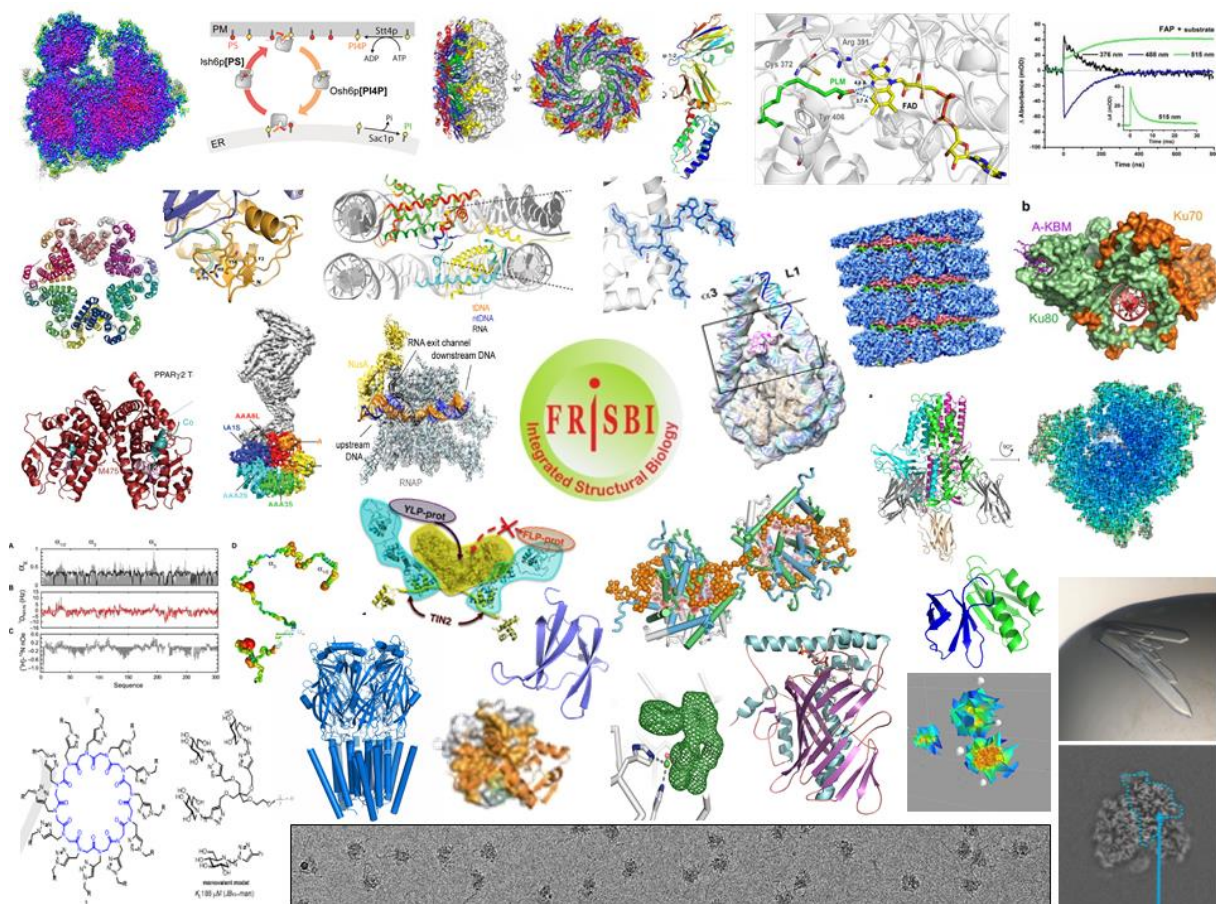


# 6<sup>e</sup> école de biologie structurale intégrative

## du 21 au 28 juin 2019

CAES de la Vieille Perrotine - Saint-Pierre d'Oléron



# Programme

## Vendredi 21 juin

Arrivée depuis la gare de La Rochelle Ville en bus

**Soirée** : Introduction et présentation générale - Présentation des étudiants et des formateurs

## Samedi 22 juin

**Matin** : Préparation d'échantillons en vue d'études structurales, interactions rayonnements-matière

**Après-midi** : Fondamentaux Bio-RX (diffusion et diffraction), fondamentaux RMN, fondamentaux Cryo-EM, rappels structuraux, chimie pour la biologie

