Sujet de stage de M2 recherche : Origine stéréochimique du code génétique – Mesures de l'affinité entre les acides aminés et leurs codons respectifs par micro-calorimétrie et effet NOE par spectroscopie RMN.

Laboratoires : (1) TIMC-IMAG[1] CNRS UMR5525, Équipe DyCTiM2[2],
Faculté de Médecine de Grenoble, 38710 La Tronche Cedex
(2) LNCMI-G[3], CNRS UPR3228 , 25 rue des martyrs, 38042, Grenoble

Contacts : Nicolas Glade (1), tel. 0456520042, E-mail. nicolas.glade@univ-grenoble-alpes.fr
Eric Beaugnon (2), E-mail. eric.beaugnon@lncmi.cnrs.fr

Contexte général.

Cette étude se situe dans le contexte de la chimie prébiotique, entre l'apparition des premières briques du vivant (acides aminés en particulier) et l'émergence des premières formes ordonnées et auto-entretenues, voire amplifiées, précurseur de systèmes de complexité croissante amenant à l'apparition de la matière vivante. Elle s'intéresse particulièrement à la possible origine stéréochimique du code génétique.

Les scénarios d'apparition des premiers systèmes auto-poïétiques (c'est-à-dire ayant la propriété de se produire eux-mêmes, en permanence et en interaction avec leur environnement, et ainsi de maintenir leur organisation malgré les changements éventuels de composants) présentent un écueil auquel de nombreuses personnes ont tenté de répondre: comment s'est établie la dualité "code génétique – protéines" et ses processus associés, la traduction en particulier. Une hypothèse ancienne concernant le code génétique fut publiée pour la première fois en 1954 par G. Gamow [1], un an après la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick. Il proposait que les acides aminés puissent s'immiscer spécifiquement dans des cavités formées par des blocs de 4 bases dans la séquence génétique (il en existe exactement 20 combinaisons dans un sens de lecture). En 1965 était découverte la correspondance que nous connaissons aujourd'hui entre chacun des acides aminés et leur(s) codon(s) respectifs. Les recherches de biologie moléculaire se sont alors focalisées sur cette machinerie de traduction fondée sur l'existence de molécules adaptatrices (les ARN de transfert assistés des ribosomes) pour passer d'un code (génétique, à triplets de 4 bases azotées possibles) à l'autre (protéique). Bien que les recherches concernant les origines du code génétique aient aussi rapidement suivi le même courant (recherche de molécules adaptatrices ancestrales nommées 'aptamères' [2,3,4,5]), quelques équipes de recherche ont néanmoins continué à s'intéresser aux fondements moléculaires du code génétique et notamment à la possible relation stéréochimique directe, sans molécules adaptatrices, entre les acides aminés et leurs triplets respectifs. Ces travaux n'ont été effectués qu'avec des modèles moléculaires ('Legos moléculaires' et plus récemment des modèles informatiques) et n'ont jamais été testés expérimentalement (seule l'affinité des acides aminées avec des aptamères a été mesurée par chromatographie d'affinité , parfois avec succès). Ils concluent pourtant à une possible relation stéréochimique spécifique entre les acides aminés et leurs codons respectifs [6,7].

Cette étude vise à quantifier par des mesures physiques de microcalorimétrie d'une part, de spectroscopie RMN d'autre part, l'interaction directe entre acides aminés et codons pour valider ou falsifier la relation primordiale soutenue par les travaux de Pelc et al [7] et de Hendry et al [6]. Ces travaux constitueront en outre un apport important dans le domaine de la régulation métabolique. En effet, nous avons déjà souligné dans [2] que selon l'intensité des interactions amino-acides – codons (affinité), les acides aminés pourraient directement participer à une régulation des processus cellulaires, en particulier la traduction. Selon le contexte environnemental, certains acides aminés peuvent se retrouver produits en quantités importantes et être en mesure d'interférer fortement, selon le principe que nous décrivons ici [1, 15, 16], avec certains éléments de la machinerie cellulaire (en particulier les ARN de transfert). Dans la mesure où ces acides aminés interagiraient spécifiquement avec leurs codons respectifs, il ne s'agirait plus d'interférence mais bel et bien de régulation.

Ce travail de recherche est soutenu par le Cross-Disciplinary Program *Origine du Vivant et des Planètes*, inscrit dans le cadre de l'IDEX Grenoblois. L'envolée que vit la recherche de planètes extra-solaires, y compris de type tellurique, ainsi que la volonté d'exploration des lunes des géantes gazeuses du système solaire (Europe, Encelade, Titan), provoque un nouvel engouement pour la question de l'apparition de la vie dans l'univers, et bien sûr son origine sur Terre. Notre recherche a donc pour objectif d'alimenter les réflexions de ce CDP concernant la phase prébiotique, et éventuellement de suggérer des mécanismes et composés à identifier permettant de caractériser l'émergence ou la présence de vivant dans des systèmes extra-terrestres.

---

1 Techniques de l'Ingénierie Médicale et Complexité – Informatique et Mathématiques Appliqués, Grenoble.
2 Dynamique Cellulaire et Tissulaire, Modélisation et Microscopie
3 Laboratoire National des Champs Magnétiques Intenses - Grenoble.

Objectif du stage et méthodologie.

Ce travail expérimental consistera en la mesure, par deux techniques indépendantes de mesures physiques, des forces d'interaction entre des acides-aminés et leurs codons respectifs dans le code génétique, et à mettre en évidence la spécificité de cette reconnaissance amino-acide – codon. L'objectif de ces expériences est de montrer que, non seulement de simples triplets de nucléotides peuvent, avec une affinité faible mais non négligeable et spécifique, complexer leurs acides-aminés correspondants (dans le code génétique), mais aussi que l'on peut confiner (rendre proches voisins) au moins 2 acides aminés donnés sur leurs triplets correspondants dans un hexanucléotide (séquence de 6 nucléotides, donc 2 codons adjacents).

