



Etude biochimique et structurale du complexe b6f, du complexe membranaire de translocation de la voie Sec et du complexe FhuA-pb5.

Cécile Breyton

► To cite this version:

Cécile Breyton. Etude biochimique et structurale du complexe b6f, du complexe membranaire de translocation de la voie Sec et du complexe FhuA-pb5.. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Denis Diderot, Paris 7, 2008. <tel-01297976>

HAL Id: tel-01297976

<http://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01297976>

Submitted on 12 Jul 2016

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

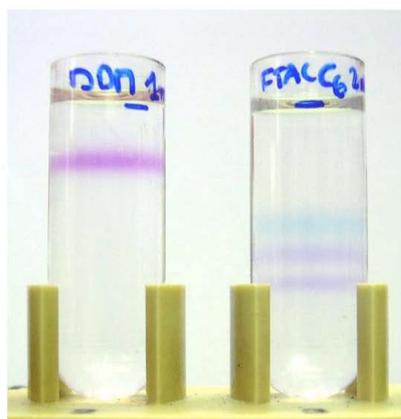
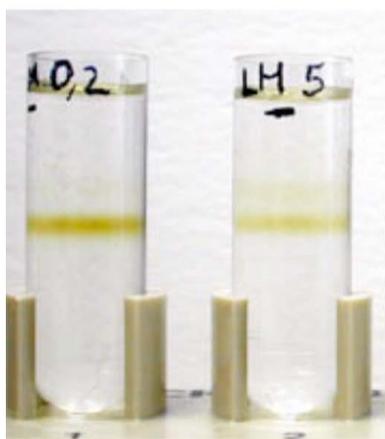
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Denis Diderot, Paris 7
UFR Science du Vivant
2008

Habilitation à diriger des recherches

Etude biochimique et structurale du complexe b6f,
du complexe membranaire de translocation de la
voie Sec et du complexe FhuA-pb5

Cécile Breyton



Soutenue le 14 Octobre 2008 devant le jury composé de :

Prof. Cathy Etchebest
Dr. Lucienne Letellier
Prof. Marc le Maire
Dr. Maïté Paternostre
Dr. Jean-Luc Popot

Rapporteure
Rapporteure
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur

IBPC Physico-chimie moléculaire des membranes biologiques
CNRS UMR 7099 – Université Paris

En couverture : Gradients 10-30% saccharose de b_{cf} en 0,2 et 5 mM DDM (gauche) et de bactériorhodopsine en 1mM DDM et 2mM F-TAC (droite). 4h de centrifugation à 200.000 g dans le rotor TLS55 de la TL100.

TABLE DES MATIERES

CURRICULUM VITAE	6
FORMATION UNIVERSITAIRE ET TITRES.....	6
ACTIVITÉ DE RECHERCHE – TONCTIONS SUCCESSIVES.....	7
PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	7
<i>Articles.....</i>	7
<i>Communications.....</i>	10
Conférences invitées dans des congrès	10
Séminaires invités.....	10
Communications à des congrès et symposia.....	12
ENCADREMENT ET ENSEIGNEMENT	14
<i>Encadrement d'étudiants.....</i>	14
<i>Accueil de jeunes au laboratoire</i>	15
<i>Enseignement annuel</i>	15
DIVERS	16
<i>Responsabilités collectives</i>	16
<i>Travaux d'expertise :</i>	16
<i>Collaborations récentes (et envisagées)</i>	17
<i>Participation à des contrats de recherche :</i>	18
ACTIVITÉ DE RECHERCHE.....	20
INTRODUCTION	20
A. TRAVAUX ANTÉRIEURS.....	25
I. <i>Etude biochimique et structurale du complexe b_f.....</i>	25
1. Biochimie du complexe cytochrome b_f	26
2. Etude des supercomplexes de la chaîne photosynthétique	29
3. Etude structurale du complexe cytochrome b_f	31
II. <i>Etude structurale du complexe membranaire de translocation de la voie Sec.....</i>	35
B. TRAVAUX ACTUELS ET PERSPECTIVES	38
I. <i>Développement de nouveaux tensioactifs fluorés.....</i>	38
1. Lien étroit entre physico-chimie et biochimie.....	40
a. Nouvelles molécules, physico-chimie et impact sur la biochimie	40
b. Interaction tensioactif fluoré – protéine membranaire.....	43
2. Développement des applications des tensioactifs fluorés pour la biochimie des protéines membranaires	43
a. Manipulation des protéines membranaires dans leur état natif.....	43
b. Renaturation de protéines membranaires.....	44
c. Réinsertion de protéines membranaires dans des membranes lipidiques préformées ..	45
d. Etude structurale de protéines membranaires	46
II. <i>Etude structurale du complexe FhuA-pb5.....</i>	46
1. Etude structurale de pb5 et du complexe FhuA-pb5	49
2. Interaction pb5-pb2	49
CONCLUSION.....	50
BIBLIOGRAPHIE	50
ANNEXES : SÉLECTION DE 5 ARTICLES.....	58
RÉSUMÉ.....	61

Je remercie tous les membres, présents et anciens, pour l'ambiance vraiment chouette qui règne au laboratoire, et le plaisir que j'ai à venir travailler tous les matins, plaisir en partie liée à leur présence. Je remercie particulièrement Edith, parce qu'elle est l'âme du labo. Je ne sais trouver les mots pour remercier Daniel pour ses conseils, son soutien, sa patience, le partage de ses connaissances, et sa disponibilité.

CURRICULUM VITAE

Cécile Breyton

Née le 2 novembre 1970 (37 ans)
à Bourgoin-Jallieu (Isère)
Mariée, 1 enfant

Adresse personnelle:
7, cité Dupetit-Thouars
75003 Paris
Tel : 01 42 17 02 52
Courriel : Cecile.Breyton@neuf.fr

Adresse professionnelle :

UMR-7099 CNRS-Université Paris-7,
Institut de Biologie Physico-Chimique
13, rue P. et M. Curie
F-75005 Paris – France
Tel: +33 1 58 41 51 04
Fax: +33 1 58 41 50 24
Courriel: Cecile.Breyton@ibpc.fr

FORMATION UNIVERSITAIRE ET TITRES

- 2004 : Chargée de recherche première classe, CNRS.
- 2001 : Chargée de recherche deuxième classe, CNRS UMR 7099, IBPC.
- 1999 : Qualification maître de conférence, Section 64^{ème}
- 1997-2000 : Stage Post-Doctoral dans le laboratoire de Werner Kühlbrandt.
- 1997 : Prix Nine Choucroune décerné par l'IBPC.
- 1997 : Doctorat de l'Université Paris 6. Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire. Mention Très Honorable avec les Félicitations du Jury.
- 1993 : DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Prof. P. Cohen, Paris VI.
- 1992 : Magistère de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Lyon I-ENS Lyon.
- 1990 : Intégration de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon.
- 1988-90 : Préparation Mathématiques Supérieures et Spéciales Biologie, Lycée Saint Louis, Paris.

ACTIVITE DE RECHERCHE – TONCTIONS SUCCESSIVES

- Depuis 2001 : UMR 7099 CNRS-Université Paris 7 (Dir. J.-L. Popot) IBPC
Etude biochimique et structurale de protéines membranaires.
- 1997-2001 : Bourse Post-Doctorale EMBO (2 ans), et Max Planck (1 an)
Laboratoire de Biologie structurale (Dir. W. Kühlbrandt)
Max-Planck Institut für Biophysik, Francfort
Apprentissage des techniques de microscopie et cristallographie
électronique.
Etude de cristaux 2D de *b₆f* et détermination de la structure 3D de SecYEG
à 8Å de résolution.
- 1993-96 : Allocation couplée Recherche-Monitorat (Bourse de thèse du MENRT)
Préparation de Thèse sous la direction de J.-L. Popot, IBPC
« Contribution à l'étude structurale et fonctionnelle du complexe
cytochrome *b₆f* de chaîne photosynthétique de *C. reinhardtii* »
- 1992-93 : DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Prof. P. Cohen, Paris VI.
Stage à l'IBPC, dans le laboratoire de P. Joliot
« Caractérisation du mode d'interaction entre la protéine de Rieske et le
complexe *b₆f* des membranes de thylacoïde de l'algue verte unicellulaire *C.
reinhardtii* »
- Juin-Juillet 91 : Stage de maîtrise dans le labo de C. Paoletti, Institut Gustave Roussy
« Inhibition des Topoisomérases I et II par les Tyrphostines »

Production scientifique

Articles

19 articles, 1 revue (n° 10), 1 contribution aux cahiers d'une école thématique du CNRS
(n° 16), 2 articles dans des proceedings de congrès (n° 20 et 21)

* : auteur correspondant.

