

# XXIIème Congrès de la Société Française de Biophysique

Groupe d'Etudes des Interactions Molécules-Membranes - GEIMM 14  
en partenariat avec l'Association Française de Cristallographie

## ARCHITECTURE & INFORMATION de la structure à la cellule



### > Sessions

Expression génique

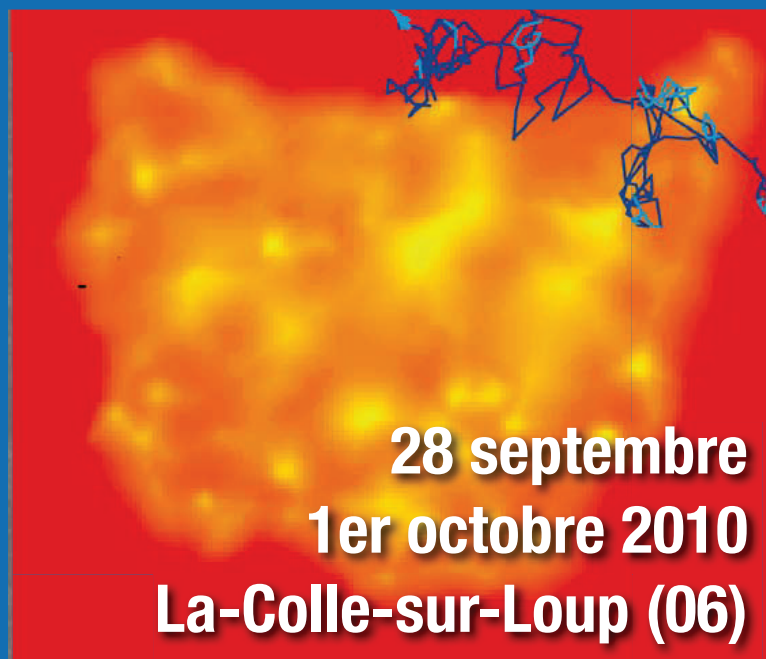
Mécanique de la Membrane & du cytosquelette

Signalisation, compartimentation & Interactions moléculaires

Lipidomique & métabolomique

Interactions hôte-pathogène

Nouveaux outils & concepts



28 septembre

1er octobre 2010

La-Colle-sur-Loup (06)

### > Conférenciers invités

Petra Schwille

Bruno Antony

Marc Baaden

Laurent Cognet

Andrea Dessen

Raphael Guerois

Guy Lippens

Bernard Payrastra

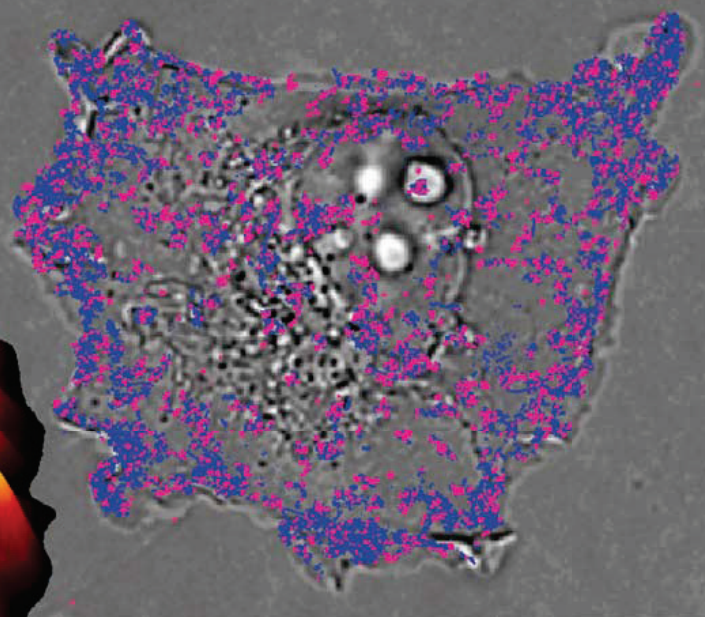
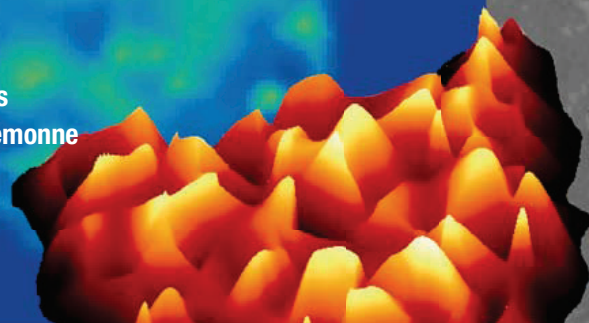
Marco Pettini

Jean-Charles Portais

Guillaume Romet-Lemonne

Yannick Schwab

Vincent Villeret



### > Comité d'organisation

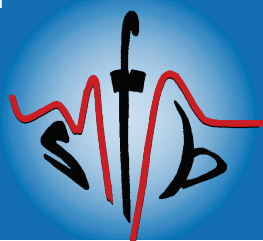
Jacqueline Cherfils

Bruno Kieffer

Alain Laigle

Didier Marguet

Isabelle Mus-Veteau



Informations & Inscriptions

[www.sfbphys.org](http://www.sfbphys.org)



**22<sup>ème</sup> Congrès de la  
Société Française de Biophysique**

*28 septembre – 1<sup>er</sup> octobre 2010*

*La Colle-sur-Loup — Alpes-Maritimes*

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



**sanofi pasteur**  
La division vaccins du Groupe sanofi-aventis.



*Chers Collègues,*

*Je vous souhaite la bienvenue à La Colle-sur-Loup, au 22<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Biophysique. J'espère que vous y apprécierez le site, et le programme que nous y ont concocté les organisateurs. J'en profite pour remercier ces derniers, Jacqueline Cherfils, Bruno Kieffer, Alain Laigle, Didier Marguet, et surtout Isabelle Mus-Veteau qui a pris en charge la redoutable tâche de l'organisation locale.*

*Cette réunion a été organisée conjointement par la SFB, l'Association Française de Cristallographie et Groupe d'Étude des Interactions Molécules Membranes. Je m'en réjouis, car cela traduit d'une part concrètement la volonté aujourd'hui affichée par nos sociétés savantes de mieux intégrer leurs actions, afin de servir plus efficacement la communauté scientifique, et d'autre part la place centrale de la Biophysique dans la science d'aujourd'hui.*

*L'été qui s'achève a été chaud dans la plupart des laboratoires, à cause des nombreux appels d'offres liés aux investissements d'avenir du gouvernement. Quoiqu'on pense de la politique scientifique menée ces dernières années, et même si on peut s'étonner de la rapidité du processus entamé au regard de ses enjeux à long terme, il n'est pas beaucoup de générations de chercheurs qui ont eu l'opportunité d'un tel soutien financier massif. En biophysique en particulier, cette décision nous donne la double chance de rattraper le retard d'investissement accumulé au fil des ans par rapport à nos voisins, et de mieux structurer nos efforts pour la science d'aujourd'hui et de demain. Je forme le vœu que cette action aille à son terme, c'est-à-dire que l'ensemble des appels d'offre prévus pour les années à venir ait effectivement lieu, et qu'ils permettent à un maximum d'entre nous d'améliorer leurs recherches. Je me permets de réaffirmer par ailleurs ici que, parallèlement à ces actions, les subventions récurrentes globales de nos laboratoires restent essentielles à la précieuse diversité de nos activités et à l'émergence d'équipes nouvelles et de sujets originaux, et je forme le second vœu qu'elles ne soient pas affectées, à court ou long terme par ces bouleversements du paysage scientifique.*

*En remerciant nos mécènes, ainsi que les organismes et laboratoires qui nous ont facilité la tâche tout au long de l'organisation de cette réunion, je vous souhaite, chers collègues, de passer à la Colle-sur-Loup des journées mêlant écoute, discussions et amitié, en bref, un excellent congrès.*

*Bruno Robert*

*Président de la SFB*



# Programme

## Mardi 28 septembre

- 9:00 Accueil des participants**
- 12:30 Buffet**
- 14:20 Cérémonie d'ouverture**
- Session Interactions hôte-pathogène**
- 14:30** Reconnaissance cellulaire par des pathogènes bactériens : une étude structurale  
C. Manzano, T. Izoré, C. Contreras-Martel, L. El Mortaji, A. M. Di Guilmi et A. Dessen
- 15:10** 1<sup>ère</sup> défensine d'œuf : caractérisation, synthèse, structure  
H. Meudal, V. Herve-Grepinet, V. Labas, A. Delmas, Y. Nys et C. Landon
- 15:30** A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by a structure-function analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Atu2422  
S. Planamente, A. Vigouroux, S. Mondy, M. Niçaise, D. Faure et S. Moréra
- 16:00 Session Posters**
- 17:30** Apports de la biophysique structurale pour sonder l'architecture et les propriétés fonctionnelles du système de sécrétion à deux partenaires (TPS) chez les bactéries pathogènes  
B. Clantin, A.-S. Delattre, N. Saint, C. Loch, F. Jacob-Dubuisson et V. Villeret
- 18:10** The parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*: characterization of the membrane tubulation mechanism induced by the GRA2 protein  
A. Bittame, G. Effantin, E. Gentilhomme, E. Marechal, M. Jamin, W. Weissenhorn, M.-F. Cesbron-Delauw, J. Gagnon et C. Mercier
- 18:30** Analyse biophysique des étapes de la formation de la capsid d'un virus bactérien  
O. Preux, A. Huet, J. Conway, P. Vachette, D. Durand et P. Boulanger
- 18:50 Conférence plénière : P. Schwillie**  
Creating to understand: the virtue of bottom-up biology
- 19:50 Dîner**

## Mercredi 29 septembre

### Session Mécanique de la membrane et du cytosquelette

- 9:00** Manipulation et dynamique de filaments individuels d'actine  
A. Jégou, M.-F. Carlier et G. Romet-Lemonne
- 9:40** Organisation ultrastructurale des filaments de septine de *S. Cerevisiae*, analysée *in vitro* et *in situ* par microscopie électronique  
A. Bertin, M. McMurray, L. Thai, G. Garcia, J. Thorner et E. Nogales
- 10:00** Protein and lipid lateral diffusion on artificial lipid nanotubes  
Y. Domanov, S. Aimon, M. Renner, A. Triller et P. Bassereau
- 10:20** **Pause Café**
- 11:00** Sensing membrane curvature with ALPS motifs  
B. Antonny, G. Drin, J. Bigay, R. Gautier, V. Morello, J.-F. Casella, H. Barelli, M. de Saint Jean et P. Gounon
- 11:40** R11-15, domaine de la dystrophine humaine et membrane : interactions et organisation modulées par le Lipid Packing  
J. Sarkis, E. Robert, E. Le Rumeur, V. Vié et J.-F. Hubert
- 12:00** Distribution de la microfluidité membranaire à l'échelle de la cellule unique  
P. Winckler, R. Jaffiol, R. Deturche, H. Morjani, P. Jeannesson et P. Royer
- 12:20** Le rôle du cytosquelette dans les mécanismes de l'électrotransfert de gène  
C. Rosazza, J.-M. Escoffre, A. Zumbusch et M.-P. Rols

**12:40** **Déjeuner**

### Session Signalisation, compartimentation et interactions moléculaires

- 14:30** La protéine neuronale Tau : fonction et (dys)fonction  
G. Lippens
- 15:10** Denaturing an intrinsically disordered protein  
G. W. Daughdrill, A. Stancik, G. Helms et V. Receveur-Bréchet
- 15:30** Contrôle du diamètre de nanotubes peptidiques par échange de contre-ions  
F. Gobeaux, N. Fay, C. Tarabout, M. Ligeti, D. Buisson, J.-C. Cintrat, K. M. H. Nguyen, C. Valéry, F. Artzner et M. Paternostre
- 16:00** **Session Posters**
- 17:30** Single molecule tracking on live neurons with different imaging modalities  
L. Cagnet
- 18:10** Spot variation FCS reveals differential membrane association kinetics for Ras isoforms  
T. Trombik, V. Ruprecht, S. Mailfert, F. Conchonaud, C. Billaudeau, O. Wurtz, A. Boned, G. Schutz, Y. Henis, S. Wieser et D. Marguet
- 18:30** Mécanisme d'activation des récepteurs P2X2 : Identification d'un mouvement couplé à la fixation d'ATP par modélisation moléculaire  
A. Taly, D. Lemoine, R. Jiang, A. Martz, S. Gonin et T. Grutter

**18:50** **Assemblée Générale SFB/GEIMM**

**19:50** **Dîner de gala**

## Jeudi 30 septembre

### Session Signalisation, compartimentation et interactions moléculaires (suite)

- 9:00** Translocation of p47phox from a soluble to a membrane-bound state: molecular mechanism of NADPH oxidase activation upon phosphorylation  
J. Marcoux, P. Man, I. Petit-Haertlein, C. Vivès, E. Forest et F. Fieschi
- 9:20** The membrane dynamics of the EGF receptor and its signal integration using holographic optical tweezers  
V. Rouger, S. Mailfert, F. Belloni, S. Monneret et D. Marguet
- 9:40** Dynamic organization of HIV co-receptors in the membrane of immune cells: a single molecule analysis  
P. Mascalchi, F. Dumas, B. Lagane, F. Bachelerie, A. Lopez et L. Salomé
- 10:00** Mammalian olfactory receptors : GPCRs exhibiting a functionality outside lipid rafts  
G. Sanz, M.-A. Persuy, J. Vidic, F. Wade, C. Péchoux, S. Chat, S. Lobasso, R. Angelini, R. Monnerie, A. Corcelli et E. Pajot-Augy

### 10:20 Pause Café

### Session Lipidomique et métabolomique

- 11:00** La fluxomique : un outil d'exploration fonctionnelle des systèmes métaboliques  
J.-C. Portais
- 11:40** Les phosphoinositides : des lipides intégrateurs de la dynamique cellulaire  
B. Payrastra

### 12:40 Déjeuner

### Session Nouveaux outils et concepts

- 14:30** Simulations interactives : toucher, déformer et assembler des molécules du bout des doigts  
M. Baaden
- 15:10** Assessing the stability of protein complexes within large assemblies  
F. Cazals et T. Dreyfus
- 15:30** Étude de la perturbation et de la dissociation par la pression d'une enzyme tétramérique, l'urate oxydase  
E. Girard, S. Marchal, J. Perez, S. Finet, R. Kahn, R. Fourme, G. Marassio, A.-C. Dhaussy, T. Prangé, R. Lange, J. Abraini, M. Mezouar et N. Colloc'h

### 16:00 Session Posters

- 17:30** Are experimental tests possible about the existence of long range interactions of the Fröhlich type between biomolecules ?  
M. Pettini
- 18:10** Real time imaging of the growth of amyloid-like fibrils using high speed atomic force microscopy  
P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieux, J.-M. Verdier, S. Marchal et T. Ando
- 18:30** Single molecule studies of seven transmembrane receptors  
O. Berthoumieu, H. Attrill et A. Watts

### 18:50 Remise du prix de la SFB et Conférence du lauréat

### 19:50 Dîner

### 20:30 Table ronde : Biophysique et éducation

## Vendredi 1<sup>er</sup> octobre

### Session Nouveaux outils et concepts (suite)

- 9:00** Spectroscopie RPE et sondes paramagnétiques : de nouvelles stratégies pour la biologie structurale  
V. Belle, M. Martinho, M. Lorenzi, G. Gerbaud, H. Vezin, F. Carriere, S. Longhi, J. Strancar, A. Fournel et B. Guigliarelli
- 9:20** Échantillonnage conformationnel du site actif d'un récepteur par dynamique moléculaire sous contrainte : application au récepteur PPAR-gamma  
S. Aci-Sèche, N. Garnier, D. Genest, S. Bourg, C. Marot, L. Morin-Allory et M. Genest
- 9:40** Padron: a fluorescent protein with a positive photo-switching mechanism  
A. Regis Faro, P. Carpentier, D. Bourgeois et P. Dedeker

### Session Expression génique

- 10:00** Dynamic assembly of proteins: characterization, prediction and design  
G. Faure, A. Gaubert, F. Ochsenbein et R. Guérois
- 10:40** **Pause Café**
- 11:10** Cell-by-cell quantification of catabolite repression in *Bacillus subtilis* by Number and Brightness Analysis  
M. Ferguson, D. Le Coq, M. Jules, C. Clerté, S. Aymerich, C. Royer et N. Declerck
- 11:30** Doigts de zinc et deubiquitination de la chromatine  
Y.-H. Wang, J. Bonnet, A. Atkinson, C. Romier, A. Hamiche, L. Tora, D. Devys et B. Kieffer
- 11:50** From live imaging to electron microscopy: technical advances in correlated light and electron microscopy  
Y. Schwab
- 12:30** **Clôture du congrès**
- 12:40** **Déjeuner**

---

***– Communications orales –***



## **– Interactions hôte-pathogène –**



## Reconnaissance cellulaire par des pathogènes bactériens : une étude structurale

C. Manzano<sup>1</sup>, T. Izoré<sup>1</sup>, C. Contreras-Martel<sup>1</sup>, L. El Mortaji<sup>2</sup>, A. M. Di Guilmi<sup>2</sup> et A. Dessen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale, Équipe Pathogénie Bactérienne, Grenoble, <sup>2</sup>Institut de Biologie Structurale, Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Grenoble

*Streptococcus pneumoniae* is a piliated pathogen whose ability to circumvent vaccination and antibiotic treatment strategies is a cause of mortality worldwide. Pili play important roles in pneumococcal infection, but little is known about their biogenesis mechanism or the relationship between components of the pilus-forming machinery, which includes the fiber pilin (RrgB), two minor pilins (RrgA, RrgC) and three sortases (SrtC-1, SrtC-2, SrtC-3). Our group interested in structurally and biochemically characterizing the entire pilus-forming machinery of *S. pneumoniae* and here I will present recent work we have done towards this goal. We have shown that SrtC-1 is the main pilus-polymerizing transpeptidase, and electron microscopy analyses of RrgB fibers reconstituted *in vitro* reveal that they structurally mimic the pneumococcal pilus backbone. Crystal structures of both SrtC-1 and SrtC-3 reveal active sites whose access is controlled by flexible lids, unlike in non-pilus sortases, and suggest that substrate specificity is dictated by surface recognition coupled to lid opening. In addition, I will also present the high-resolution crystal structure of the pilus adhesin RrgA, a 893-residue elongated macromolecule whose fold contains four domains presenting both eukaryotic and prokaryotic origins. RrgA harbors an integrin I collagen-recognition domain decorated with two inserted 'arms' that fold into a positively-charged cradle, as well as three 'stalk-forming' domains. We show by site-specific mutagenesis, mass spectrometry, and thermal shift assays that intradomain isopeptide bonds play key roles in stabilizing RrgA's stalk. The high sequence similarity between RrgA and its homologs in other Gram-positive microorganisms suggests common strategies for ECM recognition and immune evasion.

## 1<sup>ère</sup> défense d'œuf : caractérisation, synthèse, structure

H. Meudal<sup>1</sup>, V. Herve-Grepinet<sup>2</sup>, V. Labas<sup>3</sup>, A. Delmas<sup>1</sup>, Y. Nys<sup>2</sup> et C. Landon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02, <sup>2</sup>Recherches Avicoles, INRA UR83, 37380 Nouzilly, <sup>3</sup>Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, INRA UMR85 - CNRS 6175, 37380 Nouzilly

L'œuf de poule est un modèle très particulier car c'est un milieu clos contenant tous les composés nécessaires au développement de l'embryon et à sa protection.

*Caractérisation* : La Galline est une petite protéine de 41 résidus, contenant 3 ponts disulfure, identifiée à partir du blanc d'œuf. D'après sa séquence, elle possède un motif de cystéines proche de celui des  $\beta$ -défensines aviaires (AvBDs).

*Synthèse peptidique* : 11 mg de Galline pure ont été produits par synthèse peptidique, sous forme repliée avec 3 ponts disulfure.

*Activités antimicrobiennes* : Les activités antimicrobiennes ont été déterminées par diffusion radiale sur une série de bactéries (*Lehrer et al. J. Immunol. Methods* 1991, 137, 167-173).

*Structure 3D* : La structure 3D a été déterminée par RMN (expériences <sup>1</sup>H, spectromètre VARIAN 600MHz). Les modèles ont été calculés dans ARIA/CNS en utilisant l'option des ponts disulfure ambigus. La structure 3D de la Galline contient le feuillet  $\beta$  à 3 brins antiparallèles caractéristique des  $\beta$ -défensines et le réseau de ponts disulfure est sans aucune ambiguïté celui des  $\beta$ -défensines. Un petit feuillet à 2 brins parallèles vient s'ajouter dans la partie N-terminale.

*Comparaisons structurales* :

- Cette première structure de  $\beta$ -défensines d'œuf est comparée aux structures de  $\beta$ -défensines d'oiseaux déjà déterminées : celle de AvBD103b du manchot royal (*Landon et al. J Biol Chem* 2004, 279, 30433-30439) et celle de AvBD2 du poulet (*Derache et al. en préparation*) pour définir les particularités structurales communes.

- La structure de la Galline est comparée aux 3 autres défensines actuellement identifiées dans les œufs d'autres oiseaux. Nous avons modélisé les structures de ces 3 défensines d'œufs pour définir s'il existe des caractéristiques spécifiques aux défensines d'œuf.

## **A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by a structure-function analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Atu2422**

S. Planamente<sup>1,2</sup>, A. Vigouroux<sup>2</sup>, S. Mondy<sup>1</sup>, M. Niçaise<sup>3</sup>, D. Faure<sup>1</sup> et S. Moréra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut des sciences végétales (ISV), CNRS, 91198 Gif sur Yvette, <sup>2</sup>Laboratoire d'Enzymologie et biochimie structurales (LEBS), CNRS, 91198 Gif sur yvette, <sup>3</sup>Institut de biochimie et de biophysique moléculaire et cellulaire, Université paris-Sud, CNRS, 91405 Orsay

Bacterial periplasmic binding proteins (PBPs) and eukaryotic PBP-like domains (also called as Venus Flytrap modules) of G-protein coupled receptors are involved in extracellular GABA perception. We investigated the structural and functional basis of ligand specificity of the PBP Atu2422 which is implicated in virulence and transport of GABA in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Five high-resolution X-ray structures of Atu2422 liganded to GABA, proline, alanine, valine and that of the point mutant Atu2422-F77A liganded to a leucine were determined. Structural analysis of the ligand binding site revealed two essential residues Phe77 and Tyr275, of which implication in GABA-signalling and virulence was confirmed using *A. tumefaciens* cells expressing corresponding Atu2422 mutants. Phe77 residue restricts ligand specificity to  $\alpha$ -amino-acids with a short lateral chain which act as antagonists of the GABA-signalling in *A. tumefaciens*. Tyr275 specifically interacts with the GABA  $\gamma$ -amino group. Conservation of these two key-residues in proteins phylogenetically related to Atu2422 brought to light a sub-family of PBPs in which all members could bind GABA and short  $\alpha$ -amino-acids. This work led to the identification of a fingerprint sequence and structural features for defining PBPs that bind GABA and its competitors, and revealed their occurrence among host-interacting proteobacteria.

## **Apports de la biophysique structurale pour sonder l'architecture et les propriétés fonctionnelles du système de sécrétion à deux partenaires (TPS) chez les bactéries pathogènes**

B. Clantin<sup>1</sup>, A.-S. Delattre<sup>2</sup>, N. Saint<sup>3</sup>, C. Locht<sup>2</sup>, F. Jacob-Dubuisson<sup>2</sup> et V. Villeret<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherche Interdisciplinaire, IRI USR3078 CNRS - Université de Lille 1 - Université de Lille 2, parc CNRS de la Haute Borne, 50 avenue de Halley, 59658 Villeneuve d'Ascq, <sup>2</sup>Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, CNRS UMR8204 - Inserm U1019, Institut Pasteur de Lille, Université Lille Nord de France, 1 rue du Professeur Calmette, 59021 Lille, <sup>3</sup>Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR5048 - UM 1 - INSERM U554 29 rue de Navacelles 34090 Montpellier

La superfamille des protéines membranaires BamA/TpsB regroupe des protéines essentielles telles que BamA, requise pour l'assemblage et le positionnement de protéines de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, Toc75 qui fait partie de la machinerie d'importation des protéines dans les chloroplastes, Sam50 qui intervient dans l'assemblage et le positionnement de protéines de la membrane externe des mitochondries et enfin les protéines TpsB qui sont pour la plupart impliquées dans la sécrétion de facteurs de virulence chez les bactéries à Gram négatif. Le transporteur FhaC de *Bordetella pertussis* est une des protéines TpsB les plus étudiées au niveau fonctionnel. Il assure la translocation de l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), l'adhésine majeure responsable de la fixation de la bactérie au tractus respiratoire de l'hôte.

La caractérisation structurale du système TPS FHA/FhaC sera présentée. La détermination de la structure X des deux protéines permet de progresser dans la compréhension fonctionnelle du système et ouvre la voie à une exploration plus poussée par d'autres approches de la biophysique. Ces études révèlent que FHA se lie à un domaine périplasmique de FhaC de type POTRA, par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale, traverse le tonneau en conformation étendue et se replie à la surface de la cellule sous forme d'une grande hélice beta. Les protéines de la famille BamA/TpsB ont pour signature commune la présence d'un ou plusieurs domaine(s) POTRA et d'un tonneau beta présentant des similarités de séquence. L'analyse structurale d'un premier système TPS nous éclaire donc également sur les signatures structurales de cette superfamille de protéines.

## The parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*: characterization of the membrane tubulation mechanism induced by the GRA2 protein

A. Bittame<sup>1</sup>, G. Effantin<sup>2</sup>, E. Gentilhomme<sup>3</sup>, E. Marechal<sup>4</sup>, M. Jamin<sup>2</sup>, W. Weissenhorn<sup>2</sup>, M.-F. Cesbron-Delauw<sup>1</sup>, J. Gagnon<sup>1</sup> et C. Mercier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes. UMR 5163 CNRS-Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble, <sup>2</sup>Unit for Virus Host-Cell Interactions (UVHCI). UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble, <sup>3</sup>Centre de Recherche du Service de Santé des Armées « E. Pardé », Grenoble, <sup>4</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale. UMR 168 CNRS-CEA-UJF-INRA, Grenoble

Within the host cell, the parasitophorous vacuole in which *Toxoplasma gondii* develops, is characterized by a membranous nanotubular network (MNN). The molecular components, the formation and the function of the MNN remain poorly explored. We had previously demonstrated indirectly that the secreted dense granule GRA2 protein, which contains three amphipathic alpha helices, is a key element of the MNN formation (Mercier *et al.*, 2002; Travier *et al.*, 2008). The aim of this work was to demonstrate directly the role of GRA2 in the MNN formation, using an *in vitro* system to study the GRA2-membrane interactions. Native and recombinant GRA2 proteins were purified from *Toxoplasma* and from *Escherichia coli*, respectively. Dynamic light scattering and circular dichroism showed that recombinant GRA2, which folds with an alpha-helical pattern, is purified as both a potential dimer and complexes of higher molecular weight. When incubated with Small Unilamellar Vesicles (SUVs) formed with complex lipids, both native and recombinant GRA2 were shown to associate with the SUV membranes and to induce the formation of long membranous tubules observed by transmission electron microscopy (TEM). In the literature, it has been reported that most proteins capable of inducing membrane curvature, interact with phosphatidylinositol (4,5) bi-phosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>). Fat blots and binding assays of GRA2 to SUVs of defined lipid composition and containing PI(4,5)P<sub>2</sub> showed that GRA2 recognizes phosphoinositides and associates preferentially with PI(4,5)P<sub>2</sub>-containing SUVs. TEM showed that GRA2 deforms membranes only when PI(4,5)P<sub>2</sub> is present. Together, these results allowed us to propose a model of membrane deformation induced by GRA2, the principal effector of the MNN formation.

## Analyse biophysique des étapes de la formation de la capsid d'un virus bactérien

O. Preux<sup>1</sup>, A. Huet<sup>1</sup>, J. Conway<sup>2</sup>, P. Vachette<sup>1</sup>, D. Durand<sup>1</sup> et P. Boulanger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Univ Paris-Sud, UMR CNRS 8619, 91405 Orsay, <sup>2</sup>Department of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15260, U.S.A.

Le bactériophage T5 est un virus infectant *E. Coli*. Sa capsid icosaédrique (triangulation T=13) est constituée d'une protéine majeure pb8 organisée en hexamères sur les faces et en pentamères sur les angles<sub>1,2</sub>. Son assemblage et sa maturation comportent plusieurs étapes critiques pour la formation des virions lors du cycle infectieux. L'étape d'expansion se traduit par d'importantes réorganisations conformationnelles durant lesquelles le volume de la capsid double, lui permettant de contenir un ADN double brin de 122 kpb.

Elle est suivie d'une étape de fixation sur les hexamères d'une protéine de décoration pb10 qui stabilise la capsid lui permettant de résister à la pression interne (~ 50 atm) due à la compaction de l'ADN.

A l'aide d'un mutant de T5 nous avons produit des capsides vides non expansées et déterminé les conditions de leur expansion *in vitro*. Les états avant et après expansion ont été caractérisés par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ; et leurs structures ont été résolues à basse résolution (20 Å) par cryomicroscopie et reconstruction d'image. La dynamique du processus d'expansion est en cours d'étude par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et sera caractérisée par SAXS.

L'étude de la fixation de pb10 est conduite en combinant différentes méthodes biochimiques (migration sur gel natif d'agarose et SDS-PAGE) et biophysiques (spectroscopie de fluorescence et calorimétrie différentielle à balayage). Nous avons montré que pb10 ne se fixe que sur les capsides expansées. Cette fixation est coopérative et induit donc des changements conformationnels de pb8 qui seront étudiés par cristallographie.

Huet et al. J Virol. 2010 sous presse.

Effantin et al. J Mol Biol.( 2006) 361,993.



– **Conférence plénière** –



## **Creating to understand: the virtue of bottom-up biology**

P. Schwille

Biophysics - Schwille Lab Biotechnologisches Zentrum der TU Dresde, Tatzberg 47-51, 01309 Dresden, Allemagne

In recent years, biophysics has accumulated an impressive selection of novel techniques to analyze biological systems with ultimate sensitivity and precision. Single molecule imaging, tracking and manipulation have enabled us to unravel biological phenomena with unprecedented analytical power, and to come closer to revealing fundamental features of biological self-organization. The power of physics has always been the reductionist approach, i.e. the possibility to define an appropriate subsystem simple enough to be quantitatively modeled and described, but complex enough to retain the essential features of its real counterpart. Transferring this approach into biology has so far been extremely challenging, because most “modern” biological systems usually comprise so many modules and elements, many of them still awaiting to be functionally resolved, that it is a risky task to define truly essential ones. Nevertheless, the strive for identifying minimal biological systems, particularly of subcellular structures or modules, has in the past years been very successful, and crucial *in vitro* experiments with reduced complexity can nowadays be performed, e.g., on reconstituted cytoskeleton and membrane systems. As a particularly exciting example for the power of minimal systems, self-organization of essential proteins of the bacterial cell division machinery could be shown in a simple assay, consisting of only two protein species, an energy source, and a membrane. In my talk, I will discuss some recent results of our work on membrane-based systems, using single molecule optics and biological reconstitution assays. I will further discuss the perspective of assembling a minimal system to reconstitute bacterial cell division.



**– Mécanique de la membrane et du  
cytosquelette –**



## Manipulation et dynamique de filaments individuels d'actine

A. Jégou, M.-F. Carlier et G. Romet-Lemonne

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales (LEBS), CNRS Gif-sur-Yvette

De nombreux processus cellulaires impliquent des structures très organisées de filaments d'actine. Ces structures sont hautement régulées et dynamiques, et la compréhension de la dynamique des filaments d'actine est essentielle pour élucider ces mécanismes. Nous avons développé des systèmes expérimentaux basés sur des techniques de microfluidique et de pinces optiques, afin de manipuler *in vitro* des filaments individuels d'actine, et d'observer leur dynamique d'assemblage et de désassemblage, ainsi que leur interaction avec diverses protéines régulatrices. Cela nous permet d'effectuer des mesures quantitatives sur des événements individuels, tout en contrôlant l'environnement biochimique des filaments.