Une première technique que nous souhaiterions employer est la spectroscopie RMN. Nous chercherons à mesurer l'effet NOE (acronyme anglais pour Nuklear Overhauser Effect) qui décrit une interaction entre deux spins à travers l'espace, sur des distances d'au maximum 5 à 6 Å, et qui ne concerne pas les liaisons chimiques (couplage scalaire). Cet effet se manifeste par une modification des temps de relaxation nucléaire, observée par une faible variation de l'intégration du signal RMN sur les noyaux considérés. Cela est du à un transfert d'énergie entre noyaux excités voisins dans l'espace. Si les acides aminés font preuve d'une affinité suffisante pour leurs codons respectifs, des proximités moléculaires suffisamment stables dans le temps pourront être mises en évidence par mesure de cet effet.

L'autre technique que nous souhaitons utiliser est la micro-titration calorimétrique (ITC, pour Isotherm Titration Calorimetry). Cette technique permet de mesurer la chaleur de réaction de solution en fonction du volume du réactif titrant. Elle permet notamment d'accéder à l'enthalpie et à l'entropie de cette réaction. Dans notre cas, c'est une interaction faible (acides aminés - codons) mais spécifique que nous souhaitons mettre en évidence, l'agent titrant étant un acide aminé. Nous allons ainsi procéder à des injections de quantités croissantes d'acides aminés dans des solutions de polynucléotides dans un tampon phosphate (peu enclin à interagir avec nos composés). Nous allons ainsi mesurer, par ITC, l'affinité de fixation (Ka), les variations d'enthalpie (ΔH) et la stoechiométrie de fixation de ces interactions.

Pour une technique comme pour l'autre, nous procéderons ainsi pour des jeux d'acides aminés correspondants ou au contraire ne correspondant pas aux polycodons en solution.

Un préalable a ces expériences a été de déterminer les séquences hexanucléotidiques, parmi les 4096 (4^6) existantes, que nous pourrons utiliser (il ne faut en effet pas qu'elles puissent s'auto-hybrider et devenir compétitrices des acides aminés ; il faut aussi éviter qu'elles contiennent des codons parasites (un hexanucléotide contient 4 codons et nous souhaitons que seuls les 2 codons adjacents participent)) et celles qui donnent le plus de chance de réussite pour les premières mesures (celles qui contiennent les codons capables du plus grand nombre d'interactions avec leurs acides aminés). Les affinités qu'on attend dans ces expériences sont en effet probablement très faibles. Un programme informatique a permis de donner un score à ces séquences en se servant notamment des données fournies notamment par S. Pelc et M. Welton [15] estimant le nombre d'interactions entre chaque acide aminé et ses codons. Nous utiliserons ainsi des di-codons duement sélectionnés (ex : 3'TCCCTC5' ou 3'TGGTTT5') mais également des polycodons de 21 à 30 nucléotides (répétitions de ces hexanucléotides).

Résultats attendus.

Ce projet qui a des retombées potentielles importantes dans le domaine de la régulation cellulaire permettra de valider l'hypothèse de l'origine stéréochimique du code génétique en confirmant les résultats théoriques de Pelc et Welton [7] et de Hendry et al [6]. Cette validation est essentielle pour accepter les modèles de chimie prébiotique (en particulier les modèles typogénétiques tels que celui initialement proposé par D. Hofstader) [8-10] car elle résoudrait en grande partie le problème de la traduction primordiale de séquences polynucléotidiques en peptides. Ces mesures n'ont jamais été réalisées.

Compétences requises

Le candidat à ce stage de Master 2 Recherche devra posséder un bon savoir faire en biophysique et notamment des connaissances théoriques suffisantes en spectroscopie RMN et thermodynamique. Ce travail étant exploratoire, le candidat devra en outre faire preuve d'adaptabilité et d'initiative.

Bibliographie.

[1] Gamow, G.: Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures. Nature 173 (1954) 318

[2] Demongeot J., Glade N., Moreira A., Vial L., *RNA Relics and the Origin of Life*. Int. J. Mol. Sci. (2009) 10, 3420-3441

[3] Demongeot J., Glade N., Moreira A., *Evolution and RNA relics. A system biology view*, Acta Biotheor. (2008) 56:1-

2, 5-25
[4] Knight, R. D., Landweber, L. F.: Rhyme or reason: RNA-arginine interactions and the genetic code. Chem. & Biol. 5 (1998) R215
[5] Knight, R. D., Landweber, L. F.: The early evolution of the genetic code. Cell 101 (2000) 569
[6] Hendry, L. B., Bransome, E. D., Hutson, M. S., Campbell, L. K.: First approximation of the stereochemical rationale for the genetic code based on the topography and physicochemical properties of "cavities" constructed from models of DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 7440
|7] Pelc, S. R., Welton, M. G. E.: Stereochemical relationship between coding triplets and amino-acids. Nature 209 (1966) 868.
[8] Kauffman S., Autocatalytic sets of proteins, J. Theor. Biol. (1986) 119, 1
[9] Varetto J., Typogenetics: an artificial genetic system, J. Theor. Biol. (1993) 193, 257
[10] Hofstadter D. R., *Gödel, Escher, Bach: An eternal golden braid*, Basic Books, Inc. New York, 1979

Date de la proposition : 19/01/2019
Durée: 6 mois
Gratification de stage prévue

Signature du responsable scientifique
N. GLADE