1. An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*.
Pierre Cardol, Benjamin Bailleul, Fabrice Rappaport, Evelyne Dérelle, Daniel Béal, Cécile Breyton, Shaun Bailey, Francis Andre Wollman, Arthur Grossman, Herve Moreau et Giovanni Finazzi, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **105**, 7881-7886, 2008
2. Lactobionamide surfactants with hydrogenated, perfluorinated or hemifluorinated tails:
physical-chemical and biochemical characterization.
Florence Lebaupain, Andrés Salvay, Blandine Olivier, Grégory Durand, Anne-Sylvie Fabiano, Nicoals Michel, Jean-Luc Popot, Christine Ebel*, Cécile Breyton*, Bernard Pucci*, *Langmuir* **22**, 8881-90, 2006 – En annexe –

3. Fluorinated and hemifluorinated surfactants derived from maltose: synthesis and application to handling membrane proteins in aqueous solution.
Ange Polidori, Marc Passet, Florence Lebaupain, Bruno Ameduri, Jean-Luc Popot, Cécile Breyton*, Bernard Pucci*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 5827-31, 2006
4. Redox modulation of cyclic electron flow around Photosystem I in C3 plants
Cécile Breyton, Beena Nandha, Giles N. Johnson, Pierre Joliot et Giovanni Finazzi, *Biochemistry.* **45**, 13465-75, 2006 – En annexe –
5. Hemifluorinated surfactants : a non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions ?
Cécile Breyton, Elodie Chabaud, Yann Chaudier, Bernard Pucci, Jean-Luc Popot, *FEBS Lett.* **564**, 312-318, 2004
6. AFM characterisation of tilt and intrinsic flexibility of *Rhodobacter sphaeroides* light harvesting complex 2 (LH2)
Simon Sheuring, Jérôme Seguin, Sergio Marco, Daniel Lévy, Cécile Breyton, Bruno Robert et Jean-Louis Rigaud, *J. Mol. Biol.* **325**, 569-580, 2003
7. Three-dimensional structure of SecYEG, the bacterial protein translocation core complex.
Cécile Breyton*, Winfried Haase, Tom Rapoport, Werner Kühlbrandt et Ian Collinson, *Nature*, **418**, 662-665, 2002 – En annexe –
8. Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase
Ian Collinson, Cécile Breyton, Franck Duong, Christos Tziatzios, Dieter Schubert, Eran Or, Tom Rapoport et Werner Kühlbrandt, *EMBO J.* **20**, 2462-2471, 2001
9. Conformational changes in the cytochrome *b₆f* complex induced by inhibitor binding.
Cécile Breyton*, *J. Biol. Chem.* **275**, 13195-13201, 2000 – En annexe –
10. The cytochrome *b_f* complex : structural studies and comparison with the *bc₁* complex.
Cécile Breyton*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 467-474, 2000
11. Kinetics effects of the proton gradient on plastoquinone reduction at the Q_i site of the cytochrome *b₆f* complex.
Romina P. Barbagallo, Cécile Breyton, et Giovanni Finazzi, *J. Biol. Chem.* **275**, 26121-26127, 2000
12. On the arrangement of hemes and chlorophylles in the cytochrome *b₆f* dimer : geometrical constraints deduced from linear and circular dichroism spectra.
Barbara Shoepf, Elodie Chabaud, Cécile Breyton, André Verméglio, et Jean-Luc Popot, *J. Biol. Chem.* **275**, 5275-5283, 2000
13. Projection structure of cytochrome *b₆f* complex determined by electron crystallography
Patrick Bron, Jean-Jacques Lacapère, Cécile Breyton, et Gervaise Mosser, *J. Mol. Biol.* **287**, 117-126, 1999.
14. Dimer to monomer conversion of the cytochrome *b₆f* complex : causes and consequence

Cécile Breyton, Christophe Tribet, Jacqueline Olive, Jean-Paul Dubacq et Jean-Luc Popot, *J. Biol. Chem.* **272**, 21892-21900, 1997 – En annexe –

15. On the presence, role and evolutionary origin of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome *b₆f* complex
Yves Pierre, Cécile Breyton, Bruno Robert, Claudie Vernotte, et Jean-Luc Popot, *J. Biol. Chem.* **272**, 21901-21908, 1997
16. Introduction à l'utilisation des détergents pour l'étude des protéines membranaires : extraction, manipulation en solution, reconstitution, cristallisation
Cécile Breyton et Jean-Luc Popot, Cahiers de l'école thématique Biologie Végétale des Houches, juin 1997
17. Projection map of cytochrome *b₆f* complex at 8 Å resolution
Gervaise Mosser, Cécile Breyton, Anders Olofsson, Jean-Luc Popot, et Jean-Louis Rigaud, *J. Biol. Chem.* **272**, 20263-20268, 1997
18. The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a small, functionally important subunit of the cytochrome *b₆f* complex
Yuichiro Takahashi, Michèle Rahire, Cécile Breyton, Jean-Luc Popot, Pierre Joliot, et Jean-David Rochaix, *EMBO J.* **15**, 3498-3506, 1996
19. The 4-kDa nuclear encoded PetM polypeptide of the chloroplast cytochrome *b₆f* complex: nucleic acid and protein sequences, targeting signals, transmembrane topology
Catherine de Vitry, Cécile Breyton, Yves Pierre, et Jean-Luc Popot, *J. Biol. Chem.* **271**, 10667-10671, 1996
20. Molecular weight and state of association of the purified *b₆f* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*
Cécile Breyton, Christophe Tribet, Jacqueline Olive, Michel Recouvreux et Jean-Luc Popot, Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1995
21. Purification and composition of the cytochrome *b₆f* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*
Jean-Luc Popot, Yves Pierre, Cécile Breyton, Yves Lemoine, Yuishiro Takahashi et Jean-David Rochaix, Photosynthesis: from light to biosphere. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1995
22. Purification and characterisation of the cytochrome *b₆f* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*
Yves Pierre, Cécile Breyton, David Kramer, et Jean-Luc Popot, *J. Biol. Chem.* **270**, 29342-29349, 1995
23. Membrane association of cytochrome *b₆f* subunits : the Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii* is an extrinsic protein.
Cécile Breyton, Catherine de Vitry, et Jean-Luc Popot, *J. Biol. Chem.* **269**, 7597-7602, 1994