Nous utilisons ces systèmes pour étudier la dépolymérisation de filaments d'actine, et pouvons ainsi observer comment l'hydrolyse de l'ATP au sein des filaments affecte le départ des monomères d'actine. Cela nous permet de trancher entre différents modèles proposés et de déterminer que l'hydrolyse de l'ATP se fait selon un mécanisme aléatoire. Nous montrons également que l'action de la profiline, qui régule la dynamique de l'actine dans de nombreux processus, n'est pas directement couplée à l'hydrolyse de l'ATP, mais qu'elle est sensible à la nature du nucléotide lié à l'actine. Enfin, nos observations nous permettent de caractériser un phénomène intrigant qui a été récemment observé : des « pauses » qui ont lieu lors de la dépolymérisation des filaments. Nous montrons notamment que ces pauses correspondent à des événements locaux, et non une transition globale des filaments vers un état plus stable, comme cela a été proposé.

## Organisation ultrastructurale des filaments de septine de *S. Cerevisiae*, analysée *in vitro* et *in situ* par microscopie électronique

A. Bertin<sup>1</sup>, M. McMurray<sup>2</sup>, L. Thai<sup>2</sup>, G. Garcia<sup>2</sup>, J. Thorner<sup>2</sup> et E. Nogales<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex, <sup>2</sup>University of California, 94720 Berkeley (CA), U.S.A.

Les septines forment des filaments du cytosquelette essentiels à la dernière étape de la division cellulaire, la cytokinèse. Elles ont été découvertes il y a plus de 30 ans, chez *S. Cerevisiae*. Au cours de la division les septines sont liées à la membrane plasmique, et localisées au niveau de l'anneau de constriction entre cellule mère et cellule fille. Cinq septines sont exprimées au cours de la mitose : Cdc10, Cdc11, Cdc12, Cdc3 et Shs1.

Dans un premier temps, nous avons déterminé, par des méthodes de marquage spécifiques (anticorps, étiquette GFP, MBP) et des méthodes d'analyse structurales en particules isolées de microscopie électronique, l'organisation moléculaire des quatre septines essentielles (Cdc10, Cdc11, Cdc12, Cdc3). Elles forment un oligomère octamérique symétrique qui peut s'auto-assembler en paires de filaments non polaires. L'unité minimale s'organise comme suit : Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11.

Afin de s'approcher des conditions *in situ*, nous avons utilisé un système modèle de monocouches lipidiques. Nous avons montré que PI(4,5)P2 interagit spécifiquement avec Cdc10 en organisant les septines de manière spectaculaire sur ces monocouches lipidiques. Par ailleurs, PI(4,5)P2 facilite la formation de filaments des septines dans des conditions défavorables à la polymérisation des septines, en solution.

Enfin, nous sommes en cours d'analyse de l'organisation des filaments de septine au sein de la cellule par des méthodes de tomographie et cryo-tomographie électronique. Nous observons un réseau de filaments perpendiculaires au niveau de l'anneau de constriction. Ce réseau est perturbé après délétion/mutation de certaines de ces septines.

## Protein and lipid lateral diffusion on artificial lipid nanotubes

Y. Domanov<sup>1</sup>, S. Aimon<sup>1</sup>, M. Renner<sup>2</sup>, A. Triller<sup>2</sup> et P. Bassereau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Physico-Chimie Curie (UMR 168), Institut Curie, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, <sup>2</sup>Biologie Cellulaire de la Synapse, Ecole Normale Supérieure, 45 rue d'Ulm, 75005 Paris

Lateral mobility of membrane proteins is central to a variety of fundamental biomolecular processes such as biochemical reactions, signalling, transport and self-assembly. Theoretical study of Saffman & Delbrück predicted a logarithmic dependence of the protein diffusion coefficient on 1) the inverse of the size of the protein and 2) on the "membrane size" for membranes of finite size. While the experimental proof of the first prediction is a matter of debate, the second has never been approached experimentally. Here we used tubular lipid membranes providing a convenient model system of defined size where the geometrical, physical and chemical parameters of the membrane can be closely controlled and varied. We followed the diffusion of individual molecules in the membrane using single particle tracking (SPT) with quantum dots (QD) coupled to lipids or proteins reconstituted in the membrane.

We obtained diffusion coefficients for lipids in model membranes composed of phosphatidylcholine, cholesterol and sphingomyelin in various proportions. Further, voltage-gated potassium channel KvAP was reconstituted into model membranes, marked with QDs and its diffusion measured in a similar way. The coefficients were measured while changing the membrane tube radius from ~200 to ~10 nm. We found that both lipid and protein diffusion is retarded in the tubular membranes with radius below 20-50 nm. The diffusion coefficient decreased as much as 3-fold compared to the diffusion on flat membrane measured at the bottom of giant liposomes. Our data for protein and lipid diffusion is in quantitative agreement with the hydrodynamic theoretical predictions (Daniels and Turner, 2007, *Langmuir* 23:6667-70).

This study provides experimental validation for the Saffman-Delbrück theory and represents the first effort to elucidate the role of membrane shape and size in regulation of lateral diffusion.

## Sensing membrane curvature with ALPS motifs

B. Antonny<sup>1</sup>, G. Drin<sup>1</sup>, J. Bigay<sup>1</sup>, R. Gautier<sup>1</sup>, V. Morello<sup>1</sup>, J.-F. Casella<sup>1</sup>, H. Barelli<sup>1</sup>, M. de Saint Jean<sup>1</sup> et P. Gounon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université de Nice Sophia-Antipolis et CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, <sup>2</sup>Université de Nice Sophia-Antipolis, Centre Commun de Microscopie Avancée, Parc Valrose, 06000 Nice

Changes in membrane curvature are inherent of many events that occur at the surface of membrane-bound organelles; e.g. when transport vesicles bud from a donor membrane and then fuse with an acceptor membrane. Here I will discuss the use by proteins of various structures and functions of a small amphipathic motif, the ALPS motif, that specifically adsorbs at the surface of highly curved lipid membranes ( $R < 50$  nm) compared to flatter ones. In this presentation, I will first discuss the relationship between the peculiar chemistry of the ALPS motif and its ability to sense membrane curvature. I will argue that the hypersensitivity of the ALPS motif to membrane curvature lies on the length of this amphipathic helix and on the strong unbalance between its polar and non-polar faces. In a second part, I will illustrate how the chemistry of the ALPS motif is particularly well adapted to highly curved membranes of the early secretory pathway. Last, using three different examples, I will present models for the regulation of complex membrane remodeling events by ALPS motifs. This includes the assembly-disassembly cycle of a protein coat, the asymmetric tethering of flat and curved membranes by a molecular string, and, lastly, the transport of sterols between membranes of different curvature and lipid composition.

## **R11-15, domaine de la dystrophine humaine et membrane : interactions et organisation modulées par le Lipid Packing**

J. Sarkis<sup>1</sup>, E. Robert<sup>2</sup>, E. Le Rumeur<sup>1</sup>, V. Vié<sup>2</sup> et J.-F. Hubert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, <sup>2</sup>Université de Rennes 1, Institut de Physique de Rennes

La dystrophine est une protéine filamentaire normalement présente sous la membrane des cellules musculaires. Elle est indispensable au maintien de l'architecture cellulaire et sa déficience entraîne des pathologies plus ou moins graves, dites dystrophinopathies, dont font partie les myopathies de Duchenne et de Becker. Le domaine central de la dystrophine contient 24 répétitions homologues à la spectrine. Le sous-domaine constitué par les répétitions 11 à 15 (R11-15) est le seul fragment du domaine central qui interagit avec l'actine du cytosquelette, il semble intéressant alors d'aborder plus profondément les propriétés de ce fragment avec les lipides membranaires. L'interaction de DYS R11-15 avec les lipides a été étudiée en utilisant deux modèles membranaires. Dans une première approche, l'interaction de R11-15 avec les liposomes, anioniques et zwitterioniques a été quantifiée en utilisant la résonance plasmonique de surface et la spectroscopie de fluorescence du tryptophane. Pour accéder à la structure 3D et aux propriétés d'hydrophobicité et d'électrostatique de surface, une modélisation par homologie a été réalisée. La conformation adoptée par la protéine en présence des liposomes constitue un point important. Dans ce but, une protéolyse avec la trypsine et une quantification des différents peptides ont été réalisées par spectrométrie de masse ce qui permet de savoir quelles hélices de la protéine se lient aux lipides. Dans une seconde approche, le modèle monocouche de lipides (Langmuir) a été utilisé pour mieux comprendre les propriétés et le mécanisme d'assemblage de la protéine avec les lipides. Le comportement de DYS R11-15 à l'interface air/liquide ou lipide/liquide a été suivi en utilisant l'ellipsométrie, la mesure de pression de surface et la microscopie à force atomique. Ces approches montrent que la protéine a une forte affinité pour les lipides à l'interface et qu'elle forme un réseau de protéines sous la monocouche. Nous concluons que l'interaction et l'organisation de DYS R11-15 avec les lipides membranaires dépendent de la nature et du « packing » lipidique.

## **Distribution de la microfluidité membranaire à l'échelle de la cellule unique**

P. Winckler<sup>1</sup>, R. Jaffiol<sup>1</sup>, R. Deturche<sup>1</sup>, H. Morjani<sup>2</sup>, P. Jeannesson<sup>2</sup> et P. Royer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Technologie de Troyes, Institut Charles Delaunay UMR CNRS 6279 - STMR, Laboratoire de Nanotechnologie et d'Instrumentation Optique, LRC CEA, 12 rue Marie Curie, BP2060, 10010 Troyes, <sup>2</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, Faculté de Pharmacie, Matrice Extracellulaire Dynamique Cellulaire UMR CNRS 6237, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France

Nous avons caractérisé la distribution de la microfluidité membranaire de cellules vivantes grâce à des mesures de temps de diffusion par FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy). Les mesures ont été réalisées sur un grand nombre de cellules, donnant ainsi accès à la répartition typique de viscosité dans la membrane plasmique. Nous avons ainsi pu établir la loi de distribution de la fluidité membranaire à l'échelle de la cellule unique pour différentes lignées cellulaires MCF7 et LR73 [1,2]. Les distributions des temps de diffusion ainsi obtenues présentent toutes la même allure asymétrique, allure qui peut être approximée par la distribution de Gumbel. Nous montrons par simulation Monte-Carlo qu'un modèle simple de diffusion à deux dimensions, dans une matrice contenant des microdomaines visqueux, peut rendre compte de l'allure typique des distributions obtenues.

[1] H. Jankevics *et al.*, Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptor in living cells, *Biochemistry* 44, 11676–11683 (2005).

[2] C. Boutin *et al.*, High heterogeneity of plasma membrane microfluidity in multidrug-resistant cancer cells, *Journal of Biomedical Optics* 14(3), 034030 (2009).

## **Le rôle du cytosquelette dans les mécanismes de l'électrotransfert de gène**

C. Rosazza<sup>1, 2</sup>, J.-M. Escoffre<sup>2</sup>, A. Zumbusch<sup>1</sup> et M.-P. Rols<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Département Chimie, Université de Constance, Universitätsstraße 10, D-78457 Konstanz, Allemagne, <sup>2</sup>CNRS UMR 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205, Route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 4

L'électrotransfert est une technique simple et efficace qui connaît un réel succès dans le traitement du cancer. Son utilisation pour le transfert de gène est prometteuse. Cependant les mécanismes gouvernant l'entrée d'ADN dans les cellules sont complexes et son trafic intracellulaire reste énigmatique. L'ADN s'insère dans la membrane plasmique sous forme d'agrégats pendant l'électropulsation. Cette insertion est une condition nécessaire mais non suffisante à l'expression. L'ADN doit migrer dans le cytoplasme et atteindre l'enveloppe nucléaire. Le cytosquelette, souvent décrit comme un obstacle aux mouvements de l'ADN, est la seule machinerie cellulaire capable de transporter des cargos. Notre hypothèse est que, comme pour certains virus et vecteurs, l'ADN électrotransféré utiliserait le cytosquelette pour entrer dans la cellule et atteindre le noyau.

Nous avons mis en évidence la formation de patches d'actine au niveau de la membrane électropéabilisée. Ces patches colocalisent avec les agrégats d'ADN et possèdent des caractéristiques communes à ceux-ci en termes de lieu, de temps, de nombre et de taille. Nous avons également montré que l'altération du réseau d'actine induit une diminution de la quantité d'ADN interagissant avec la membrane et de l'expression génique. Il apparaît ainsi envisageable que l'actine intervienne dans la translocation de l'ADN dans la cellule.

De plus, grâce à la technique de Single Particle Tracking, nous avons suivi les mouvements de l'ADN. L'analyse de ses trajectoires dans le cytoplasme a montré qu'un transport actif s'opère avec des vitesses pouvant atteindre 3000nm/s. Ces résultats suggèrent que les mouvements de l'ADN seraient pris en charge par le cytosquelette qui apparaîtrait comme un acteur clé du processus de l'électrotransfert.

**– Signalisation, compartimentation et  
interactions moléculaires –**



## Denaturing an intrinsically disordered protein

G. W. Daughdrill<sup>1</sup>, A. Stancik<sup>2</sup>, G. Helms<sup>3</sup> et V. Receveur-Bréchet<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Microbiology, and Molecular Biology and the Center for Biomolecular Identification and Targeted Therapeutics, University of South Florida, 3720 Spectrum Blvd., Tampa, FL 33, <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, University of Idaho, Life Science Building, 252, Moscow Idaho, 83844-3051, USA, <sup>3</sup>Department of Chemistry, Washington State University, Fulmer Hall, B3, Pullman Washington, 99164-4630, USA, <sup>4</sup>IMR – CNRS, UPR3243, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

The transactivation domain of p53 is known to be an intrinsically disordered protein. Using small angle x-ray scattering, we have investigated the dimensions and the distribution of conformations of p53TAD. Analysis of the results using the polymer theory, and of the distribution of conformation inferred from the data, seems to indicate that the protein is fully disordered and behaves as a random coil. However in presence of 8M of the denaturing osmolyte urea, the dimensions of p53TAD increase, and become larger than those of a random coil. This shows that the native state of p53TAD is partially stabilized by noncovalent interactions that are disrupted during denaturation. We performed a molecular dynamics analysis on p53TAD wt and mutants devoid of part or all of the prolines, that strongly suggests that the high content of prolines in p53TAD may cause molecular restraints along the polypeptide chain.

Altogether, these results suggest that using random polymer models to describe the native state ensembles of intrinsically disordered proteins may overlook important structural features, and question about the use of the term *random coil* to describe intrinsically disordered proteins.

## Contrôle du diamètre de nanotubes peptidiques par échange de contre-ions

F. Gobeaux<sup>1</sup>, N. Fay<sup>1</sup>, C. Tarabout<sup>2</sup>, M. Ligeti<sup>3</sup>, D. Buisson<sup>3</sup>, J.-C. Cintrat<sup>3</sup>, K. M. H. Nguyen<sup>1</sup>, C. Valéry<sup>4</sup>, F. Artzner<sup>2</sup> et M. Paternostre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>URA 2096, iBiTech-S, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, <sup>2</sup>Groupe Matière Condensée et Matériaux, UMR 6626 CNRS et Université Rennes 1, 35042 Rennes cedex, <sup>3</sup>CEA iBiTec-S / SCBM, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, <sup>4</sup>Ipsen Pharma S.A., Ctra. Laureà Miró 395, 08980 Sant Feliu de Llobregat, Barcelona, Espagne

Le Lanreotide est un octapeptide de synthèse qui présente la remarquable propriété de s'assembler sous forme de nanotubes de 24 nm de diamètre et atteignant plusieurs millimètres de long à partir d'une concentration massique de 2.5%. Sa simplicité de manipulation en fait un système modèle utile pour étudier certains phénomènes d'auto-assemblage au niveau moléculaire. Précédemment, un équilibre subtil entre des effets hydrophobes attractifs et des forces répulsives provenant des charges positives portées par le peptide a été mis en évidence. En effet, le peptide doit sa grande solubilité dans l'eau à deux charges positives placées sur l'amine terminale et sur la chaîne latérale de la lysine. Ici, nous présentons des travaux étudiant le rôle respectif de ces deux charges dans la structure des nanotubes ainsi que l'influence de la taille et du type de contre-ions sur les caractéristiques des nanotubes. La suppression de l'une ou de l'autre des charges montre que les deux charges ne sont pas équivalentes puisque l'acétylation de l'amine terminale mène à la formation de filaments structurés en feuillets  $\beta$  parallèles tandis que l'acétylation de la charge portée par la lysine n'empêche pas la formation de nanotubes structurés en feuillets  $\beta$  parallèles. En utilisant une approche combinant la microscopie électronique à transmission, la diffusion des rayons X et des méthodes spectroscopiques, nous avons démontré que les contre-ions sont une partie intégrante de la structure des nanotubes et peuvent en tant que tels moduler leur diamètre dans la gamme de 19-26 nm sans pour autant modifier la structure en feuillets  $\beta$ . Enfin, nous montrons qu'il est possible de dédoubler la paroi des tubes en utilisant des contre-ions divalents.

## Spot variation FCS reveals differential membrane association kinetics for Ras isoforms

T. Trombik<sup>1</sup>, V. Ruprecht<sup>2</sup>, S. Mailfert<sup>1</sup>, F. Conchonaud<sup>1</sup>, C. Billaudeau<sup>1</sup>, O. Wurtz<sup>1,4</sup>, A. Boned<sup>1</sup>, G. Schutz<sup>2</sup>, Y. Henis<sup>3</sup>, S. Wieser<sup>1,2</sup> et D. Marguet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie de Marseille Luminy; Université de la Méditerranée; INSERM, UMR 631; CNRS, UMR 6102; Marseille, France, <sup>2</sup>Biophysics Institute, Johannes-Kepler University, Linz, Austria, <sup>3</sup>Department of Neurobiology, George S Wise faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Israel, <sup>4</sup>Present address: Université de Rouen, INSERM U413, Mont Saint Aignan, France

The Ras protein family is implicated in the regulation of different cellular processes such as cell growth, differentiation or apoptosis. Ras proteins play a key role in the control of the relay of signals from cell surface receptors and thus activate different signaling pathways. It is known that H-Ras proteins interact with the plasma membrane via reversible palmitoylation of the C terminus. For K-Ras it is believed that C-terminal polybasic region is implicated in the dynamic association with the plasma membrane. However, the nature of this process remains still unclear. Here, we present a novel application of spot variation FCS (svFCS) for the characterization of binding kinetics of transiently membrane associated molecules such as K-Ras. Starting from simulations, we next measured using svFCS the membrane association of different K-Ras mutants in living COS-7 cells. We observed that association/dissociation time of K-Ras with the plasma membrane achieves several tens of milliseconds. Moreover, the substitution of lysine to alanine in the polybasic region of the K-Ras C-terminus leads to the liberation of this protein from the plasma membrane. From the other hand, using a phosphatidylserine-deficient CHO mutant we showed that the association of K-Ras with the plasma membrane is also impaired. Our observations demonstrated that K-Ras differently from H-Ras associate to the plasma membrane and a positively charged, polybasic region plays a key role in this process providing a differential dynamic cellular redistribution of K-Ras.

## Mécanisme d'activation des récepteurs P2X2 : Identification d'un mouvement couplé à la fixation d'ATP par modélisation moléculaire

A. Taly, D. Lemoine, R. Jiang, A. Martz, S. Gonin et T. Grutter

Laboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux, UMR 7199 CNRS, Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch

La structure récemment résolue par cristallographie du récepteur-canal de type P2X4, activé par l'ATP, offre une vue statique de son architecture, mais les mécanismes moléculaire de son activation restent mystérieux. Un modèle du récepteur P2X2, basé sur la structure cristallographique a été utilisé pour étudier la dynamique de ce récepteur par analyse de modes normaux. Les dix premiers modes ont été étudiés à la recherche d'un changement de conformation global qui permettrait l'ouverture du canal ionique mais aucun n'a pu être identifié. Nous avons donc testé l'effet sur les modes normaux de l'ATP, préalablement positionné par docking. La présence de l'ATP nous a permis d'identifier un mode qui amène principalement une fermeture du site de fixation de l'ATP. Pour tester l'hypothèse que ce mode, même si il ne conduit pas à l'ouverture du canal ionique, est impliqué dans le mécanisme d'activation nous avons calculé son couplage à la fixation d'agoniste ou d'antagoniste dans le site de fixation de l'ATP. Des expériences de docking suggèrent que ce mouvement est favorisé par l'ATP mais empêché par l'antagoniste TNP-ATP en accord avec son implication dans le mécanisme d'activation promu par l'ATP.

## **Translocation of p47phox from a soluble to a membrane-bound state: molecular mechanism of NADPH oxidase activation upon phosphorylation**

J. Marcoux<sup>1</sup>, P. Man<sup>2</sup>, I. Petit-Haertlein<sup>1</sup>, C. Vivès<sup>1</sup>, E. Forest<sup>1</sup> et F. Fieschi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale, UMR 5075CEA/CNRS/UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, <sup>2</sup>Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, Videnska 1083, CZ-14220 Prague 4, Czech Republic

The neutrophilic NADPH oxidase is an enzymatic complex involved in innate immunity. Phosphorylation of p47phox promotes its translocation followed by membrane interaction and assembly with membranous flavocytochrome b558. It ends with formation of a functional NADPH oxidase complex at the phagosomal membrane, producing reactive oxygen species with microbicidal activity against pathogens. p47phox has always been resistant to crystallography trials, due to its modular organization leading to relative flexibility. To characterize p47phox conformational changes during activation, we used wild type and S303/304/328E triple mutant mimicking the phosphorylated state. Hydrogen/Deuterium exchange coupled to mass spectrometry was used to obtain structural information on the conformational mechanism that underlies p47phox activation. We confirmed a relative opening of the protein with exposure of a tandem of SH3 modules that are known to bind membranous flavocytochrome b558 and of a PX domain involved in membrane lipids binding. A new surface was shown to be unmasked after activation, representing a potential auto-inhibitory surface that may block the interaction of the PX domain with the membrane in the resting state. Within this surface, we identified two residues involved in the interaction with the PX domain. The double mutant R162A/D166A showed a higher affinity for specific phospholipids but none for the flavocytochrome b558, reflecting an intermediate conformation between the auto-inhibited and activated forms in this mutant.

## **The membrane dynamics of the EGF receptor and its signal integration using holographic optical tweezers**

V. Rouger<sup>1</sup>, S. Mailfert<sup>1</sup>, F. Belloni<sup>2</sup>, S. Monneret<sup>2</sup> et D. Marguet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Université de la Méditerranée; INSERM UMR 631; CNRS UMR 6102; Marseille, France, <sup>2</sup>Institut Fresnel, CNRS UMR 6133, Marseille, France

The EGF receptor is one of the most studied prototypical receptor tyrosine kinase that generates important signals in cell proliferation, migration, differentiation or apoptosis. From the other hand, the EGFR signaling pathway is persistently activated in the majority of human epithelial cancers, what places it in the center of interest in cancer research and development of anticancer drugs. The main objective of this study consists in the correlation of the EGFR stimulation level and the biological response of the cells. In our laboratory, we are using an original approach that combines a classical multi-color epi-fluorescence microscopy with a holographic optical tweezers (HOT) manipulation. HOT allows us the handling of different microscopic objects such as entire cells or beads covered with specific ligands in 3D. We can stimulate the receptors on the cell surface and observe specific cell response upon the stimulation in a perfect spatio-temporal resolution. In our experimental approach we activate the COS-7 cells naturally expressing EGFR with beads covered with EGF and we follow the calcium response of these cells as a result of EGFR signaling cascade. Alternatively, we can verify the sequential stimulation by increasing the quantity of ligand-coated beads at the cell surface in the function of time. Interestingly, we've seen also a calcium response in cells remaining in a physical contact with the EGF-stimulated cell. Indeed, our results show that this type of cellular communication exists. These studies will help us in a better comprehension of the EGFR induced cell signaling. Moreover we would like to figure out the stimulation level necessary to trigger on biological response of the cell.

## Dynamic organization of HIV co-receptors in the membrane of immune cells: a single molecule analysis

P. Mascalchi<sup>1</sup>, F. Dumas<sup>1</sup>, B. Lagane<sup>2</sup>, F. Bachelier<sup>2</sup>, A. Lopez<sup>1</sup> et L. Salomé<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNRS - IPBS (Institute of Pharmacology and Structural Biology), 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse & Université de Toulouse, UPS - IPBS, 31077 Toulouse, <sup>2</sup>Unité de Pathogénie Virale Moléculaire, INSERM U819, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris

HIV infection of immune cells requires the sequential binding of gp120 viral envelop proteins to first CD4, and then CCR5 (or CXCR4) membrane receptors. As several trimeric units of gp120 are required in this viral process, its efficiency probably depends on the dynamic distribution of CD4 and CCR5 receptors.

We previously showed by fluorescence based approaches that compartmentalization of these receptors in their basal state exists at the surface of a model cell line<sup>1,2</sup>. To validate these results and to evaluate the molecular mechanisms that control this lateral distribution, we pursue our study on natural targets of HIV: immune cells which express both CD4 and CCR5 native receptors. We developed a single particle tracking method to investigate the behaviour of individual receptors. It is based on the labelling of HIV receptors by Quantum Dots bearing specific antibodies. Our first results obtained for CD4 reveal three diffusion modes: random, confined or transiently confined diffusion. Addition of the envelop protein or other molecules disrupting the distribution of each receptor will allow us to determine which processes are involved in their dynamic membrane organization. These data will help to design new therapeutic strategies which aim at inhibiting the binding of viral particles to target cells.

<sup>1</sup> Gaibelet *et al.*, 2006. *J Biol Chem* 281:37921-29. <sup>2</sup> Baker *et al.*, 2007. *J Biol Chem* 282 :35163-68.

## Mammalian olfactory receptors : GPCRs exhibiting a functionality outside lipid rafts

G. Sanz<sup>1</sup>, M.-A. Persuy<sup>1</sup>, J. Vidic<sup>4</sup>, F. Wade<sup>1</sup>, C. Péchoux<sup>2</sup>, S. Chat<sup>2</sup>, S. Lobasso<sup>3</sup>, R. Angelini<sup>3</sup>, R. Monnerie<sup>1</sup>, A. Corcelli<sup>3</sup> et E. Pajot-Augy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR1197 Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France; IFR 144 Neuro-Sud Paris France, <sup>2</sup>INRA, UR1196 Génomique et Physiologie de la Lactation, Plateau de Microscopie électronique – Plateforme MIMA2, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France, <sup>3</sup>Dipartimento di Biochimica Medica, Biologia Medica e Fisica Medica, Università degli Studi di Bari Aldo moro, Piazza G. Cesare, I-70125 Bari, Italy, <sup>4</sup>INRA, UR892 Virologie et Immunologie Moléculaire, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

*S. cerevisiae* yeasts efficiently express heterologous mammalian olfactory receptors (ORs). In this work, this expression system was further characterized in terms of ORs functionality depending on subcellular localisation, and lipid environment, in particular relative to lipid raft microdomains.

OR localisation in membranes was investigated by density gradients and immunoblotting using antibodies targeting proteins specific of subcellular compartments and of lipid raft microdomains. The functional response of ORs was monitored by Surface Plasmon Resonance for the various membrane subfractions. Moreover, the lipidic composition of the subfractions was determined by TLC analyses, and ORs were observed by transmission electron microscopy after immunogold labelling.

Expression induction duration improves ORs trafficking to the plasma membrane, but ORs respond to odorants starting from the endoplasmic reticulum, although at a lower level than at the plasma membrane. ORs localize outside lipid rafts microdomains, although considered as putative signaling platforms, while exhibiting an efficient functional response. The same observation was reached for ORs expressed in a mammalian heterologous expression system. These results are discussed relative to various assumptions formulated for other G-protein coupled receptors (GPCRs). The relative ergosterol content increased from inner to plasma membranes, which could increase membrane rigidity and account for the larger size of the plasma membrane vesicles carrying receptors. Considering the amount of functional ORs together with the rigidity of the membranes in the various subfractions could help improve biosensors prepared from yeast membranes carrying ORs.

## **– Lipidomique et métabolomique –**



## **La fluxomique : un outil d'exploration fonctionnelle des systèmes métaboliques**

J.-C. Portais

Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, UMR5504, UMR792, CNRS-INRA-INSA, et Université de Toulouse; INSA, UPS, INP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

Le métabolisme est une fonction cellulaire de base qui conditionne la survie, la croissance et l'adaptation des organismes vivants. A l'échelle cellulaire, il repose sur plusieurs centaines de réactions biochimiques qui fonctionnent de manière très dépendante les unes des autres mais sont au contraire fortement interconnectées. Cette organisation en réseau du métabolisme cellulaire conditionne en grande partie le comportement métabolique global. Toutefois, les principes généraux d'organisation, de fonctionnement, et d'adaptation des réseaux métaboliques sont actuellement très mal connus. Leur connaissance est cependant essentielle pour comprendre le fonctionnement du métabolisme cellulaire, pour analyser le rôle du métabolisme dans l'adaptation des organismes à leur environnement, mais aussi pour orienter efficacement le métabolisme vers la production de molécules d'intérêt. A terme l'objectif est de pouvoir développer des modèles prédictifs du comportement métabolique, particulièrement recherchés dans un contexte de biologie synthétique.



**– Nouveaux outils et concepts –**



## Assessing the stability of protein complexes within large assemblies

F. Cazals et T. Dreyfus

INRIA Sophia-Antipolis-Méditerranée, Algorithms-Biology-Structure, 2004 route des lucioles, BP 93, 06902 Sophia Antipolis

Structural genomics projects exploiting Tandem Affinity Purification (TAP) or similar data have revealed remarkable features of proteomes [G06]. While these insights are essentially of combinatorial nature—selected proteins are known to interact within a complex, leveraging this information requires building three dimensional models of these complexes. Such an endeavour has recently been completed for the Nuclear Pore Complex (NPC), for which plausible reconstructions have been computed from different experimental data, including TAP data [A07a-b]. Yet, a full synergy between TAP data and the reconstruction is not at play for two reasons. First, the models built are qualitative. Second, the reconstruction does not elucidate the precise connexion between the model and TAP data. In particular, deciding whether proteins seen in a TAP experiment correspond to a single complex or a mixture of complexes within the NPC is not addressed.

This talk will present a method addressing these limitations. First, we shall introduce tolerated models to inherently model uncertain shapes. A tolerated model is a one-parameter family of shapes (a continuum of geometries) representing an uncertain shape, which can be used to investigate stable complexes amidst the continuum. Second, for models reconstructed from TAP data, we shall explain how tolerated models and their built-in geometric statistics can be used to disambiguate complexes versus mixtures of complexes. Illustrations will be provided on NPC models derived from the density maps presented in [A07a-b].

[G06] A-C. Gavin et al, Nature, 440, 2006.

[A07a-b] F. Alber and Al, Nature, 450, 2007.

[CD10] F. Cazals and T. Dreyfus, Symposium on Geometry Processing, 2010.

<http://hal.archives-ouvertes.fr/inria-00497688/en>

## Étude de la perturbation et de la dissociation par la pression d'une enzyme tétramérique, l'urate oxydase

E. Girard<sup>1</sup>, S. Marchal<sup>2</sup>, J. Perez<sup>3</sup>, S. Finet<sup>5</sup>, R. Kahn<sup>1</sup>, R. Fourme<sup>3</sup>, G. Marassio<sup>4</sup>, A.-C. Dhaussy<sup>6</sup>, T. Prangé<sup>7</sup>, R. Lange<sup>2</sup>, J. Abraini<sup>4</sup>, M. Mezouar<sup>5</sup> et N. Colloc'h<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, UMR5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex, <sup>2</sup>INSERM, U710, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France; Univ. Montpellier 2, 34095 Montpellier, <sup>3</sup>Synchrotron-SOLEIL, BP48 Saint Aubin, 91192 Gif-sur-Yvette, <sup>4</sup>CI-NAPS, UMR6232-UCBN-CNRS, ERT 1083, Centre CYCERON, bd Becquerel, 14704 Caen, <sup>5</sup>ESRF, BP220, 38027 Grenoble, <sup>6</sup>CRISTMAT ENSICAEN, bd Maréchal Juin, 14000 Caen, <sup>7</sup>LCRB, CNRS UMR 8015-Univ. Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris

L'urate oxydase est une enzyme homotétramérique dont les sites actifs sont situés aux interfaces. Son activité enzymatique est directement relié à l'intégrité du tétramère. Pour étudier les modifications induites par la pression, nous avons employé différentes techniques utilisant la haute pression hydrostatique : la cristallographie des rayons X, la spectroscopie de fluorescence, et le SAXS, ainsi que les mesures d'activité enzymatique sous pression et après décompression.

