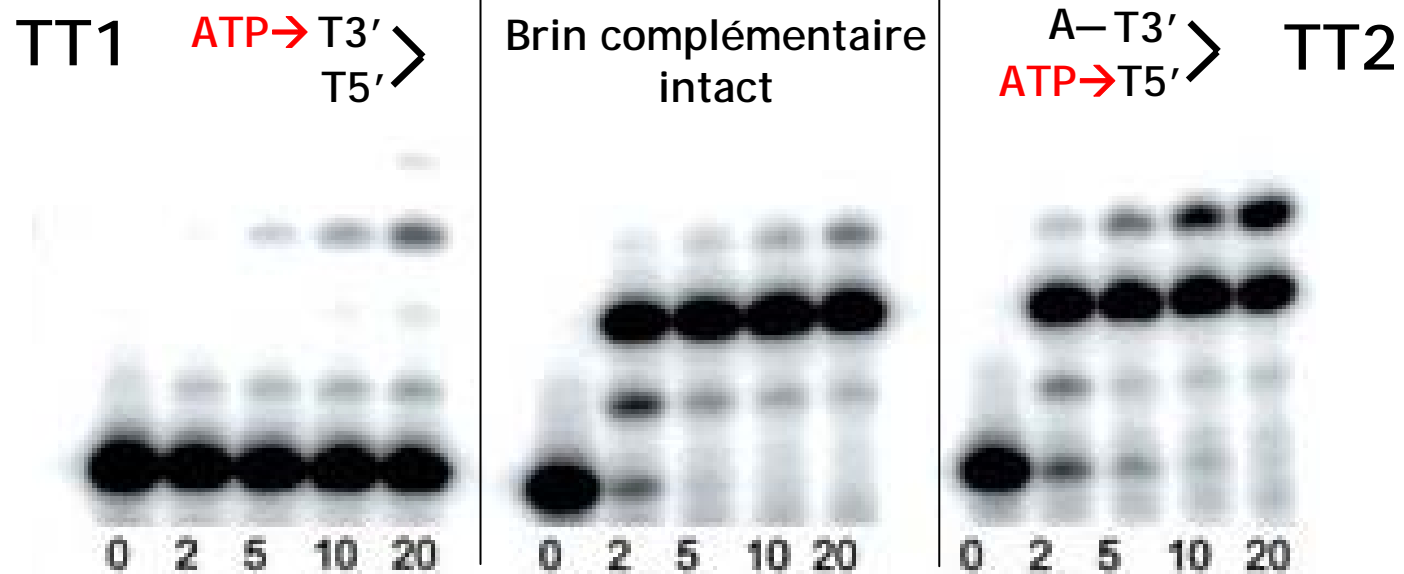
Ce mécanisme explique peut être la faible mutagénicité face à la thymine en 5' du CTD

# Méthode

- 5ns de Simulation de dynamique moléculaire pour chaque structure.
- Structure initiale: TT1 (1RYR.pdb) et TT2 (1RYS.pdb)
- remplacer  $\text{Ca}^{2+}$  par  $\text{Mg}^{2+}$  et ajouter un groupe 3' OH au brin primaire de façon a simuler une structure active
- ~12000 molécules d'eau + 150 mM de KCl pour se placer dans les conditions physiologiques

**Interprétation de la différence  
d'efficacité entre l'insertion  
d'adénine face à la thymine en  
3' ou en 5' du CTD**