**Soirée** : Introduction à Linux. Les rudiments pour les TPs/TDs.

## Dimanche 23 juin

**Matin** : MX : Diffraction et diffusion des rayons X – Aspects conceptuels

**Après-midi** : Diffraction et diffusion des rayons X – Aspects pratiques

**Soirée** : Les développements technologiques RX.

## Lundi 24 juin

**Matin** : Cryo-microscopie Electronique – Aspects conceptuels

**Après-midi** : Cryo-microscopie Electronique – Aspects pratiques

**Soirée** : Développements de la cryo-EM vers la biologie structurale cellulaire

## Mardi 25 juin

**Matin** : Analyse des interactions moléculaires, contrôle-qualité des échantillons

**Après-midi** : libre et/ou activités diverses

**Soirée** : Escape Game

## Mercredi 26 juin

**Matin** : Résonance Magnétique Nucléaire – Aspects conceptuels

**Après-midi** : Résonance Magnétique Nucléaire – Aspects pratiques

**Soirée** : Quizz BSI

## Jeudi 27 juin

**Matin** : Méthodes complémentaires

**Après-midi** : TP SAXS et BLI

**Soirée** : Soirée dansante

## Vendredi 28 juin

**Matin** : Retour vélos, départ vers la gare de La Rochelle en Bus

# Sponsors et partenaires

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

**DECTRIS**  
detecting the future

**PALL** FortéBio®

**MOTEMPER**

  
**NovAliX**

**X** **xenocs**  
Exploring the very small

**SEC-SAXS in the laboratory**  
[www.xenocs.com](http://www.xenocs.com)

 **Eurisotop**



**Sf $\mu$**   
Société Française  
des Microscopies

**aviesan**  
alliance nationale  
pour les sciences de la vie et de la santé



# Programme détaillé

## Vendredi 21 juin

**17h30 : Bus depuis la gare de La Rochelle Ville (Trajet 1h15 vers La vieille Perrotine)**

**18h30 : Arrivée CAES**

**19h30 : Dîner**

**20h45 : Introduction et présentation générale**

*Jean Cavarelli (IGBMC, Strasbourg-Illkirch). Coordinateur ReNaFoBiS*

**21h15 : Présentation des étudiants et des formateurs**

## Samedi 22 juin

**Matin :**

**8h15 : Prise en charge des vélos**

**9h00 : Préparation des échantillons en vue des études structurales**

*Arnaud Poterszman (IGBMC, Strasbourg-Illkirch)*

Les systèmes d'expression eucaryotes constituent une alternative à la production en bactérie lorsque des protéines ou complexes multi protéiques ne peuvent être obtenus sous forme soluble ou reconstitués in vitro à partir des constituants isolés. Après un tour d'horizon des systèmes d'expression utilisés pour la préparation d'échantillons en vue d'études structurales, les principales approches pour la production de complexes multi-protéiques recombinants et l'analyse d'interactions protéine-protéines seront discutées. Un dernier volet sera focalisé sur les possibilités offertes par les techniques d'ingénierie du génome pour étiqueter des gènes de cellules mammifères et ainsi isoler plus facilement des complexes endogènes peu abondants et les caractériser dans un contexte cellulaire.

**10h30 : Pause**

**11h00 : Interactions rayonnements- matière**

*Dominique Housset (IBS, Grenoble)*

Nous présenterons le plus simplement possible les principes physiques qui nous permettent d'obtenir les informations structurales à l'échelle atomique. En partant des limites de la microscopie optique, nous montrerons comment nous pouvons "voir" les atomes et modéliser les macromolécules biologiques, grâce aux ondes électromagnétiques (photons X, ...), aux électrons ou aux neutrons et aux différentes techniques qui les utilisent (diffraction des rayons X ou des neutrons, microscopie électronique, SAXS, ...).