L'analyse des différents résultats expérimentaux a permis de proposer un modèle de dissociation par la pression. Il y a d'abord une perte de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, puis l'enzyme se dissocie de façon irréversible en monomères qui s'agrègent rapidement.

La comparaison des structures cristallographiques à 150 MPa et à pression ambiante a montré que le volume de la cavité interne diminuait sous pression tandis que celui du site actif augmentait et que les régions dans lesquelles les facteurs d'agitation thermique augmentaient le plus se situent toutes autour du tunnel d'accès du substrat.. On peut relier la perte d'affinité de l'enzyme pour son substrat à ces deux modifications structurales.

Au cours de la réaction enzymatique, le site actif doit s'ouvrir pour s'adapter à un produit plus volumineux que le substrat. L'augmentation de volume du site ne peut sans doute avoir lieu que par la diminution du volume de la cavité. La structure sous haute pression représente donc probablement un état conformationnel que l'enzyme doit prendre au cours de son mécanisme catalytique. L'hypothèse que la pression piège un sous-état conformationnel relié au mécanisme est ici démontrée de façon structurale.

Girard *et al.*, Biophys J., 2010, 98 :2365-2373

## Are experimental tests possible about the existence of long range interactions of the Fröhlich type between biomolecules ?

M. Pettini

Centre de Physique Théorique de Luminy, Université de la Méditerranée, 13288 Marseille cedex 09

Les interactions biochimiques précises entre différentes molécules biologiques, incluant protéines et acides nucléiques, sont cruciales pour le maintien des fonctions cellulaires et la viabilité d'organismes vivants. Le milieu aqueux dans lequel ont lieu ces interactions constitue théoriquement une barrière électrostatique pour ces processus, rendant impossible toute interaction/réaction efficace de nature électrostatique au delà d'environ 100 Å de distance entre deux molécules. Quelles sont donc les forces physiques capables de mettre en interaction des partenaires biochimiques au bon endroit et dans le bon ordre avec la précision et l'efficacité étonnantes que l'on observe dans la matière vivante? Nous sommes en train d'étudier cette problématique en testant l'hypothèse - due à H. Fröhlich - que ces forces soient des forces à longue portée, dont l'existence est prédite par la mécanique quantique, engendrées par des dipôles électriques oscillants en résonance. Associant une expertise en physique théorique et notamment sur les systèmes dynamiques (groupe de M. Pettini au CPT, UMR 6207, Luminy), en mesure de diffusion à l'échelle unicellulaire (groupe de D. Marguet, CIML/CNRS UMR 6102, Luminy), et en biologie moléculaire (groupe de P. Ferrier, CIML/CNRS UMR 6102), nous suivons précisément les cinétiques et les activités catalytiques de systèmes-modèles de reconnaissance et de clivage de l'ADN par des protéines effectrices site-spécifiques (endonucléases de restriction et recombinaison RAG1/2). Ceci devrait nous permettre de comparer la pertinence d'un modèle de rencontre purement stochastique entre deux partenaires biochimiques et d'un mode mixte, superposition d'une force aléatoire (résultant des chocs chaotiques des molécules d'eau) et d'une force électrodynamique à longue portée.

## Real time imaging of the growth of amyloid-like fibrils using high speed atomic force microscopy

P.-E. Milhiet<sup>1</sup>, D. Yamamoto<sup>2</sup>, O. Berthoumieux<sup>1</sup>, J.-M. Verdier<sup>3</sup>, S. Marchal<sup>3</sup> et T. Ando<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biochimie Structurale, UMR5048 CNRS, UMR554 INSERM, Université Montpellier I et II, 29, rue de Navacelles, 34090 Montpellier, <sup>2</sup>Department of Physics, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-1192, Japan, <sup>3</sup>MMDN, UMR710 INSERM, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon-CC105 - 34095 Montpellier

Neurodegenerative diseases are generally associated to extracellular aggregation of proteins that form fibrillar deposits in brain. Among them, lithostathine is a protein that forms fibrils in Alzheimer and Creutzfeldt-Jakob diseases by a self-proteolysis of its N-terminal part [1,2].

In order to characterize the structure of lithostathine fibrils and protofibrils as well as the dynamics of their formation, high speed AFM experiments were performed in liquid [3]. Proto-fibrils were shown to laterally and vertically associate forming bundles and paired helical filaments. The formation of these structures as well as the growth of fibers was observed in real time (1 image/s) providing new insights into the assembly mechanism of amyloid fibrils.

References

- [1] Duplan, L.; Michel, B.; Boucraut, J.; Barthellémy, S.; Desplat-Jego, S.; Marin, V.; Gambarelli, D.; Bernard, D.; Berthézène, P.; Alescio-Lautier, B.; Verdier, J.M. *Neurobiol. Aging*, 22, 79-88. (2001).
- [2] Laurine E.; Grégoire C.; Fšndrich M.; Engemann S.; Marchal S.; Thion L.; Thimonier J.; Mohr M.; Monsarrat B.; Michel B.; Dobson C.M.; Wanker E.; Erard M. and Verdier J.M. *J. Biol. Chem.*, 278, 51770-51778. (2003).
- [3] Ando, T. Uchihashi, T., Kodera, N., Yamamoto, D., Taniguchi, M., Miyagi, A. and Yamashita, H. High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes. *J. Mol. Recognit.* 20:448-458 (2007).

## Single molecule studies of seven transmembrane receptors

O. Berthoumieu, H. Attrill et A. Watts

University of Oxford, Department of Biochemistry, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom

Bacteriorhodopsin (bR) is the only protein in the purple membrane of the halophilic organism *Halobacterium salinarium*. It is a light-driven proton pump that contains a chromophore, the retinal, covalently bound to the protein. On illumination, the retinal isomerization initiates a cycle of conformational changes resulting in a transmembrane proton gradient. This photocycle also results in successive charges displacements across the protein, altering the electronic conductance of the molecule. Moreover, its crystalline structure provides bR with a high chemical and thermal stability, making it an attractive material for developing biomolecular devices. A rudimentary imaging system based on purple membrane and showing differential response to illumination was assembled in 1992 (Miyasaka *et al.*, Science, 255, 342-344) and applications such as photodetectors and optical memories are being experimented, but all these studies use the protein within the membrane on relatively large surfaces. Here, conducting-probe atomic force microscopy (CP-AFM) was used to measure the electrical response in the dark and on illumination of isolated trimers of bacteriorhodopsin as a function of an applied bias. Experiments were performed on gold-bR-gold junctions using a 75% delipidated cysteine mutant. I-V curves were obtained in the dark interspersed with brief illuminations using longpass filters at a wavelength corresponding to the maximum of absorbance of the protein. A switch of conductance (i.e drop of resistance) on illumination with a return to dark conditions was reproducibly observed for a same feature, after successive illuminations in a same experiment.

## Spectroscopie RPE et sondes paramagnétiques : de nouvelles stratégies pour la biologie structurale

V. Belle<sup>1</sup>, M. Martinho<sup>1</sup>, M. Lorenzi<sup>1</sup>, G. Gerbaud<sup>1</sup>, H. Vezin<sup>3</sup>, F. Carriere<sup>2</sup>, S. Longhi<sup>4</sup>, J. Strancar<sup>5</sup>, A. Fournel<sup>1</sup> et B. Guigliarelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, BIP-UPR9036, CNRS et Université d'Aix-Marseille I et II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, <sup>2</sup>Enzymologie Interfaciale et Physiologie de la Lipolyse, EIPL, UPR9025, CNRS et Université d'Aix-Marseille I et II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, <sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, LCOM, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, <sup>4</sup>Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, AFMB-UMR6098, CNRS et Université d'Aix-Marseille I et II, Chemin de Luminy, Marseille, <sup>5</sup>Laboratory of Biophysics, Solid States Physics Department, Josef Stefan Institute, Ljubljana, Slovénie

L'utilisation de sondes paramagnétiques de type radicaux nitroxydes pour explorer par spectroscopie RPE l'environnement local d'une chaîne polypeptidique ou d'acides nucléiques est une technique utilisée de longue date [1]. Toutefois, les avancées technologiques récentes dans le domaine de la RPE multifréquence et de la RPE impulsionnelle ont permis l'émergence d'une véritable RPE structurale. Sans limitation de taille pour les systèmes biologiques étudiés, nous montrons comment, combinée à la dynamique moléculaire, cette approche permet de suivre en détail les transitions structurales à l'œuvre dans les processus de reconnaissance moléculaire ou les mécanismes catalytiques. Plusieurs exemples portant sur des applications récentes seront présentés :

- La catalyse interfaciale sur micelles par les enzymes de type lipase [2].

- La cartographie des transitions désordre-ordre dans les nucléoprotéines virales lors des processus de réplication [3, 4].

Par ailleurs, nous montrerons comment, grâce à la longue portée des interactions dipolaires électroniques, les nouvelles stratégies de DEER (Double Résonance Electron Electron) permettent de mesurer des distances intersondes jusqu'à 8 nm. Elles ouvrent ainsi des perspectives inédites sur l'assemblage des grands édifices biologiques (complexes et supercomplexes membranaires) et sur la dynamique de leur fonctionnement [2].

1- V. Belle *et al.* in Instrumental Analysis of IDP's, V. Uverski and S. Longhi Eds, Wiley **2010**

2- S. Ranaldi, V. Belle, M. Woudstra, R. Bourgeas, B. Guigliarelli *et al.* *Biochemistry* **2010**, 49, 2140.

3- V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo, E. Liquière, J. Strancar *et al.* *Proteins* **2008**, 73, 973-988.

4- A. Kavalenka, I. Urbančič, V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo *et al.* *Biophysical J.* **2010**, 98, 1055.

## Échantillonnage conformationnel du site actif d'un récepteur par dynamique moléculaire sous contrainte : application au récepteur PPAR-gamma

S. Aci-Sèche<sup>1</sup>, N. Garnier<sup>1</sup>, D. Genest<sup>1</sup>, S. Bourg<sup>2</sup>, C. Marot<sup>3</sup>, L. Morin-Allory<sup>3</sup> et M. Genest<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biophysique Moléculaire (affilié à l'Université d'Orléans et à l'INSERM) CNRS, rue Charles Sadron, 45701 Orléans cedex 2, <sup>2</sup>Fédération de Recherche «Physique et Chimie du Vivant», CNRS 2708, rue Charles Sadron, 45701 Orléans cedex 2, <sup>3</sup>Institut de Chimie Organique et Analytique, CNRS – Université d'Orléans, BP 6759, rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2

Le docking est une technique *in silico* très utilisée pour étudier les interactions entre molécules ou orienter les chimistes dans le développement de nouveaux composés pharmaceutiques. Cependant, les méthodes existantes peuvent manquer de fiabilité car elles ne prennent pas ou peu en compte la flexibilité du récepteur. Plusieurs méthodologies sont actuellement en cours de développement pour introduire ce concept de flexibilité du récepteur dans les études de docking.

Une approche intéressante est celle du docking multi-conformations, qui consiste à réaliser un docking rigide sur un ensemble de conformations du site actif du récepteur représentatif de sa flexibilité. Cet ensemble peut être déterminé expérimentalement ou par des méthodes de simulations numériques, les mieux adaptées à l'échantillonnage structural. Cependant, explorer la diversité conformationnelle d'une protéine requiert de larges gammes de temps de simulation (de l'ordre de la centaine de nanoseconde), ce qui peut s'avérer très coûteux en temps-calcul. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches permettant l'exploration rapide et fiable de l'espace conformationnel d'un récepteur. Nous présentons ici un protocole qui permet de générer un vaste ensemble de conformations d'un récepteur en utilisant des techniques de simulation de dynamique moléculaire sous contraintes et un modèle de solvant implicite. Nous présentons également une méthode de partitionnement pour sélectionner, parmi les conformations générées, un ensemble de conformations représentatives de la flexibilité du récepteur utilisable pour des études de docking multi-conformation. La méthode est appliquée au récepteur de prolifération et d'activation des peroxyosomes gamma (PPAR $\gamma$ ).

## Padron: a fluorescent protein with a positive photo-switching mechanism

A. Regis Faro<sup>1</sup>, P. Carpentier<sup>1</sup>, D. Bourgeois<sup>1</sup> et P. Dedeker<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut de biologie Structurale - Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, <sup>2</sup>Leuven University, Belgique

Proteins of the GFP family have revolutionized the biological field because they allow to mark biological systems in a non-invasive way. Padron fluorescent protein belongs to GFP family and it has the propriety to be reversibly switchable between fluorescent *on* state and non-fluorescent *off* state upon irradiation. Padron exhibits a positive photo-switching behaviour because excitation of the protein at the peak absorption of the on-state ( $\sim 532$  nm) enhances fluorescence (populates even more the *on* state), whereas upon excitation at 405 nm (peak absorption of the *off* state), the protein switches off even more. This is in contrary to the famous RSFP Dronpa that displays negative photo-switching. In this work we described for the first time photo-isomerization of a fluorescent protein at low temperature. Based on our results we suggest that isomerization of the chromophore is the photo-switching trigger event, occurring in the excited state of the chromophore and implying crossing of a low energy barrier (possible at 100 K), followed by structural relaxation accompanied by a protonation equilibration in the ground state, which probably involve solvent exchange and a high energy barrier (crossable at RT). By designing an experimental setup at low temperature (100 K), we could trap a new fluorescent state of the photoswitchable fluorescent protein Padron. We propose that this state is an intermediate state along the *off* to *on* photoswitching pathway of Padron.

– **Expression génique** –



## Dynamic assembly of proteins: characterization, prediction and design

G. Faure<sup>1,2</sup>, A. Gaubert<sup>1,2</sup>, F. Ochsenbein<sup>1,2</sup> et R. Guérois<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>iBiTecS, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, <sup>2</sup>URA CNRS 2096, 91191 Gif-sur-Yvette cedex

Protein interaction maps obtained for different model organisms are now providing a wealth of data to further disentangle the molecular logic associated with proteins dynamic assemblies. In particular, competitions and synergies existing between interacting partners need to be further uncovered through targeted perturbations at complex interfaces. How predictive approaches in the field of structural bioinformatics may help unravel the physical reality underlying protein interaction networks ?

To explore how two proteins likely assemble, at least two tracks can be envisioned. One relies on the physico-chemical properties of the interface while the other rather exploits the evolutionary constraints arising from partners coevolution. We are exploring how both types of constraints can be combined to better model the structures of protein complexes. How far may evolutionary constraints be used to predict the way proteins assemble ? Coupling together computational and experimental approaches, we developed and assessed several methodologies which use structural information to better predict protein interactions. We have particular interest in assembly chaperones, a class of proteins which regulates macromolecular assemblies and play important roles in cell stress responses. The possibility to predict how proteins do assemble, also opens perspectives for the design of compounds able to challenge native interactions in the cellular context. Assembly chaperones provide appealing targets because their interactions are labile, accessible to exogeneous compounds and may bring about major perturbation in otherwise highly stable assemblies.

## Cell-by-cell quantification of catabolite repression in *Bacillus subtilis* by Number and Brightness Analysis

M. Ferguson<sup>1</sup>, D. Le Coq<sup>2</sup>, M. Jules<sup>2</sup>, C. Clerté<sup>1</sup>, S. Aymerich<sup>2</sup>, C. Royer<sup>1</sup> et N. Declerck<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biochimie Structurale, INSERM 554, CNRS 5048, 34090 Montpellier, <sup>2</sup>Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon

Number and brightness analysis (N&B) is a useful technique for characterizing the concentration and molecular brightness of fluorescent molecules in vivo (Digman et al, 2008). Here we investigate promoter activity in bacterial strains expressing green fluorescent protein (GFP) under the control of native promoters engineered into the *Bacillus subtilis* chromosome (Botella et al, 2010). We are interested in observing the regulation networks of the central carbon metabolism of *B. subtilis*, in particular the transcriptional activity of promoters implicated in the switch between glycolysis and gluconeogenesis.

We utilize two photon laser scanning microscopy and N&B analysis to monitor the number of GFP molecules diffusing within living bacterial cells. By quantifying intensity fluctuations from fluorescent images recorded on timescales faster than diffusion, we can directly measure the true concentration of fluorescent molecules inside individual bacterial cells. The concentration of GFP molecules produced from different promoter fusions was determined for hundreds of *B. subtilis* cells grown on either glucose or malate. This analysis yielded Numbers histograms and statistical parameters associated to the intrinsic variability of gene expression within the cell population. Attempts to fit experimental quantitative data to stochastic models of gene expression and regulation are currently underway.

Botella E, Fogg M, Jules M, Piersma S, Doherty G, Hansen A, Denham EL, Le Chat L, Veiga P, Bailey K, Lewis PJ, van Dijl JM, Aymerich S, Wilkinson AJ, Devine KM (2010) pBaSysBioII: an integrative plasmid generating gfp transcriptional fusions for high-throughput analysis of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*

Digman MA, Dalal R, Horwitz AF, Gratton E (2008) Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophys J* 94(6): 2320-2332

---

## Doigts de zinc et deubiquitination de la chromatine

Y.-H. Wang<sup>1</sup>, J. Bonnet<sup>2</sup>, A. Atkinson<sup>1</sup>, C. Romier<sup>1</sup>, A. Hamiche<sup>2</sup>, L. Tora<sup>2</sup>, D. Devys<sup>2</sup> et B. Kieffer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie et de Génomique Structurales, IGBMC, CNRS UMR 7104, INSERM U 964, Université de Strasbourg, <sup>2</sup>Département de Génomique fonctionnelle, IGBMC, CNRS UMR 7104, INSERM U 964, Université de Strasbourg

Le facteur de transcription SAGA est un coactivateur impliqué dans la dynamique de la chromatine. Il contient deux enzymes catalysant l'acétylation des queues d'histones ainsi que leur déubiquitination. Les sous-unités ATXN7 et ATXN7L3 appartenant au sous-complexe de déubiquitination de SAGA contiennent un domaine similaire, stabilisé par un doigt de zinc particulier. La structure tridimensionnelle des deux domaines a été résolue par RMN. De façon inattendue, la structure des deux domaines à zinc est différente, malgré une signature en séquence très similaire. Des expériences de biochimie et de RMN montrent que seul le doigt de zinc de la sous-unité ATXN7 possède une activité de liaison au nucléosome.

---

***– Communications par affiches –***



**– Interactions hôte-pathogène –**



**Affiche 1****The parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*: characterization of the membrane tubulation mechanism induced by the GRA2 protein**

A. Bittame<sup>1</sup>, G. Effantin<sup>2</sup>, E. Gentilhomme<sup>3</sup>, E. Marechal<sup>4</sup>, M. Jamin<sup>2</sup>, W. Weissenhorn<sup>2</sup>, M.-F. Cesbron-Delauw<sup>1</sup>, J. Gagnon<sup>1</sup> et C. Mercier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes. UMR 5163 CNRS-Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble, <sup>2</sup>Unit for Virus Host-Cell Interactions (UVHCI). UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble, <sup>3</sup>Centre de Recherche du Service de Santé des Armées « E. Pardé », Grenoble, <sup>4</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale. UMR 168 CNRS-CEA-UJF-INRA, Grenoble

Within the host cell, the parasitophorous vacuole in which *Toxoplasma gondii* develops, is characterized by a membranous nanotubular network (MNN). The molecular components, the formation and the function of the MNN remain poorly explored. We had previously demonstrated indirectly that the secreted dense granule GRA2 protein, which contains three amphipathic alpha helices, is a key element of the MNN formation (Mercier *et al.*, 2002; Travier *et al.*, 2008). The aim of this work was to demonstrate directly the role of GRA2 in the MNN formation, using an *in vitro* system to study the GRA2-membrane interactions. Native and recombinant GRA2 proteins were purified from *Toxoplasma* and from *Escherichia coli*, respectively. Dynamic light scattering and circular dichroism showed that recombinant GRA2, which folds with an alpha-helical pattern, is purified as both a potential dimer and complexes of higher molecular weight. When incubated with Small Unilamellar Vesicles (SUVs) formed with complex lipids, both native and recombinant GRA2 were shown to associate with the SUV membranes and to induce the formation of long membranous tubules observed by transmission electron microscopy (TEM). In the literature, it has been reported that most proteins capable of inducing membrane curvature, interact with phosphatidylinositol (4,5) bi-phosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>). Fat blots and binding assays of GRA2 to SUVs of defined lipid composition and containing PI(4,5)P<sub>2</sub> showed that GRA2 recognizes phosphoinositides and associates preferentially with PI(4,5)P<sub>2</sub>-containing SUVs. TEM showed that GRA2 deforms membranes only when PI(4,5)P<sub>2</sub> is present. Together, these results allowed us to propose a model of membrane deformation induced by GRA2, the principal effector of the MNN formation.

**Affiche 2****Biochemical and biophysical studies of RalF, a pathogenic regulator hijacking the human cellular traffic GTPases**

V. Campanacci<sup>1</sup>, M. Zeghouf<sup>1</sup>, A. Delprato<sup>1</sup>, P. Ray<sup>1</sup>, C. R. Roy<sup>2</sup>, B. Antonny<sup>3</sup> et J. Cherfils<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LEBS UPR3082 CNRS, bat. 34 - avenue de la Terrasse - 91198 Gif sur Yvette cedex, France, <sup>2</sup>Yale School of Medicine, 295 Congress Ave. New Haven, CT 06536-0812, USA, <sup>3</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, 660 Route des Lucioles Sophia Antipolis 06560 Valbonne, France

Many pathogenic bacteria hijack the cellular machineries that control the actin cytoskeleton and cellular traffic in order to escape the host immune response, or to facilitate their replication or motility. Small GTP-binding proteins (GTPases) of the Rho, Arf and Rab families, which are pivotal regulators in these processes, have thus been identified as targets for various human pathogens, for example salmonella, clostridia and legionella. To that purpose, these pathogens translocate bacterial effectors in the host cell, which are in general unrelated to host proteins, but recapitulate their biochemical functions to activate, inhibit or modulate GTPases irrespective of their normal cellular controls. In our lab, we study RalF, a family of bacterial regulators of cellular traffic, which are translocated in host cells by the human intracellular pathogens *Legionella pneumophila* (legionellosis) and *Rickettsia prowazekii* (epidemic typhus). RalF is a 42 kDa protein with a domain related to cellular exchange factors (ArfGEFs), which stimulate GDP/GTP exchange to activate the small G-protein Arf. Our aim is to decipher the biophysical, structural and dynamics mechanisms of this protein family. The expected outcome is to obtain an integrated “movie” of the intramolecular protein-protein and protein-membrane interactions that underlie hijacking of a central machinery of cellular traffic by a human pathogen.

**Affiche 3****Effect of the beta-propiolactone treatment on the adsorption and fusion of A/H1N1 influenza virus on a mixed phospholipids DMPC/GM3 monolayer at the air-water interface**B. Desbat<sup>1</sup>, E. Lancelot<sup>1</sup>, M. C. Nicolai<sup>2</sup>, F. Vogel<sup>2</sup>, M. Chevalier<sup>2</sup> et F. Ronzon<sup>2</sup><sup>1</sup>CBMN, UMR-CNRS 5248, 33607 Pessac, <sup>2</sup>Sanofi Pasteur, 69280 Marcy l'Étoile

For safety reasons, most physico-chemical analysis of influenza virus is conducted using influenza virus inactivated with beta-propiolactone (BPL). Consequently, few fundamental studies comparing native virus with inactivated virus have been reported in the literature. Moreover, there is no agreement on the specific mechanisms of action of BPL on the influenza virus.

In these studies, conducted under BSL-2 conditions, we used ellipsometry to study the adsorption properties at the air-water interface of two A/H1N1 strains (Brisbane and New Caledonia) before and after inactivation with BPL. These studies were conducted on a mixed lipid monolayer consisting of 95% DMPC and 5%GM3. After virus adsorption, we also assessed the influence a pH shift from 7.4 to 5 on the virus fusion with the lipid monolayer. The results of the present studies indicate that the native virus adsorbs more easily in the mixed monolayer lipid environment with a tendency to form auto assembling virus domains. In contrast, BPL-treated virus showed lower affinity for the DMPC/GM3. Notably, adsorption of auto assembled domains was observed only by injecting a high quantity of virus into the subphase. An important behavioral difference was also observed between the native and the inactivated virus when the pH subphase was decreased at the end of the adsorption step. In presence of the native virus, the adsorbed domains decreased in thickness with a concomitant increase in lipid thickness and surface pressure when the pH was decreased from 7.4 to 5. These observations are in agreement with the fusion model that the virus membrane fuses with the lipid monolayer. Importantly, this fusion effect was not observed with adsorbed inactivated virus.

In summary, it is well-known that BPL can react with genetic material, however, our work shows that this molecule can also exert an effect on the external shell of the virus, by decreasing its affinity for GM3 lipid. Moreover, BPL treatment resulted in the near complete abrogation of virus membrane fusion with the lipid layer at decreasing pH.

**Affiche 4****Hijacking of the pleiotropic cytokine interferon- $\gamma$  by the type III secretion system of *Yersinia pestis***C. Gendrin<sup>1</sup>, S. Sarrazin<sup>1</sup>, D. Bonnaffé<sup>2</sup>, J.-M. Jault<sup>1</sup>, H. Lortat-Jacob<sup>1</sup> et A. Dessen<sup>1</sup><sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex 1, <sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Organique Multifonctionnelle, ICMO UMR CNRS-UPS 8182, Université Paris-Sud 11, 91405 Orsay

Like several gram negative pathogenic bacteria, *Y. pestis* uses a type III secretion system (T3SS) to inject toxins into the cytoplasm of the target cell. Amongst the T3SS proteins, LcrV is located at the top of the secretion needle, and has been shown to be essential for infection (Brubaker, 2003). Its crucial role in the pathogenesis of the bacterium is related to its interaction with the immune system: LcrV is responsible for the down-regulation of inflammation mechanisms (Heesemann et al., 2006), and it has been shown to be a protective antigen against infection (Brubaker, 2003). LcrV is currently in phase II trials as the principal agent of a protective vaccine against plague.

Recently, it has been shown, with cellular biology techniques, that LcrV could interact with the multifunctional cytokine interferon gamma (IFN $\gamma$ ) bound to its receptor (Abramov et al., 2007). We have characterized this interaction using the Biacore system and the intrinsic fluorescence of IFN $\gamma$ . The interaction site comprises the two basic clusters of IFN $\gamma$ . Potential inhibitors have been identified that could provide candidates for developing new antibiotics against *Yersinia*.

**Affiche 5****Assemblage *in vitro* de la capsidie d'un virus bactérien**A. Huet<sup>1</sup>, J. Conway<sup>2</sup>, L. Letellier<sup>1</sup>, O. Preux<sup>1</sup>, D. Durand<sup>1</sup>, P. Vachette<sup>1</sup> et P. Boulanger<sup>1</sup><sup>1</sup>Université Paris-Sud 11, IBBMC, UMR 8619, 91405 Orsay, <sup>2</sup>Department of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh PA, U.S.A.

L'assemblage des capsides des bactériophages à ADN double brin suit une séquence d'évènements régulés. Ce processus débute par la formation d'une capsidie icosaédrique à partir d'une protéine majeure de tête et l'intégration de la protéine portale au niveau d'un sommet. Le transport de l'ADN à travers la portale est assuré par un moteur moléculaire, la terminase. Après fermeture de la portale et stabilisation par des protéines de décoration, la capsidie constitue un assemblage résistant à la forte pression interne exercée par l'ADN compacté.

En combinant des approches génétiques, biochimiques et structurales nous analysons les premières étapes d'assemblage de la capsidie du coliphage T5. La structure 3D obtenue par cryo-microscopie électronique montre que cette capsidie de symétrie T=13 est constituée d'une unique protéine pb8 qui forme les pentons et hexons de l'icosaèdre. Elle est initialement assemblée à partir d'un précurseur pb8p, qui inclut une extension N-terminale jouant le rôle d'échafaudage. Ce domaine est clivé par une protéase virale, avant l'encapsidation de l'ADN. Les réarrangements structuraux de la capsidie (expansion) qui accompagnent cette étape ont été caractérisés par SAXS et cryo-EM. Par ailleurs, des capsides icosaédriques de même géométrie que les capsides formées *in vivo* ont été assemblées *in vitro* à partir de pb8p montrant que la protéine contient à elle seule l'information nécessaire pour la formation d'une capsidie de symétrie T=13. La régulation de l'assemblage des capsides est également étudiée *in vivo*, par co-expression de pb8p avec la portale et la protéase.

A. Huet, J. Conway, L. Letellier, P. Boulanger ; J. Virol., in press (June 2010)

**Affiche 6****1<sup>ère</sup> défensine d'œuf : caractérisation, synthèse, structure**H. Meudal<sup>1</sup>, V. Herve-Grepinet<sup>2</sup>, V. Labas<sup>3</sup>, A. Delmas<sup>1</sup>, Y. Nys<sup>2</sup> et C. Landon<sup>1</sup><sup>1</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 02, <sup>2</sup>Recherches Avicoles, INRA UR83, 37380 Nouzilly, <sup>3</sup>Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, INRA UMR85 - CNRS 6175, 37380 Nouzilly

L'œuf de poule est un modèle très particulier car c'est un milieu clos contenant tous les composés nécessaires au développement de l'embryon et à sa protection.

*Caractérisation* : La Galline est une petite protéine de 41 résidus, contenant 3 ponts disulfure, identifiée à partir du blanc d'œuf. D'après sa séquence, elle possède un motif de cystéines proche de celui des  $\beta$ -défensines aviaires (AvBDs).

*Synthèse peptidique* : 11 mg de Galline pure ont été produits par synthèse peptidique, sous forme repliée avec 3 ponts disulfure.

*Activités antimicrobiennes* : Les activités antimicrobiennes ont été déterminées par diffusion radiale sur une série de bactéries (Lehrer et al. *J. Immunol. Methods* 1991, 137, 167-173).

*Structure 3D* : La structure 3D a été déterminée par RMN (expériences <sup>1</sup>H, spectromètre VARIAN 600MHz). Les modèles ont été calculés dans ARIA/CNS en utilisant l'option des ponts disulfure ambigus. La structure 3D de la Galline contient le feuillet  $\beta$  à 3 brins antiparallèles caractéristique des  $\beta$ -défensines et le réseau de ponts disulfure est sans aucune ambiguïté celui des  $\beta$ -défensines. Un petit feuillet à 2 brins parallèles vient s'ajouter dans la partie N-terminale.

*Comparaisons structurales* :

- Cette première structure de  $\beta$ -défensines d'œuf est comparée aux structures de  $\beta$ -défensines d'oiseaux déjà déterminées : celle de AvBD103b du manchot royal (Landon et al. *J Biol Chem* 2004, 279, 30433-30439) et celle de AvBD2 du poulet (Derache et al. en préparation) pour définir les particularités structurales communes.

- La structure de la Galline est comparée aux 3 autres défensines actuellement identifiées dans les œufs d'autres oiseaux. Nous avons modélisé les structures de ces 3 défensines d'œufs pour définir s'il existe des caractéristiques spécifiques aux défensines d'œuf.

**Affiche 7****A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by a structure-function analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Atu2422**S. Planamente<sup>1,2</sup>, A. Vigouroux<sup>2</sup>, S. Mondy<sup>1</sup>, M. Niçaise<sup>3</sup>, D. Faure<sup>1</sup> et S. Moréra<sup>2</sup><sup>1</sup>Institut des sciences végétales (ISV), CNRS, 91198 Gif sur Yvette, <sup>2</sup>Laboratoire d'Enzymologie et biochimie structurales (LEBS), CNRS, 91198 Gif sur yvette, <sup>3</sup>Institut de biochimie et de biophysique moléculaire et cellulaire, Université paris-Sud, CNRS, 91405 Orsay

Bacterial periplasmic binding proteins (PBPs) and eukaryotic PBP-like domains (also called as Venus Flytrap modules) of G-protein coupled receptors are involved in extracellular GABA perception. We investigated the structural and functional basis of ligand specificity of the PBP Atu2422 which is implicated in virulence and transport of GABA in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Five high-resolution X-ray structures of Atu2422 liganded to GABA, proline, alanine, valine and that of the point mutant Atu2422-F77A liganded to a leucine were determined. Structural analysis of the ligand binding site revealed two essential residues Phe77 and Tyr275, of which implication in GABA-signalling and virulence was confirmed using *A. tumefaciens* cells expressing corresponding Atu2422 mutants. Phe77 residue restricts ligand specificity to  $\alpha$ -amino-acids with a short lateral chain which act as antagonists of the GABA-signalling in *A. tumefaciens*. Tyr275 specifically interacts with the GABA  $\gamma$ -amino group. Conservation of these two key-residues in proteins phylogenetically related to Atu2422 brought to light a sub-family of PBPs in which all members could bind GABA and short  $\alpha$ -amino-acids. This work led to the identification of a fingerprint sequence and structural features for defining PBPs that bind GABA and its competitors, and revealed their occurrence among host-interacting proteobacteria.