Communications

Conférences invitées dans des congrès

- 1-6 septembre 2002 : 15th International congress on electron microscopy. Durban, Afrique du Sud
" 3D structure of the bacterial core protein translocase at 8Å resolution "
- 6-15 août 2002 : XIX Congress of the international assembly of the international union of crystallography. Genève, Suisse
" 3D structure of the bacterial core protein translocase at 8Å resolution "
- 26-31 mai 2002 : Gordon Research Conference " Ligand recognitions and Molecular gating " Il Ciocco, Italie
" 3D structure of the bacterial core protein translocase at 8Å resolution "
- 3-6 Juillet 2001 : Congrès de l'association française de cristallographie, Orsay, France
" Structure du complexe membranaire de translocation Sec à 8Å de résolution déterminé par cryo-microscopie électronique "
- 18-22 novembre 2000 : Conférence Jacques Monod : 'Structure et Fonction de la Photosynthèse Oxygénique', Roscoff, France
" Conformational changes in the cytochrome b_6f complex induced by inhibitor binding. "
- 9-14 septembre 2000 : 11th European Bioenergetics Conference (EBEC) Brighton Angleterre,
" The cytochrome b_6f complex : structural studies and comparison with the bc_1 complex "
- 12-16 février 2000 : 44th Annual Meeting of the Biophysical Society, la Nouvelle Orléans, USA
" Conformational changes in the cytochrome b_6f complex induced by inhibitor binding "
- 7-11 Juin 1998 : Conférence Jacques Monod 'Regulation of photosynthesis', Aussois, France
" Projection map of the cytochrome b_6f complex determined by cryo-electron crystallography "
- 8-10 Octobre 1997 : SFB, Molecular bioenergetics, Mauloff, Allemagne
" The cytochrome b_6f complex, structural and functional studies "
- 23-24 Juin 1997 : Colloque de Photosynthèse, Paris, France
" Le complexe cytochrome b_6f : détermination de sa masse moléculaire et délipidation et présence d'une mystérieuse chlorophylle "

Séminaires invités

- Lors de l'atelier « Cristallisation des protéines membranaires » du GDR 2478, 26-29 Novembre 2007, Carry-le-Rouet : « Biochimie des protéines membranaires ou l'importance de la bonne concentration de détergent »
- Le 24 Mars 2006 : « Utilisation des tensioactifs hémifluorés pour la manipulation des protéines membranaires ». IBGC, Bordeaux
- Le 6 décembre 2005, lors d'une réunion du GDR 2611 : conférence plénière : « Insertion des protéines membranaires dans les membranes *in vivo* », Roscoff, France
- Le 25 octobre 2004, à l'atelier « Interaction protéine / protéine ou protéine / peptide dans les membranes ou les micelles » du GDR 2478 « : Manipulation des protéines membranaires : rappels sur l'utilisation des détergents », Saulieu, France
- Lors d'une réunion du GDR 2368 Cryomicroscopie électronique structurale en Janvier 2002, Gif-sur Yvette, France : « Structure 3D de la translocase bactérienne SecYEG à 8Å de résolution »
- IBPC, dans le cadre des séminaires « Membranes et molécules », le 18 décembre 2001 :
" Structure 3D de la translocase bactérienne SecYEG à 8Å de résolution "
- Max-Planck Institut Für Biophysik, le 13 décembre 2001 : « 8Å structure of SecYEG »
- Weizmann Institut, le 8 novembre 2001 : "8Å structure of SecYEG, a bacterial core protein translocase, determined by cryo-EM"
- Laboratoire de physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste, IBPC, le 10 Septembre 1999 : « Mouvements au sein du complexe *b_f* induits par la fixation de stigmatelline »
- Lors d'une réunion GDR 692 en Octobre 1999 à Erdeven : « Application de la microscopie électronique a la Biologie : exemple du cytochrome *b_f* »
- Lors d'une réunion GDR 692 en Octobre 1998 à Batz-sur-mer : « La cristallisation en deux dimensions : un équilibre délicat entre détergent, lipide, et protéine »
- New York University, le 5 Juin 1997 : "Study of a membrane protein : state of oligomerisation, causes leading to monomerisation and crystallisation of the cytochrome *b_f* complex"
- C.E.A. de Saclay, le 14 Mai 1997 : « Etude structurale et fonctionnelle du complexe *b_f* : état d'oligomérisation et délipidation, et présence d'une mystérieuse chlorophylle »
- Lors de l'école d'été sur les Membranes Végétales, les Houches, Mai 1997 :
« Purification, manipulation et cristallisation des protéines membranaires » (3h de cours).

Biocentrum de Bâle, le 27 Mars 1997 : "Study of a membrane protein : state of oligomerisation, causes leading to monomerisation and crystallisation of the cytochrome *b₆f* complex"

IBPC, le 9 Janvier 1997, soutenance de Thèse : « Contribution à l'étude structurale et fonctionnelle du complexe cytochrome *b₆f* »

Lors d'une réunion GDR 1082 en Janvier 1995 : « Une nouvelle approche biochimique pour l'étude des régions transmembranaires »

D.I.E.P., à Saclay le 14 novembre 1994 : « Une nouvelle approche biochimique pour l'étude des régions transmembranaires »

Communications à des congrès et symposia

25-29 Mars 2008 : Réunion plénière du GDR 2478 « Protéines membranaires : propriétés moléculaires dans des environnements amphiphiles », Praz-sur-Arly
Conférence : "Les tensioactifs fluorés : effets de la taille de la tête polaire"

19-21 Octobre 2007 : IMPS 2nd yearly meeting, Cambridge, Angleterre
Conférence : "Fluorinated surfactants : a study of the influence of the polar head size"

22-25 Juin 2004 : Congrès GTBio, Lyon, France
Affiche : Les tensioactifs hémifluorés, un nouvel outil pour manipuler les protéines membranaires en solution? Florence Lebaupain, Blandine Olivier, Grégory Durand, Bernard Pucci, Jean-Luc Popot et Cécile Breyton

26-29 Janvier 2003 : EMBO workshop on Molecular Genetics and Biophysical Aspects of Photosynthesis.
Affiche : " Hunting for supercomplexes of photosynthesis " Cécile Breyton, Alison Golding et Giovanni Finazzi

4-8 novembre 2001 : International conference on sequence, structure and function in membrane protein systems. Zichron Ya'acov, Israël
Affiche : 3D structure of SecYEG at 8Å resolution C. Breyton, W. Haase, I. Collinson et W. Kühlbrandt

24-29 juin 2001 : Gordon Research Conference " 3D-Electron microscopy " Bristol, Rhodes Island, USA
Affiche sélectionné pour une conférence orale : " 3D structure of the bacterial core protein translocase at 8Å resolution " C. Breyton, W. Haase, I. Collinson et W. Kühlbrandt

6-9 Février 2001 : Workshop on pumps, channels and transporters: structure and function, Madrid, Espagne
Affiche sélectionnée pour une conférence orale : " 3D structure of the bacterial core protein translocase at 9Å resolution " C. Breyton, I. Collinson, W. Haase et W. Kühlbrandt