Nous présenterons les interactions entre "rayonnement" et matière à la base de ces techniques pour mieux comprendre ce que l'on "voit", ainsi que quelques concepts et outils (transformée de Fourier, ...) qui permettent d'obtenir les modèles macromoléculaires.

**12h45 : Déjeuner**

## **Après-midi :**

### **14h00 : Fondamentaux Bio-RX (diffusion et diffraction)**

*Patrice Gouet (IBCP, Lyon)*

Diffusion et diffraction des rayons X pour des études structurales de macromolécules biologiques en SAXS et Cristallographie.

### **15h15 : Fondamentaux RMN**

*Catherine Bougault (IBS, Grenoble)*

À l'autre extrémité du spectre électromagnétique par rapport aux photons X, les ondes radiofréquences sont utilisées en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour obtenir des informations structurales et dynamiques sur les macromolécules biologiques. Après une introduction sur les principes physiques de la RMN, nous introduirons les divers paramètres clés pour la détermination de structure, pour l'acquisition d'information sur la dynamique de l'échantillon, ou pour l'étude d'interaction entre divers partenaires biologiques. Les concepts simples présentés seront réinvestis durant la journée dédiée à cette méthode.

### **16h30 : Pause**

### **17h00 : Fondamentaux Cryo-EM**

*Ottillie Loeffelholz von Colberg (CBI/IGBMC, Strasbourg-Illkirch), Bruno Klaholz (CBI/IGBMC, Strasbourg-Illkirch), Olivier Lambert (CBMN, Bordeaux)*

Historique des grandes étapes et développements en microscopie électronique, ce que l'on peut voir selon le niveau de résolution, exemples de structures au fil du temps, réalisations récentes.

Ce que l'on peut voir avec un microscope; éléments clés d'un TEM et obtention d'une projection de l'objet; concepts généraux en traitement d'images: formation d'image, transformé de Fourier et spectre de puissance en fonction des fréquences spatiales, contraste des images, phase plates, attribution angulaire, concept de rétro-projection et de reconstruction 3D.

Concepts cryo-EM et traitement d'images, le lien avec les 3 prix Nobel en cryo-EM 2017; ce qu'on obtient en cryo-EM: une carte de cryo-EM (un potentiel électrostatique), comment l'interpréter; distinction entre reconstruction 3D/carte et modèle atomique, affinement du modèle atomique; comparaison des méthodes, intégration multi-échelle, vers la biologie structurale intégrative.

### **18h30 : Rappels structuraux, chimie pour la biologie**

*Bruno Klaholz*

Intérêt d'une étude structurale: interactions / reconnaissance moléculaire.

### **19h30 : Dîner**

### **21h00 : Introduction à Linux. Les rudiments pour les TPs/TDs. Distribution des clés USB**

*Alain Roussel (AFMB, Marseille)*

## **Dimanche 23 juin**

### **Matin : Diffraction et Diffusion des Rayons X – Aspects conceptuels**

#### **9h00 : MX : Cristallisation et préparation des échantillons**

*Mirjam Czjzek (Station Biologique, Roscoff)*

Prérequis d'échantillons en vue de la cristallisation, contrôles qualités et principes de la cristallogénèse.

#### **9h45 : SAXS**

*Mirjam Czjzek*

Principes de bases de la diffusion des rayons X aux petits angles, et comparaison à la cristallographie.

#### **10h30 : Pause**

#### **11h00 : Acquisition de données cristallographiques / Stratégie d'enregistrement de données**

*Dominique Housset*

Le principe de l'enregistrement des données cristallographiques à partir d'un cristal sera présenté. Un rappel sur les symétries cristallines sera fait, pour bien comprendre l'impact qu'à la symétrie du cristal sur les données cristallographiques. Enfin, nous montrerons comment le choix de différentes stratégies d'enregistrement va impacter les données finales. Le but global étant de comprendre comment obtenir le maximum d'information à partir du cristal.