**Affiche 8****Analyse biophysique des étapes de la formation de la capsid d'un virus bactérien**O. Preux<sup>1</sup>, A. Huet<sup>1</sup>, J. Conway<sup>2</sup>, P. Vachette<sup>1</sup>, D. Durand<sup>1</sup> et P. Boulanger<sup>1</sup><sup>1</sup>Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Univ Paris-Sud, UMR CNRS 8619, 91405 Orsay, <sup>2</sup>Department of Structural Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15260, U.S.A.

Le bactériophage T5 est un virus infectant *E. Coli*. Sa capsid icosaédrique (triangulation T=13) est constituée d'une protéine majeure pb8 organisée en hexamères sur les faces et en pentamères sur les angles<sub>1,2</sub>. Son assemblage et sa maturation comportent plusieurs étapes critiques pour la formation des virions lors du cycle infectieux. L'étape d'expansion se traduit par d'importantes réorganisations conformationnelles durant lesquelles le volume de la capsid double, lui permettant de contenir un ADN double brin de 122 kpb.

Elle est suivie d'une étape de fixation sur les hexamères d'une protéine de décoration pb10 qui stabilise la capsid lui permettant de résister à la pression interne (~ 50 atm) due à la compaction de l'ADN.

A l'aide d'un mutant de T5 nous avons produit des capsides vides non expansées et déterminé les conditions de leur expansion *in vitro*. Les états avant et après expansion ont été caractérisés par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ; et leurs structures ont été résolues à basse résolution (20 Å) par cryomicroscopie et reconstruction d'image. La dynamique du processus d'expansion est en cours d'étude par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et sera caractérisée par SAXS.

L'étude de la fixation de pb10 est conduite en combinant différentes méthodes biochimiques (migration sur gel natif d'agarose et SDS-PAGE) et biophysiques (spectroscopie de fluorescence et calorimétrie différentielle à balayage). Nous avons montré que pb10 ne se fixe que sur les capsides expansées. Cette fixation est coopérative et induit donc des changements conformationnels de pb8 qui seront étudiés par cristallographie.

Huet et al. J Virol. 2010 sous presse.

Effantin et al. J Mol Biol.( 2006) 361,993.

**– Mécanique de la membrane et du  
cytosquelette –**



**Affiche 9****Impact of simultaneous thermal and osmotic treatments on the plasma membrane and the survival of yeast**L. Beney<sup>1</sup>, S. Dupont<sup>1</sup>, H. Simonin<sup>2</sup> et P. Gervais<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, 1 esplanade Érasme, 21000 Dijon, <sup>2</sup>GEPEA-ENITIAA-CNRS UMR 6144, rue de la Géraudière, 44000 Nantes

During drying, cells are exposed to simultaneous variations in osmotic pressure and temperature, which may lead to death or activity loss. Plasma membrane (PM) of cells, because of its function and its position, is a primary target of physical stresses and its modifications have been evoked to be the main cause of cell death during environmental physical perturbations. However, the mechanisms leading to cell death remains unclear.

The aim of the present work was to study the structural changes in the yeast PM induced by dehydration and their impact on cell viability. Results confirm the existence of a link between membrane physical state and yeast survival to drastic water stresses. The conjunction between lipid phase transition and volume contraction during dehydration led to PM permeabilization and internalization (Simonin *et al.*, 2007). PM internalization caused a surface deficit which is at the origin of membrane rupture during rehydration and cell volume expansion (Dupont *et al.*, 2010). This basic mechanism should be avoided in order to optimize the survival rate of biological cells submitted to simultaneous thermal and osmotic stresses during biotechnological processes such as drying or freezing (Simonin *et al.*, 2008).

Dupont, S., L. Beney, et al. (2010). "Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration." *Biochim Biophys Acta* **1798**(5): 975-85.

Simonin, H., L. Beney, et al. (2007). "Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death." *Biochim Biophys Acta* **1768**(6): 1600-10.

Simonin, H., L. Beney, et al. (2008). "Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments." *Biotechnol Bioeng* **100**(2): 325-33.

**Affiche 10****Organisation ultrastructurale des filaments de septine de *S. Cerevisiae*, analysée *in vitro* et *in situ* par microscopie électronique**A. Bertin<sup>1</sup>, M. McMurray<sup>2</sup>, L. Thai<sup>2</sup>, G. Garcia<sup>2</sup>, J. Thorner<sup>2</sup> et E. Nogales<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex, <sup>2</sup>University of California, 94720 Berkeley (CA), U.S.A.

Les septines forment des filaments du cytosquelette essentiels à la dernière étape de la division cellulaire, la cytokinèse. Elles ont été découvertes il y a plus de 30 ans, chez *S. Cerevisiae*. Au cours de la division les septines sont liées à la membrane plasmique, et localisées au niveau de l'anneau de constriction entre cellule mère et cellule fille. Cinq septines sont exprimées au cours de la mitose : Cdc10, Cdc11, Cdc12, Cdc3 et Shs1.

Dans un premier temps, nous avons déterminé, par des méthodes de marquage spécifiques (anticorps, étiquette GFP, MBP) et des méthodes d'analyse structurales en particules isolées de microscopie électronique, l'organisation moléculaire des quatre septines essentielles (Cdc10, Cdc11, Cdc12, Cdc3). Elles forment un oligomère octamérique symétrique qui peut s'auto-assembler en paires de filaments non polaires. L'unité minimale s'organise comme suit : Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11.

Afin de s'approcher des conditions *in situ*, nous avons utilisé un système modèle de monocouches lipidiques. Nous avons montré que PI(4,5)P2 interagit spécifiquement avec Cdc10 en organisant les septines de manière spectaculaire sur ces monocouches lipidiques. Par ailleurs, PI(4,5)P2 facilite la formation de filaments des septines dans des conditions défavorables à la polymérisation des septines, en solution.

Enfin, nous sommes en cours d'analyse de l'organisation des filaments de septine au sein de la cellule par des méthodes de tomographie et cryo-tomographie électronique. Nous observons un réseau de filaments perpendiculaires au niveau de l'anneau de constriction. Ce réseau est perturbé après délétion/mutation de certaines de ces septines.

**Affiche 11****Structure of phospholipid bilayers from yeast membranes incorporating mammalian olfactory receptors (ORs) from X-ray, neutron and light scattering experiments**G. Brotons<sup>1</sup>, G. Sanz<sup>2</sup>, M.-A. Persuy<sup>2</sup> et E. Pajot-Augy<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratoire de Physique de l'État Condensé (UMR CNRS 6087), Université du Maine, Le Mans, <sup>2</sup>INRA, UMR1197 Neurobiologie de l'Olfaction et de la Prise Alimentaire, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas ; Université Paris-Sud 11, UMR 1197, 91400 Orsay ; IFR 144 Neuro-Sud, Paris

Our aim is to shed some light on the structure of natural phospholipid membranes from yeast incorporating active mammalian olfactory receptors (ORs). Yeasts are grown, OR expression is induced and membrane fraction is prepared via mechanical disruption and centrifugation steps[1]. Nanosomes, i.e. small unilamellar vesicles (SUV) with a nanometric size are obtained from the membrane fraction by sonication[2]. They are immobilized through specific antibodies onto functionalized gold surfaces, for instance on Surface Plasmon Resonance sensorchips[3], which already allowed to check ORs functionality at this level. For all further applications, it is crucial to study the structure and composition of such vesicles, and to understand and control the possible fusion of the vesicles into flat membranes.

The SUV size distribution was obtained from light scattering experiments. The small angle scattering signal was measured with x-rays (SWING, SOLEIL in collaboration with J. Perez) and neutrons (D22, ILL in collaboration with I. Grillo). We present the first results obtained on yeast membrane fractions containing ORs and the issues to be addressed in this field.

[1] Minic, J., Persuy, M.A., Godel, E., Aioun, J., Connerton, I., Salesse, R., Pajot-Augy, E., *Functional expression of olfactory receptors in yeast and development of a bioassay for odorant screening*, **FEBS J.** **2005**, 272, 524–537

[2] Casuso, I., Pla-Roca, M., Gomila, G., Minic Vidic, J., Persuy, M.A., Aioun, J., Pajot-Augy, E., Salesse, R., Samitier, J., *Native nanovesicles containing olfactory receptors adsorbed onto gold electrodes for biosensor applications. An atomic force microscopy study*, **Material Science and Engineering C** **2008**, 28, 686-691

[3] Minic Vidic, J., Grosclaude, J., Persuy, M.A., Aioun, J., Salesse, R., and Pajot-Augy, E., *Quantitative assessment of olfactory receptors activity in immobilized nanosomes: a novel concept for bioelectronic nose*, **Lab on a Chip** **2006**, 6, 1026-1032.

**Affiche 12****Protein and lipid lateral diffusion on artificial lipid nanotubes**Y. Domanov<sup>1</sup>, S. Aimon<sup>1</sup>, M. Renner<sup>2</sup>, A. Triller<sup>2</sup> et P. Bassereau<sup>1</sup><sup>1</sup>Physico-Chimie Curie (UMR 168), Institut Curie, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, <sup>2</sup>Biologie Cellulaire de la Synapse, Ecole Normale Supérieure, 45 rue d'Ulm, 75005 Paris

Lateral mobility of membrane proteins is central to a variety of fundamental biomolecular processes such as biochemical reactions, signalling, transport and self-assembly. Theoretical study of Saffman & Delbrück predicted a logarithmic dependence of the protein diffusion coefficient on 1) the inverse of the size of the protein and 2) on the "membrane size" for membranes of finite size. While the experimental proof of the first prediction is a matter of debate, the second has never been approached experimentally. Here we used tubular lipid membranes providing a convenient model system of defined size where the geometrical, physical and chemical parameters of the membrane can be closely controlled and varied. We followed the diffusion of individual molecules in the membrane using single particle tracking (SPT) with quantum dots (QD) coupled to lipids or proteins reconstituted in the membrane.

We obtained diffusion coefficients for lipids in model membranes composed of phosphatidylcholine, cholesterol and sphingomyelin in various proportions. Further, voltage-gated potassium channel KvAP was reconstituted into model membranes, marked with QDs and its diffusion measured in a similar way. The coefficients were measured while changing the membrane tube radius from ~200 to ~10 nm. We found that both lipid and protein diffusion is retarded in the tubular membranes with radius below 20-50 nm. The diffusion coefficient decreased as much as 3-fold compared to the diffusion on flat membrane measured at the bottom of giant liposomes. Our data for protein and lipid diffusion is in quantitative agreement with the hydrodynamic theoretical predictions (Daniels and Turner, 2007, *Langmuir* 23:6667-70).

This study provides experimental validation for the Saffman-Delbrück theory and represents the first effort to elucidate the role of membrane shape and size in regulation of lateral diffusion.

**Affiche 13**

**Membrane fusion is spatially controlled by modification of phosphoinositides**

F. Dumas<sup>2</sup>, R. Byrne<sup>1</sup>, B. Vincent<sup>3</sup>, L. Salome<sup>2</sup>, D. Poccia<sup>3</sup> et B. Larijani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cell Biophysics Laboratory, Lincoln's Inn Fields Laboratories, Cancer Research UK, 44 Lincoln's Inn Fields, London, WC2A 3PX, UK, <sup>2</sup>IPBS-CNRS, 205 route de Narbonne Toulouse, France, <sup>3</sup>Department of Biology, Amherst College, Amherst, MA, 01002, USA

Nuclear envelope assembly is an essential event in cell cycle but its mechanism and regulation remain mostly unknown. Using a cell-free system derived from sea urchin gametes we report that nuclear envelope formation involves the fusion of membrane vesicles highly enriched in phosphoinositides via the production of a fusogenic lipid, the diacylglycerol. By performing time course fluorescence lifetime imagery, we measured the kinetic of this process and demonstrate that nuclear envelope assembly is polarised. It is initiated at the poles of the nucleus where the nuclear envelope remnants are located. This study provides a mechanism for temporal control of NE assembly and offers an explanation for how such a process of membrane fusion can be spatially regulated.

**Affiche 14**

**Kinetic of dehydration affects lateral membrane organization and cell survival**

S. Dupont, P. Gervais et L. Beney

Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, AgroSup Dijon-Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon

Plasma membrane (PM) is a major site of injury during hydric perturbations. Its structure is strongly affected and cell death can occur during these perturbations. The understanding of the PM mechanisms by which cells survive to extreme dehydration are important to biological research and for stabilizing cells for biotechnological applications.

In the present study, we investigated the effect of dehydration kinetics, known as a crucial parameter for cell survival, on the structural organization of yeast PM. Structural (morphology, ultrastructure, fluidity, distribution of the protein Sur7-GFP contained in sterol-rich membrane microdomains) and functional (permeability) PM modifications were studied after progressive (non-lethal) and rapid (lethal) hyperosmotic perturbations. Rapid dehydration induced the formation of many highly curved PM invaginations followed by internalization of low sterol content PM regions resulting in the decrease of membrane surface. Permeabilization of the PM occurred during the rehydration stage because of lack of membrane area and led to cell death. Progressive dehydration conducted to the redistribution of Sur7-GFP membrane microdomains (not observed after rapid perturbation) and to the formation of some big PM pleats, without internalization. These results suggest that changes in membrane organization, caused by drastic dehydration, depend on the kinetic of perturbations. These different PM behaviors, observed in hydric conditions where metabolism is abolished, could be explained by the difference in the time constants of the membrane deformation (related to the increase of the cell surface-to-volume ratio) and the PM lipid phase separations. These findings highlight the influence of the perturbation kinetic on the evolution of the PM organization and indicate the crucial role of membrane lateral reorganization in cell survival to perturbations.

**Affiche 15****Comparative effects of sterol depletion on purified fractions- and native- plasma membrane of tobacco cells**

P. Gerbeau-Pissot<sup>1</sup>, I. Anca<sup>1</sup>, D. Thomas<sup>1</sup>, C. Der<sup>1</sup>, Y. Roche<sup>2</sup> et F. Simon-Plas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR INRA 1088 Plante Microbe Environnement/CNRS 5184/UB - Bâtiment CMSE - Operation 3 : Dynamique membranaire et microdomaines, 17 rue Sully, BP 86 510, 21065 Dijon Cedex, <sup>2</sup>Plateau Technique Imagerie Spectroscopique IFR 92 - Plateforme Dimacell Laboratoire GPMA - AgroSup Dijon - Université Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon

The first characterization of a Triton X-100 insoluble fraction purified from higher plant plasma membrane (PM) allowed us to propose that both lipidic (Mongrand *et al.*, J. Biol. Chem., 2004) and proteic (Morel *et al.*, Mol. Cell. Prot., 2006) compositions exhibited particular properties similar to those of animal lipid rafts. Addressing the question of the role of sterols, commonly enriched in Detergent-Resistant-Membranes (DRMs), in the structuration of plant PM, we used steady state fluorescence spectroscopy with different probes as DPH, TMA-DPH and Laurdan, and demonstrated that the sterol depletion of purified PM fractions generates a decrease in their relative amount of liquid ordered phases. Developing a new method based on an environmental probe, di-4-ANEPPDHQ, we interestingly noticed that sterol depletion induced a transition involving lo-like and ld-like domains together with the disappearance of DRMs fractions (Roche *et al.*, FASEB J., 2008). Phytosterols could thus account for the lateral organization of purified plant PM fractions, we then tried to test this hypothesis at the plant cell level. After 15 minutes of incubation in 5 mM of cyclodextrin, sterols purified from treated cells PM have been quantified by gas chromatography and are depleted at  $18.3 \pm 7.7 \%$  (n=5) compared to the control PM. We measured spectroscopic characteristics of the di-4-ANEPPDHQ probe loaded on sterol depleted cells and observed a PM global fluidification measured by FRAP experiment as an increase on PM heterogeneity recorded with a spectrofluorimeter. We concluded that phytosterols are involved in PM lateral structuration in native conditions also.

**Affiche 16****Le rôle du cytosquelette dans les mécanismes de l'électrotransfert de gène**

C. Rosazza<sup>1,2</sup>, J.-M. Escoffre<sup>2</sup>, A. Zumbusch<sup>1</sup> et M.-P. Rols<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Département Chimie, Université de Constance, Universitätsstraße 10, D-78457 Konstanz, Allemagne, <sup>2</sup>CNRS UMR 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205, Route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 4

L'électrotransfert est une technique simple et efficace qui connaît un réel succès dans le traitement du cancer. Son utilisation pour le transfert de gène est prometteuse. Cependant les mécanismes gouvernant l'entrée d'ADN dans les cellules sont complexes et son trafic intracellulaire reste énigmatique. L'ADN s'insère dans la membrane plasmique sous forme d'agrégats pendant l'électropulsation. Cette insertion est une condition nécessaire mais non suffisante à l'expression. L'ADN doit migrer dans le cytoplasme et atteindre l'enveloppe nucléaire. Le cytosquelette, souvent décrit comme un obstacle aux mouvements de l'ADN, est la seule machinerie cellulaire capable de transporter des cargos. Notre hypothèse est que, comme pour certains virus et vecteurs, l'ADN électrotransféré utiliserait le cytosquelette pour entrer dans la cellule et atteindre le noyau.

Nous avons mis en évidence la formation de patches d'actine au niveau de la membrane électropéabilisée. Ces patches colocalisent avec les agrégats d'ADN et possèdent des caractéristiques communes à ceux-ci en termes de lieu, de temps, de nombre et de taille. Nous avons également montré que l'altération du réseau d'actine induit une diminution de la quantité d'ADN interagissant avec la membrane et de l'expression génique. Il apparaît ainsi envisageable que l'actine intervienne dans la translocation de l'ADN dans la cellule.

De plus, grâce à la technique de Single Particle Tracking, nous avons suivi les mouvements de l'ADN. L'analyse de ses trajectoires dans le cytoplasme a montré qu'un transport actif s'opère avec des vitesses pouvant atteindre 3000nm/s. Ces résultats suggèrent que les mouvements de l'ADN seraient pris en charge par le cytosquelette qui apparaîtrait comme un acteur clé du processus de l'électrotransfert.

**Affiche 17****R11-15, domaine de la dystrophine humaine et membrane : interactions et organisation modulées par le Lipid Packing**J. Sarkis<sup>1</sup>, E. Robert<sup>2</sup>, E. Le Rumeur<sup>1</sup>, V. Vié<sup>2</sup> et J.-F. Hubert<sup>1</sup><sup>1</sup>Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, <sup>2</sup>Université de Rennes 1, Institut de Physique de Rennes

La dystrophine est une protéine filamentaire normalement présente sous la membrane des cellules musculaires. Elle est indispensable au maintien de l'architecture cellulaire et sa déficience entraîne des pathologies plus ou moins graves, dites dystrophinopathies, dont font partie les myopathies de Duchenne et de Becker. Le domaine central de la dystrophine contient 24 répétitions homologues à la spectrine. Le sous-domaine constitué par les répétitions 11 à 15 (R11-15) est le seul fragment du domaine central qui interagit avec l'actine du cytosquelette, il semble intéressant alors d'aborder plus profondément les propriétés de ce fragment avec les lipides membranaires. L'interaction de DYS R11-15 avec les lipides a été étudiée en utilisant deux modèles membranaires. Dans une première approche, l'interaction de R11-15 avec les liposomes, anioniques et zwitterioniques a été quantifiée en utilisant la résonance plasmonique de surface et la spectroscopie de fluorescence du tryptophane. Pour accéder à la structure 3D et aux propriétés d'hydrophobicité et d'électrostatique de surface, une modélisation par homologie a été réalisée. La conformation adoptée par la protéine en présence des liposomes constitue un point important. Dans ce but, une protéolyse avec la trypsine et une quantification des différents peptides ont été réalisées par spectrométrie de masse ce qui permet de savoir quelles hélices de la protéine se lient aux lipides. Dans une seconde approche, le modèle monocouche de lipides (Langmuir) a été utilisé pour mieux comprendre les propriétés et le mécanisme d'assemblage de la protéine avec les lipides. Le comportement de DYS R11-15 à l'interface air/liquide ou lipide/liquide a été suivi en utilisant l'ellipsométrie, la mesure de pression de surface et la microscopie à force atomique. Ces approches montrent que la protéine a une forte affinité pour les lipides à l'interface et qu'elle forme un réseau de protéines sous la monocouche. Nous concluons que l'interaction et l'organisation de DYS R11-15 avec les lipides membranaires dépendent de la nature et du « packing » lipidique.

**Affiche 18****Distribution de la microfluidité membranaire à l'échelle de la cellule unique**P. Winckler<sup>1</sup>, R. Jaffiol<sup>1</sup>, R. Deturche<sup>1</sup>, H. Morjani<sup>2</sup>, P. Jeannesson<sup>2</sup> et P. Royer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Technologie de Troyes, Institut Charles Delaunay UMR CNRS 6279 - STMR, Laboratoire de Nanotechnologie et d'Instrumentation Optique, LRC CEA, 12 rue Marie Curie, BP2060, 10010 Troyes, <sup>2</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, Faculté de Pharmacie, Matrice Extracellulaire Dynamique Cellulaire UMR CNRS 6237, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France

Nous avons caractérisé la distribution de la microfluidité membranaire de cellules vivantes grâce à des mesures de temps de diffusion par FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy). Les mesures ont été réalisées sur un grand nombre de cellules, donnant ainsi accès à la répartition typique de viscosité dans la membrane plasmique. Nous avons ainsi pu établir la loi de distribution de la fluidité membranaire à l'échelle de la cellule unique pour différentes lignées cellulaires MCF7 et LR73 [1,2]. Les distributions des temps de diffusion ainsi obtenues présentent toutes la même allure asymétrique, allure qui peut être approximée par la distribution de Gumbel. Nous montrons par simulation Monte-Carlo qu'un modèle simple de diffusion à deux dimensions, dans une matrice contenant des microdomaines visqueux, peut rendre compte de l'allure typique des distributions obtenues.

[1] H. Jankevics *et al.*, Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptor in living cells, *Biochemistry* 44, 11676–11683 (2005).

[2] C. Boutin *et al.*, High heterogeneity of plasma membrane microfluidity in multidrug-resistant cancer cells, *Journal of Biomedical Optics* 14(3), 034030 (2009).



**– Signalisation, compartimentation et  
interactions moléculaires –**



**Affiche 19****A biomimetic system for the reconstitution of membrane mitochondrial proteins**

M. Allouche<sup>1</sup>, J. Chopineau<sup>1,3</sup>, S. Bayle<sup>2</sup>, D. Hide<sup>1</sup>, J. L. Robert<sup>3</sup>, O. Sharaf Edein<sup>4</sup> et C. Brenner<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UMR 5253 CNRS ICGM, 34095 Montpellier Cedex 5, <sup>2</sup>EMA Alès, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, <sup>3</sup>Université de Nîmes, rue du Docteur Georges Salan, 30021 Nîmes Cedex 1, <sup>4</sup>INSERM U769 - Signalisation énergétique et physiopathologie cardiaque et musculaire, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry

Apoptosis is considered as most important phenomena which guarantee the organism integrity. It was discovered that mitochondria play a central role in the intrinsic pathway of apoptosis and this is mediated by mitochondrial membrane permeabilization. VDAC provides a major pathway for hydrophilic solutes exchange between cytosol and mitochondria. Recent studies strongly suggest that voltage-dependent anion channel is in release from mitochondria to cytosol of apoptogenic factors, to activate the apoptotic cascade, although the detailed molecular mechanisms are still in debate. Our aim is to explain how induces mitochondrial membrane permeabilization via a specific interaction with the permeability transition pore complex, which comprises the VDAC in the outer membrane and the ANT in the inner membrane. For this, we develop biophysical methods for studying membrane proteins *in vitro*, require a membrane mimicking environment to stabilize the protein. Our strategy combined using the native fold of the membrane protein achieved by its successful functional incorporation into liposomes, and the high stability, small surface, and controlled fluidics obtained by using surface plasmon resonance detection. This experiment enables us to work with very small reaction volumes. VDAC was reconstituted in vesicles; the proteoliposome was reconstituted in a mixed EggPC and cholesterol vesicles. In first approach, mixed vesicles or detergent micelles containing VDAC were linked onto NiNTA sensor chip. On the VDAC platform we study the binding of different proteins. This work allows us, first, to establish a dialogue between two mitochondrial membrane proteins ANT/VDAC. Secondly to investigate the influence of Bcl-2 family proteins which have pro/ anti-apoptotic role and have been shown to interact with VDAC.

**Affiche 20****Effect of Protoporphyrin IX-mediated photosensitization on the cellular adhesion visualized by RICM**

P. Araujo Santos<sup>1,2</sup>, C. Marques<sup>1</sup>, A. Schroder<sup>1</sup>, A. Uchôa Fernandes<sup>2</sup> et M. Silva Baptista<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Charles Sadron - CNRS, 23 rue du Loess, BP 84047, 67034 Strasbourg cedex 2, <sup>2</sup>Instituto de Quimica - Universidade de São Paulo, Brasil

Protoporphyrin IX photosensitization has been studied for its effects on cellular adhesion of a human cancer cell line (HeLa). Cell adhesion plays a vital role in regulating key physiological processes including cell survival, proliferation and migration. Photodynamic Therapy (PDT) is based on the light absorption by a photosensitizer that transfers part of the excitation energy to oxygen producing singlet oxygen, a very toxic form. Among various targets, PDT has induced lipids and proteins oxidation producing cell membrane and extracellular matrix damage. As a first step, we analyzed the cell adhesion on glass at intervals during 24h after cell plating and the characteristic time profile of lamellipodia extension and retraction by Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM). This interferometric technique allows quantitative analysis of the contact zone between the cell and the substrate. The contact zone size distribution is polydisperse, with a well defined average size that evolves with time. The lamellipodia contact area first growth in time with a power-law behavior, while the time profile of the lamellipodia retraction follows an exponential decay behavior.

**Affiche 21****An unfolding model for the GDP/GTP conformational switch of the small GTPase Arf6**

J. Cherfils<sup>1</sup>, V. Biou<sup>1</sup>, K. Aizel<sup>1</sup>, M. Zeghouf<sup>1</sup>, V. Buosi<sup>2</sup>, A. Thureau<sup>2</sup>, E. Jacquet<sup>2</sup>, E. Guittet<sup>2</sup>, C. van Heijenoort<sup>2</sup>, P. Roblin<sup>3</sup> et J. Perez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, Gif-sur-Yvette, <sup>2</sup>Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette, <sup>3</sup>Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette

How do highly homologous protein isoforms achieve exquisitely specific functions in cells? The small GTPases Arf1 and Arf6 are highly similar: they have over 60% sequence identity, and structural studies have shown that the surfaces they use to interact with regulators and effectors are essentially identical in sequence and structure. Yet, they have non-overlapping functions in cells. Arf1 is a major regulator of most aspects of vesicular traffic, while Arf6 acts at the plasma membrane at the crossroads of trafficking and cytoskeletal functions. Consistent with their cellular specificities, Arf1 and Arf6 also have distinctive biochemical properties *in vitro*, for which no straightforward structural explanation has been put forward. Activation of Arf proteins is a multi-step event, which involves the recruitment of Arf-GDP from the cytosol to membranes, followed by GDP/GTP exchange. We show that a truncated Arf6 mutant which mimics membrane-bound Arf6-GDP is partially unfolded in the crystal compared to cytosolic, full-length Arf6. This unusual conformation is the major Arf6-GDP species in solution, as shown by synchrotron SAXS analysis. In contrast, the equivalent Arf1 mutant is essentially identical to full-length, cytosolic Arf1-GDP, as shown by NMR analysis. However, truncated Arf1-GDP differs from full-length Arf1-GDP by a spectacular increase in the dynamics of H/D exchange in the region where truncated Arf6-GDP is partially unfolded. These experiments suggest that the structural routes for the activation of Arf1 and Arf6 diverge at the step where GDP-bound Arf is recruited to membranes prior to nucleotide exchange. These differences in structural dynamics may account for the biochemical differences between Arf1 and Arf6, and yield their functional specificities.

**Affiche 22****Denaturing an intrinsically disordered protein**

G. W. Daughdrill<sup>1</sup>, A. Stancik<sup>2</sup>, G. Helms<sup>3</sup> et V. Receveur-Bréchet<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Microbiology, and Molecular Biology and the Center for Biomolecular Identification and Targeted Therapeutics, University of South Florida, 3720 Spectrum Blvd., Tampa, FL 33, <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, University of Idaho, Life Science Building, 252, Moscow Idaho, 83844-3051, USA, <sup>3</sup>Department of Chemistry, Washington State University, Fulmer Hall, B3, Pullman Washington, 99164-4630, USA, <sup>4</sup>IMR – CNRS, UPR3243, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

The transactivation domain of p53 is known to be an intrinsically disordered protein. Using small angle x-ray scattering, we have investigated the dimensions and the distribution of conformations of p53TAD. Analysis of the results using the polymer theory, and of the distribution of conformation inferred from the data, seems to indicate that the protein is fully disordered and behaves as a random coil. However in presence of 8M of the denaturing osmolyte urea, the dimensions of p53TAD increase, and become larger than those of a random coil. This shows that the native state of p53TAD is partially stabilized by noncovalent interactions that are disrupted during denaturation. We performed a molecular dynamics analysis on p53TAD wt and mutants devoid of part or all of the prolines, that strongly suggests that the high content of prolines in p53TAD may cause molecular restraints along the polypeptide chain.

Altogether, these results suggest that using random polymer models to describe the native state ensembles of intrinsically disordered proteins may overlook important structural features, and question about the use of the term *random coil* to describe intrinsically disordered proteins.

**Affiche 23****Contrôle du diamètre de nanotubes peptidiques par échange de contre-ions**

F. Gobeaux<sup>1</sup>, N. Fay<sup>1</sup>, C. Tarabout<sup>2</sup>, M. Ligeti<sup>3</sup>, D. Buisson<sup>3</sup>, J.-C. Cintrat<sup>3</sup>, K. M. H. Nguyen<sup>1</sup>, C. Valéry<sup>4</sup>, F. Artzner<sup>2</sup> et M. Paternostre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>URA 2096, iBiTech-S, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, <sup>2</sup>Groupe Matière Condensée et Matériaux, UMR 6626 CNRS et Université Rennes 1, 35042 Rennes cedex, <sup>3</sup>CEA iBiTec-S / SCBM, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, <sup>4</sup>Ipsen Pharma S.A., Ctra. Laureà Miró 395, 08980 Sant Feliu de Llobregat, Barcelona, Espagne

Le Lanreotide est un octapeptide de synthèse qui présente la remarquable propriété de s'assembler sous forme de nanotubes de 24 nm de diamètre et atteignant plusieurs millimètres de long à partir d'une concentration massique de 2.5%. Sa simplicité de manipulation en fait un système modèle utile pour étudier certains phénomènes d'auto-assemblage au niveau moléculaire. Précédemment, un équilibre subtil entre des effets hydrophobes attractifs et des forces répulsives provenant des charges positives portées par le peptide a été mis en évidence. En effet, le peptide doit sa grande solubilité dans l'eau à deux charges positives placées sur l'amine terminale et sur la chaîne latérale de la lysine. Ici, nous présentons des travaux étudiant le rôle respectif de ces deux charges dans la structure des nanotubes ainsi que l'influence de la taille et du type de contre-ions sur les caractéristiques des nanotubes. La suppression de l'une ou de l'autre des charges montre que les deux charges ne sont pas équivalentes puisque l'acétylation de l'amine terminale mène à la formation de filaments structurés en feuillets  $\beta$  parallèles tandis que l'acétylation de la charge portée par la lysine n'empêche pas la formation de nanotubes structurés en feuillets beta parallèles. En utilisant une approche combinant la microscopie électronique à transmission, la diffusion des rayons X et des méthodes spectroscopiques, nous avons démontré que les contre-ions sont une partie intégrante de la structure des nanotubes et peuvent en tant que tels moduler leur diamètre dans la gamme de 19-26 nm sans pour autant modifier la structure en feuillets beta. Enfin, nous montrons qu'il est possible de dédoubler la paroi des tubes en utilisant des contre-ions divalents.