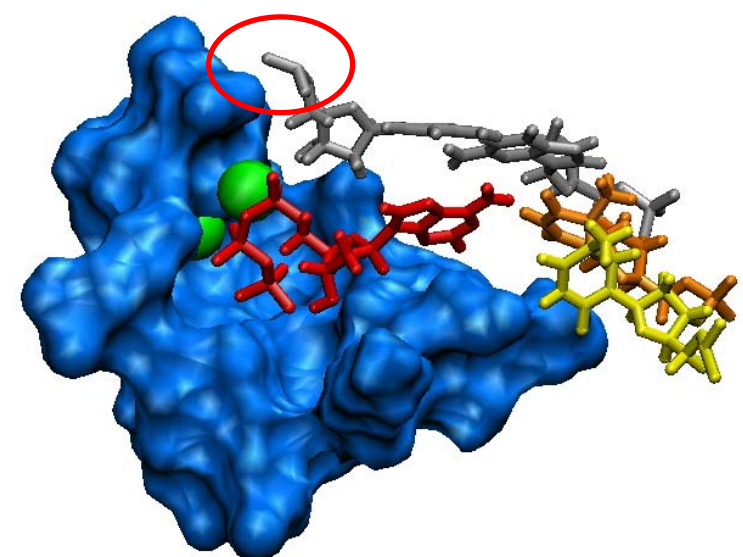
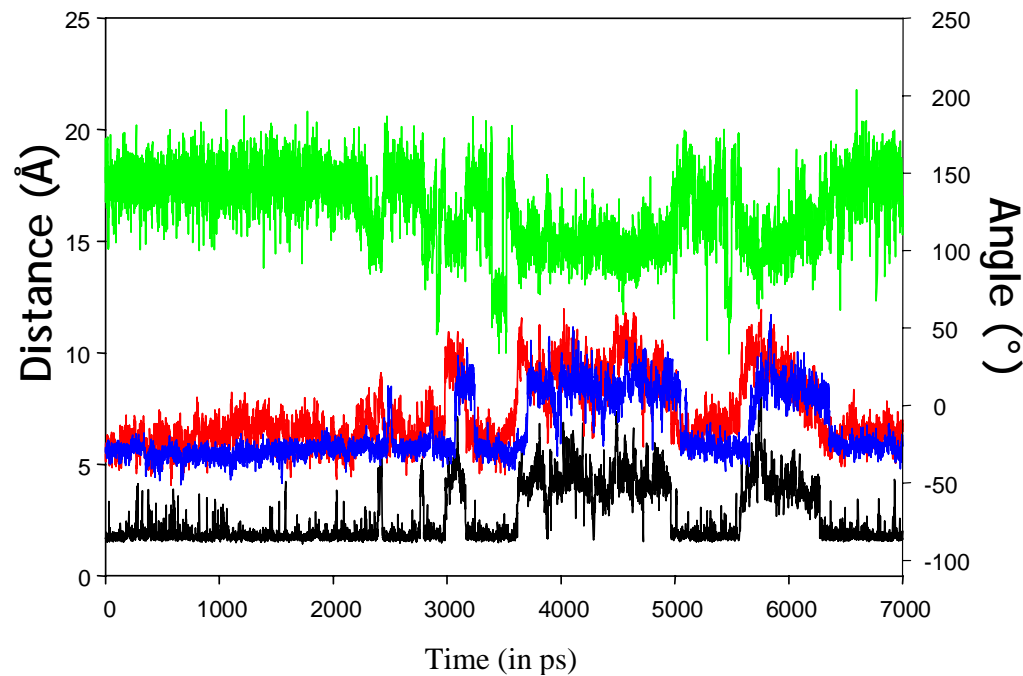
# Réplication d'un CTD par Dpo4 en solution



Ling et al. *Nature* (2003)