#### **11h45 : Phasage/Affinement**

*Patrice Gouet*

Principes des méthodes de phasage par remplacement moléculaire, remplacement isomorphe multiple et utilisation du signal anomal, affinement et validation de la structure cristalline.

#### **12h45 : Déjeuner**

### **Après-midi : Diffraction et Diffusion des Rayons X – Aspects pratiques**

#### **14h00 : Aspects pratiques. Du traitement des données cristallographiques à la construction du modèle.**

*Mirjam Czjzek, Patrice Gouet, Dominique Housset*

#### **16h30 : Pause**

#### **16h45-18h00 : Aspects pratiques. Du traitement des données cristallographiques à la construction du modèle, suite**

#### **19h30: Dîner**

#### **21h00: Integrated Biology at 3rd generation synchrotrons: applications and possibilities at Synchrotron SOLEIL**

*Leonard Chavas (SOLEIL, Gif-sur-Yvette)*

Avec l'explosion d'intérêt récente pour la microscopie électronique et les méthodes intégrées, la contribution des synchrotrons envers la communauté biologique a besoin d'être repensée, de manière à s'adapter et répondre à ses évolutions technologiques rapides. Les membres de la section scientifique biologie et santé du Synchrotron SOLEIL ont pour ambition de changer les modes d'accès au synchrotron, de manière à prendre en compte ces demandes grandissantes d'accès à des méthodologies complémentaires pour une biologie totalement intégrée.

En prenant comme exemples divers cas rencontrés à SOLEIL, je vais faire le point sur les complémentarités entre les techniques mises à disposition sur les synchrotrons, en mettant l'accent sur l'importance de cette intégration pour la biologie.



## **Lundi 24 juin**

### **Matin : Cryo-microscopie Électronique – Aspects conceptuels**

**9h00 : Préparation d'échantillons en cryo-EM; l'eau vitreuse; collecte de données; caméras à détection directe d'électrons et « movie processing »**

*Olivier Lambert*

**9h45: Traitement d'images (1): correction de la fonction de transfert du contraste (CTF), sélection des particules, centrage, normalisation, méthodes de classification 2D, attribution angulaire, reconstruction 3D initiale**

*Otilie Loeffelholz von Colberg*

**10h30 : Pause**

**11h00 : Traitement d'images (2): concept de rétroprojection et reconstruction 3D; obtention d'une carte cryo-EM; théorème de la section centrale en espace Fourier; type de filtres (bande passante etc.); groupes ponctuels de symétrie (symétries internes)**

*Leandro Estrozi (IBS, Grenoble)*

**11h45 : tris de structures par classification 3D, classifications et affinements focalisés; filtre de la carte cryo-EM et interprétation de la carte, affinement du modèle atomique**

*Bruno Klaholz*

**12h45 : Déjeuner**

### **Après-midi : Cryo-microscopie Electronique – Aspects pratiques**

**14h00 : Aspects pratiques**

*Otilie Loeffelholz von Colberg, Leandro Estrozi, Olivier Lambert, Bruno Klaholz*

**16h30 : Pause**

**16h45 : Aspects pratiques, suite**

**19h30 : Dîner**

**21h00 : Développements de la cryo-EM vers la biologie structurale cellulaire**

*Amélie Leforestier (LPS, Paris)*

La cryo-microscopie n'est pas uniquement réservée à l'étude des macromolécules isolées en solution. Elle permet également de faire de la biologie structure in situ et d'explorer la conformation des macromolécules directement au sein de leur environnement cellulaire. La cryoME cellulaire doit faire face à des problèmes spécifiques : la vitrification d'objets massifs que sont les cellules et tissus (hélium liquide, haute pression); l'obtention à partir de ces objets, de spécimens minces transparents aux électrons par cryo-sections ou amincissement ionique; l'utilisation de la cryo-tomographie pour accéder aux structures 3D; l'identification des espèces moléculaires au sein d'un milieu dense et hétérogène par corrélation cryoME/cryo-microscopie de fluorescence.