**Affiche 24****Direct kinetic evidence for the essential role of Lys 215 in the phospho-transfer catalyzed by human 3-phosphoglycerate kinase**

C. Lionne<sup>1</sup>, P. Lallemand<sup>1</sup>, A. Varga<sup>2</sup>, M. Vas<sup>2</sup>, T. Barman<sup>1</sup> et L. Chaloin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, UMR 5236, CNRS-UMI-UMII, Institut de Biologie, 4 bd Henri IV, CS69033, 34965 Montpellier cedex 2, <sup>2</sup>Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Karolina Ut 29, H-1113, Budapest, Hungary

Human 3-phosphoglycerate kinase (PGK) is a promising candidate for the activation of nucleotide analogues used in anti-viral and anticancer therapies<sup>1</sup>. It is a key enzyme in glycolysis catalyzing the reversible reaction  $1,3\text{-bisphosphoglycerate} + \text{ADP} \leftrightarrow 3\text{-phosphoglycerate} + \text{ATP}$ . We have explored the catalytic role of the highly conserved Lys 215 that has been proposed to be essential for PGK function<sup>2</sup>, by a transient and equilibrium kinetic study with the active site mutant K215A<sup>3</sup>. By fluorescence stopped-flow, we show that the kinetics of substrate binding and the associated protein isomerisation steps are fast and identical for the wild-type PGK and mutant K215A. By the use of a chemical sampling method (rapid-quench-flow) under multiple and single turnover conditions and in both directions of the reaction, we show that the rate-limiting step with wild type PGK follows product formation (presumably products release), whereas with the mutant it is the phospho-transfer step itself. Mutant K215A has a low inherent phospho-transferase activity and to explain this, we carried out a molecular modelling study. This suggests that with the mutant, the conserved Arg 65 replaces the missing Lys 215 by helping to position the transferable phospho-group during the reaction. Molecular dynamics simulations suggest that in the mutant, the closed conformation of the enzyme is stabilized by a salt bridge between Asp 218 and Arg 170 rather than Arg 65 in wild-type PGK.

## References

1. Gallois-Montbrun *et al.* (2004) *Biochem. Pharmacol.* 68, 1749-1756.
2. Flachner *et al.* (2005) *Biochemistry* 44, 16853-16865.
3. Varga *et al.* (2009) *Biochemistry* 48, 6998-7008.

**Affiche 25****Kes1p is structurally designed to transport sterol from a curved to a PI(4)P-containing membrane**M. Magdeleine, D. Douguet, B. Antonny et G. Drin

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - CNRS UMR6097 - Université de Nice-Sophia Antipolis, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne Sophia Antipolis

Vesicular and non-vesicular pathways exist to maintain a proper sterol distribution in cell. In yeast, Kes1p/Osh4p and several members of the OSH family are expected to guaranty a non-vesicular transport of sterol between membranes. Kes1p is the only OSH/ORP protein whose structure is known. This  $\beta$ -barrel can trap one sterol inside a pocket and has a N-terminal helix with a dual-role: acting as a lid to secure sterol inside Kes1p or targeting lipid membrane of positive curvature. Kes1p probably ensures specifically one route of transport but its nature remains elusive. Various clues indicate that Kes1p targets the trans-Golgi in a PI(4)P-dependant manner. In Sec14p-deficient yeasts, Kes1p is known to block vesicular transport by monopolizing PI(4)P lipids at the expense of proteins involved in vesicle formation. Our work aimed at understanding the real function of Kes1p and the reason of its localization on the trans-Golgi.

We created new in vitro protocols to determine how membrane curvature and lipid composition influence the ability of Kes1p to extract, transport and release sterol. We found that Kes1p extract optimally sterol from a curved neutral membrane. Moreover, we found that once loaded, Kes1p delivers with high efficiency sterol only to PI(4)P-containing membrane. Last, it seems that PI(4)P guaranty an efficient delivery by preventing with high specificity Kes1p from re-extracting sterol once delivered.

Our data indicate a link between the recognition of PI(4)P by Kes1p and its ability to transport sterol. We conclude that Kes1p is structurally designed to guaranty a one-way transport of neo-synthesized sterol from ER (composed of neutral lipid and highly tubulated) to the trans-Golgi, pinpointed by PI(4)P, to enrich this compartment with sterol.

**Affiche 26****Translocation of p47phox from a soluble to a membrane-bound state: molecular mechanism of NADPH oxidase activation upon phosphorylation**J. Marcoux<sup>1</sup>, P. Man<sup>2</sup>, I. Petit-Haertlein<sup>1</sup>, C. Vivès<sup>1</sup>, E. Forest<sup>1</sup> et F. Fieschi<sup>1</sup><sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale, UMR 5075CEA/CNRS/UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, <sup>2</sup>Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, Videnska 1083, CZ-14220 Prague 4, Czech Republic

The neutrophilic NADPH oxidase is an enzymatic complex involved in innate immunity. Phosphorylation of p47phox promotes its translocation followed by membrane interaction and assembly with membranous flavocytochrome b558. It ends with formation of a functional NADPH oxidase complex at the phagosomal membrane, producing reactive oxygen species with microbicidal activity against pathogens. p47phox has always been resistant to crystallography trials, due to its modular organization leading to relative flexibility. To characterize p47phox conformational changes during activation, we used wild type and S303/304/328E triple mutant mimicking the phosphorylated state. Hydrogen/Deuterium exchange coupled to mass spectrometry was used to obtain structural information on the conformational mechanism that underlies p47phox activation. We confirmed a relative opening of the protein with exposure of a tandem of SH3 modules that are known to bind membranous flavocytochrome b558 and of a PX domain involved in membrane lipids binding. A new surface was shown to be unmasked after activation, representing a potential auto-inhibitory surface that may block the interaction of the PX domain with the membrane in the resting state. Within this surface, we identified two residues involved in the interaction with the PX domain. The double mutant R162A/D166A showed a higher affinity for specific phospholipids but none for the flavocytochrome b558, reflecting an intermediate conformation between the auto-inhibited and activated forms in this mutant.

**Affiche 27****Dynamic organization of HIV co-receptors in the membrane of immune cells: a single molecule analysis**

P. Mascalchi<sup>1</sup>, F. Dumas<sup>1</sup>, B. Lagane<sup>2</sup>, F. Bachelier<sup>2</sup>, A. Lopez<sup>1</sup> et L. Salomé<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CNRS - IPBS (Institute of Pharmacology and Structural Biology), 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse & Université de Toulouse, UPS - IPBS, 31077 Toulouse, <sup>2</sup>Unité de Pathogénie Virale Moléculaire, INSERM U819, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris

HIV infection of immune cells requires the sequential binding of gp120 viral envelop proteins to first CD4, and then CCR5 (or CXCR4) membrane receptors. As several trimeric units of gp120 are required in this viral process, its efficiency probably depends on the dynamic distribution of CD4 and CCR5 receptors.

We previously showed by fluorescence based approaches that compartmentalization of these receptors in their basal state exists at the surface of a model cell line<sup>1,2</sup>. To validate these results and to evaluate the molecular mechanisms that control this lateral distribution, we pursue our study on natural targets of HIV: immune cells which express both CD4 and CCR5 native receptors. We developed a single particle tracking method to investigate the behaviour of individual receptors. It is based on the labelling of HIV receptors by Quantum Dots bearing specific antibodies. Our first results obtained for CD4 reveal three diffusion modes: random, confined or transiently confined diffusion. Addition of the envelop protein or other molecules disrupting the distribution of each receptor will allow us to determine which processes are involved in their dynamic membrane organization. These data will help to design new therapeutic strategies which aim at inhibiting the binding of viral particles to target cells.

<sup>1</sup> Gaibelet *et al.*, 2006. *J Biol Chem* 281:37921-29. <sup>2</sup> Baker *et al.*, 2007. *J Biol Chem* 282 :35163-68.

**Affiche 28****Stability study of the human G-Protein Coupled Receptor, smoothened**

R. Nehmé<sup>1</sup>, O. Joubert<sup>1</sup>, B. Lacombe<sup>1</sup>, M. Bidet<sup>1</sup>, B. Pucci<sup>2</sup> et I. Mus-Veteau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Nice - Sophia Antipolis, CNRS UMR 6543, Institute of Developmental Biology and Cancer Research, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, <sup>2</sup>Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, Laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels, 84000 Avignon

Smoothened is a member of the G-protein coupled receptor (GPCR) family responsible for the transduction of the Hedgehog signal to the intracellular effectors of the Hedgehog signaling pathway. Aberrant regulation of this receptor is implicated in many cancers but also in neurodegenerative disorders. Despite the pharmacological relevance of this receptor, very little is known about its functional mechanism and its physiological ligand. In order to characterize this receptor for basic and pharmacological interest, we developed the expression of human Smoothened in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Smoothened was then purified. Using Surface Plasmon Resonance technology, we showed that human Smoothened was in a native conformational state and able to interact with its antagonist, the cyclopamine, both at the yeast plasma membrane and after purification. Thermostability assays on purified human Smoothened showed that this GPCR is relatively stable in the classical detergent dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM). The fluorinated surfactant C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>TAC, which has been proposed to be less aggressive towards membrane proteins than classical detergents, increased Smoothened thermostability in solution. Moreover, the replacement of a glycine by an arginine in the third intracellular loop of Smoothened coupled to the use of the fluorinated surfactant C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>TAC during the mutant purification increased Smoothened thermostability even more. These data will be very useful for future crystallization assays and structural characterization of the human receptor Smoothened.

**Affiche 29****Elucidation of the self-assembly pathway of Lanreotide octapeptide into beta-sheet nanotubes: role of two stable intermediates**M. Paternostre<sup>1</sup>, F. Artzner<sup>2</sup>, E. Pouget<sup>2</sup>, N. Fay<sup>1</sup>, C. Valéry<sup>5</sup>, T. Rose<sup>4</sup>, D. Tomas<sup>6</sup> et E. Dujardin<sup>3</sup><sup>1</sup>CEA, iBiTec-S- SB2SM, 91191 Gif-sur-Yvette, <sup>2</sup>Institut de Physique de Rennes, UMR 625, 35042 Rennes,<sup>3</sup>NanoSciences Group, CEMES UPR 8011, 31055 Toulouse cedex 4, <sup>4</sup>Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France.,<sup>5</sup>Ipsen Pharma S.A., Barcelona, Espagne, <sup>6</sup>UMR 6026 CNRS et Université Rennes 1, 35042 Rennes cedex

Nanofabrication by molecular self-assembly involves the design of molecules and self-assembly strategies so that shape and chemical complementarities drive the units to organize spontaneously into the desired structures. The power of self-assembly makes it the ubiquitous strategy of organized living matter and provides a powerful tool to chemists. However, a challenging issue in complex supramolecular structure self-assembly is to understand how kinetically efficient pathways emerge from the multitude of possible transition states and routes. Unfortunately, very few systems provide an intelligible structure and formation mechanism on which new models can be developed. Here, we elucidate the molecular and supramolecular self-assembly mechanism of synthetic octapeptide into nanotubes in equilibrium conditions. Their complex hierarchical self-assembly has recently been described at the mesoscopic level<sup>1,2</sup> and we show now that this system uniquely exhibits three assembly stages and three intermediates: i) a peptide dimer evidenced by both analytical centrifugation and NMR translational diffusion experiments and ii) an open ribbon and iii) an unstable helical ribbons, both visualized by transmission electron microscopy and characterized by Small Angle X-ray Scattering. Interestingly, the structural features of the three stable intermediates are related to the final nanotube organization as they respectively set the nanotube wall thickness and the final wall curvature radius. We propose that a specific self-assembly pathway is selected by the existence of such pre-organized and stable intermediates so that a unique final molecular organization is kinetically favored. Our findings suggests that the rational design of oligopeptides can encode both molecular- and macro-scale morphological characteristics of their higher-order assemblies thus opening the way to ultra-high resolution peptide scaffold engineering.

**Affiche 30****Translocation d'ADN simples brins et dépliement de protéines à travers un nanopore**L. Payet<sup>1</sup>, M. Martinho<sup>1</sup>, M. Pastoriza-Gallego<sup>1</sup>, J.-M. Betton<sup>4</sup>, V. Viasnoff<sup>1</sup>, L. Auvray<sup>2</sup>, J. Pelta<sup>3</sup> et J. Mathé<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratoire d'Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, Équipe Matériaux Polymères aux Interfaces, CNRS-UMR 8587, Université d'Évry-Val-d'Essonne, 91025 Évry, <sup>2</sup>Laboratoire de Nanobiophysique, CNRS-UMR Gulliver, ESPCI Paris Tech, Paris, <sup>3</sup>Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, CNRS-UMR 7057, Université Denis-Diderot, Paris, <sup>4</sup>Unité de Biochimie Structurale, CNRS-URA 2185, Institut Pasteur, Paris

Le transport de macromolécules à travers des canaux insérés dans des membranes est essentiel pour de nombreuses fonctions biologiques.

Les protéines transportées à travers un canal sont en général dépliées; elles doivent se replier séquentiellement en sortie de pore pour acquérir leurs propriétés fonctionnelles. De nombreuses pathologies sont associées à un mauvais repliement ou à un mauvais transport des protéines, et il est important d'étudier ces deux processus et leur relation.

Pour étudier ces processus, nous utilisons une technique de détection de molécule unique qui consiste à mesurer le courant ionique qui s'établit sous l'action d'une tension électrique, aux travers d'un pore protéique inséré dans une bicouche lipidique. L'interaction ou le passage de macromolécules avec ou au travers du nanopore induit des blocages de courant dont la fréquence et la durée sont les paramètres qui permettent de caractériser ces phénomènes.

Je présenterai le transport de macromolécules pour deux nanopores protéiques différents, l'alpha-hémolysine et l'aérollysine, en fonction de la température et de la tension appliquée. Nous comparons la dynamique à travers ces deux toxines de géométries et de charges nettes différentes. Les macromolécules sont des simples brins d'ADN (molécules modèles pour la technique) et une protéine mutante, déficiente pour le transport du maltose dans la bactérie, MalE219. Nous avons observé que l'alpha-hémolysine différencie les brins d'ADN selon leur direction de passage 3'-5' ou inverse. Pour la protéine, nous avons noté l'augmentation de la fréquence de blocage de courant et la diminution de leur durée avec l'augmentation de la température. Ces variations traduisent le dépliement de la protéine. La technique de nanopore permet ainsi de détecter des macromolécules et de suivre le dépliement de protéines en molécule unique.

**Affiche 31****Padron: a fluorescent protein with a positive photo-switching mechanism**A. Regis Faro<sup>1</sup>, P. Carpentier<sup>1</sup>, D. Bourgeois<sup>1</sup> et P. Dedeker<sup>2</sup><sup>1</sup>Institut de biologie Structurale - Jean-Pierre Ebel, 38027 Grenoble, <sup>2</sup>Leuven University, Belgique

Proteins of the GFP family have revolutionized the biological field because they allow to mark biological systems in a non-invasive way. Padron fluorescent protein belongs to GFP family and it has the propriety to be reversibly switchable between fluorescent *on* state and non-fluorescent *off* state upon irradiation. Padron exhibits a positive photo-switching behaviour because excitation of the protein at the peak absorption of the on-state (~532 nm) enhances fluorescence (populates even more the *on* state), whereas upon excitation at 405 nm (peak absorption of the *off* state), the protein switches off even more. This is in contrary to the famous RSFP Dronpa that displays negative photo-switching. In this work we described for the first time photo-isomerization of a fluorescent protein at low temperature. Based on our results we suggest that isomerization of the chromophore is the photo-switching trigger event, occurring in the excited state of the chromophore and implying crossing of a low energy barrier (possible at 100 K), followed by structural relaxation accompanied by a protonation equilibration in the ground state, which probably involve solvent exchange and a high energy barrier (crossable at RT). By designing an experimental setup at low temperature (100 K), we could trap a new fluorescent state of the photoswitchable fluorescent protein Padron. We propose that this state is an intermediate state along the *off* to *on* photoswitching pathway of Padron.

**Affiche 32****The membrane dynamics of the EGF receptor and its signal integration using holographic optical tweezers**V. Rouger<sup>1</sup>, S. Mailfert<sup>1</sup>, F. Belloni<sup>2</sup>, S. Monneret<sup>2</sup> et D. Marguet<sup>1</sup><sup>1</sup>Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Université de la Méditerranée; INSERM UMR 631; CNRS UMR 6102; Marseille, France, <sup>2</sup>Institut Fresnel, CNRS UMR 6133, Marseille, France

The EGF receptor is one of the most studied prototypical receptor tyrosine kinase that generates important signals in cell proliferation, migration, differentiation or apoptosis. From the other hand, the EGFR signaling pathway is persistently activated in the majority of human epithelial cancers, what places it in the center of interest in cancer research and development of anticancer drugs. The main objective of this study consists in the correlation of the EGFR stimulation level and the biological response of the cells. In our laboratory, we are using an original approach that combines a classical multi-color epi-fluorescence microscopy with a holographic optical tweezers (HOT) manipulation. HOT allows us the handling of different microscopic objects such as entire cells or beads covered with specific ligands in 3D. We can stimulate the receptors on the cell surface and observe specific cell response upon the stimulation in a perfect spatio-temporal resolution. In our experimental approach we activate the COS-7 cells naturally expressing EGFR with beads covered with EGF and we follow the calcium response of these cells as a result of EGFR signaling cascade. Alternatively, we can verify the sequential stimulation by increasing the quantity of ligand-coated beads at the cell surface in the function of time. Interestingly, we've seen also a calcium response in cells remaining in a physical contact with the EGF-stimulated cell. Indeed, our results show that this type of cellular communication exists. These studies will help us in a better comprehension of the EGFR induced cell signaling. Moreover we would like to figure out the stimulation level necessary to trigger on biological response of the cell.

**Affiche 33****Mammalian olfactory receptors : GPCRs exhibiting a functionality outside lipid rafts**

G. Sanz<sup>1</sup>, M.-A. Persuy<sup>1</sup>, J. Vidic<sup>4</sup>, F. Wade<sup>1</sup>, C. Péchoux<sup>2</sup>, S. Chat<sup>2</sup>, S. Lobasso<sup>3</sup>, R. Angelini<sup>3</sup>, R. Monnerie<sup>1</sup>, A. Corcelli<sup>3</sup> et E. Pajot-Augy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR1197 Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France ; IFR 144 Neuro-Sud Paris France, <sup>2</sup>INRA, UR1196 Génomique et Physiologie de la Lactation, Plateau de Microscopie électronique – Plateforme MIMA2, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France, <sup>3</sup>Dipartimento di Biochimica Medica, Biologia Medica e Fisica Medica, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Piazza G. Cesare, I-70125 Bari, Italy, <sup>4</sup>INRA, UR892 Virologie et Immunologie Moléculaire, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

*S. cerevisiae* yeasts efficiently express heterologous mammalian olfactory receptors (ORs). In this work, this expression system was further characterized in terms of ORs functionality depending on subcellular localisation, and lipid environment, in particular relative to lipid raft microdomains.

OR localisation in membranes was investigated by density gradients and immunoblotting using antibodies targeting proteins specific of subcellular compartments and of lipid raft microdomains. The functional response of ORs was monitored by Surface Plasmon Resonance for the various membrane subfractions. Moreover, the lipidic composition of the subfractions was determined by TLC analyses, and ORs were observed by transmission electron microscopy after immunogold labelling.

Expression induction duration improves ORs trafficking to the plasma membrane, but ORs respond to odorants starting from the endoplasmic reticulum, although at a lower level than at the plasma membrane. ORs localize outside lipid rafts microdomains, although considered as putative signaling platforms, while exhibiting an efficient functional response. The same observation was reached for ORs expressed in a mammalian heterologous expression system. These results are discussed relative to various assumptions formulated for other G-protein coupled receptors (GPCRs). The relative ergosterol content increased from inner to plasma membranes, which could increase membrane rigidity and account for the larger size of the plasma membrane vesicles carrying receptors. Considering the amount of functional ORs together with the rigidity of the membranes in the various subfractions could help improve biosensors prepared from yeast membranes carrying ORs.

**Affiche 34****Étude du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine, une protéine pro-apoptotique**

V. Senille, O. Delalande, S. Villette, D. Gosset, M. Dubois, A. Legrand, D. Lelievre, A. Delmas et C. Landon  
Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS - UPR 4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2

Nous souhaitons déterminer la voie de déclenchement de l'apoptose induite par l'expression de la mitogaligine, une protéine humaine de 97 résidus qui ne présente aucune homologie de séquence avec des protéines connues. Des études précédentes ont montré que la mitogaligine interagit avec la membrane des mitochondries, déclenchant une fuite de cytochrome c vers le cytoplasme (Duneau et Al, *Experimental Cell research* **2005**, 194-205). Le fragment d'adressage mitochondrial a été localisé en position interne [31-53] et possède à lui seul une activité cytotoxique. Pour fonctionner efficacement, ce peptide a besoin de la présence de cardiolipine, un phospholipide spécifique des mitochondries (Gonzalez et Al, *Biochemistry* **2007**, 7374-82). L'étude structurale et fonctionnelle de ce fragment d'adressage va nous aider à élucider son mode d'action.

Plusieurs techniques d'analyse structurale sont utilisées pour étudier l'interaction du fragment avec la membrane mitochondriale. Le fragment [31-53] a été produit par synthèse chimique. Des analyses de dichroïsme circulaire et RMN, en présence de différents milieux membranaires, nous montrent l'influence du type de milieu sur la structuration du peptide. La structure 3D en présence de micelles de SDS est résolue par RMN. La fluorescence des Trp et l'utilisation de sondes paramagnétiques, nous renseignent sur l'enfouissement du peptide dans les micelles. Toutes ces données seront utilisées dans des simulations de dynamique moléculaire en présence de membranes, afin d'établir un modèle expliquant l'interaction du fragment d'adressage mitochondrial avec sa cible.

Une étude fonctionnelle est menée en parallèle, pour cerner l'effet toxique du fragment [31-53] sur des cellules humaines. La microinjection du peptide dans des cellules HELA montre un effet cytotoxique immédiat. La concentration minimale nécessaire au déclenchement de la mort cellulaire est déterminée en utilisant une gamme de concentrations. Le marquage fluorescent des mitochondries et du fragment [31-53] va nous permettre de suivre notre peptide au sein de la cellule.

**Affiche 35****Structure du co-facteur M2-1 de la polymérase du virus RSV et interactions au sein du complexe polymérase**

C. Sizon<sup>1</sup>, V. Dubosclard<sup>2</sup>, M.-L. Blondot<sup>2</sup>, F. Bontems<sup>1</sup> et J.-F. Eleouet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, 91190 Gif-sur-Yvette, <sup>2</sup>Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA UR0892, 78350 Jouy-en-Josas

Le virus respiratoire syncytial (RSV) est le principal agent responsable de maladies respiratoires graves chez l'homme et les bovins. Chez l'homme, il n'existe pas de vaccin et les antiviraux disponibles sont peu efficaces. Le complexe ARN polymérase du RSV représente une cible de choix pour de nouveaux antiviraux, car il est très spécifique du virus et n'a pas d'équivalent dans la cellule hôte. Ce complexe réplique à la fois l'ARN génomique viral et transcrit les gènes viraux. Les données structurales et fonctionnelles concernant les ARN polymérase des virus à ARN négatif simple brin sont de façon générale très restreintes, et en particulier pour le RSV.

La protéine M2-1 (22K) est un co-facteur essentiel de la polymérase du RSV, spécifique à la sous-famille des pneumovirus. Elle assure sa processivité et agit comme facteur d'antiterminaison. Elle est composée de plusieurs domaines, dont un domaine d'oligomérisation et un domaine globulaire. Nous avons résolu la structure du domaine globulaire par RMN. Son repliement en hélices est similaire à celui d'une phosphoprotéine d'une autre sous-famille de virus à ARN négatif. L'analyse par RMN des interactions avec différentes séquences d'ARN permet de dégager une surface d'interaction avec des acides nucléiques, néanmoins sans spécificité de séquence. Comme l'oligomérisation de M2-1 est essentielle pour l'activité de la protéine, on peut spéculer que la reconnaissance spécifique de l'ARN repose sur la proximité spatiale de plusieurs domaines globulaires. Il a été vu que la phosphoprotéine P du complexe polymérase et l'ARN se fixaient de manière compétitive à M2-1. Nous avons également observé par RMN que P interagissait avec le domaine globulaire de M2-1 et se liait à proximité de la surface d'interaction avec l'ARN.

**Affiche 36****Mécanisme d'activation des récepteurs P2X2 : Identification d'un mouvement couplé à la fixation d'ATP par modélisation moléculaire**

A. Taly, D. Lemoine, R. Jiang, A. Martz, S. Gonin et T. Grutter

Laboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux, UMR 7199 CNRS, Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch

La structure récemment résolue par cristallographie du récepteur-canal de type P2X4, activé par l'ATP, offre une vue statique de son architecture, mais les mécanismes moléculaire de son activation restent mystérieux. Un modèle du récepteur P2X2, basé sur la structure cristallographique a été utilisé pour étudier la dynamique de ce récepteur par analyse de modes normaux. Les dix premiers modes ont été étudiés à la recherche d'un changement de conformation global qui permettrait l'ouverture du canal ionique mais aucun n'a pu être identifié. Nous avons donc testé l'effet sur les modes normaux de l'ATP, préalablement positionné par docking. La présence de l'ATP nous a permis d'identifier un mode qui amène principalement une fermeture du site de fixation de l'ATP. Pour tester l'hypothèse que ce mode, même si il ne conduit pas à l'ouverture du canal ionique, est impliqué dans le mécanisme d'activation nous avons calculé son couplage à la fixation d'agoniste ou d'antagoniste dans le site de fixation de l'ATP. Des expériences de docking suggèrent que ce mouvement est favorisé par l'ATP mais empêché par l'antagoniste TNP-ATP en accord avec son implication dans le mécanisme d'activation promu par l'ATP.

**Affiche 37****Spot variation FCS reveals differential membrane association kinetics for Ras isoforms**

T. Trombik<sup>1</sup>, V. Ruprecht<sup>2</sup>, S. Mailfert<sup>1</sup>, F. Conchonaud<sup>1</sup>, C. Billaudeau<sup>1</sup>, O. Wurtz<sup>1, 4</sup>, A. Boned<sup>1</sup>, G. Schutz<sup>2</sup>, Y. Henis<sup>3</sup>, S. Wieser<sup>1, 2</sup> et D. Marguet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie de Marseille Luminy; Université de la Méditerranée; INSERM, UMR 631; CNRS, UMR 6102; Marseille, France, <sup>2</sup>Biophysics Institute, Johannes-Kepler University, Linz, Austria, <sup>3</sup>Department of Neurobiology, George S Wise faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Israel, <sup>4</sup>Present address: Université de Rouen, INSERM U413, Mont Saint Aignan, France

The Ras protein family is implicated in the regulation of different cellular processes such as cell growth, differentiation or apoptosis. Ras proteins play a key role in the control of the relay of signals from cell surface receptors and thus activate different signaling pathways. It is known that H-Ras proteins interact with the plasma membrane via reversible palmitoylation of the C terminus. For K-Ras it is believed that C-terminal polybasic region is implicated in the dynamic association with the plasma membrane. However, the nature of this process remains still unclear. Here, we present a novel application of spot variation FCS (svFCS) for the characterization of binding kinetics of transiently membrane associated molecules such as K-Ras. Starting from simulations, we next measured using svFCS the membrane association of different K-Ras mutants in living COS-7 cells. We observed that association/dissociation time of K-Ras with the plasma membrane achieves several tens of milliseconds. Moreover, the substitution of lysine to alanine in the polybasic region of the K-Ras C-terminus leads to the liberation of this protein from the plasma membrane. From the other hand, using a phosphatidylserine-deficient CHO mutant we showed that the association of K-Ras with the plasma membrane is also impaired. Our observations demonstrated that K-Ras differently from H-Ras associate to the plasma membrane and a positively charged, polybasic region plays a key role in this process providing a differential dynamic cellular redistribution of K-Ras.

**Affiche 38****Bioluminescence Resonance Energy Transfer studies demonstrate Constitutive and Specific Homo-oligomerization of a Mammalian Olfactory Receptor**

F. Wade<sup>1</sup>, A. Espagne<sup>2</sup>, M.-A. Persuy<sup>1</sup>, R. Monnerie<sup>1</sup>, F. Merola<sup>2</sup>, E. Pajot-Augy<sup>1</sup> et G. Sanz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UR1197 Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas; IFR 144 Neuro-Sud, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, <sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000, Université Paris-Sud 11 & CNRS, 91405 Orsay

The living organisms have evolved the sense of smell to recognize and distinguish odors. The first step of odorant molecule detection involves an interaction between odorants, possibly carried through the olfactory mucus by Odorant-Binding Proteins (OBPs), and the olfactory receptors (ORs) present on the ciliae of olfactory sensory neurons emerging from the olfactory epithelium. However, the relationship between receptor activation and its association/conformational states remains largely unknown. The mammalian ORs belong to the G-protein coupled receptors (GPCRs) super-family. GPCR oligomerization is thought to play an important role in the maturation pathway, the trafficking to the cell surface and the functional response of the receptors. Using biochemical tools and a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) approach, we addressed the question whether mammalian ORs exist as homo-oligomers and whether this phenomenon is involved in receptor signaling upon odorant ligand activation. Our results clearly demonstrate that the OR1740, a human OR, can self-associate into dimers *in vitro*, that dimers are formed early in the biosynthetic pathway, and are constitutively expressed at the plasma membrane. Moreover, an odorant agonist binding induced a modulation in BRET levels, suggesting a conformational rearrangement of the receptor related to its activation/signaling state. The bell-shaped curve observed for this variation as a function of odorant concentration corroborates our previous results, according to which ligand-mediated conformational change can promote an inactive state of the OR dimers at high ligand concentration. This demonstration of OR homo-dimerization supports and validates one of the hypotheses at the basis of our model for tripartite OBP-odorant-OR partnership.

**– Lipidomique et métabolomique –**



**Affiche 39****Development of antileishmanial lipidic nanocomplexes****H. Pham**<sup>1, 2</sup>, G. Barratt<sup>1, 2</sup>, P. M. Loiseau<sup>3, 2</sup> et M. Saint-Pierre Chazalet<sup>3, 4</sup><sup>1</sup>Université Paris-Sud, Physico-chimie, Pharmacotechnie, Biopharmacie, UMR 8612 CNRS, 92296 Chatenay-Malabry,<sup>2</sup>CNRS, 92296 Chatenay-Malabry, <sup>3</sup>Université Paris-Sud, BioCis, UMR 8076 CNRS, 92296 Chatenay-Malabry,<sup>4</sup>Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 75252 Paris

Visceral leishmaniasis is a life-threatening disease that affects nearly a million people every year. The emergence of strains resistant to existing drugs constitutes a major problem complicating its treatment. The development of new lipid complex combining two active molecules: Amphotericin B (AmB), a first-line drug in the treatment of visceral leishmaniasis and Miltefosine (HePC), a very useful drug because of its activity by the oral route, is an interesting strategy which could increase effectiveness, decrease the toxicity of each drug and reduce the risk of appearance of resistance. Both drugs have tensioactive properties: AmB forms aggregates at concentrations above 0.1  $\mu$ M and the critical micellar concentration (CMC) of HePC is 2  $\mu$ M). In order to better understand the physico-chemical interactions between AmB, HePC and the lipids – dioleoylphosphatidylserine (DOPS) and cholesterol (CH) - in the nanocomplex, in relation with the amphiphilic behaviour of the drugs, two Langmuir monolayer techniques were used. The drug was either injected into the subphase beneath monolayers of pure DOPS or a mixture of DOPS-CH or mixed with the lipids first and then spread at the air/water interface. At a constant pressure of 25 mN/m, the adsorption kinetics of HePC into monolayers showed that HePC molecules are inserted into the monolayers of lipids as monomers up to its CMC. At HePC concentrations above the CMC, micelles of HePC are deployed at the interface and the drug inserts into the monolayer as groups of monomers. The study of monolayers of HePC/lipid mixtures spread at the air–water interface showed that DOPS maintains HePC at the interface and this effect becomes more marked in the presence of CH. In the case of AmB, a simple miscibility between AmB and DOPS was observed, whereas a high level of condensation was observed between AmB and the DOPS-CH mixture due to the high affinity of AmB for CH. These preliminary results are encouraging for the development of the lipidic nanocomplex because they indicate that the two drugs form stable interactions with the chosen lipids.