Extension du brin primaire couplé à un brin d'ADN intact ou en présence d'un CTD

# Fluctuation de l'angle Alpha du primaire au cours de la simulation de TT1 et mouvements corrélés dans le site actif



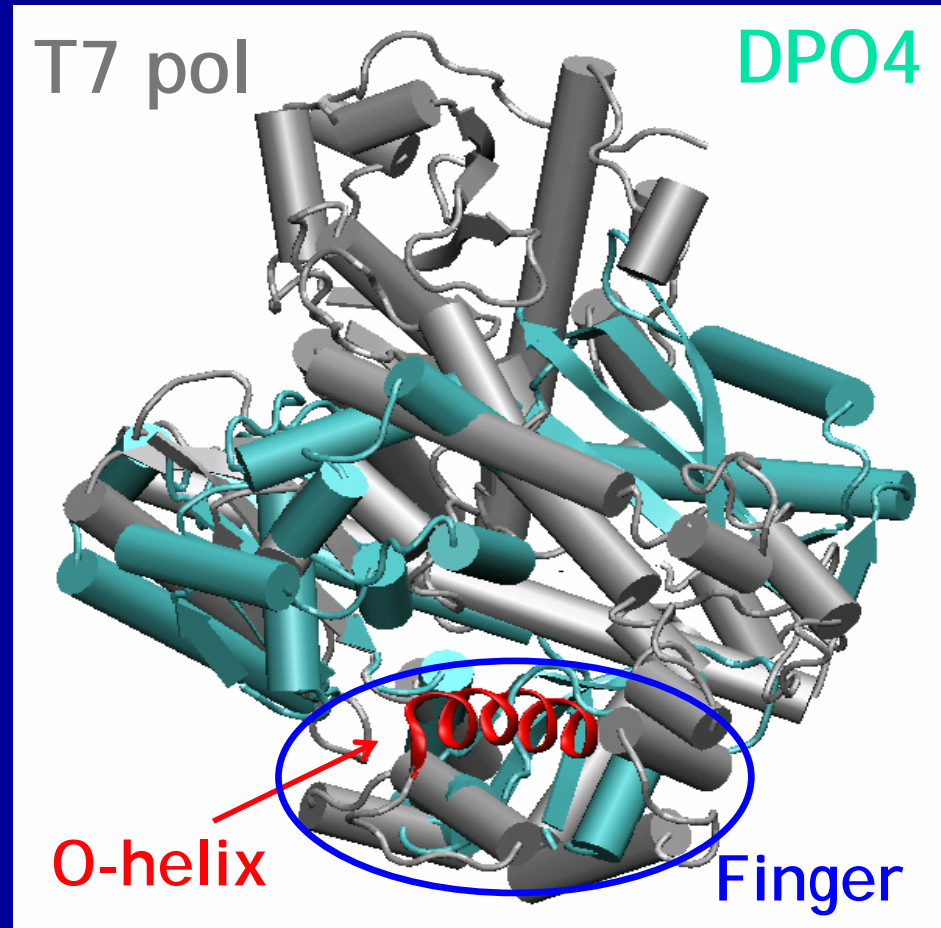
H3T-O1P : noire      O3'-E106 : rouge      O3'- Mg<sup>2+</sup> catalytique : bleu