## **Mardi 25 juin**

### **Matin : Approches Complémentaires/ Contrôle-Qualité des échantillons.**

**9h00 : Approches complémentaires pour l'analyse des interactions moléculaires.**

**Illustrations sur plusieurs systèmes biologiques**

*Alain Roussel*

Il existe de nombreuses méthodes d'investigation des interactions entre macromolécules. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Nous proposons dans un premier temps de revoir les définitions de différents paramètres cinétiques et thermodynamiques. Dans un second temps nous regarderons comment les méthodes comme la « surface plasmon resonance (SPR), la « isothermal titration calorimetry » (ITC), la « bio-layer interferometry » (BLI) ou la « micro scale thermophoresis » (MST) permettent de déterminer certains de ces paramètres.

**10h15 : Présentation sponsor FortéBio**

*Florian Bossard*

**10h30 : Pause**

**11h00 : Contrôle-Qualité des échantillons**

*Arnaud Poterszman*

Les principales approches utilisées pour la caractérisation des échantillons et le contrôle qualité seront discutées. Elles incluent des techniques pouvant nous renseigner sur la pureté des échantillons (analyse SDS PAGE, spectrométrie de masse), leur homogénéité et stabilité (Gel filtration, Diffusion dynamique de la lumière, dichroïsme circulaire, fluorimétrie différentielle,..) ainsi que sur leur taille et forme (MALLS, Ultracentrifugation analytique, SAXS, Microscopie Electronique).

**12h15 : Présentation sponsor Nanotemper**

*Pierre Soule*

**12h45 : Déjeuner**

### **Après-midi : libre et/ou activités diverses**

**19h30: Dîner Paëlla**

**21h00: Escape Game**

*Marie Hélène Le Du et l'équipe encadrante*



## **Mercredi 26 juin**

### **Matin : Résonance Magnétique Nucléaire – Aspects conceptuels**

#### **9h00 : Introduction à la spectroscopie RMN biomoléculaire à l'état solide**

*Robert Schneider (UGSF, Lille)*

La spectroscopie RMN à l'état solide est devenue une méthode de pointe pour analyser à haute résolution structure, dynamique et fonction des biomolécules. Elle n'est pas, en principe, limitée par la taille des molécules; elle peut accéder aux molécules insolubles et elle ne nécessite pas que les systèmes étudiés soient ordonnés à longue échelle. Ceci permet d'étudier, par exemple, les protéines membranaires dans une bicouche lipidique ou des grands assemblages comme les fibrilles amyloïdiques. Comme, dans un échantillon solide, il n'y a pas de rotation globale de molécules comme en solution, des interactions anisotropes sont présentes qui peuvent considérablement élargir les lignes spectrales, mais qui peuvent aussi être exploitées spectroscopiquement. Ce cours présentera les concepts propres à l'étude structurale des biomolécules par RMN à l'état solide. Nous illustrerons également la puissance de cette technique sur de nombreux exemples.

#### **10h00 : Contributions de la RMN à la biologie structurale : Approches multi-échelles spatiales et temporelles**

*Carine van Heijenoort, (ICSN, Gif-sur-Yvette)*

#### **11h00 : Pause**

#### **11h30 : Relaxation et phénomènes dynamiques**

*Carine van Heijenoort*

#### **12h00 : Instrumentations et derniers développements en liquide/solide**

*Catherine Bougault, Robert Schneider*

Ce cours présentera les derniers développements apparus ces dernières années en RMN. Nous évoquerons les progrès réalisés en instrumentation et en préparation d'échantillons, ainsi que l'émergence de nouveaux concepts. Nous reviendrons également sur des exemples marquants d'apport de la RMN en biologie structurale ou biologie au sens large.