19-24 Septembre 1999 : XIII International Biophysical Congress, New Delhi, Inde

- Affiche* : " Large conformational changes induced by inhibitor binding in the cytochrome *b₆f* complex. " Cécile Breyton et Werner Kühlbrandt
- 20-25 Juin 1999 : Gordon Research Conference "Three-dimensional electron microscopy of macromolecules", New England College, USA
Affiche : " Large conformational changes induced by inhibitor binding in the cytochrome *b₆f* complex " Cécile Breyton, Vinzenz Unger et Werner Kühlbrandt
- 7-11 Juin 1998 : Conférence Jacques Monod 'Regulation of photosynthesis', Aussois
Affiche : " Projection map of the cytochrome *b₆f* complex determined by cryo-electron crystallography " Patrick Bron, Jean-Jacques Lacapère, Cécile Breyton, Jean-Luc Popot et Gervaise Mosser
- 13-17 Juillet 1997 : Congrès Européen de Biophysique, Orléans, France
Affiche : " Characterisation of the structural and functional organisation of the cytochrome *b₆f* complex " Cécile Breyton et Jean-Luc Popot.
- 22-23 Avril 1997 : Rencontres Physique-Chimie-Biologie de la Montagne St Geneviève
Affiche : " Le complexe cytochrome *b₆f* de *Chlamydomonas reinhardtii* : détermination de sa masse moléculaire et étude de sa stabilité en solution détergente " Cécile Breyton et Jean-Luc Popot.
- 20-25 Juillet 1996 : FASEB Summer Research Conferences, Molecular Biophysics of Cellular Membranes, Saxton River, Vermont, USA
Affiche : " The *b₆f* complex : state of association, dimer to monomer transition and delipidation " Cécile Breyton, Christophe Tribet, Yves Pierre, Jacqueline Olive, Jean-Paul Dubacq et Jean-Luc Popot
- 21-22 Novembre 1994 : Association de la Montagne Sainte Geneviève, Colloque de Biologie Structurale, Paris, France
Affiche : " Cristallisation du complexe *b₆f* de *Chlamydomonas reinhardtii* " Gervaise Mosser, Anders Olofsson, et Jean-Louis Rigaud
Cécile Breyton, Daniel Picot, et Jean-Luc Popot
- 29-31 Mai 1995 : Euroconference on the experimental biology of *Chlamydomonas*, Amsterdam, Les Pays Bas
Affiche : " Structural characterisation of the cytochrome *b₆f* complex " Cécile Breyton, Yves Pierre, et Jean-Luc Popot
- 20-25 Août 1995 : Xème Congrès international de photosynthèse, Montpellier, France
3 *Affiches* : " The cytochrome *b₆f* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*: purification, polypeptide composition and state of association " Yves Pierre, Cécile Breyton, Christophe Tribet, Jacqueline Olive, et Jean-Luc Popot
" The 4-kDa chloroplast polypeptide of the cytochrome *b₆f* complex encoded by the nuclear PetX gene : nucleic acid and protein sequences, targeting signals, and membrane topology " Catherine de Vitry, Cécile Breyton, Yves Pierre, et Jean-Luc Popot

“ Crystallising the cytochrome *b₆f* complex from *Chlamydomonas reinhardtii* ” Gervaise Mosser, Jean-Jacques Lacapère, and Jean-Louis Rigaud, Cécile Breyton, Daniel Picot, et Jean-Luc Popot

21-22 Novembre 1994 : Association de la Montagne Sainte Geneviève, IIème Forum de Biologie, Interfaces Biologie, Chimie, Physique, Paris, France

Affiche : “ Purification et cristallisation d'une protéine membranaire intégrale, le cytochrome *b₆f* de *Chlamydomonas reinhardtii* ” Gervaise Mosser, Jean-Jacques Lacapère, et Jean-Louis Rigaud ; Cécile Breyton, Daniel Picot, et Jean-Luc Popot

6-7 Mai 1994 : Association de la Montagne Sainte Geneviève “ Des Films Moléculaires aux Biomembranes ”, Paris, France

Affiche : “ Membrane association of cytochrome *b₆f* subunits: the Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii* is an extrinsic protein ” Cécile Breyton, Catherine de Vitry, Yves Pierre, et Jean-Luc Popot

28 Juin-2 Juillet 1993 : Conférence Jacques Monod “ Protein-Protein Interaction in the Photosynthetic Apparatus ”, Aussois, France

Affiche : “ Membrane association of cytochrome *b₆f* subunits : the Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii* is an extrinsic protein ” Cécile Breyton, Catherine de Vitry, Yves Pierre, et Jean-Luc Popot

Encadrement et Enseignement

Encadrement d'étudiants

Février-Juillet 2008 : Ali Flayhan, étudiant en M2 SPGF, Paris 7. « Etude structurale du complexe FhuA-pb5 »

Juin 2004-Décembre 2007 : Florence Lebaupain, étudiante en thèse de l'école doctorale Inter // Bio. « Développement des applications des tensioactifs fluorés et hémifluorés pour la manipulation des protéines membranaires ».

Depuis l'automne 2006 : Tutrice de thèse de Szymon Jarolawski, Institut Curie, et de Paula Gonzalez-Rubio, Institut Curie, puis à l'EBGM,INSERM U726

Février-Juin 2004 : Florence Lebaupain, étudiante du DEA de Biophysique « Caractérisation biochimique des complexes protéine/HF-Lac en vue de leur étude structurale »

15 Mai- 15 Juillet 2004 : Nicolas Sisourat, étudiant en 2^{ème} année de magistère de physico-chimie « Etude d'un tensioactif hémifluoré à extrémité butyle (H₂F-Lac) pour la manipulation des protéines membranaires »

Juillet-septembre 2003 : Estelle Rousselet, étudiante de l'école de chimie de Grenoble « Etude d'un tensioactif hémifluoré (HF-Lac) pour la manipulation des protéines membranaires »

Janvier-Juin 2003: Participation à l'encadrement de Bruno Manas, étudiant de DEA de spectroscopie.

Juin-juillet 2002 : Jérémy Frandemiche, étudiant en 2^{ème} année de BTS de chimie. « Etude des potentialités d'un tensioactif hémifluoré (HF-AO) pour la manipulation des protéines membranaires »

Juillet-Août 1999 : Christian Mesters, étudiant en maîtrise "Effect of the redox potential on the conformation of the Rieske protein in 2D crystals of cytochrome *b_Lf* complex".

Pendant ma thèse : Accompagnement des premiers pas dans le labo de Yann Gohon et d'Elodie Chabaud étudiants en DEA, et des étudiants d'été.

Accueil de jeunes au laboratoire

Juin 2008 : Découverte du monde de l'entreprise, stage en labo d'une semaine, Laure Christiansen, élève de seconde.

Avril 2008 : Accueil de Anthony Ciredem et Maxime Borry, élèves de lycée dans le cadre du festival Paris-Montagne : visite du labo et expérimentation.

Avril 2007 : Stage d'une semaine de Joachim Lhabouz et de Cédric Dias, élèves de seconde, dans le cadre de la Science Ac'. "Détermination de la CMC du LDAO à différentes forces ioniques et différents pH par la méthode des gouttes".

Janvier 2007 : Découverte du monde de l'entreprise en une semaine, Antoine Gascoin, élève de troisième.

Juillet 2006 : Accueil d'élèves de lycée dans le cadre du festival Paris-Montagne : visite du labo et expérimentations par petits groupes.

5 mai 2004 : Accueil d'une classe de terminal scientifique : visite du labo et expérimentations par petits groupes.

Enseignement annuel

Organisation du Module (une semaine) M1-G1 de l'ENS Ulm : « Histoires de membranes : structure et dynamique »

Dans ce cadre, 3h: « Comment les protéines traversent-elles les membranes? Etude du translocon par microscopie électronique »

3h « Comment les protéines traversent-elles les membranes? Etude du translocon par microscopie électronique » 2^{ème} année d'école à AgrParisTech.

3h « Les protéines membranaires : manipulation et structure en vue d'appréhender la fonction » M2-Signalisation Cellulaire, Neurosciences de l'Université Paris 11.

2h « Les détergents » M2-Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Paris 6 et 7

1h « Introduction à la microscopie électronique » dans le cadre des matinées de biologie structurale de l'école doctorale INTER//BIO.

1h « Les particularités des protéines membranaires » Formation permanente INSERM/CNRS sur la biochimie et la biophysique des protéines

3h « La microscopie électronique » M1-Méthodes biophysiques d'étude des structures de macromolécules et de leurs interactions, Université Paris 7

3h « La microscopie électronique en biologie » en M1 de physique, option biophysique, Paris 6

Depuis l'an dernier :10h de cours magistraux dans le L3 de Biochimie de Paris 7, Structure de protéines, spectroscopies. Remplacement de Cathy Etchebest, Prof Paris 7 en délégation INSERM.

Co-organisation d'un atelier du GDR :
GDR 2478 "Protéines membranaires et assemblage colloïdaux"
Interactions protéines / protéines ou peptides dans les membranes et micelles.
Du 24 au 27 octobre 2004, Saulieu (Côte d'Or). 50 Participants.

Lors du monitorat 1994-97 : 96 h de TP et TD de Biochimie générale niveau DEUG, Université Paris 6.

1994-96 : Participation à l'enseignement du cours Pasteur, une semaine « Introduction à la manipulation des protéines membranaires », module organisé par J.-L. Popot.