**– Nouveaux outils et concepts –**



**Affiche 40****Échantillonnage conformationnel du site actif d'un récepteur par dynamique moléculaire sous contrainte : application au récepteur PPAR-gamma**S. Aci-Sèche<sup>1</sup>, N. Garnier<sup>1</sup>, D. Genest<sup>1</sup>, S. Bourg<sup>2</sup>, C. Marot<sup>3</sup>, L. Morin-Allory<sup>3</sup> et M. Genest<sup>1</sup><sup>1</sup>Centre de Biophysique Moléculaire (affilié à l'Université d'Orléans et à l'INSERM) CNRS, rue Charles Sadron, 45701 Orléans cedex 2, <sup>2</sup>Fédération de Recherche «Physique et Chimie du Vivant», CNRS 2708, rue Charles Sadron, 45701 Orléans cedex 2, <sup>3</sup>Institut de Chimie Organique et Analytique, CNRS – Université d'Orléans, BP 6759, rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2

Le docking est une technique *in silico* très utilisée pour étudier les interactions entre molécules ou orienter les chimistes dans le développement de nouveaux composés pharmaceutiques. Cependant, les méthodes existantes peuvent manquer de fiabilité car elles ne prennent pas ou peu en compte la flexibilité du récepteur. Plusieurs méthodologies sont actuellement en cours de développement pour introduire ce concept de flexibilité du récepteur dans les études de docking.

Une approche intéressante est celle du docking multi-conformations, qui consiste à réaliser un docking rigide sur un ensemble de conformations du site actif du récepteur représentatif de sa flexibilité. Cet ensemble peut être déterminé expérimentalement ou par des méthodes de simulations numériques, les mieux adaptées à l'échantillonnage structural. Cependant, explorer la diversité conformationnelle d'une protéine requiert de larges gammes de temps de simulation (de l'ordre de la centaine de nanoseconde), ce qui peut s'avérer très coûteux en temps-calcul. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches permettant l'exploration rapide et fiable de l'espace conformationnel d'un récepteur. Nous présentons ici un protocole qui permet de générer un vaste ensemble de conformations d'un récepteur en utilisant des techniques de simulation de dynamique moléculaire sous contraintes et un modèle de solvant implicite. Nous présentons également une méthode de partitionnement pour sélectionner, parmi les conformations générées, un ensemble de conformations représentatives de la flexibilité du récepteur utilisable pour des études de docking multi-conformation. La méthode est appliquée au récepteur de prolifération et d'activation des peroxysomes gamma (PPAR $\gamma$ ).

**Affiche 41****Spectroscopie RPE et sondes paramagnétiques : de nouvelles stratégies pour la biologie structurale**V. Belle<sup>1</sup>, M. Martinho<sup>1</sup>, M. Lorenzi<sup>1</sup>, G. Gerbaud<sup>1</sup>, H. Vezin<sup>3</sup>, F. Carriere<sup>2</sup>, S. Longhi<sup>4</sup>, J. Strancar<sup>5</sup>, A. Fournel<sup>1</sup> et B. Guigliarelli<sup>1</sup><sup>1</sup>Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, BIP-UPR9036, CNRS et Université d'Aix-Marseille I et II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, <sup>2</sup>Enzymologie Interfaciale et Physiologie de la Lipolyse, EIPL, UPR9025, CNRS et Université d'Aix-Marseille I et II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, <sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, LCOM, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, <sup>4</sup>Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, AFMB-UMR6098, CNRS et Université d'Aix-Marseille I et II, Chemin de Luminy, Marseille, <sup>5</sup>Laboratory of Biophysics, Solid States Physics Department, Josef Stefan Institute, Ljubljana, Slovénie

L'utilisation de sondes paramagnétiques de type radicaux nitroxydes pour explorer par spectroscopie RPE l'environnement local d'une chaîne polypeptidique ou d'acides nucléiques est une technique utilisée de longue date [1]. Toutefois, les avancées technologiques récentes dans le domaine de la RPE multifréquence et de la RPE impulsionnelle ont permis l'émergence d'une véritable RPE structurale. Sans limitation de taille pour les systèmes biologiques étudiés, nous montrons comment, combinée à la dynamique moléculaire, cette approche permet de suivre en détail les transitions structurales à l'œuvre dans les processus de reconnaissance moléculaire ou les mécanismes catalytiques. Plusieurs exemples portant sur des applications récentes seront présentés :

- La catalyse interfaciale sur micelles par les enzymes de type lipase [2].

- La cartographie des transitions désordre-ordre dans les nucléoprotéines virales lors des processus de réplication [3, 4].

Par ailleurs, nous montrerons comment, grâce à la longue portée des interactions dipolaires électroniques, les nouvelles stratégies de DEER (Double Résonance Electron Electron) permettent de mesurer des distances intersondes jusqu'à 8 nm. Elles ouvrent ainsi des perspectives inédites sur l'assemblage des grands édifices biologiques (complexes et supercomplexes membranaires) et sur la dynamique de leur fonctionnement [2].

1- V. Belle *et al.* in Instrumental Analysis of IDP's, V. Uverski and S. Longhi Eds, Wiley **2010**2- S. Ranaldi, V. Belle, M. Woudstra, R. Bourgeas, B. Guigliarelli *et al.* *Biochemistry* **2010**, 49, 2140.3- V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo, E. Liquière, J. Strancar *et al.* *Proteins* **2008**, 73, 973-988.4- A. Kavalenka, I. Urbančič, V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo *et al.* *Biophysical J.* **2010**, 98, 1055.

**Affiche 42****Single molecule studies of seven transmembrane receptors**

O. Berthoumieu, H. Attrill et A. Watts

University of Oxford, Department of Biochemistry, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, United Kingdom

Bacteriorhodopsin (bR) is the only protein in the purple membrane of the halophilic organism *Halobacterium salinarium*. It is a light-driven proton pump that contains a chromophore, the retinal, covalently bound to the protein. On illumination, the retinal isomerization initiates a cycle of conformational changes resulting in a transmembrane proton gradient. This photocycle also results in successive charges displacements across the protein, altering the electronic conductance of the molecule. Moreover, its crystalline structure provides bR with a high chemical and thermal stability, making it an attractive material for developing biomolecular devices. A rudimentary imaging system based on purple membrane and showing differential response to illumination was assembled in 1992 (Miyasaka *et al.*, Science, 255, 342-344) and applications such as photodetectors and optical memories are being experimented, but all these studies use the protein within the membrane on relatively large surfaces. Here, conducting-probe atomic force microscopy (CP-AFM) was used to measure the electrical response in the dark and on illumination of isolated trimers of bacteriorhodopsin as a function of an applied bias. Experiments were performed on gold-bR-gold junctions using a 75% delipidated cysteine mutant. I-V curves were obtained in the dark interspersed with brief illuminations using longpass filters at a wavelength corresponding to the maximum of absorbance of the protein. A switch of conductance (i.e drop of resistance) on illumination with a return to dark conditions was reproducibly observed for a same feature, after successive illuminations in a same experiment.

**Affiche 43****Mise au point d'inhibiteurs anti-déphosphorylation par criblage virtuel : aide dans la lutte contre les résistances aux traitements thérapeutiques**S. Blanc<sup>1</sup>, P. Lallemand<sup>1</sup>, J. Viguière<sup>1</sup>, L. P. Jordheim<sup>2</sup>, C. Dumontet<sup>2</sup>, C. Lionne<sup>1</sup> et L. Chaloin<sup>1</sup><sup>1</sup>Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS) - UMR 5236 – CNRS - Université Montpellier 1 et 2 - Institut de Biologie, 34965 Montpellier, <sup>2</sup>Laboratoire de Cytologie Analytique - INSERM U590 - Faculté Rockefeller, 69008 Lyon

La dégradation de prodrogues utilisées en thérapie antivirale et anticancéreuse constitue un frein majeur à leur efficacité thérapeutique. Parmi les enzymes responsables, la 5'-nucléotidase cytosolique II (cN-II) qui catalyse la déphosphorylation de certains analogues monophosphates serait impliquée dans des mécanismes de résistance à certains traitements anticancéreux. Dans un contexte physiologique, les nucléotidases ont pour fonction de réguler le «pool» intracellulaire en nucléosides monophosphates mais peu de données sont disponibles quant à leur implication lors de l'utilisation d'analogues nucléosidiques cytotoxiques. Afin de mieux comprendre le rôle exact de cette enzyme, de nouveaux inhibiteurs ont été développés par criblage de chimiothèques *in silico* en intégrant les aspects structuraux et dynamiques de la protéine. La première approche présentée consiste à rechercher des inhibiteurs compétitifs vis à vis du substrat naturel; la seconde cible les sites régulateurs ou allostériques de l'enzyme. Dans ce dernier cas, il s'agit de trouver des molécules capables de figer l'enzyme dans une conformation pour laquelle sa dynamique est fortement limitée et par conséquent sa fonction enzymatique. La combinaison de la dynamique moléculaire et des modes normaux a permis de générer de nouvelles conformations de l'enzyme mettant en évidence des cavités à volume variable. Les résultats obtenus à partir du criblage de chimiothèques ont permis d'identifier plusieurs molécules candidates qui ont pu être validées par des tests d'inhibition *in vitro* et sur lignées cellulaires. L'obtention de deux types d'inhibiteurs (compétitifs et non compétitifs) devrait constituer une avancée majeure dans la lutte contre les résistances thérapeutiques où la cN-II est impliquée.

**Affiche 44****Micellar and biochemical properties of (hemi)fluorinated surfactants are controlled by the size of the polar head**C. Breyton<sup>1,2</sup>, F. Gabel<sup>1</sup>, M. Ablat<sup>3</sup>, Y. Pierre<sup>2</sup>, F. Lebaupain<sup>2</sup>, G. Durand<sup>3</sup>, J.-L. Popot<sup>2</sup>, C. Ebel<sup>1</sup> et B. Pucci<sup>3</sup><sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale, CEA, CNRS, Université Joseph Fourier, Grenoble, <sup>2</sup>IBPC, CNRS UMR 7099, Paris,<sup>3</sup>LCBSMV, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Faculté des Sciences, Avignon

Integral membrane proteins represent 20-30% of the proteins encoded in the genomes of cells. The knowledge of their structure, function and dysfunction is essential to a wide range of biomedical and biotechnological applications. They however are difficult to study in vitro. This is in particular related to their limited stability and motivates the search of new surfactants (e.g. 1-4), and among them, fluorinated (FSs) and hemifluorinated (HFSs) surfactants.

Surfactants with a polymeric hydrophilic head (F-TAC and HF-TAC) proved to be particularly mild towards MPs (1). Surfactants were designed with chemically defined polar heads for structural applications. Lactobionamide derivative (HF-Lac) was found to be efficient in keeping several MPs water soluble and active. But it formed elongated rods (2). A new class of surfactants, the Glu- family, was synthesized, characterized in by Small angle Neutron Scattering (SANS) and analytical ultracentrifugation, and for its biochemical interest. The formation of rods is related to the low volumetric ratio between the polar head and hydrophobic tail. The surfactant bearing two Glucose moieties is the most promising one, leading to both homogeneous and stable complexes for both BR and the b<sub>6f</sub>. It was also shown to be of particular interest for the structural investigation of membrane proteins using SANS (3).

(1). Breyton et al. (2004) *FEBS Lett* 564, 312-318.(2) Lebaupain et al. (2006) *Langmuir* 22, 8881-8890.(3) Breyton et al. (2009) *Biophys. Journal.* 97, 1077-86.(4) Gohon et al. (2008) *Biophys. Journal.* 94, 3523-37.**Affiche 45****Assessing the stability of protein complexes within large assemblies**

F. Cazals et T. Dreyfus

INRIA Sophia-Antipolis-Méditerranée, Algorithms-Biology-Structure, 2004 route des lucioles, BP 93, 06902 Sophia Antipolis

Structural genomics projects exploiting Tandem Affinity Purification (TAP) or similar data have revealed remarkable features of proteomes [G06]. While these insights are essentially of combinatorial nature—selected proteins are known to interact within a complex, leveraging this information requires building three dimensional models of these complexes. Such an endeavour has recently been completed for the Nuclear Pore Complex (NPC), for which plausible reconstructions have been computed from different experimental data, including TAP data [A07a-b]. Yet, a full synergy between TAP data and the reconstruction is not at play for two reasons. First, the models built are qualitative. Second, the reconstruction does not elucidate the precise connexion between the model and TAP data. In particular, deciding whether proteins seen in a TAP experiment correspond to a single complex or a mixture of complexes within the NPC is not addressed.

This talk will present a method addressing these limitations. First, we shall introduce tolerated models to inherently model uncertain shapes. A tolerated model is a one-parameter family of shapes (a continuum of geometries) representing an uncertain shape, which can be used to investigate stable complexes amidst the continuum. Second, for models reconstructed from TAP data, we shall explain how tolerated models and their built-in geometric statistics can be used to disambiguate complexes versus mixtures of complexes. Illustrations will be provided on NPC models derived from the density maps presented in [A07a-b].

[G06] A-C. Gavin et al, *Nature*, 440, 2006.[A07a-b] F. Alber and AI, *Nature*, 450, 2007.

[CD10] F. Cazals and T. Dreyfus, Symposium on Geometry Processing, 2010.

<http://hal.archives-ouvertes.fr/inria-00497688/en>

**Affiche 46****Enzyme at work: Kinetic crystallography on acetylcholinesterase**J.-P. Colletier, B. Sanson et M. Weik

Institut de Biologie Structurale, Structural Protein Dynamics Research Team, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble

Protein function critically depends on the synergy of structure and dynamics. This is particularly true for acetylcholinesterase (AChE), one of Nature's most rapid enzymes that displays a high catalytic turnover despite the buried nature of its active site. Unravelling the molecular organization of substrate and product traffic within AChE has been a challenging focus over the past decade of our research team and numerous collaborators appearing in the references.

Structural dynamics are not readily accessible to conventional X-ray crystallography. Yet, the advent of third-generation synchrotron sources has brought about exciting new possibilities to study structural dynamics by kinetic crystallography, aiming at the observation of e.g. enzymes in action. We developed and employed several kinetic-crystallography approaches to gain insight into molecular motions involved in substrate and product traffic within AChE [1]. As a first step, substrate and product binding sites were elucidated by solving the crystal structures of AChE in complex with products, substrates and substrate-analogues [2]. Conformational changes during product clearance from the active site, identified by combining temperature-controlled crystallography and radiolysis or laser-photolysis of caged compounds [3], hint at the existence of a transiently opened 'backdoor'. Furthermore, binding of a bifunctional inhibitor revealed a large conformational heterogeneity of the gorge [4] that might be important for rational design of new anti-Alzheimer drugs [5]. Taken together, these crystallographic snapshots are part of a molecular movie showing acetylcholinesterase at work.

[1] Weik & Colletier (2010) *Acta Crystallographica Section D* 66: 437[2] Colletier Fournier, Greenblatt, Sussman, Zaccai, Silman & Weik (2006) *EMBO J.* 25: 2746[3] Colletier, Bourgeois, Sanson, Fournier, Sussman, Silman & Weik (2008) *PNAS* 105: 11742[4] Colletier, Sanson, Nachon, Gabellieri, Fattorusso, Campiani & Weik (2006) *JACS* 128: 4526[5] Xu, Colletier, Jiang, Silman, Sussman & Weik (2008) *Protein Sci.* 17: 601**Affiche 47****Étude de la perturbation et de la dissociation par la pression d'une enzyme tétramérique, l'urate oxydase**E. Girard<sup>1</sup>, S. Marchal<sup>2</sup>, J. Perez<sup>3</sup>, S. Finet<sup>5</sup>, R. Kahn<sup>1</sup>, R. Fourme<sup>3</sup>, G. Marassio<sup>4</sup>, A.-C. Dhaussy<sup>6</sup>, T. Prangé<sup>7</sup>, R. Lange<sup>2</sup>, J. Abraini<sup>4</sup>, M. Mezouar<sup>5</sup> et N. Colloc'h<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, UMR5075 CEA-CNRS-UJF, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble cedex, <sup>2</sup>INSERM, U710, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France; Univ. Montpellier 2, 34095 Montpellier, <sup>3</sup>Synchrotron-SOLEIL, BP48 Saint Aubin, 91192 Gif-sur-Yvette, <sup>4</sup>CI-NAPS, UMR6232-UCBN-CNRS, ERT 1083, Centre CYCERON, bd Becquerel, 14704 Caen, <sup>5</sup>ESRF, BP220, 38027 Grenoble, <sup>6</sup>CRISTMAT ENSICAEN, bd Maréchal Juin, 14000 Caen, <sup>7</sup>LCRB, CNRS UMR 8015-Univ. Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris

L'urate oxydase est une enzyme homotétramérique dont les sites actifs sont situés aux interfaces. Son activité enzymatique est directement relié à l'intégrité du tétramère. Pour étudier les modifications induites par la pression, nous avons employé différentes techniques utilisant la haute pression hydrostatique : la cristallographie des rayons X, la spectroscopie de fluorescence, et le SAXS, ainsi que les mesures d'activité enzymatique sous pression et après décompression.

L'analyse des différents résultats expérimentaux a permis de proposer un modèle de dissociation par la pression. Il y a d'abord une perte de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, puis l'enzyme se dissocie de façon irréversible en monomères qui s'agrègent rapidement.

La comparaison des structures cristallographiques à 150 MPa et à pression ambiante a montré que le volume de la cavité interne diminuait sous pression tandis que celui du site actif augmentait et que les régions dans lesquelles les facteurs d'agitation thermique augmentaient le plus se situent toutes autour du tunnel d'accès du substrat. On peut relier la perte d'affinité de l'enzyme pour son substrat à ces deux modifications structurales.

Au cours de la réaction enzymatique, le site actif doit s'ouvrir pour s'adapter à un produit plus volumineux que le substrat. L'augmentation de volume du site ne peut sans doute avoir lieu que par la diminution du volume de la cavité. La structure sous haute pression représente donc probablement un état conformationnel que l'enzyme doit prendre au cours de son mécanisme catalytique. L'hypothèse que la pression piège un sous-état conformationnel relié au mécanisme est ici démontrée de façon structurale.

Girard *et al.*, *Biophys J.*, 2010, 98 :2365-2373

**Affiche 48****Studies of lipid order and apoptosis of cell plasma membranes using new fluorescent probes**

A. S. Klymchenko, S. Oncul, Z. Darwich, O. A. Kucherak, Y. Mély et G. Duportail

Laboratoire de biophotonique et Pharmacologie, UMR CNRS 7213, Université de Strasbourg, faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch

Cell plasma membranes exhibit remarkable lipid asymmetry, where sphingomyelin (SM) presents a major fraction in the outer leaflet. With cholesterol, SM forms a highly packed liquid ordered membrane phase (Lo), separated from the loosely packed liquid disordered phase of unsaturated phospholipids (Ld), which is believed to play an important role in membrane functions. Our aim was to study these phases in model and cellular membranes and to follow the phase changes in response to both cholesterol extraction and apoptosis. For this purpose, two families of dyes were developed, which stain selectively the outer leaflet of the plasma membrane. The first is based on 3-hydroxyflavone dye, which exhibits a dual emission sensitive to polarity and hydration of the environment. The second one is a Nile Red-based dye, which shows a single emission band changing its position with environment. Our studies in model membranes showed that the emission (the ratio of the two emission bands or the position of the emission maximum) of these probes changes with phase allowing imaging of separate domains in GUVs. In living cells, the emission is modified in response to cholesterol extraction by methyl- $\beta$ -cyclodextrin, inducing transition from Lo to Ld phases. Moreover, these dyes are sensitive to apoptosis as shown by different apoptosis-inducing agents. The response is similar to the effect of cholesterol extraction. It results that the lipid order at the outer leaflet decreases dramatically on apoptosis, probably because of the flip of SM from the outer to the inner leaflet. Thus, these new membrane probes find a variety of applications in membrane biophysics.

Ref.: (1) V.V. Shynkar et al. "Fluorescent ratiometric detection of apoptosis." *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 2187. (2) O.A. Kucherak et al. "Switchable Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes." *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 4907. (3) S. Oncul et al. "Lo phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: Effects of cholesterol depletion and apoptosis." *Biochim. Biophys. Acta* **1798** (2010) 1436.

**Affiche 49****Marquage de spin de la protéine chaperon NarJ : Étude structurale par RPE et rôle dans la biogenèse de la Nitrate réductase d'*Escherichia coli***M. Lorenzi<sup>1</sup>, G. Gerbaud<sup>1</sup>, L. Sylvi<sup>2</sup>, M. Mure<sup>2</sup>, A. Magalon<sup>2</sup>, H. Vezin<sup>3</sup>, V. Belle<sup>1</sup> et B. Guigliarelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioénergétique et Ingénierie des Protéines CNRS & Aix-Marseille Université, 31 chemin J. Aiguier, 13009 Marseille, France, <sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Bactérienne CNRS & Aix-Marseille Université, 31 chemin J. Aiguier, 13009 Marseille, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire Université de Lille I, Villeneuve d'Ascq, France

La Nitrate réductase A est une enzyme présente chez la bactérie *Escherichia Coli* qui permet d'assurer la respiration sur nitrate. Ce complexe est composé de trois sous unités (NarG, NarH, NarI) contenant huit centres métalliques. La biogenèse de cette enzyme est un processus complexe dans lequel le rôle de la protéine chaperon NarJ est essentiel [1]. Cette protéine de 236 acides aminés, est dotée d'une très haute flexibilité empêchant une analyse structurale en RMN et cristallographie. Pour surmonter cette limitation, nous avons étudié ce processus à l'aide de la RPE et du marquage de spin [2].

Grâce à une précédente étude [3], nous avons pu montrer que NarJ rendait possible l'insertion des deux centres de la sous unité catalytique et empêchait l'ancrage prématuré du complexe NarGH à la sous unité NarI [4]. Ce contrôle résulte d'une association de NarJ avec le peptide N-terminal de NarG. Quatre mutants de NarJ ont été produits pour pouvoir être greffés. Un peptide de synthèse correspondant au domaine N-terminal de NarG a été utilisé pour étudier son interaction avec NarJ par spectroscopie RPE. Par ailleurs, l'étude de NarJ bi-marquée a permis de mettre en évidence une flexibilité structurale de cette protéine lors de son interaction avec le peptide.

[1] A. Vergnes, J. Pommier, R. Toci, F. Blasco, G. Giordano, A. Magalon, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 2170.

[2] V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo, E. Liquière, J. Strancar, B. Guigliarelli, A. Fournel, S. Longhi, *Proteins* **2008**, 73, 973-988.

[3] Lanciano P, Savoyant A, Grimaldi S, Magalon A, Guigliarelli B, Bertrand P. *J Phys Chem B.* **2007**, 111, 13632-7.

[4] Lanciano P, Vergnes A, Grimaldi S, Guigliarelli B, Magalon A. *J Biol Chem.* **2007**, 282, 17468-74.

**Affiche 50****Real time imaging of the growth of amyloid-like fibrils using high speed atomic force microscopy**

P.-E. Milhiet<sup>1</sup>, D. Yamamoto<sup>2</sup>, O. Berthoumieux<sup>1</sup>, J.-M. Verdier<sup>3</sup>, S. Marchal<sup>3</sup> et T. Ando<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biochimie Structurale, UMR5048 CNRS, UMR554 INSERM, Université Montpellier I et II, 29, rue de Nava-  
celles, 34090 Montpellier, <sup>2</sup>Department of Physics, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-1192, Japan, <sup>3</sup>MMDN,  
UMR710 INSERM, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon-CC105 - 34095 Montpellier

Neurodegenerative diseases are generally associated to extracellular aggregation of proteins that form fibrillar deposits in brain. Among them, lithostathine is a protein that forms fibrils in Alzheimer and Creutzfeld-Jakob diseases by a self-proteolysis of its N-terminal part [1,2].

In order to characterize the structure of lithostathine fibrils and protofibrils as well as the dynamics of their formation, high speed AFM experiments were performed in liquid [3]. Proto-fibrils were shown to laterally and vertically associate forming bundles and paired helical filaments. The formation of these structures as well as the growth of fibers was observed in real time (1 image/s) providing new insights into the assembly mechanism of amyloid fibrils.

## References

- [1] Duplan, L.; Michel, B.; Boucraut, J.; Barthellémy, S.; Desplat-Jego, S.; Marin, V.; Gambarelli, D.; Bernard, D.; Berthézène, P.; Alescio-Lautier, B.; Verdier, J.M. *Neurobiol. Aging*, 22, 79-88. (2001).
- [2] Laurine E.; Grégoire C.; Fšndrich M.; Engemann S.; Marchal S.; Thion L.; Thimonier J.; Mohr M.; Monsarrat B.; Michel B.; Dobson C.M.; Wanker E.; Erard M. and Verdier J.M. *J. Biol. Chem.*, 278, 51770-51778. (2003).
- [3] Ando, T. Uchihashi, T., Kodera, N., Yamamoto, D., Taniguchi, M., Miyagi, A. and Yamashita, H. High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes. *J. Mol. Recognit.* 20:448-458 (2007).

**Affiche 51****Interactions et structure de peptides avec les petites vésicules unilamellaires**

L. Mouret<sup>1</sup>, G. da Costa<sup>2</sup>, B. Legrand<sup>1</sup>, J.-P. Monti<sup>2</sup> et A. Bondon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>RMN-ILP, UMR CNRS 6026, CS 34317, Campus de Villejean, Université de Rennes 1, 35043 Rennes cedex, France,  
<sup>2</sup>Laboratoire de physique et biophysique GESVAB EA 3675, ISVV, Université de Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076  
Bordeaux cedex, France

Les interactions dynamiques à la membrane jouent un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes de reconnaissance, de signalisation ou d'activité antibiotique. Différents environnements membranaires modèles sont utilisés pour mimer l'association de molécules avec les lipides de la membrane. Alors que les petites vésicules unilamellaires (SUV) ont un « tumbling » relativement rapide, les molécules enfouies dans la bicouche, par exemple les protons des stérols, sont « invisibles » ou difficilement détectables par RMN selon leur amplitude de mouvement au sein des phospholipides. Par contre, en cas de dynamique rapide d'association-dissociation, les SUV peuvent constituer un modèle efficace pour la détermination structurale de peptides par RMN du proton en « condition liquide ». A l'inverse des conditions de TR-NOE si l'on veut détecter les signaux de la forme totalement liée, il convient de rajouter un excès de lipides. Dans ces conditions, la cinétique de dissociation permet juste de s'affranchir des interactions dipolaires et des signaux relativement fins peuvent être obtenus. Deux exemples seront présentés. L'un sur la MENK en interaction avec des SUV et l'autre sur la détermination structurale tridimensionnelle de la neurotensine avec des SUV anioniques.

**Affiche 52**

**Interactions et structure de peptides avec les petites vésicules unilamellaires**

L. Mouret<sup>1</sup>, G. da Costa<sup>2</sup>, B. Legrand<sup>1</sup>, J.-P. Monti<sup>2</sup> et A. Bondon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>RMN-ILP, UMR CNRS 6026, PRISM, Université de Rennes 1, CS 34317, Campus de Villejean, 35043 Rennes cedex, France, <sup>2</sup>Laboratoire de physique et biophysique GESVAB EA 3675, ISVV, Université de Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

Les interactions dynamiques à la membrane jouent un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes de reconnaissance, de signalisation ou d'activité antibiotique. Différents environnements membranaires modèles sont utilisés pour mimer l'association de molécules avec les lipides de la membrane. En cas de dynamique rapide d'association-dissociation, les petites vésicules unilamellaires peuvent constituer un modèle efficace pour la détermination structurale de peptides par RMN du proton en « condition liquide ». Certains exemples seront présentés.

**Affiche 53**

**Apprehending cell topology for extended Multi-Target Tracing in 3D**

A. Sergé<sup>1</sup>, V. Rouger<sup>1</sup>, E. Barthelet<sup>2</sup>, N. Bertaux<sup>2</sup> et D. Marguet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, INSERM, CNRS, Aix-Marseille Université, France, <sup>2</sup>Institut Fresnel, CNRS, Aix-Marseille Université, École Centrale Marseille, France

Investigating molecular dynamics while correctly handling the complex geometry of cell structures is a challenging issue in biophotonics. In particular, the plasma membrane has been often approximated as a flat, planar structure, in pioneering studies such as single-particle tracking. However, carefully estimating membrane landscape, such as shaped by ruffles or internalization pits, can be a key element, both for quantitative evaluation and for functional implications of the reported molecular dynamics (*Adler et al 2010*).

We address this issue here by extending our Multi-Target Tracing (MTT – *Sergé et al 2008*) to 3D measures. Several strategies allow 3D microscopy, such as 3D confocal scanning, dual-focus imaging, Point-Spread Function (PSF) shaping, or astigmatic optics (*Kao et al 1994*). This last option, straightforward to implement, only requires introducing a cylindrical lens within the optical path. The resulting PSF becomes elongated along one axis of the image plane or the other, for particles below or above the focal plane respectively. By using an asymmetric Gaussian peak to fit this astigmatic PSF, standard single-molecule detection and estimation scheme directly provide lateral and axial positions. This extra information can further be used to reconnect trajectories over time.

We benchmarked the performances of MTT in 3D to evaluate the limits, both theoretically, by computing the Cramer-Rao lower bound of the estimate, and analytically, against simulated targets. This provides nanometric accuracy in lateral and axial resolution, for reasonable signal to noise ratio, such as delivered by quantum-dots. This method can be readily applied to membrane receptors on live cells, offering the possibility to accurately monitor internalization upon ligand stimulation.

**Affiche 54****Imagerie cellulaire à haute résolution spatiale**

P. Winckler, R. Jaffiol, J. Plain et R. Pascal

Laboratoire de Nanotechnologie et d'Instrumentation Optique, LRC CEA, CNRS UMR 6279 - STMR, ICD, Univ. de Technologie de Troyes, 12 rue Marie Curie, BP 2060, 10 010 Troyes cedex

Nous proposons une nouvelle technique d'imagerie de fluorescence à haute résolution spatiale dédiée à l'imagerie cellulaire et plus particulièrement à l'imagerie des points d'adhésion. Cette nouvelle technique, basée sur un transfert d'énergie non radiatif permet de briser la limite de diffraction, la profondeur de champ du microscope est ainsi réduite à l'échelle nanométrique. Le procédé permet également de s'affranchir du problème posé par l'autofluorescence du milieu cellulaire. La méthode proposée repose sur une fonctionnalisation du substrat et peut donc être aisément mise en œuvre sur un microscope conventionnel. Par ailleurs, aucun marquage spécifique des protéines d'adhésion n'est nécessaire ; un simple marquage membranaire, moins perturbateur, convient parfaitement. Nous présentons également une autre application de ce développement instrumental : la spectroscopie de corrélation de fluorescence dans des volumes de quelques attolitres.

**Affiche 55****“Old pole” proteins tracking by correlative imaging in *E. Coli***N. Zambrano<sup>1,2</sup>, S. Marco<sup>1</sup>, F. Taddei<sup>2</sup> et A. Lindner<sup>2</sup><sup>1</sup>Institut Curie - INSERM U759, Centre Universitaire, Bâtiment 110, 91405 Orsay cedex, <sup>2</sup>Inserm U1001 (ex U571), Centre de Recherche Interdisciplinaire (CRI), Faculté 2ème étage, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris

In aging, the cell cycle machinery is affected. The existence of an “old pole” inherited asymmetrically between the progeny cells leads to a growth pattern. To understand this phenomenon, we focus our work on tracking molecules identified at the maintenance machinery in *Escherichia coli*, using bacterial models [2,4]. Is why to describe the behavior of maintenance machinery in *E. coli* to correlate its localization with the bacteria “old pole”. We will try to do a Intracellular following of macromolecules, at nanometric resolution. This is a major challenge in cellular biological imaging.