#### **12h45: Déjeuner**

### **Après-midi : Résonance Magnétique Nucléaire – Aspects pratiques**

#### **14h00 : Aspects pratiques**

*Marc-André Delsuc (IGBMC, Strasbourg-Illkirch), Carine van Heijenoort, Robert Schneider, Catherine Bougault*

Ce cours pratique sera divisé en groupes de niveaux en fonction de l'expérience préalable des participants avec la RMN: un groupe "ouvert à tou.te.s" pour discuter de tout ce que les participants ont envie de savoir sur la RMN; un groupe "intermédiaire" où on va présenter principalement le spectre HSQC et ce qu'il permet d'apprendre de manière qualitative sur la protéine étudiée (repliement, interactions, ...); et un groupe "avancé" où on va, en fonction des centres d'intérêt des participants, analyser des spectres RMN à l'état solide, réaliser une attribution à l'aide d'expériences 3D, analyser des données de relaxation, ou encore regarder le processing des spectres RMN.

#### **16h30 : Pause**

#### **16h45-18h00 : Aspects pratiques, suite**

#### **19h30 : Dîner**

#### **21h00 : Quizz BSI Équipe encadrante Oléron 2019**

## **Jeudi 27 juin**

### **Matin : Méthodes complémentaires**

#### **9h00 : Spectrométrie de masse, principes et approches structurales**

*Marc-André Delsuc*

La spectrométrie de masse a toujours été un outil analytique incontournable pour caractériser les molécules, vérifier leur intégrité et leur pureté, et pour caractériser un mélange de protéines (protéomique) ou de métabolites (métabolomique). Grâce à la montée en puissance des instruments, et la possibilité d'étudier de grands objets biologiques en conditions natives, elle est aussi utilisée de plus en plus comme un moyen d'étude de structure. Dans ce cours, nous verrons dans un premiers temps les principes de la mesure en spectrométrie de masse: différents modes de mesure, différents modes d'ionisation, spectrométrie en tandem, etc. Et nous apprendrons à lire les spectres obtenus. Dans un deuxième temps, les différentes stratégies pour les études structurales seront présentées: échange proton-deutérium, cross-link, MS-MS pour l'étude de surface ou l'étude des différentes protéiformes, étude d'équilibre, criblage et mesure d'interactions, etc... Un rapide coup d'œil aux développements récents (2D-MS) sera même proposé.

#### **10:30 : Pause**

#### **11h00 : " Le FRET sur molécules uniques : un nouvel outil pour la biologie structurale"**

*Emmanuel Margeat (CBS, Montpellier)*

Ce cours présentera l'apport de la technologie FRET (Forster Resonance Energy Transfer), notamment sur molécules uniques fluorescentes, en biologie structurale. Seront notamment abordés :

- Les aspects théoriques du phénomène de FRET
- Le marquage de protéines par des sondes fluorescentes
- La détection de molécules uniques, d'un point de vue pratique
- Les notions d'échelles de distance, d'échelles de temps (de la ns à la s), qui peuvent être mesurées par FRET
- Les derniers développements et les efforts de la communauté pour standardiser l'acquisition et l'analyse de données de FRET, afin de garantir leur robustesse et leur reproductibilité.

#### **12h45 : Déjeuner**

### **Après-midi:**

#### **14h00 : TP SAXS et BLI.**

*2 groupes de 2h en parallèle.*

*SAXS : Aurélien Thureau (SOLEIL, Gif-sur-Yvette), Marie-Hélène Le Du (I2BC, Saclay), Patrice Gouet*

Lors du TP SAXS, vous verrez une démo qui permet d'obtenir une courbes SAXS à partir d'images collectées sur un synchrotron. Nous analyserons ensuite une courbe SAXS afin de la comparer à des modèles atomiques e également pour obtenir des paramètres biophysiques.

*BLI : Pall FortéBio*

#### **16h30 : Pause**

#### **16h45 : TP SAXS et BLI (suite)**

#### **19h30 : Dîner et soirée dansante**

***Vendredi 28 juin***

***8h00 – 8h45 : Retour des vélos***

***9h00 : Départ vers la Rochelle en Bus (trajet 1h15 pour la gare de La Rochelle ville)***