Divers

Responsabilités collectives

Automne 2008 : Membre du jury de recrutement d'un Technicien pour le laboratoire.

Depuis 2007: Membre du conseil scientifique du groupe français de bioénergétique.

2003-06: Membre du conseil scientifique du GDR 2611 "Protéine membranaires et Spectrométrie de masse"

Depuis 2001: Responsable du cycle de séminaires "Membranes et Molécules" de l'IBPC.

Depuis 1997 : Sauveteur Secouriste du Travail, recyclage annuel.

Travaux d'expertise :

Septembre 2008 : Examinatrice de la thèse de Pierre Jacquot.

Juin 2008 : Examinatrice de la thèse de Jérôme Seguin, Inter//Bio

Janvier 2008 : Revue d'un papier de recherche soumis au "Journal of Biological Physics"

Mars 2006 : Revue d'un papier de recherche soumis à BBA

Juillet 2005 – Rapporteuse d'un stage de M1 en Microscopie Electronique à Londres pour un élève de l'ENS.

Juin 2004 – Revue d'une demande de contrat "Action concertée : Interface Physique-Chimie-Biologie : Dynamique et Réactivité des assemblages biologiques"

Mai 2004 - Revue d'un papier de recherche soumis à FEBS Lett

Avril 2004 – Revue d'une demande de contrat pour "The Israel Science Fondation"

Avril 2003 – Revue d'un dossier pour le prix de jeune chercheur en Biophysique

Septembre 2001 – Rapporteuse d'un stage de DEA de Neuropharmacologie en vue de l'obtention d'une bourse de thèse dans le cadre de l'Ecole doctorale 3C.

Collaborations récentes (et *envisagées)

Pascale Boulanger

Transports Membranaires de Macromolécules, UMR 8619, IBBMC, Université Paris 11
Etude cristallographique du complexe FhuA-pb5

Mohamed Chami

Biozentrum, Bâle, Suisse
Etude de cristaux 2D du complexe FhuA-pb5

Frank Wien

Synchrotron SOLEIL, ligne de lumière DISCO
Etude du changement de conformation lié à la liaison de FhuA à pb5 par SRCD

***Wolfram Welte**

Université de Constance, Allemagne
Etude cristallographique du complexe FhuA-pb5

***Miklos de Zamaroczy et Liliana Mora**

Import et mécanisme d'action des colicines, CNRS-UPR 9073, IBPC
Purification et la cristallisation de FepA en association avec la colicine D.

Bernard Pucci

Laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Organisés, Université d'Avignon.
Développement de nouveaux tensioactifs pour la biochimie des protéines membranaires
Publications n° 2, 3 et 4

Christine Ebel et Frank Gabel

Institut de Biologie Structurale, Grenoble
Etude physico-chimique des tensioactifs (hémi)fluorés
Publication n°2

***Véronique Peyre**

Laboratoire Electrochimie et Chimie Analytique UMR 7575, Université Paris 6
Etude de l'adsorption des tensioactifs (hémi)fluorés par potentiométrie

***Sophie Cribier**

UMR 7099 CNRS-Université Denis Diderot, Paris 7
Insertion des protéines membranaires dans des liposomes géants grâce aux tensioactifs (hémi)fluorés

Giles Jonhson

Faculty of Life Sciences, Manchester, Angleterre
Etude du transfert d'électron cyclique
Publication n°4

Giovanni Finazzi

UMR 7141, CNRS et Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
Biochimie des complexes photosynthétiques
Etude du photocycle de la BR en tensioactifs (hémi)fluorés
Publications n°1, 4 et 11

Simon Scheuring

Institut Curie
Etude de cristaux 2D du LHII
Publication n°6

Delphine Borgel

Laboratoire d'Hématologie, Université Paris 5
Etude de l'état d'oligomérisation de la protéine PS du sérum humain.

Participation à des contrats de recherche :

2007 – 2010 : ANR-PCV : "Tensioactifs fluorés et hémifluorés : un outils majeur pour l'analyse des protéines membranaires". Directrice d'équipe, en collaboration avec Bernard Pucci (Université d'Avignon) coordinateur, et Christine Ebel (IBS, Grenoble).

2006 – 2008 : Participation au contrat européen "Specific targeted research project" : "Inovative Tools for Membrane Structural Proteomics". Coordinateur : J.-L. Popot.

2002 – Contrat CNRS, Support aux jeunes chercheurs.

2001 – Contrat "Protéomique et Génie des Protéines" : "Surexpression, purification et cristallisation de Yor1p, un transporteur ABC membranaire de levure de type MRP. Etude et développement de détergent fluorés pour le stabilisation et la cristallisation de protéines membranaires".
Directrice d'équipe, en collaboration avec Pierre Falson (CEA Saclay).

1998-2000 : Contrat PROCOPE entre l'UMR 7099 et le labo de W. Kühlbrandt, « Etude des cristaux2D du b_f »