Angle  $\alpha$  (O3'-P-O5'-C5') du primaire : vert

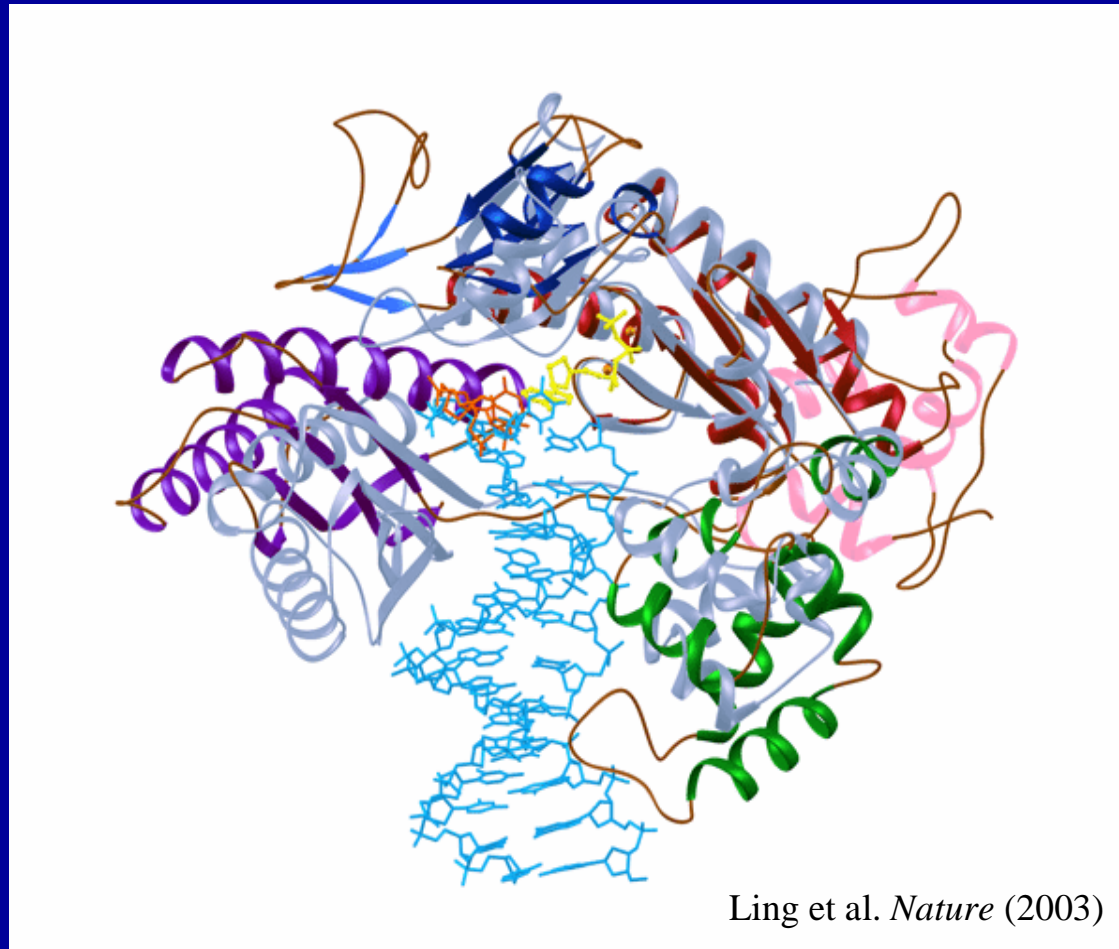


Existe t'il un mécanisme de  
« fit » induit pour DP04 ?