Several methods allowing the use of a tag having the capabilities to track single molecules within the cell by different imaging methods are in increasing development. Recently, it has been described a clonable tag based on methallothionein properties to fix gold forming nanometric clusters visible at the electron microscope [3]. This tag has successfully demonstrated its high potential to locate, at nanometric precision, endogenous proteins even in 3D by electron tomography [1]. However, gold nanoparticles are not adapted for other cellular imaging methods than electron microscopy. In this context, lanthanides present interesting properties as theoretically they can be fluorescent, observables by different electron microscopy methods and secondary ion mass spectroscopic imaging (SIMS). The use of clonable MTTags able to form lanthanides nanometric clusters can be a way to perform specific intracellular molecular tracking by different imaging methods. We have evaluated the capabilities of a MTTags to fix lanthanides within the cell. For this purpose we have test, in *E. coli* transformed or not with the MTTTag, different bacterial conditions in presence of EuCl<sub>2</sub>. Electron energy loss spectroscopy (EELS) performed on these samples has evidenced that bacteria cultured with EuCl<sub>2</sub> show the characteristic Eu spectrum within the cell. This indicates that in both cases Eu is present within the bacteria. This is confirmed by nano-SIMS imaging. Interestingly, transmission electron microscopy evidences the presence of slightly electron dense nanometric particles in bacteria expressing the MTTTag Eu absent in bacteria without the Tag plasmid or in absence of EuCl<sub>3</sub> incubation. Moreover, STEM-HAADF performed in the same samples clearly confirms, by Z-contrast imaging, the presence of Eu nanometric clusters only present in bacteria expressing MTTags and incubated in presence of EuCl<sub>3</sub>. This indicates that this Tag is able to capture lanthanides in vivo and to specifically form nano-metric clusters. Therefore, combining MTTags with lanthanides can be an interesting approach for nanometric tracking of biological macromolecules by different imaging methods as CLOEM methods (of Correlative Light (LM), optic (OM) and electron microscopy (EM)) in revolutionizing our understanding of the structural basis of cell biology.

This project has the collaboration of the Institut Curie UMR168, and U759, and also in collaboration with TAMARA's Lab (U1001).

[1] Diestra E, Fontana J, Guichard P, Marco S, Risco C. Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *J Struct Biol.* 2009 Mar;165(3):157-68.

[2] Mercogliano CP, DeRosier DJ. Concatenated metallothionein as a clonable gold label for electron microscopy. *J Struct Biol.* 2007 Oct;160(1):70-82.

[3] Lindner, A.B. et al., 2008. Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *PNAS.* 105(8), 3076-3081.

[4] Stewart, E.J. et al., 2005. Aging and Death in an Organism That Reproduces by Morphologically Symmetric Division. *PLoS Biology*, 3(2).

– ***Expression génique*** –



**Affiche 56****Cell-by-cell quantification of catabolite repression in *Bacillus subtilis* by Number and Brightness Analysis**M. Ferguson<sup>1</sup>, D. Le Coq<sup>2</sup>, M. Jules<sup>2</sup>, C. Clerté<sup>1</sup>, S. Aymerich<sup>2</sup>, C. Royer<sup>1</sup> et N. Declerck<sup>1</sup><sup>1</sup>Centre de Biochimie Structurale, INSERM 554, CNRS 5048, 34090 Montpellier, <sup>2</sup>Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon

Number and brightness analysis (N&B) is a useful technique for characterizing the concentration and molecular brightness of fluorescent molecules in vivo (Digman et al, 2008). Here we investigate promoter activity in bacterial strains expressing green fluorescent protein (GFP) under the control of native promoters engineered into the *Bacillus subtilis* chromosome (Botella et al, 2010). We are interested in observing the regulation networks of the central carbon metabolism of *B. subtilis*, in particular the transcriptional activity of promoters implicated in the switch between glycolysis and gluconeogenesis.

We utilize two photon laser scanning microscopy and N&B analysis to monitor the number of GFP molecules diffusing within living bacterial cells. By quantifying intensity fluctuations from fluorescent images recorded on timescales faster than diffusion, we can directly measure the true concentration of fluorescent molecules inside individual bacterial cells. The concentration of GFP molecules produced from different promoter fusions was determined for hundreds of *B. subtilis* cells grown on either glucose or malate. This analysis yielded Numbers histograms and statistical parameters associated to the intrinsic variability of gene expression within the cell population. Attempts to fit experimental quantitative data to stochastic models of gene expression and regulation are currently underway.

Botella E, Fogg M, Jules M, Piersma S, Doherty G, Hansen A, Denham EL, Le Chat L, Veiga P, Bailey K, Lewis PJ, van Dijl JM, Aymerich S, Wilkinson AJ, Devine KM (2010) pBaSysBioII: an integrative plasmid generating gfp transcriptional fusions for high-throughput analysis of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*

Digman MA, Dalal R, Horwitz AF, Gratton E (2008) Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope. *Biophys J* 94(6): 2320-2332

**Affiche 57****Doigts de zinc et deubiquitination de la chromatine**Y.-H. Wang<sup>1</sup>, J. Bonnet<sup>2</sup>, A. Atkinson<sup>1</sup>, C. Romier<sup>1</sup>, A. Hamiche<sup>2</sup>, L. Tora<sup>2</sup>, D. Devys<sup>2</sup> et B. Kieffer<sup>1</sup><sup>1</sup>Département de Biologie et de Génomique Structurales, IGBMC, CNRS UMR 7104, INSERM U 964, Université de Strasbourg, <sup>2</sup>Département de Génomique fonctionnelle, IGBMC, CNRS UMR 7104, INSERM U 964, Université de Strasbourg

Le facteur de transcription SAGA est un coactivateur impliqué dans la dynamique de la chromatine. Il contient deux enzymes catalysant l'acétylation des queues d'histones ainsi que leur déubiquitination. Les sous-unités ATXN7 et ATXN7L3 appartenant au sous-complexe de déubiquitination de SAGA contiennent un domaine similaire, stabilisé par un doigt de zinc particulier. La structure tridimensionnelle des deux domaines a été résolue par RMN. De façon inattendue, la structure des deux domaines à zinc est différente, malgré une signature en séquence très similaire. Des expériences de biochimie et de RMN montrent que seul le doigt de zinc de la sous-unité ATXN7 possède une activité de liaison au nucléosome.



– ***Index des auteurs*** –



# Index des auteurs

- Abla M. 81  
Abraini J. 37, 82  
Aci-Sèche S. 40, 79  
Aimon S. 22, 56  
Aizel K. 64  
Allouche M. 63  
Anca I. 58  
Ando T. 38, 84  
Angelini R. 30, 70  
Antonny B. 22, 49, 66  
Araujo Santos P. 63  
Artzner F. 27, 65, 68  
Atkinson A. 44, 89  
Attrill H. 39, 80  
Auvray L. 68  
Aymerich S. 43, 89
- Bachelier F. 30, 67  
Barelli H. 22  
Barman T. 65  
Barratt G. 75  
Barthelet E. 85  
Bassereau P. 22, 56  
Bayle S. 63  
Belle V. 39, 79, 83  
Belloni F. 29, 69  
Beney L. 55, 57  
Bertaux N. 85  
Berthoumieu O. 39, 80  
Berthoumieux O. 38, 84  
Bertin A. 21, 55  
Betton J.-M. 68  
Bidet M. 67  
Bigay J. 22  
Billaudeau C. 28, 72  
Biou V. 64  
Bittame A. 13, 49  
Blanc S. 80  
Blondot M.-L. 71  
Bondon A. 84, 85  
Boned A. 28, 72  
Bonnaffé D. 50  
Bonnet J. 44, 89  
Bontems F. 71  
Boulangier P. 13, 51, 52  
Bourg S. 40, 79  
Bourgeois D. 40, 69  
Brenner C. 63  
Breyton C. 81  
Brotens G. 56
- Buisson D. 27, 65  
Buosi V. 64  
Byrne R. 57
- Campanacci V. 49  
Carlier M.-F. 21  
Carpentier P. 40, 69  
Carriere F. 39, 79  
Casella J.-F. 22  
Cazals F. 37, 81  
Cesbron-Delauw M.-F. 13, 49  
Chaloin L. 65, 80  
Chat S. 30, 70  
Cherfils J. 49, 64  
Chevalier M. 50  
Chopineau J. 63  
Cintrat J.-C. 27, 65  
Clantin B. 12  
Clerté C. 43, 89  
Colletier J.-P. 82  
Colloc'h N. 37, 82  
Conchonaud F. 28, 72  
Contreras-Martel C. 11  
Conway J. 13, 51, 52  
Corcelli A. 30, 70
- da Costa G. 84, 85  
Darwich Z. 83  
Daughdrill G. W. 27, 64  
de Saint Jean M. 22  
Declerck N. 43, 89  
Dedeker P. 40, 69  
Delalande O. 70  
Delattre A.-S. 12  
Delmas A. 11, 51, 70  
Delprato A. 49  
Der C. 58  
Desbat B. 50  
Dessen A. 11, 50  
Deturche R. 23, 59  
Devys D. 44, 89  
Dhaussy A.-C. 37, 82  
Di Guilmi A. M. 11  
Domanov Y. 22, 56  
Douguet D. 66  
Dreyfus T. 37, 81  
Drin G. 22, 66  
Dubois M. 70  
Dubosclard V. 71  
Dujardin E. 68
- Dumas F. 30, 57, 67  
Dumontet C. 80  
Dupont S. 55, 57  
Duportail G. 83  
Durand D. 13, 51, 52  
Durand G. 81
- Ebel C. 81  
Effantin G. 13, 49  
El Mortaji L. 11  
Eleouet J.-F. 71  
Escoffre J.-M. 24, 58  
Espagne A. 72
- Faure D. 12, 52  
Faure G. 43  
Fay N. 27, 65, 68  
Ferguson M. 43, 89  
Fieschi F. 29, 66  
Finet S. 37, 82  
Forest E. 29, 66  
Fourme R. 37, 82  
Fournel A. 39, 79
- Gabel F. 81  
Gagnon J. 13, 49  
Garcia G. 21, 55  
Garnier N. 40, 79  
Gaubert A. 43  
Gautier R. 22  
Gendrin C. 50  
Genest D. 40, 79  
Genest M. 40, 79  
Gentilhomme E. 13, 49  
Gerbaud G. 39, 79, 83  
Gerbeau-Pissot P. 58  
Gervais P. 55, 57  
Girard E. 37, 82  
Gobeaux F. 27, 65  
Gonin S. 28, 71  
Gosset D. 70  
Gounon P. 22  
Grutter T. 28, 71  
Guérois R. 43  
Guigliarelli B. 39, 79, 83  
Guittet E. 64
- Hamiche A. 44, 89  
Helms G. 27, 64  
Henis Y. 28, 72  
Herve-Grepinet V. 11, 51

- Hide D. 63  
Hubert J.-F. 23, 59  
Huet A. 13, 51, 52
- Izoré T. 11
- Jacob-Dubuisson F. 12  
Jacquet E. 64  
Jaffiol R. 23, 59, 86  
Jamin M. 13, 49  
Jault J.-M. 50  
Jeannesson P. 23, 59  
Jégou A. 21  
Jiang R. 28, 71  
Jordheim L. P. 80  
Joubert O. 67  
Jules M. 43, 89
- Kahn R. 37, 82  
Kieffer B. 44, 89  
Klymchenko A. S. 83  
Kucherak O. A. 83
- Labas V. 11, 51  
Lacombe B. 67  
Lagane B. 30, 67  
Lallemand P. 65, 80  
Lancelot E. 50  
Landon C. 11, 51, 70  
Lange R. 37, 82  
Larijani B. 57  
Le Coq D. 43, 89  
Le Rumeur E. 23, 59  
Lebaupain F. 81  
Legrand A. 70  
Legrand B. 84, 85  
Lelievre D. 70  
Lemoine D. 28, 71  
Letellier L. 51  
Ligeti M. 27, 65  
Lindner A. 86  
Lionne C. 65, 80  
Lobasso S. 30, 70  
Locht C. 12  
Loiseau P. M. 75  
Longhi S. 39, 79  
Lopez A. 30, 67  
Lorenzi M. 39, 79, 83  
Lortat-Jacob H. 50
- Magalon A. 83  
Magdeleine M. 66  
Mailfert S. 28, 29, 69, 72  
Man P. 29, 66  
Manzano C. 11  
Marassio G. 37, 82  
Marchal S. 37, 38, 82, 84  
Marco S. 86  
Marcoux J. 29, 66  
Marechal E. 13, 49  
Marguet D. 28, 29, 69, 72, 85  
Marot C. 40, 79
- Marques C. 63  
Martinho M. 39, 68, 79  
Martz A. 28, 71  
Mascalchi P. 30, 67  
Mathé J. 68  
McMurray M. 21, 55  
Mély Y. 83  
Mercier C. 13, 49  
Merola F. 72  
Meudal H. 11, 51  
Mezouar M. 37, 82  
Milhiet P.-E. 38, 84  
Mondy S. 12, 52  
Monneret S. 29, 69  
Monnerie R. 30, 70, 72  
Monti J.-P. 84, 85  
Morello V. 22  
Moréra S. 12, 52  
Morin-Allory L. 40, 79  
Morjani H. 23, 59  
Mouret L. 84, 85  
Mure M. 83  
Mus-Veteau I. 67
- Nehmé R. 67  
Nguyen K. M. H. 27, 65  
Niçaise M. 12, 52  
Nicolai M. C. 50  
Nogales E. 21, 55  
Nys Y. 11, 51
- Ochsenbein F. 43  
Oncul S. 83
- Pajot-Augy E. 30, 56, 70, 72  
Pascal R. 86  
Pastoriza-Gallego M. 68  
Paternostre M. 27, 65, 68  
Payet L. 68  
Péchoux C. 30, 70  
Pelta J. 68  
Perez J. 37, 64, 82  
Persuy M.-A. 30, 56, 70, 72  
Petit-Haertlein I. 29, 66  
Pettini M. 38  
Pham H. 75  
Pierre Y. 81  
Plain J. 86  
Planamente S. 12, 52  
Poccia D. 57  
Popot J.-L. 81  
Portais J.-C. 33  
Pouget E. 68  
Prangé T. 37, 82  
Preux O. 13, 51, 52  
Pucci B. 67, 81
- Ray P. 49  
Receveur-Bréchet V. 27, 64  
Regis Faro A. 40, 69  
Renner M. 22, 56  
Robert E. 23, 59
- Robert J. L. 63  
Roblin P. 64  
Roche Y. 58  
Rols M.-P. 24, 58  
Romet-Lemonne G. 21  
Romier C. 44, 89  
Ronzon F. 50  
Rosazza C. 24, 58  
Rose T. 68  
Rouger V. 29, 69, 85  
Roy C. R. 49  
Royer C. 43, 89  
Royer P. 23, 59  
Ruprecht V. 28, 72
- Saint N. 12  
Saint-Pierre Chazalet M. 75  
Salomé L. 30, 67  
Salome L. 57  
Sanson B. 82  
Sanz G. 30, 56, 70, 72  
Sarkis J. 23, 59  
Sarrazin S. 50  
Schroder A. 63  
Schutz G. 28, 72  
Schwille P. 17  
Senille V. 70  
Sergé A. 85  
Sharaf Edein O. 63  
Silva Baptista M. 63  
Simon-Plas F. 58  
Simonin H. 55  
Sizun C. 71  
Stancik A. 27, 64  
Strancar J. 39, 79  
Sylvi L. 83
- Taddei F. 86  
Taly A. 28, 71  
Tarabout C. 27, 65  
Thai L. 21, 55  
Thomas D. 58  
Thorner J. 21, 55  
Thureau A. 64  
Tomas D. 68  
Tora L. 44, 89  
Triller A. 22, 56  
Trombik T. 28, 72
- Uchôa Fernandes A. 63
- Vachette P. 13, 51, 52  
Valéry C. 27, 65, 68  
van Heijenoort C. 64  
Varga A. 65  
Vas M. 65  
Verdier J.-M. 38, 84  
Vezin H. 39, 79, 83  
Viasnoff V. 68  
Vidic J. 30, 70  
Vié V. 23, 59  
Vigouroux A. 12, 52

|             |        |                |            |             |        |
|-------------|--------|----------------|------------|-------------|--------|
| Viguié J.   | 80     | Wade F.        | 30, 70, 72 | Wurtz O.    | 28, 72 |
| Villeret V. | 12     | Wang Y.-H.     | 44, 89     | Yamamoto D. | 38, 84 |
| Villette S. | 70     | Watts A.       | 39, 80     | Zambrano N. | 86     |
| Vincent B.  | 57     | Weik M.        | 82         | Zeghouf M.  | 49, 64 |
| Vivès C.    | 29, 66 | Weissenhorn W. | 13, 49     | Zumbusch A. | 24, 58 |
| Vogel F.    | 50     | Wieser S.      | 28, 72     |             |        |
|             |        | Winckler P.    | 23, 59, 86 |             |        |



**– Liste des participants –**



# Liste des participants

**ACI-SÈCHE Samia**

CBM-CNRS  
rue Charles Sadron  
45071 Orléans  
Email : samia.aci@cnrs-orleans.fr  
Tél : 02 38 25 55 93  
Fax : 02 38 69 70 31

**BENEY Laurent**

Laboratoire GPMA  
AgroSup Dijon  
1, Esplanade Erasme  
Campus Universitaire  
21000 Dijon  
Email : lbene@u-bourgogne.fr  
Tél : 03 80 39 66 66

**ALLOUCHE Maya**

9 rue bourrely  
34000 Montpellier  
Email : mayaallouche@yahoo.fr  
Tél : 04 67 63 54 31  
Fax : 04 67 04 88 74

**BERTHOUMIEU Olivia**

St Hugh's College  
St Margarets Road  
OX2 6LE Oxford  
Royaume-Uni  
Email : olivia.berthoumieu@bioch.ox.ac.uk  
Tél : +44518957589

**ANTONNY Bruno**

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire  
C.N.R.S.  
660 route des Lucioles  
06560 Valbonne  
Email : antonny@ipmc.cnrs.fr  
Tél : 04 93 95 77 75  
Fax : 04 93 95 77 10

**BERTIN Aurélie**

IBBMC, Bat 430  
Université Paris Sud XI  
91405 Orsay  
Email : aurelie.bertin@u-psud.fr  
Tél : 01 69 15 39 11  
Fax : 01 69 85 37 15

**ARAUJO DOS SANTOS Patricia**

Institut Charles Sadron  
23, rue de Loess  
BP 84047  
67034 Strasbourg  
Email : araujodossantos@unistra.fr  
Tél : 06 48 20 61 90  
Fax : 03 88 41 40 99

**BIDET Michel**

UMR6543 - IBDC  
Université de Nice  
Faculté des Sciences  
Parc Valrose  
06108 Nice  
Email : michel.bidet@unice.fr  
Tél : 04 92 07 68 71  
Fax : 04 92 07 68 34

**BAADEN Marc**

Laboratoire de Biochimie Théorique  
CNRS UPR 9080 - IBPC  
13, rue Pierre et Marie Curie  
75005 Paris  
Email : baaden@smplinux.de  
Tél : 06 09 84 32 17  
Fax : 01 58 41 50 26

**BIGAY Joelle**

CNRS-IPMC  
660 route des Lucioles  
Sophia Antipolis  
06560 Valbonne  
Email : bigay@ipmc.cnrs.fr  
Tél : 04 93 95 77 72  
Fax : 04 93 95 77 10

**BITTAME Amina**

Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes  
CNRS UMR 5163  
Université Joseph Fourier  
Campus Santé Domaine de la Merci  
38700 Grenoble  
Email : bioamina@gmail.com  
Tél : 06 88 25 58 27

**BOMPARD Coralie**

Institut de Recherche Interdisciplinaire - IRI  
USR3078 CNRS - Université de Lille 1 - Université de  
Lille 2  
Parc CNRS de la Haute Borne  
50 avenue de Halley - BP 70478  
59658 Villeneuve d'Ascq  
Email : coralie.bompard@iri.univ-lille1.fr  
Tél : 03 62 53 17 40

**BONDON Arnaud**

RMN-ILP, UMR CNRS 6026  
PRISM, IFR 140  
CS 34317, Campus de Villejean  
Université de Rennes 1  
35043 Rennes  
Email : arnaud.bondon@univ-rennes1.fr  
Tél : 02 23 23 65 61  
Fax : 02 23 23 46 06

**BROTONS Guillaume**

LPEC, UMR CNRS n°6087.  
Université du Maine, Faculté des Sciences et techniques  
Av. O. Messiaen  
72085 Le Mans  
Email : guillaume.brottons@univ-lemans.fr  
Tél : 06 17 27 62 36  
Fax : 02 43 83 35 18

**BUCKLE Malcolm**

LBPA ENS (Cachan)  
61 Ave. Du Pr. Wilson  
94235 Cachan  
Email : buckle@lbpa.ens-cachan.fr  
Tél : 01 47 40 76 73  
Fax : 01 47 40 76 84

**CAMPANACCI Valérie**

LEBS CNRS UPR3082  
Bat. 34  
Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Email : campanacci@lebs.cnrs-gif.fr  
Tél : 01 69 82 42 47  
Fax : 01 69 82 31 29

**CAZALS Frederic**

INRIA Algorithms-Biology-Structure  
2004 route des Lucioles, BP 93,  
F-06902 Sophia-Antipolis, FRANCE  
06902 Sophia-Antipolis  
Email : frederic.cazals@sophia.inria.fr  
Tél : 04 92 38 71 88  
Fax : 04 97 15 53 95

**CHALOIN Laurent**

CPBS - UMR5236  
Institut de Biologie - 4 Boulevard Henri IV  
cs69033  
34965 Montpellier  
Email : laurent.chaloin@cpbs.cnrs.fr  
Tél : 04 67 60 02 31  
Fax : 04 67 60 44 20

**CHERFILS Jacqueline**

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales  
Bâtiment 34, CNRS, Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Email : cherfils@lebs.cnrs-gif.fr  
Tél : 01 69 82 34 77  
Fax : 01 69 82 31 29

**COLLOC'H Nathalie**

Ci-NAPS UMR 6232 - UCBN - CNRS - CEA  
Centre Cyceron  
boulevard Becquerel  
14074 Caen  
Email : colloch@cyceron.fr  
Tél : 02 31 47 01 32  
Fax : 02 31 47 02 22

**DA COSTA Grégory**

Équipe de RMN structurale et métabolique GESVAB  
INRA-Domaine de la Grande Ferrade Batiment IBVM  
71, avenue Edouard Bourleaux BP 81  
33883 Villenave d'Ornon  
Email : gregory.dacosta@u-bordeaux2.fr  
Tél : 05 57 12 27 09  
Fax : 05 57 12 27 17

**DECLERCK Nathalie**

Centre de Biochimie Structurale  
INSERM 554- CNRS 5048  
29 rue de Navacelles  
34090 Montpellier  
Email : nathalie@cbs.cnrs.fr  
Tél : 04 67 41 79 11  
Fax : 04 67 41 79 13

**DESSEN Andrea**

Institut de Biologie Structurale  
41 rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble  
Email : andrea.dessen@ibs.fr  
Tél : 04 38 78 95 90  
Fax : 04 38 78 54 94

**DOMANOV Yegor**

PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168)  
Institut Curie  
11, rue Pierre et Marie Curie  
75231 Paris  
Email : yegor.domanov@curie.fr  
Tél : 01 56 24 69 52  
Fax : 01 40 51 06 36

**DREYFUS Tom**

2004 route des Lucioles  
06902 Sophia Antipolis  
Email : tom.dreyfus@inria.fr  
Tél : 04 92 38 50 84

**DRIN Guillaume**

IPMC  
660, rte des Lucioles  
06560 Valbonne- Sophia Antipolis  
Email : drin@ipmc.cnrs.fr  
Tél : 04 93 95 77 72

**DUMAS Fabrice**

IPBS, 205 route de Narbonne  
31077 Toulouse  
Email : dumas@ipbs.fr  
Tél : 05 61 17 54 68  
Fax : 05 61 17 59 94

**DUPONT Sébastien**

laboratoire GPMA  
1, esplanade Erasme  
21000 Dijon  
Email : sebastien.dupont@u-bourgogne.fr  
Tél : 03 80 77 40 97

**DUPORTAIL Guy**

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie  
UMR 7213 du CNRS  
Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg  
BP 60024  
67401 Illkirch  
Email : guy.duportail@unistra.fr  
Tél : 06 07 26 11 02  
Fax : 03 68 85 43 13

**EBEL Christine**

Institut de Biologie Structurale  
UMR5075 CEA-CNRS-UJF  
41, rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble  
Email : christine.ebel@ibs.fr  
Tél : 04 38 78 95 70  
Fax : 04 38 78 54 94

**ENGLAND Patrick**

Institut Pasteur  
Plate-forme de Biophysique des Macromolécules  
et de leurs Interactions  
25 rue du Docteur Roux  
75015 Paris  
Email : patrick.england@pasteur.fr  
Tél : 01 44 38 94 74

**FAVARD Cyril**

Equipe Mosaic - Institut Fresnel  
UMR 6133 CNRS-Universités Aix Marseille  
Campus de Saint Jérôme, av. Escadrille Normandie  
13397 Marseille  
Email : cyril.favard@fresnel.fr  
Tél : 04 91 28 80 84  
Fax : 04 91 28 80 67

**FIESCHI Franck**

Institut de Biologie Structurale  
41 rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble  
Email : franck.fieschi@ibs.fr  
Tél : 04 38 78 91 77  
Fax : 04 38 78 54 94

**FRANCO Michel**

660, route des Lucioles  
06560 Valbonne  
Email : franco@ipmc.cnrs.fr  
Tél : 04 93 95 77 70  
Fax : 04 93 95 77 08

**GARNIER Norbert**

Centre de Biophysique Moléculaire  
rue Charles Sadron  
45071 Orléans  
Email : norbert.garnier@cnrs-orleans.fr  
Tél : 02 38 25 76 68

**GENDRIN Claire**

Equipe de Pathogénicité Bactérienne  
41 rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble  
Email : claire.gendrin@ibs.fr  
Tél : 04 38 78 93 77  
Fax : 04 38 78 54 94

**GENEST Monique**

CBM-CNRS  
Rue Charles Sadron  
45071 Orléans  
Email : m.genest@cnrs-orleans.fr  
Tél : 02 38 25 55 68  
Fax : 02 38 63 15 17

**GERBEAU-PISSOT Patricia**

17 rue Sully  
UMR PME batiment CMSE  
21065 Dijon  
Email : pgerbeau@u-bourgogne.fr  
Tél : 03 80 69 34 59  
Fax : 03 80 69 37 53

**GOBEAUX Frédéric**

iBiTec-S, SB2SM CNRS URA 2096  
Batiment 532, CEA-Saclay  
91191 Gif-sur-Yvette  
Email : frederic.gobeaux@cea.fr  
Tél : 01 69 08 67 49

**GUÉROIS Raphaël**

LBSR - Batiment 144 - point courrier 22  
iBiTecS  
CEA Saclay  
91191 Gif-sur-Yvette  
Email : guerois@cea.fr  
Tél : 01 69 08 67 17  
Fax : 01 69 08 47 12

**GUIGLIARELLI Bruno**

Bioénergétique et Ingénierie des Protéines - BIP  
UPR9036  
CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier  
13402 Marseille  
Email : guigliar@ifr88.cnrs-mrs.fr  
Tél : 04 91 16 45 67  
Fax : 04 91 16 40 97

**HASCHKA Thomas**

35 rue des Blancs-Manteaux  
c/o Sarfati  
75004 Paris  
Email : haschka@gmail.com  
Tél : 06 88 95 76 51

**JAFFIOL Rodolphe**

Laboratoire de Nanotechnologie et d'Instrumentation Optique  
Univ. de Technologie de Troyes  
12 rue Marie Curie, BP2060  
10010 Troyes  
Email : rodolphe.jaffiol@utt.fr  
Tél : 03 25 71 85 27  
Fax : 93 25 71 84 56

**JFTIC Jelena**

ENSCR UMR CNRS 6226  
Avenue du Général Leclerc  
35700 Rennes  
Email : jelena.jftic@ensc-rennes.fr  
Tél : 02 23 23 80 34  
Fax : 02 23 23 80 46

**KIEFFER Bruno**

Groupe de RMN  
IGBMC  
1, rue Laurent Fries  
67400 Illkirch  
Email : kieffer@igbmc.fr  
Tél : 03 68 85 47 22  
Fax : 03 68 85 47 18

**KOCHOYAN Michel**

Centre de Biochimie Structurale  
29 rue de Navacelles  
34090 Montpellier  
Email : michel.kochoyan@cbs.cnrs.fr  
Tél : 04 67 41 79 05  
Fax : 04 67 41 79 13

**LACOMBE Catherine**

Unité de Biorhéologie  
Faculté de Médecine Pierre et Marie CURIE  
91 boulevard de l'Hôpital  
75013 Paris  
Email : catherine.lacombe@upmc.fr  
Tél : 01 40 77 96 00

**LAIGLE Alain**

21 rue de la Convention  
75015 Paris  
Email : alain.laigle@upmc.fr  
Tél : 01 77 13 79 91

**LANDON Céline**

Centre de Biophysique Moléculaire  
CNRS CBM UPR4301  
rue Charles Sadron  
45071 Orléans  
Email : celine.landon@cnrs-orleans.fr  
Tél : 02 38 25 55 74  
Fax : 02 38 63 15 17

**LE RUMEUR Elisabeth**

UMR CNRS 6026 - Equipe RMN-ILP  
Faculté de Médecine, CS 34317  
35043 Rennes  
Email : elisabeth.lerumeur@univ-rennes1.fr  
Tél : 02 23 23 46 27  
Fax : 02 23 23 46 06

**LETELLIER Lucienne**

IBBMC, UMR 8619  
Université Paris Sud  
Centre d'Orsay, Bat 430  
91405 Orsay  
Email : lucienne.letellier@u-psud.fr  
Tél : 01 69 15 64 29  
Fax : 01 69 85 37 15

**LIONNE Corinne**

CPBS  
Institut de Biologie (CS69033)  
4 bd Henri IV  
34965 Montpellier  
Email : corinne.lionne@cpbs.cnrs.fr  
Tél : 04 67 60 05 95  
Fax : 04 67 60 44 20

**LORENZI Magali**

31 chemin joseph aiguier  
BIP-UPR9036  
13402 Marseille  
Email : mlorenzi@ifr88.cnrs-mrs.fr  
Tél : 04 91 16 46 10  
Fax : 04 91 16 40 97

**LUTON Frédéric**

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire  
CNRS UMR6097  
660, route des Lucioles  
06560 Valbonne  
Email : luton@ipmc.cnrs.fr  
Tél : 04 93 95 77 70  
Fax : 04 93 95 77 10

**MALOD-DOGNIN Noël**

INRIA Sophia-Antipolis, A.B.S,  
2004 route des Lucioles,  
BP 93  
06902 Sophia-Antipolis  
Email : noel.malod-dognin@sophia.inria.fr  
Tél : 04 92 38 75 63  
Fax : 04 92 38 53 95

**MARGUET Didier**

Centre d'immunologie de Marseille Luminy  
Parc Scientifique de Luminy  
Case 906  
13288 Marseille  
Email : marguet@ciml.univ-mrs.fr  
Tél : 04 91 26 91 28  
Fax : 04 91 26 95 30

**MASCALCHI Patrice**

205 route de Narbonne  
31077 Toulouse  
Email : mascali@ipbs.fr  
Tél : 05 61 17 59 40

**MILHIET Pierre-Emmanuel**

Centre de Biochimie Structurale  
UMR5048 CNRS, UMR554 INSERM  
29, rue de Navacelles  
34090 Montpellier  
Email : pem@cbs.cnrs.fr  
Tél : 04 67 41 79 17  
Fax : 04 67 41 79 13

**MOHRBACH Hervé**

8 bis rue du Centre  
57140 Plesnois  
Email : mohrbach@univ-metz.fr  
Tél : 06 12 59 63 63

**MORERA Solange**

LEBS UPR3082 CNRS  
1 av de la terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette  
Email : morera@lebs.cnrs-gif.fr  
Tél : 01 69 82 34 70  
Fax : 01 69 82 31 29

**MUS-VETEAU Isabelle**

IBDC, Université de Nice-Sophia Antipolis  
Bat recherche Sciences Naturelles 4e niveau  
Parc Valrose  
06108 Nice  
Email : isabelle.mus-veteau@unice.fr  
Tél : 04 92 07 68 71  
Fax : 04 92 07 68 34

**NARDECCHIA Ilaria**

33 rue nau  
13006 Marseille  
Email : i.nardecchia@gmail.com  
Tél : 06 67 78 86 48

**NEMOZ Maud**

CRHEA-CNRS  
Rue B Grégory  
06220 Vallauris  
Email : mn@crhea.cnrs.fr  
Tél : 04 93 95 43 29  
Fax : 04 93 95 83 61

**PAJOT-AUGY Edith**

INRA-NOeMI  
Bat Biotechnologies (440)  
Domaine de Vilvert  
78350 Jouy-en-Josas  
Email : edith.pajot@jouy.inra.fr  
Tél : 01 34 65 25 63  
Fax : 01 35 65 22 41