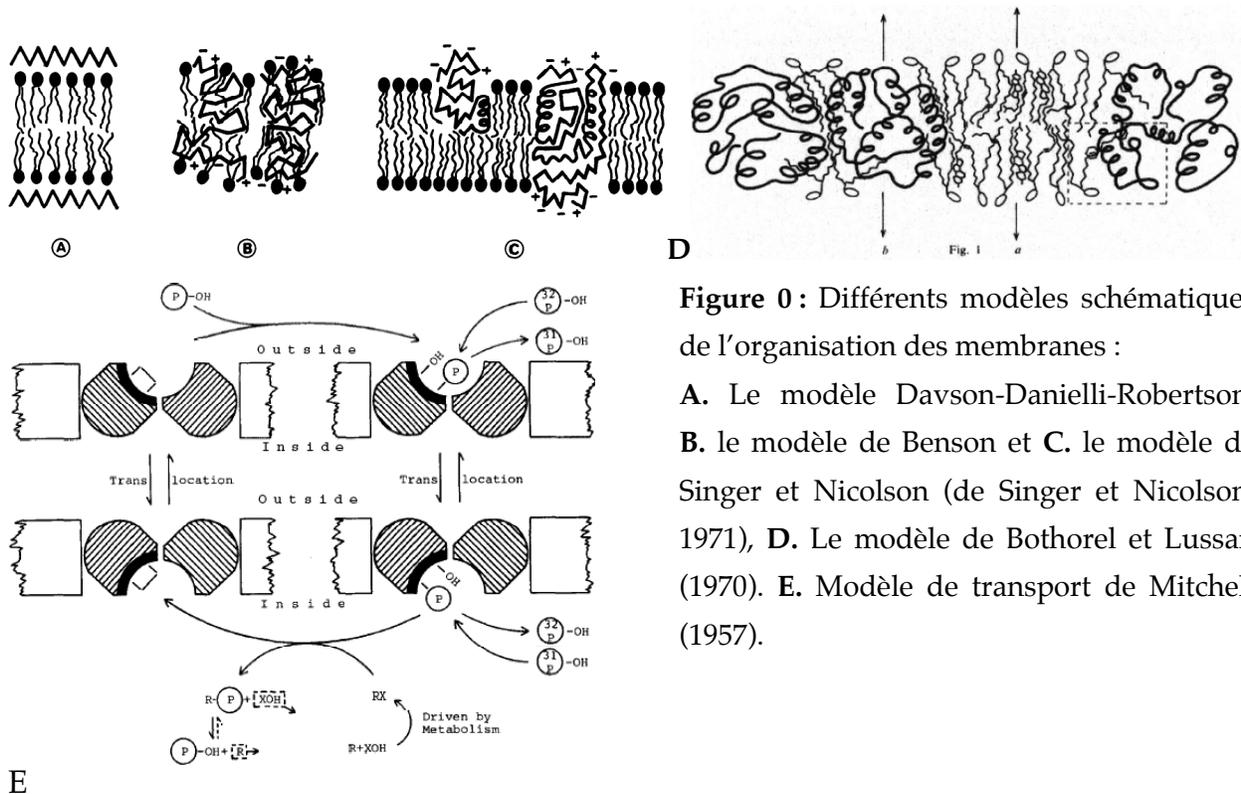
ACTIVITE DE RECHERCHE

Introduction

La structure en bicouche des lipides composant la membrane a été mise en évidence au début du 20^{ème} siècle par Gorter et Grendel qui observèrent que la surface en monocouche des lipides des érythrocytes était le double de celle de la membrane (Gorter et Grendel, 1925). En revanche, le mode d'interaction des protéines avec la bicouche était assez approximatif, et le modèle Danielli-Davson-Robertson proposait que les protéines membranaires seraient périphériques à la bicouche lipidique (Fig. 0A, Danielli et Davson, 1935, Robertson, 1957). Une meilleure compréhension du système vient en grande partie de l'étude des membranes bioénergétiques, pour lesquelles les scientifiques ont cherché à isoler les différentes enzymes de la respiration ou des « hypothétiques complexes protéine-pigments » de la photosynthèse. Jusque dans les années 50, les modes d'extraction sont assez approximatifs (utilisation de solvants organiques, de pH non physiologiques, de températures élevées...). Le premier article de biochimie « moderne », c-à-d utilisant des détergents non-ioniques, que j'ai trouvé concerne la solubilisation des chromatophores de *Rhodospseudomonas spheroides* par du Triton X-100, qui permet à l'auteur de séparer deux types de complexes protéine-pigment (Bril, 1958). Dans le cas des enzymes de la respiration, Ziegler et coll. en 1959 solubilisent les membranes de mitochondries avec du cholate afin de purifier la DPNH deshydrogénase. Il s'en suit une précipitation au sulfate d'ammonium, une extraction de la phase aqueuse par de l'éther, puis par de l'isooctane, et enfin la lyophilisation du gel dans lequel se retrouve (!) l'activité diaphorase ...

Avec *i*) une nouvelle interprétation des clichés de microscopie électronique de sections de membranes mitochondriales (*i.e.* Fernandez Moran et coll. 1964), *ii*) la notion de particules lipoprotéiques et l'importance de la « liaison hydrophobe » les liant aux membranes (Richardson et coll. 1963, Criddle et coll. 1961), et *iii*) l'importance de l'utilisation des détergents et de la présence de certains lipides pour la manipulation des « unités » (Griffiths et Wharton 1961, Horie et Morrison 1963, Sekusu et coll. 1963, Bruni et Racker 1968), les idées concernant l'interaction entre les protéines et les lipides évoluent : Green et Perdue, 1966 proposent que la membrane serait l'association

bidimensionnelle « d'unités lipoprotéiques répétées », dont les fonctions et la structure serait spécifique de chaque membrane. Ces unités peuvent être solubilisées par les sels biliaires, mais si ces derniers sont ôtés, les unités reforment spontanément la membrane (Benson arrive aux mêmes conclusions se basant sur ses travaux parallèles sur les membranes thylacoïdales, mais je n'ai pas accès à ses papiers, voir Anderson, 2007, Figure 0B). Les scientifiques qui s'intéressent alors au transport transmembranaire de solutés hésitent entre deux modèles, l'un d'entre eux proposant que les protéines catalysant le transport seraient transmembranaires (revue dans Pardee, 1968). Mitchell toutefois, en étudiant le transport des solutés de part et d'autre de la membrane, propose, sans se pencher sur l'organisation physico-chimique, que les protéines puissent prendre en charge des solutés polaires ou chargés au travers de la membrane (Figure 0E, Mitchell 1957)



Indépendamment, *i*) Wallach et Zahler (1966), en étudiant les propriétés optiques des protéines de la membrane de microsomes, *ii*) Branton (1966), en observant des membranes de thylacoïde par « freeze etching », *iii*) Lussan et Bothorel (1969), en considérant les rôles biologiques de la membrane et des protéines membranaires, *iv*) Reynolds et Tanford (1970), étendant leurs résultats de liaison de SDS aux protéines –

principalement dû à des forces hydrophobes – à l'interaction protéines membranaires/lipides au sein de la membrane, *v*) Vanderkooi et Sundaralingam (1970), qui examinent la membrane des bâtonnets de la rétine, et *vi*) Glaser et coll. (1970), suite à des observations sur l'effet de la température et de la phospholipase C sur les membranes d'érythrocytes, proposent que les protéines membranaires pourraient, sans grandement perturber la bicouche lipidique, la traverser en une région hydrophobe (qui pourrait délimiter une cavité intérieure polaire pour permettre le transport de solutés, contrôlé par la conformation de la protéine (Wallach et Zahler 1966)), bornée par deux régions hydrophiles en contact avec d'autres protéines, transmembranaires ou pas, les têtes des lipides et le compartiment aqueux. Singer et Nicolson, reprenant certains de ces résultats et se basant sur des considérations principalement thermodynamiques, conceptualisent et immortalisent le modèle de la mosaïque fluide (Fig. 0, Singer et Nicolson, 1971, Singer et Nicolson, 1972). La membrane serait une « solution visqueuse, orientée, bidimensionnelle, de protéines amphipathiques et de lipides en équilibre thermodynamique » (Singer et Nicolson, 1972). En 1975, Henderson et Unwin déterminent la structure de la membrane pourpre à 7Å de résolution par microscopie électronique (Henderson et Unwin, 1975) : la carte montre sept densités allongées, perpendiculaires au plan de la membrane, de 35-40Å de long, organisées en faisceau. Ces densités sont attribuées à sept hélices α transmembranaires du polypeptide de la bactériorhodopsine (BR). Les lipides en bicouche, localisés entre les trimères de BR et en leur centre, ne sont pas résolus, mais le modèle était démontré.

Parallèlement aux progrès concernant l'organisation de la membrane, la physico-chimie des protéines membranaires avance également à pas de géants : Helenius et Simons (1972), en mesurant la quantité de deoxycholate et de TritonX-100 liée à différentes protéines, membranaires ou non, observent que la quantité de détergent lié est proportionnel à la taille de la région transmembranaire et concluent que le détergent se lie à la place des lipides sur la surface hydrophobe des protéines. Makino et coll. (1973), observent que le deoxycholate ou le Triton X-100 se lient à l'albumine sans dénaturer cette dernière, contrairement à d'autres détergents anioniques : la notion de détergent « doux » était née. Quant à la biochimie des protéines membranaires, la purification des enzymes de la respiration et de la photosynthèse s'affine, avec l'utilisation de détergents « doux » (digitonine, Triton X100, dérivés de sels biliaries, CE,...), et avec des méthodes similaires à celle des protéines solubles, aboutissant à des

préparations plus pures et plus actives, permettant une caractérisation de plus en plus fine de la composition et du fonctionnement des complexes membranaires (voir par ex. Wainio, (1964) pour la cytochrome oxidase, ou Bengis et Nelson, (1975) pour les centres réactionnels).

Au début des années 80, les premiers cristaux tri-dimensionnels de protéines membranaires sont obtenus par les méthodes de cristallisation classiquement utilisées pour les protéines solubles : la BR solubilisée en octylglucoside (Michel et Oesterhelt, 1980), le centre réactionnel de *Rhodospseudomonas viridis* solubilisé en dodécyl-diméthyl-aminoxyde (Michel, 1982), et une porine trimérique en quatre détergents différents (Garavito et coll. 1983). Seuls les cristaux de centre réactionnel permettront la résolution de la structure de la protéine (Deisenhofer et coll. 1984, Deisenhofer et coll. 1985), confirmant une structure en faisceau d'hélices α auxquelles sont intimement liés les différents groupements prothétiques. Aucune molécule de détergent ou de lipide n'était résolue à l'époque, ne permettant pas de localiser la position de la membrane, mais la surface hydrophobe du faisceau d'hélice, la position des groupements prosthétiques et la connaissance de la fonction de la protéine suggèrent très fortement une topologie transmembranaire de la protéine. Suivront la structure de porines trimériques, en tonneau de 16 brins β antiparallèles et dont une grande boucle repliée au sein du tonneau explique la sélectivité (Weiss et coll. 1990, Weiss et coll. 1991, Cowan et coll. 1992), et de la prostaglandine synthétase, dont la structure suggère très fortement une topologie monotopique (en contact avec un seul feuillet de la bicouche) de la protéine (Picot et coll. 1994). Avec ces trois premières structures, étaient décrits les trois types de repliement des protéines membranaires.