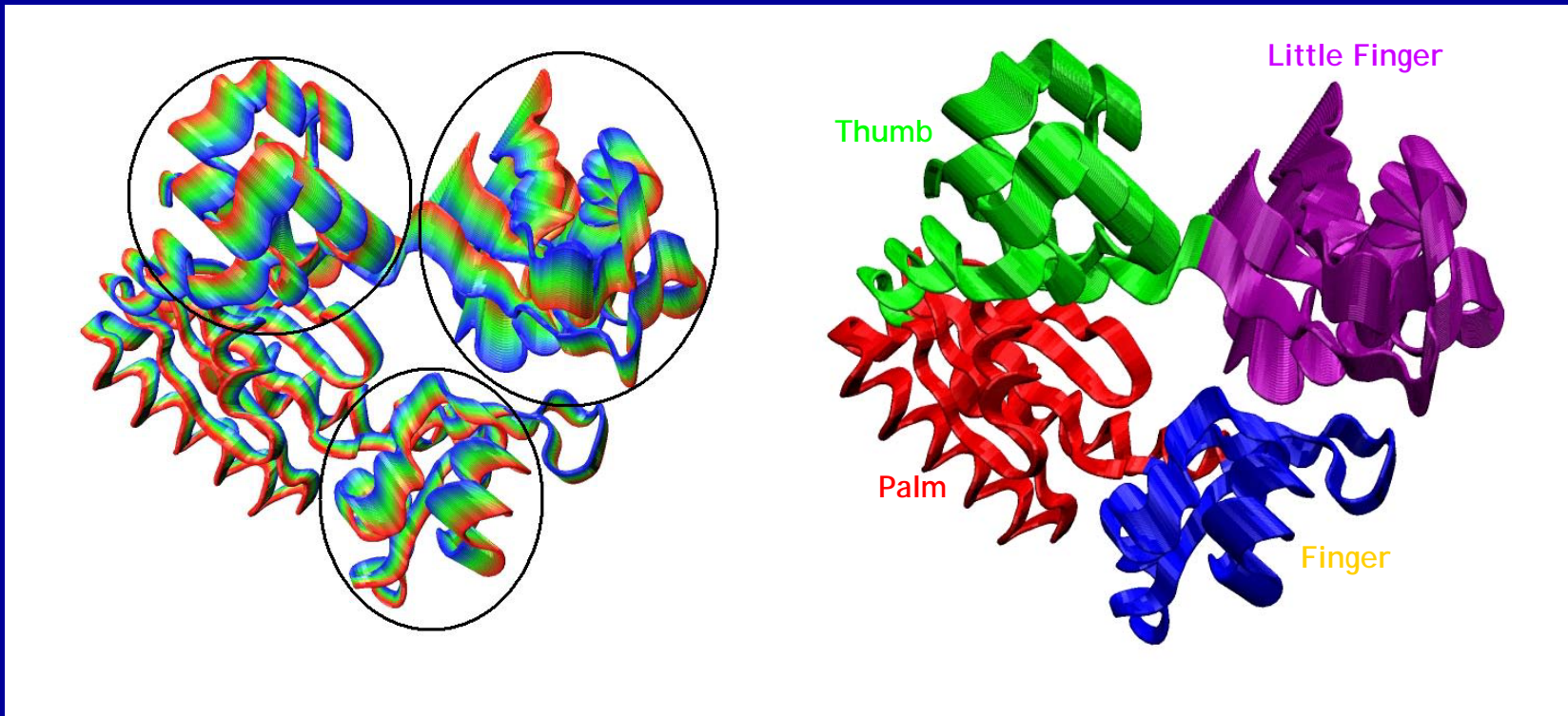
# Comparaison entre DPO4 et pol T7



# Modèle de pol $\eta$ construit par superposition de la Paume sur la structure de TT1



# Comparaison des propriétés dynamiques des complexes secondaires et tertiaires de DPO4.



# Bilan et Perspective

- La faible activité catalytique et la plus grande mutagénicité de DPO4 lors de la réplication de la thymine en 3' du CTD semblent être dues aux propriétés dynamiques du brin primaire.
- L'étude des propriétés vibrationnelles des complexes secondaires et ternaïres de DPO4 suggère que le mécanisme de « fit » induit commun aux autres polymérases s'applique également à DPO4 et aux membres de la famille Y.
- Fidélité lors de l'insertion :
  - Watson-Crick ou Hoogsteen
  - Insertion d'un NTP correcte ou incorrecte
- Fidélité lors de la catalyse :
  - Étude par chimie quantique de la catalyse
  - Étude par QM/MM de l'état de transition

# Conclusions

- les méthodes de simulation moléculaire (MD, MM, BD) constituent un outil particulièrement précieux pour l'étude des réactions biochimiques et biophysiques au niveau moléculaire.
- Autorise l'accès à des informations structurales et énergétiques.
- Permettent de simuler avec une grande exactitude le comportement de macromolécule ou de complexes macromoléculaires en solution, ou sous forme cristalline, et ce, durant plusieurs dizaines de nanosecondes.
- L'application de contraintes permet également d'étudier des changements conformationnels de plus grande envergure tout en restant qualitativement correcte.

# Remerciements

- Les membres du laboratoire de biochimie théorique et en particulier le Dr. R. Lavery et le Dr. P. Varnai.
- Les membres du projet ABC et en particulier le Pr. D. Beveridge et le Dr. S. Dixit.
- Les membres du département de Physiologie et Biophysique de l'école de médecine de l'hôpital du Mont Sinai et en particulier le Pr. R. Osman et le Dr. G. Forde.
- Les membres de l'équipe SDM
- L'ensemble des personnes ici présentes.