**PATERNOSTRE Maité**

URA 2096  
iBiTec-S/SB<sup>2</sup>SM  
Bat. 532, DEA-SAclay  
91191 Gif-sur-Yvette  
Email : maite.paternostre@cea.fr  
Tél : 01 69 08 67 49  
Fax : 01 69 08 43 89

**PAYET Linda**

LAMBE, Batiment Maupertius, Université d'Evry  
91000 Évry  
Email : linda.payet@univ-evry.fr  
Tél : 01 69 47 76 25

**PETTINI Marco**

Centre de physique théorique  
Campus de Luminy  
13288 Marseille  
Email : marco.pettini@gmail.com  
Tél : 04 91 26 95 24  
Fax : 04 91 26 95 53

**PHAM Thi Thu Hanh**

UMR CNRS 8612 (2e étage, D209)  
Centre d'Études Pharmaceutiques  
5 rue J.B. Clément  
92296 Chatenay-Malabry  
Email : thi-thu-hanh.pham@u-psud.fr  
Tél : 01 46 83 55 80

**PORTAIS Jean-Charles**

LISBP/INSA 135 Avenue de Rangueil  
31077 Toulouse  
Email : jean-charles.portais@insa-toulouse.fr  
Tél : 05 61 55 96 89  
Fax : 05 61 55 96 89

**PRETO Jordane**

Résidence "Les Estudines" app. A103  
Rue Antoine Bourdelle  
Colline de Luminy  
13009 Marseille  
Email : preto@cpt.univ-mrs.fr  
Tél : 06 20 13 90 31

**PREUX Olivier**

Bât 430 - Université de Paris-Sud 11  
91405 Orsay  
Email : olivier.preux1@u-psud.fr  
Tél : 01 69 15 48 34

**RECEVEUR-BRÉCHOT Véronique**

IMR - CNRS UPR3243  
31 chemin Joseph Aiguier  
13402 Marseille  
Email : veronique.brechot@ibsm.cnrs-mrs.fr  
Tél : 04 91 16 45 01  
Fax : 04 91 16 45 40

**REGIS FARO Aline**

41 Rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble  
Email : aline.regis-faro@ibs.fr  
Tél : 04 38 78 67 23  
Fax : 04 38 78 51 22

**RENOUARD Madalena**

Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire  
Bât 430 - Université de Paris-Sud 11  
91405 Orsay  
Email : madalena.renouard@u-psud.fr  
Tél : 01 69 15 63 70  
Fax : 01 69 85 37 15

**ROBERT Bruno**

CEA Saclay  
Bâtiment 532  
91191 Gif-sur-Yvette  
Email : bruno.robert@cea.fr  
Tél : 01 69 08 90 15

**ROMET-LEMONNE Guillaume**

LEBS - bâtiment 34  
CNRS, avenue de la Terrasse  
91190 Gif-sur-Yvette  
Email : romet@lebs.cnrs-gif.fr  
Tél : 01 69 82 34 66  
Fax : 01 69 82 31 29

**RONZON Frédéric**

Sanofi PASTEUR  
Bâtiment X3  
1541 avenue Marcel Mérieux  
69280 Marcy l'Étoile  
Email : frederic.ronzon@sanofipasteur.com  
Tél : 04 37 37 04 46

**ROSAZZA Christelle**

schulthaißstraße 10  
78462 Konstanz  
Allemagne  
Email : christelle.rosazza@uni-konstanz.de  
Tél : +4917649673564

**ROUGER Vincent**

Centre d'Immunologie de Marseille Luminy  
Parc Scientifique et Technologique de Luminy  
163, Avenue de Luminy  
Case 906  
13288 Marseille  
Email : rouger@ciml.univ-mrs.fr  
Tél : 04 91 26 91 26  
Fax : 04 91 26 95 30

**ROYER Catherine**

CBS  
29 rue de Navacelles  
34090 Montpellier  
Email : catherine.royer@cbs.cnrs.fr  
Tél : 04 67 41 79 02  
Fax : 04 67 41 79 13

**SAINT-PIERRE CHAZALET Michèle**

ANBIOPHY CNRS FRE 3207-UPMC  
Genopole campus 1  
5 rue H. Desbruères  
91030 Évry  
Email : michele.saint-pierre@upmc.fr  
Tél : 06 71 60 70 35  
Fax : 01 46 83 55 57

**SALOMÉ Laurence**

IPBS-CNRS  
205, route de Narbonne  
31077 Toulouse  
Email : laurence.salome@ipbs.fr  
Tél : 05 61 17 59 39  
Fax : 05 61 17 59 94

**SCHWILLE Petra**

TU Dresden  
BIOTEC  
Tatzberg 47-51  
01309 Dresden  
Allemagne  
Email : schwille@biotec.tu-dresden.de  
Tél : +49-351-4634032  
Fax : +49-351-4634034

**SEKSEK Olivier**

ANBIOPHY CNRS FRE 3207 - UPMC  
Genopole campus 1  
5, rue H. Desbruères  
91030 Évry  
Email : olivier.seksek@upmc.fr  
Tél : 01 69 87 43 55  
Fax : 01 69 87 43 60

**SENILLE Violette**

Centre de Biophysique Moléculaire  
CNRS CBM UPR4301  
rue Charles Sadron  
45071 Orléans  
Email : violette.senille@cnrs-orleans.fr  
Tél : 02 38 25 55 74  
Fax : 02 38 63 15 17

**SERGÉ Arnaud**

CIML  
Case 906  
Université de la Méditerranée  
13009 Marseille  
Email : serge@ciml.univ-mrs.fr  
Tél : 04 91 26 91 27  
Fax : 04 91 26 91 69

**SIMON Anne**

Université Lyon 1 - ICBMS UMR 5246  
Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques  
et Assemblages Supramoléculaires  
Bâtiment CPE- Curien  
43, boulevard du 11 Novembre 1918  
69622 Villeurbanne  
Email : anne.simon@univ-lyon1.fr  
Tél : 04 72 44 82 14  
Fax : 04 72 44 79 70

**SIZUN Christina**

ICSN  
Avenue de la Terrasse, bât 23B  
91190 Gif-sur-Yvette  
Email : sizun@icsn.cnrs-gif.fr  
Tél : 01 69 82 36 78

**TALY Antoine**

Laboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux  
UMR 7199 Conception et Application de Molecules Bio-  
actives  
Faculté de Pharmacie-UDS  
74 Route du Rhin  
67401 Illkirch  
Email : a.taly@unistra.fr  
Tél : 03 68 85 41 66  
Fax : 03 68 85 43 06

**TÉLETCHÉA Stéphane**

1 rue Gaston Veil  
Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse  
INSERM U957, Université de Nantes EA3822  
Bureau 150  
44035 Nantes  
Email : stephane.teletchea@univ-nantes.fr  
Tél : 02 40 41 29 60  
Fax : 02 40 41 28 60

**TROMBIK Tomasz**

Centre d'Immunologie de Marseille Luminy  
Parc Scientifique et Technologique de Luminy  
163, Avenue de Luminy  
Case 906  
13288 Marseille  
Email : trombik@ciml.univ-mrs.fr  
Tél : 04 91 26 91 27  
Fax : 04 91 26 94 30

**VILLERET Vincent**

IRI Parc CNRS de la Haute Borne  
50 avenue de Halley  
59658 Villeneuve d'Ascq  
Email : [vincent.villeret@iri.univ-lille1.fr](mailto:vincent.villeret@iri.univ-lille1.fr)  
Tél : 06 86 51 30 32

**WADE Fallou**

INRA, Bât. Biotechnologies  
Domaine de Vilvert  
78350 Jouy-en-Josas  
Email : [fallou.wade@jouy.inra.fr](mailto:fallou.wade@jouy.inra.fr)  
Tél : 01 34 65 25 63  
Fax : 01 34 65 22 41

**WEIK Martin**

Laboratoire de Biophysique Moléculaire  
Institut de Biologie Structurale  
41, rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble  
Email : [weik@ibs.fr](mailto:weik@ibs.fr)  
Tél : 04 38 78 95 69  
Fax : 04 38 78 54 94

**WINCKLER Pascale**

Laboratoire de Nanotechnologie et d'Instrumentation Optique  
Université de technologie de Troye  
12, rue Marie Curie  
BP 2060 - cedex  
10010 Troyes  
Email : [pascale.winckler@utt.fr](mailto:pascale.winckler@utt.fr)  
Tél : 03 25 75 97 24  
Fax : 03 25 71 84 56

**ZAMBRANO PINEDA Nebraska Katherinne**

24, rue du Faubourg Saint Jacques  
Centre for Research and Interdisciplinarity (CRI)  
75014 Paris  
Email : [nebraska.zambrano@etu.parisdescartes.fr](mailto:nebraska.zambrano@etu.parisdescartes.fr)  
Tél : 06 42 36 34 93

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Éditorial</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Programme</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Communications orales</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Interactions hôte-pathogène</b>  | <b>11</b> |
| Reconnaissance cellulaire par des pathogènes bactériens : une étude structurale<br><i>C. Manzano, T. Izoré, C. Contreras-Martel, L. El Mortaji, A. M. Di Guilmi et A. Dessen</i> . . . . .  | 11        |
| 1 <sup>ère</sup> défensine d'œuf : caractérisation, synthèse, structure<br><i>H. Meudal, V. Herve-Grepinet, V. Labas, A. Delmas, Y. Nys et C. Landon</i> . . . . .  | 11        |
| A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by a structure-function analysis of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Atu2422<br><i>S. Planamente, A. Vigouroux, S. Mondy, M. Niçaise, D. Faure et S. Moréra</i> . . . . .  | 12        |
| Apports de la biophysique structurale pour sonder l'architecture et les propriétés fonctionnelles du système de sécrétion à deux partenaires (TPS) chez les bactéries pathogènes<br><i>B. Clantin, A.-S. Delattre, N. Saint, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson et V. Villeret</i> . . . . .        | 12        |
| The parasitophorous vacuole of <i>Toxoplasma gondii</i> : characterization of the membrane tubulation mechanism induced by the GRA2 protein<br><i>A. Bittame, G. Effantin, E. Gentilhomme, E. Marechal, M. Jamin, W. Weissenhorn, M.-F. Cesbron-Delauw, J. Gagnon et C. Mercier</i> . . . . . | 13        |
| Analyse biophysique des étapes de la formation de la capsid d'un virus bactérien<br><i>O. Preux, A. Huet, J. Conway, P. Vachette, D. Durand et P. Boulanger</i> . . . . .   | 13        |
| <b>Conférence plénière</b>  | <b>17</b> |
| Creating to understand: the virtue of bottom-up biology<br><i>P. Schwille</i> . . . . .   | 17        |
| <b>Mécanique de la membrane et du cytosquelette</b>   | <b>21</b> |
| Manipulation et dynamique de filaments individuels d'actine<br><i>A. Jégou, M.-F. Carlier et G. Romet-Lemonne</i> . . . . .   | 21        |
| Organisation ultrastructurale des filaments de septine de <i>S. Cerevisiae</i> , analysée <i>in vitro</i> et <i>in situ</i> par microscopie électronique<br><i>A. Bertin, M. McMurray, L. Thai, G. Garcia, J. Thorner et E. Nogales</i> . . . . .   | 21        |
| Protein and lipid lateral diffusion on artificial lipid nanotubes<br><i>Y. Domanov, S. Aimon, M. Renner, A. Triller et P. Bassereau</i> . . . . .   | 22        |
| Sensing membrane curvature with ALPS motifs<br><i>B. Antonny, G. Drin, J. Bigay, R. Gautier, V. Morello, J.-F. Casella, H. Barelli, M. de Saint Jean et P. Gounon</i> . . . . .   | 22        |
| R11-15, domaine de la dystrophine humaine et membrane : interactions et organisation modulées par le Lipid Packing<br><i>J. Sarkis, E. Robert, E. Le Rumeur, V. Vié et J.-F. Hubert</i> . . . . .   | 23        |
| Distribution de la microfluidité membranaire à l'échelle de la cellule unique<br><i>P. Winckler, R. Jaffiol, R. Deturche, H. Morjani, P. Jeannesson et P. Royer</i> . . . . .   | 23        |
| Le rôle du cytosquelette dans les mécanismes de l'électrotransfert de gène<br><i>C. Rosazza, J.-M. Escoffre, A. Zumbusch et M.-P. Rols</i> . . . . .  | 24        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Signalisation, compartimentation et interactions moléculaires</b>  | <b>27</b> |
| Denaturing an intrinsically disordered protein<br><i>G. W. Daughdrill, A. Stancik, G. Helms et V. Receveur-Bréchet</i> . . . . .  | 27        |
| Contrôle du diamètre de nanotubes peptidiques par échange de contre-ions<br><i>F. Gobeaux, N. Fay, C. Tarabout, M. Ligeti, D. Buisson, J.-C. Cintrat, K. M. H. Nguyen, C. Valéry, F. Artzner et M. Paternostre</i> . . . . .  | 27        |
| Spot variation FCS reveals differential membrane association kinetics for Ras isoforms<br><i>T. Trombik, V. Ruprecht, S. Mailfert, F. Conchonaud, C. Billaudeau, O. Wurtz, A. Boned, G. Schutz, Y. Henis, S. Wieser et D. Marguet</i> . . . . .                                     | 28        |
| Mécanisme d'activation des récepteurs P2X2 : Identification d'un mouvement couplé à la fixation d'ATP par modélisation moléculaire<br><i>A. Taly, D. Lemoine, R. Jiang, A. Martz, S. Gonin et T. Grutter</i> . . . . .  | 28        |
| Translocation of p47phox from a soluble to a membrane-bound state: molecular mechanism of NADPH oxidase activation upon phosphorylation<br><i>J. Marcoux, P. Man, I. Petit-Haertlein, C. Vivès, E. Forest et F. Fieschi</i> . . . . .   | 29        |
| The membrane dynamics of the EGF receptor and its signal integration using holographic optical tweezers<br><i>V. Rouger, S. Mailfert, F. Belloni, S. Monneret et D. Marguet</i> . . . . .   | 29        |
| Dynamic organization of HIV co-receptors in the membrane of immune cells: a single molecule analysis<br><i>P. Mascalchi, F. Dumas, B. Lagane, F. Bachelier, A. Lopez et L. Salomé</i> . . . . .   | 30        |
| Mammalian olfactory receptors : GPCRs exhibiting a functionality outside lipid rafts<br><i>G. Sanz, M.-A. Persuy, J. Vidic, F. Wade, C. Péchoux, S. Chat, S. Lobasso, R. Angelini, R. Monnerie, A. Corcelli et E. Pajot-Augy</i> . . . . .  | 30        |
| <br>  |           |
| <b>Lipidomique et métabolomique</b>   | <b>33</b> |
| La fluxomique : un outil d'exploration fonctionnelle des systèmes métaboliques<br><i>J.-C. Portais</i> . . . . .  | 33        |
| <br>  |           |
| <b>Nouveaux outils et concepts</b>  | <b>37</b> |
| Assessing the stability of protein complexes within large assemblies<br><i>F. Cazals et T. Dreyfus</i> . . . . .  | 37        |
| Étude de la perturbation et de la dissociation par la pression d'une enzyme tétramérique, l'urate oxydase<br><i>E. Girard, S. Marchal, J. Perez, S. Finet, R. Kahn, R. Fourme, G. Marassio, A.-C. Dhaussy, T. Prangé, R. Lange, J. Abraini, M. Mezouar et N. Colloc'h</i> . . . . . | 37        |
| Are experimental tests possible about the existence of long range interactions of the Fröhlich type between biomolecules?<br><i>M. Pettini</i> . . . . .  | 38        |
| Real time imaging of the growth of amyloid-like fibrils using high speed atomic force microscopy<br><i>P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieux, J.-M. Verdier, S. Marchal et T. Ando</i> . . . . .  | 38        |
| Single molecule studies of seven transmembrane receptors<br><i>O. Berthoumieu, H. Attrill et A. Watts</i> . . . . .   | 39        |
| Spectroscopie RPE et sondes paramagnétiques : de nouvelles stratégies pour la biologie structurale<br><i>V. Belle, M. Martinho, M. Lorenzi, G. Gerbaud, H. Vezin, F. Carriere, S. Longhi, J. Strancar, A. Fournel et B. Guigliarelli</i> . . . . .                                  | 39        |
| Échantillonnage conformationnel du site actif d'un récepteur par dynamique moléculaire sous contrainte : application au récepteur PPAR-gamma<br><i>S. Aci-Sèche, N. Garnier, D. Genest, S. Bourg, C. Marot, L. Morin-Allory et M. Genest</i> . . . . .                              | 40        |
| Padron: a fluorescent protein with a positive photo-switching mechanism<br><i>A. Regis Faro, P. Carpentier, D. Bourgeois et P. Dedeker</i> . . . . .  | 40        |
| <br>  |           |
| <b>Expression génique</b>   | <b>43</b> |
| Dynamic assembly of proteins: characterization, prediction and design<br><i>G. Faure, A. Gaubert, F. Ochsenbein et R. Guérois</i> . . . . .   | 43        |
| Cell-by-cell quantification of catabolite repression in <i>Bacillus subtilis</i> by Number and Brightness Analysis<br><i>M. Ferguson, D. Le Coq, M. Jules, C. Clerté, S. Aymerich, C. Royer et N. Declerck</i> . . . . .  | 43        |
| Doigts de zinc et deubiquitination de la chromatine<br><i>Y.-H. Wang, J. Bonnet, A. Atkinson, C. Romier, A. Hamiche, L. Tora, D. Devys et B. Kieffer</i> . . . . .  | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Communications par affiches</b>  | <b>47</b> |
| <b>Interactions hôte-pathogène</b>  | <b>49</b> |
| The parasitophorous vacuole of <i>Toxoplasma gondii</i> : characterization of the membrane tubulation mechanism induced by the GRA2 protein<br><i>A. Bittame, G. Effantin, E. Gentilhomme, E. Marechal, M. Jamin, W. Weissenhorn, M.-F. Cesbron-Delauw, J. Gagnon et C. Mercier</i> . . . . . | 49        |
| Biochemical and biophysical studies of RalF, a pathogenic regulator hijacking the human cellular traffic GTPases<br><i>V. Campanacci, M. Zeghouf, A. Delprato, P. Ray, C. R. Roy, B. Antonny et J. Cherfils</i> . . . . .   | 49        |
| Effect of the beta-propiolactone treatment on the adsorption and fusion of A/H1N1 influenza virus on a mixed phospholipids DMPC/GM3 monolayer at the air-water interface<br><i>B. Desbat, E. Lancelot, M. C. Nicolai, F. Vogel, M. Chevalier et F. Ronzon</i> . . . . .                       | 50        |
| Hijacking of the pleiotropic cytokine interferon- $\gamma$ by the type III secretion system of <i>Yersinia pestis</i><br><i>C. Gendrin, S. Sarrazin, D. Bonnaffé, J.-M. Jault, H. Lortat-Jacob et A. Dessen</i> . . . . .   | 50        |
| Assemblage <i>in vitro</i> de la capsid d'un virus bactérien<br><i>A. Huet, J. Conway, L. Letellier, O. Preux, D. Durand, P. Vachette et P. Boulanger</i> . . . . .   | 51        |
| 1 <sup>ère</sup> défensine d'œuf : caractérisation, synthèse, structure<br><i>H. Meudal, V. Herve-Grepinet, V. Labas, A. Delmas, Y. Nys et C. Landon</i> . . . . .  | 51        |
| A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by a structure-function analysis of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Atu2422<br><i>S. Planamente, A. Vigouroux, S. Mondy, M. Niçaise, D. Faure et S. Moréra</i> . . . . .  | 52        |
| Analyse biophysique des étapes de la formation de la capsid d'un virus bactérien<br><i>O. Preux, A. Huet, J. Conway, P. Vachette, D. Durand et P. Boulanger</i> . . . . .   | 52        |
| <b>Mécanique de la membrane et du cytosquelette</b>   | <b>55</b> |
| Impact of simultaneous thermal and osmotic treatments on the plasma membrane and the survival of yeast<br><i>L. Beney, S. Dupont, H. Simonin et P. Gervais</i> . . . . .  | 55        |
| Organisation ultrastructurale des filaments de septine de <i>S. Cerevisiae</i> , analysée <i>in vitro</i> et <i>in situ</i> par microscopie électronique<br><i>A. Bertin, M. McMurray, L. Thai, G. Garcia, J. Thorner et E. Nogales</i> . . . . .   | 55        |
| Structure of phospholipid bilayers from yeast membranes incorporating mammalian olfactory receptors (ORs) from X-ray, neutron and light scattering experiments<br><i>G. Brotons, G. Sanz, M.-A. Persuy et E. Pajot-Augy</i> . . . . .   | 56        |
| Protein and lipid lateral diffusion on artificial lipid nanotubes<br><i>Y. Domanov, S. Aimon, M. Renner, A. Triller et P. Bassereau</i> . . . . .   | 56        |
| Membrane fusion is spatially controlled by modification of phosphoinositides<br><i>F. Dumas, R. Byrne, B. Vincent, L. Salome, D. Poccia et B. Larijani</i> . . . . .  | 57        |
| Kinetic of dehydration affects lateral membrane organization and cell survival<br><i>S. Dupont, P. Gervais et L. Beney</i> . . . . .  | 57        |
| Comparative effects of sterol depletion on purified fractions- and native- plasma membrane of tobacco cells<br><i>P. Gerbeau-Pissot, I. Anca, D. Thomas, C. Der, Y. Roche et F. Simon-Plas</i> . . . . .  | 58        |
| Le rôle du cytosquelette dans les mécanismes de l'électrotransfert de gène<br><i>C. Rosazza, J.-M. Escoffre, A. Zumbusch et M.-P. Rols</i> . . . . .  | 58        |
| R11-15, domaine de la dystrophine humaine et membrane : interactions et organisation modulées par le Lipid Packing<br><i>J. Sarkis, E. Robert, E. Le Rumeur, V. Vié et J.-F. Hubert</i> . . . . .   | 59        |
| Distribution de la microfluidité membranaire à l'échelle de la cellule unique<br><i>P. Winckler, R. Jaffiol, R. Deturche, H. Morjani, P. Jeannesson et P. Royer</i> . . . . .   | 59        |
| <b>Signalisation, compartimentation et interactions moléculaires</b>  | <b>63</b> |
| A biomimetic system for the reconstitution of membrane mitochondrial proteins<br><i>M. Allouche, J. Chopineau, S. Bayle, D. Hide, J. L. Robert, O. Sharaf Edein et C. Brenner</i> . . . . .   | 63        |
| Effect of Protoporphyrin IX-mediated photosensitization on the cellular adhesion visualized by RICM<br><i>P. Araujo Santos, C. Marques, A. Schroder, A. Uchôa Fernandes et M. Silva Baptista</i> . . . . .  | 63        |
| An unfolding model for the GDP/GTP conformational switch of the small GTPase Arf6<br><i>J. Cherfils, V. Biou, K. Aizel, M. Zeghouf, V. Buosi, A. Thureau, E. Jacquet, E. Guittet, C. van Heijenoort, P. Roblin et J. Perez</i> . . . . .  | 64        |

|  |    |
|--|----|
| Denaturing an intrinsically disordered protein<br><i>G. W. Daughdrill, A. Stancik, G. Helms et V. Receveur-Bréchet</i> . . . . .   | 64 |
| Contrôle du diamètre de nanotubes peptidiques par échange de contre-ions<br><i>F. Gobeaux, N. Fay, C. Tarabout, M. Ligeti, D. Buisson, J.-C. Cintrat, K. M. H. Nguyen, C. Valéry, F. Artzner et M. Paternostre</i> . . . . .                           | 65 |
| Direct kinetic evidence for the essential role of Lys 215 in the phospho-transfer catalyzed by human 3-phosphoglycerate kinase<br><i>C. Lionne, P. Lallemand, A. Varga, M. Vas, T. Barman et L. Chaloin</i> . . . . .                                  | 65 |
| Kes1p is structurally designed to transport sterol from a curved to a PI(4)P-containing membrane<br><i>M. Magdeleine, D. Douguet, B. Antonny et G. Drin</i> . . . . .  | 66 |
| Translocation of p47phox from a soluble to a membrane-bound state: molecular mechanism of NADPH oxidase activation upon phosphorylation<br><i>J. Marcoux, P. Man, I. Petit-Haertlein, C. Vivès, E. Forest et F. Fieschi</i> . . . . .                  | 66 |
| Dynamic organization of HIV co-receptors in the membrane of immune cells: a single molecule analysis<br><i>P. Mascacchi, F. Dumas, B. Lagane, F. Bachelerie, A. Lopez et L. Salomé</i> . . . . .   | 67 |
| Stability study of the human G-Protein Coupled Receptor, smoothened<br><i>R. Nehmé, O. Joubert, B. Lacombe, M. Bidet, B. Pucci et I. Mus-Veteau</i> . . . . .  | 67 |
| Elucidation of the self-assembly pathway of Lanreotide octapeptide into beta-sheet nanotubes: role of two stable intermediates<br><i>M. Paternostre, F. Artzner, E. Pouget, N. Fay, C. Valéry, T. Rose, D. Tomas et E. Dujardin</i> . . . . .          | 68 |
| Translocation d'ADN simples brins et dépliement de protéines à travers un nanopore<br><i>L. Payet, M. Martinho, M. Pastoriza-Gallego, J.-M. Betton, V. Viasnoff, L. Auvray, J. Pelta et J. Mathé</i> . . . . .   | 68 |
| Padron: a fluorescent protein with a positive photo-switching mechanism<br><i>A. Regis Faro, P. Carpentier, D. Bourgeois et P. Dedeker</i> . . . . .   | 69 |
| The membrane dynamics of the EGF receptor and its signal integration using holographic optical tweezers<br><i>V. Rouger, S. Mailfert, F. Belloni, S. Monneret et D. Marguet</i> . . . . .  | 69 |
| Mammalian olfactory receptors : GPCRs exhibiting a functionality outside lipid rafts<br><i>G. Sanz, M.-A. Persuy, J. Vidic, F. Wade, C. Péchoux, S. Chat, S. Lobasso, R. Angelini, R. Monnerie, A. Corcelli et E. Pajot-Augy</i> . . . . .             | 70 |
| Étude du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaline, une protéine pro-apoptotique<br><i>V. Senille, O. Delalande, S. Villette, D. Gosset, M. Dubois, A. Legrand, D. Lelievre, A. Delmas et C. Landon</i> . . . . .                            | 70 |
| Structure du co-facteur M2-1 de la polymérase du virus RSV et interactions au sein du complexe polymérase<br><i>C. Sizun, V. Dubosclard, M.-L. Blondot, F. Bontems et J.-F. Eleouet</i> . . . . .  | 71 |
| Mécanisme d'activation des récepteurs P2X2 : Identification d'un mouvement couplé à la fixation d'ATP par modélisation moléculaire<br><i>A. Taly, D. Lemoine, R. Jiang, A. Martz, S. Gonin et T. Grutter</i> . . . . .                                 | 71 |
| Spot variation FCS reveals differential membrane association kinetics for Ras isoforms<br><i>T. Trombik, V. Ruprecht, S. Mailfert, F. Conchonaud, C. Billaudeau, O. Wurtz, A. Boned, G. Schutz, Y. Henis, S. Wieser et D. Marguet</i> . . . . .        | 72 |
| Bioluminescence Resonance Energy Transfer studies demonstrate Constitutive and Specific Homo-oligomerization of a Mammalian Olfactory Receptor<br><i>F. Wade, A. Espagne, M.-A. Persuy, R. Monnerie, F. Merola, E. Pajot-Augy et G. Sanz</i> . . . . . | 72 |

**Lipidomique et métabolomique** **75**

|   |    |
|---|----|
| Development of antileishmanial lipidic nanocomplexes<br><i>H. Pham, G. Barratt, P. M. Loiseau et M. Saint-Pierre Chazalet</i> . . . . . | 75 |
|---|----|

**Nouveaux outils et concepts** **79**

|   |    |
|---|----|
| Échantillonnage conformationnel du site actif d'un récepteur par dynamique moléculaire sous contrainte : application au récepteur PPAR-gamma<br><i>S. Aci-Sèche, N. Garnier, D. Genest, S. Bourg, C. Marot, L. Morin-Allory et M. Genest</i> . . . . .          | 79 |
| Spectroscopie RPE et sondes paramagnétiques : de nouvelles stratégies pour la biologie structurale<br><i>V. Belle, M. Martinho, M. Lorenzi, G. Gerbaud, H. Vezin, F. Carriere, S. Longhi, J. Strancar, A. Fournel et B. Guigliarelli</i> . . . . .              | 79 |
| Single molecule studies of seven transmembrane receptors<br><i>O. Berthoumieu, H. Attrill et A. Watts</i> . . . . .   | 80 |
| Mise au point d'inhibiteurs anti-déphosphorylation par criblage virtuel : aide dans la lutte contre les résistances aux traitements thérapeutiques<br><i>S. Blanc, P. Lallemand, J. Viguier, L. P. Jordheim, C. Dumontet, C. Lionne et L. Chaloin</i> . . . . . | 80 |

|   |            |
|---|------------|
| Micellar and biochemical properties of (hemi)fluorinated surfactants are controlled by the size of the polar head<br><i>C. Breyton, F. Gabel, M. Ablu, Y. Pierre, F. Lebaupain, G. Durand, J.-L. Popot, C. Ebel et B. Pucci</i> . . . . .   | 81         |
| Assessing the stability of protein complexes within large assemblies<br><i>F. Cazals et T. Dreyfus</i> . . . . .  | 81         |
| Enzyme at work: Kinetic crystallography on acetylcholinesterase<br><i>J.-P. Colletier, B. Sanson et M. Weik</i> . . . . .   | 82         |
| Étude de la perturbation et de la dissociation par la pression d'une enzyme tétramérique, l'urate oxydase<br><i>E. Girard, S. Marchal, J. Perez, S. Finet, R. Kahn, R. Fourme, G. Marassio, A.-C. Dhaussy, T. Prangé, R. Lange, J. Abraini, M. Mezouar et N. Colloc'h</i> . . . . . | 82         |
| Studies of lipid order and apoptosis of cell plasma membranes using new fluorescent probes<br><i>A. S. Klymchenko, S. Oncul, Z. Darwich, O. A. Kucharak, Y. Mély et G. Duportail</i> . . . . .  | 83         |
| Marquage de spin de la protéine chaperon NarJ : Étude structurale par RPE et rôle dans la biogenèse de la Nitrate réductase d' <i>Escherichia coli</i><br><i>M. Lorenzi, G. Gerbaud, L. Sylvi, M. Mure, A. Magalon, H. Vezin, V. Belle et B. Guigliarelli</i> . . . . .             | 83         |
| Real time imaging of the growth of amyloid-like fibrils using high speed atomic force microscopy<br><i>P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieux, J.-M. Verdier, S. Marchal et T. Ando</i> . . . . .  | 84         |
| Interactions et structure de peptides avec les petites vésicules unilamellaires<br><i>L. Mouret, G. da Costa, B. Legrand, J.-P. Monti et A. Bondon</i> . . . . .  | 84         |
| Interactions et structure de peptides avec les petites vésicules unilamellaires<br><i>L. Mouret, G. da Costa, B. Legrand, J.-P. Monti et A. Bondon</i> . . . . .  | 85         |
| Apprehending cell topology for extended Multi-Target Tracing in 3D<br><i>A. Sergé, V. Rouger, E. Barthelet, N. Bertaux et D. Marguet</i> . . . . .  | 85         |
| Imagerie cellulaire à haute résolution spatiale<br><i>P. Winckler, R. Jaffiol, J. Plain et R. Pascal</i> . . . . .  | 86         |
| “Old pole” proteins tracking by correlative imaging in <i>E. Coli</i><br><i>N. Zambrano, S. Marco, F. Taddei et A. Lindner</i> . . . . .  | 86         |
| <b>Expression génique</b>   | <b>89</b>  |
| Cell-by-cell quantification of catabolite repression in <i>Bacillus subtilis</i> by Number and Brightness Analysis<br><i>M. Ferguson, D. Le Coq, M. Jules, C. Clerté, S. Aymerich, C. Royer et N. Declerck</i> . . . . .  | 89         |
| Doigts de zinc et deubiquitination de la chromatine<br><i>Y.-H. Wang, J. Bonnet, A. Atkinson, C. Romier, A. Hamiche, L. Tora, D. Devys et B. Kieffer</i> . . . . .  | 89         |
| <b>Index des auteurs</b>  | <b>93</b>  |
| <b>Liste des participants</b>   | <b>99</b>  |
| <b>Table des matières</b>   | <b>107</b> |