Depuis lors toutefois, le dogme que les protéines transmembranaires se replient soit en faisceau d'hélices α , soit en tonneau β a été mise à mal par la résolution de structures telles les transporteurs de la membrane externe des bactéries (Ferguson et coll. 1998, Locher et coll. 1998), le canal potassique KcsA (Doyle et coll. 1998), les aquaporines (Murata et coll. 2000), le canal à chlore (Dutzler et coll. 2002), un homologue du transporteur du glutamate (Yernool et coll. 2004) etc, qui montrent qu'il suffit que les structures (α ou β) en contact avec les chaînes grasses des lipides soient « canoniques » pour assurer la stabilité de la protéine dans la bicouche lipidique, mais qu'à l'intérieur du faisceau ou du tonneau, la structure peut « s'adapter à la fonction de la protéine » en toute liberté.

Une structure intéressante est celle du photosystème I de cyanobactérie (Jordan et coll. 2001, d'autres exemples suivront) dans laquelle des lipides sont retrouvés à l'intérieur du faisceau d'hélices, faisant part entière de la structure protéique, en ligandant par exemple des chlorophylles. En cela, cette structure remet à l'ordre du jour le modèle de Benson (Fig. 0B, réfuté par Singer et Nicolson, 1971) proposant des sous-unités lipoprotéiques associées les unes aux autres), et rend aux lipides leurs lettres de noblesse dans la structure des protéines membranaires (voir par ex. Lee, 2003).

Depuis 1985, la quantité de structures de protéines membranaires déterminée a augmenté de façon exponentielle, un peu plus lentement que pour les protéines solubles en translatant à l'année de la première structure (White, 2004). Alors que dans ce dernier cas les progrès sont en grande partie liés à l'amélioration techniques dans l'obtention et le traitement des données, dans le cas des protéines membranaires il s'agit plutôt de surmonter des problèmes de quantité, de stabilité et de « cristabilité » des protéines. Le problème de la surexpression peut être illustré par le fait que jusqu'à 2005, les structures de protéines membranaires eucaryotes déterminées l'étaient exclusivement à partir de sources naturelles. Les problèmes de la surexpression situent au niveau *i)* de l'insertion dans la membrane des protéines surexprimées, *ii)* de leur toxicité potentielle pour la cellule hôte, *iii)* de leurs modifications post-traductionnelles, *iv)* de la composition en lipides de la membrane hôte,... (pour une revue sur la surexpression des protéines membranaires, voir Midgett et Madden, 2007). En ce qui concerne la stabilité des protéines membranaires, nous avons vu qu'un pré-requis pour les étudier était leur solubilisation en solution détergente. Très tôt, la présence de lipides pour la stabilité des protéines solubilisées en détergent est observée (voir par ex. Sekusu et coll. 1963). En effet, si les détergents se substituent aux lipides autour de la région transmembranaire afin d'extraire et de solubiliser les protéines des membranes, leur structure, leur dynamique, leurs propriétés physico-chimiques ne sont pas équivalentes à celle des lipides. En conséquence, les protéines membranaires sont souvent instables en solution détergentes, étant inactivées, dissociées, s'agrégeant, ce qui complique leur étude *in vitro* (pour des revues récentes, voir Rosenbusch, 2001, Gohon et Popot, 2003, Sanders et coll. 2004, Privé 2007). En outre, la présence du détergent dans les essais de cristallisation ajoute un paramètre de plus, et un paramètre loin d'être négligeable !

A mon arrivée en septembre 1993 au laboratoire de Photosynthèse de l'Institut de Biologie Physico-Chimique dans l'équipe de Jean-Luc Popot, je me suis intéressée à la biochimie des protéines membranaires : *i*) le mécanisme d'inactivation par les détergents, et *ii*) la caractérisation en terme de sous-unités (nombre, topologie), cofacteurs, état d'oligomérisation d'un complexe purifié, le b_6f de la chaîne photosynthétique. Ceci m'a mené à en étudier la structure à partir de cristaux bidimensionnels lors d'un stage post-doctoral à Francfort dans le labo de Werner Kühlbrandt, mais également, à mon retour en France, à développer de nouveaux tensioactifs (hémi)fluorés pour la biochimie des protéines membranaires. De mon séjour en Allemagne j'ai rapporté le goût et la culture de la structure des protéines membranaires, avec la résolution de la structure à 8Å du complexe SecYEG, le translocon de la membrane interne de *E. coli*. Je m'intéresse donc maintenant également au mécanisme de reconnaissance phage-bactérie et de l'injection de l'ADN phagique dans la bactérie d'un point de vue structural.

A. Travaux antérieurs

I. Etude biochimique et structurale du complexe b_6f

Dans la photosynthèse oxygénique, le complexe b_6f occupe une place centrale en transférant les électrons du photosystème II au photosystème I (Figure 1). Ce processus de transfert d'électrons au sein du complexe est accompagné par un pompage de protons, ce qui contribue à constituer un gradient de protons transmembranaire, utilisé pour la synthèse d'ATP.

Le complexe b_6f est l'analogue chloroplastique du complexe cytochrome bc_1 mitochondrial. C'est un complexe membranaire multiprotéique, dont on sait aujourd'hui qu'il est composé de huit sous-unités transmembranaires, dont quatre, de haut poids moléculaire, portent les groupements prosthétiques nécessaires aux transferts d'électron), et quatre mini-protéines de moins de 4 kDa, une molécule de chlorophylle, une molécule de β -carotène et de lipides associés (Figure 2, Stroebel et coll. 2003)

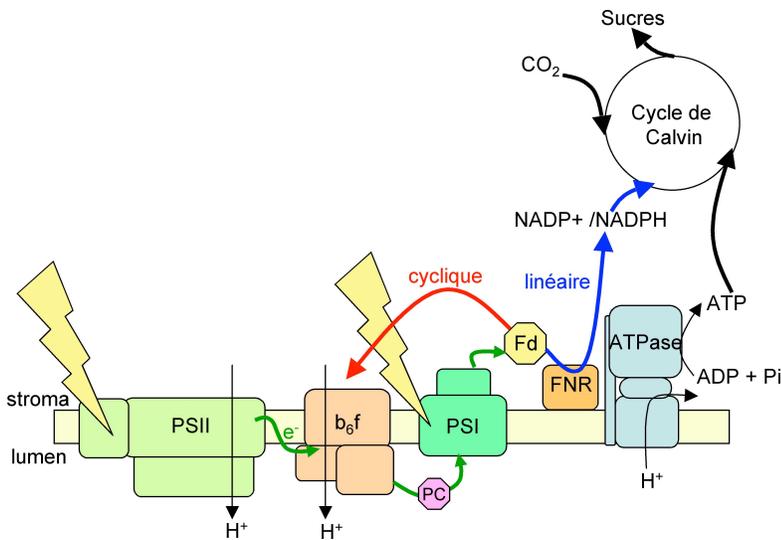
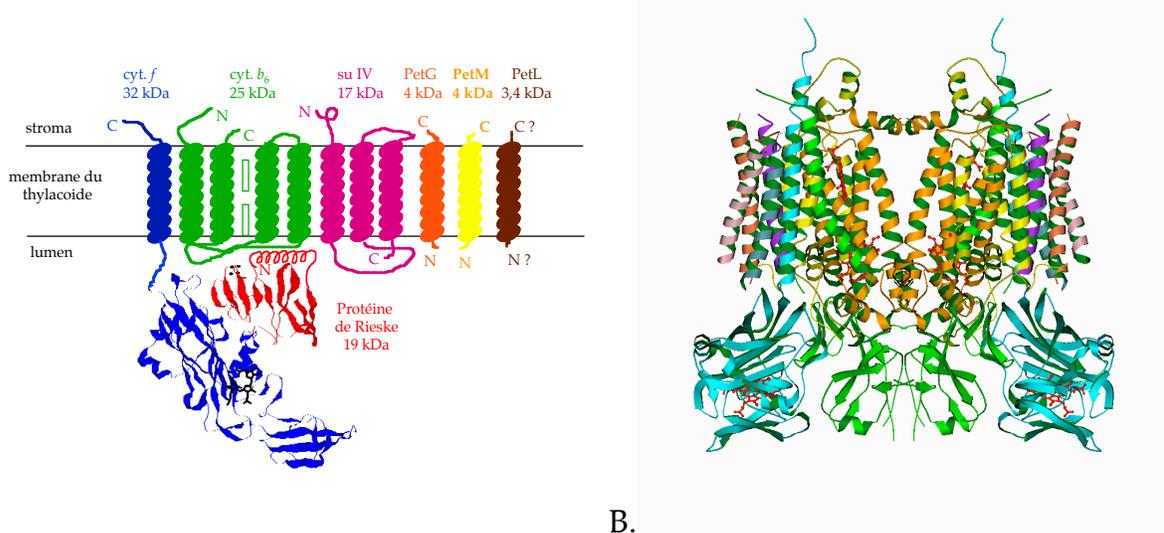


Figure 1 : Chaîne photosynthétique de transfert d'électrons de la membrane des thylacoïdes, dans laquelle le cytochrome b_6f occupe un rôle central. Le transfert d'électrons linéaire génère NADPH et ATP (via le gradient de proton), alors que le transfert cyclique ne génère que de l'ATP.



A. B.
Figure 2 : le complexe cytochrome b_6f . A: schéma d'après nos connaissances en 1997 (Breyton 1997). B: structure cristallographique du dimère (Stroebel et coll. 2003).

1. Biochimie du complexe cytochrome b_6f

Travail de thèse, sous la direction de Jean-Luc Popot. *Publications n° 11 à 15, et 18 à 23. Publication 14 Breyton et coll, 1997 en Annexe.*

Au début de ma thèse, le b_6f était l'un des complexes photosynthétiques dont la connaissance était la moins avancée. A mon arrivée au laboratoire, un protocole de purification du complexe de *C. reinhardtii* venait d'être mis au point. Il reposait sur l'utilisation d'un détergent à tête sucre en C_{12} , l'hécameg, en micelles mixtes avec la phosphatidylcholine (PC). J'ai développé l'analyse biochimique de cette préparation : *i)* en contribuant à la détermination du nombre et de l'identité des sous-unités, leur mode

d'association avec la membrane (de Vitry et coll. 1996), et dans le cas de PetL, l'effet de la délétion de la sous-unité sur l'efficacité du complexe *in vivo* ainsi que sur la stabilité du complexe purifié (Takahashi et coll. 1996). Dans le cas de la protéine de Rieske, j'ai examiné en détail son mode d'association avec le complexe, qui faisait à l'époque l'objet de vives controverses (Breyton et coll. 1994). *ii*) Avec Yves Pierre, nous avons étudié le mode d'association de la molécule de chlorophylle et en avons examiné le rôle éventuel (Pierre et coll. 1997). *iii*) Finalement j'ai déterminé l'état d'oligomérisation du complexe à partir de la mesure des coefficients de diffusion et de sédimentation, et de la densité : le complexe *b₆f* est un dimère. Je me suis ensuite penchée sur les conditions qui entraînent sa monomérisation et son inactivation : en présence d'un excès de détergent, le dimère se convertit en monomères inactifs ayant perdu certaines sous-unités, un cofacteurs et les lipides. La figure 3 détaille les intermédiaires de la dissociation, isolés en étudiant les étapes et les causes de la dissociation du complexe. Que la monomérisation soit une conséquence de l'augmentation de la phase micellaire suggère qu'un composant stabilisant le dimère est dilué dans les micelles : j'ai pu démontrer le rôle protecteur des lipides dans la stabilisation du dimère. On peut penser à deux mécanismes possibles : soit un rôle structural, le lipide stabilisant directement le dimère par des interactions spécifiques; soit un rôle de protection vis-à-vis du détergent. En effet, les molécules de détergent sont plus petites et plus flexibles que les lipides, et peuvent avoir accès à des sites inaccessibles aux lipides et protégés par ceux-ci; la liaison de détergent sur certains de ces sites déstabiliserait la protéine.

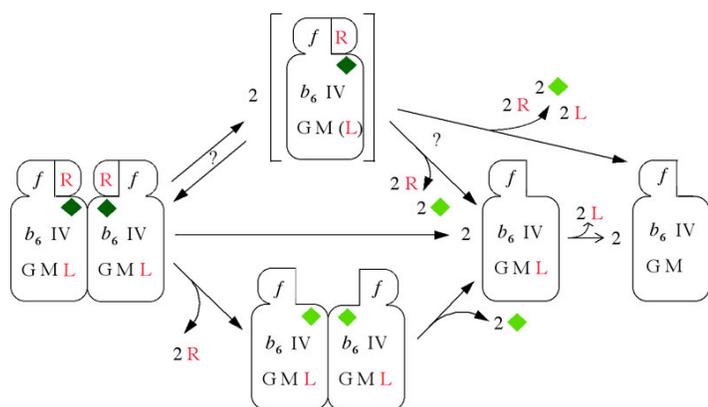


Figure 3 : Etapes de dissociation du complexe cytochrome *b₆f* suite à l'exposition à un excès de détergent. A l'époque, PetN et le β -carotène n'avait pas encore été découverts. Les sous-unités du *b₆f* sont notées par le code une lettre, et la molécule de chlorophylle par un losange vert (dont la couleur reflète le changement de spectre, voir Breyton et coll. 1997).

Ainsi, ces études sur le complexe *b₆f* purifié, dans l'aire pré-structure, ont d'une part fait progresser nos connaissances biochimiques et structurales sur le complexe, et

d'autre part ont contribué à déterminer les conditions dans lesquelles le complexe est stable et à élucider certains mécanismes de son inactivation. Ces derniers ne sont pas spécifiques du complexe *b₆f*, mais relèvent plutôt de méthodes d'intérêt général largement transposables à d'autres protéines et complexes membranaires. Nous retrouverons ces idées dans la partie "Travaux actuels et projets". J'ai également contribué à démontrer que le complexe *b₆f* de *C. reinhardtii* ressemblait en tous points à celui des plantes supérieures et à l'établir comme un système expérimental de choix.

Depuis lors, Daniel Picot et David Stroebel au laboratoire ont cristallisé le complexe *b₆f* (Stroebel et coll. 2003), et les résultats présentés ci-dessus peuvent être revisités à la lumière de la structure... On retrouve l'organisation en dimère du complexe, avec les sous-unités et l'orientation proposée. PetL occupe une position périphérique, compatible avec les résultats de délétion de cette sous-unité non délétère pour le complexe. L'anneau chlorine de la molécule de chlorophylle est pris en sandwich entre les hélices F et G de la sous-unité IV, et sa chaîne phytyl remonte jusqu'au site Q_o. La structure n'apporte pas de lumières supplémentaires quant à son rôle possible. En revanche, l'un des résultats marquants et contradictoires est que la protéine de Rieske possède une longue hélice transmembranaire coudée qui longe un des monomères, prenant en sandwich la chaîne grasse d'un lipide, le domaine catalytique étant en contact avec l'autre monomère. Ceci explique le fait que la monomérisation induise la perte de la protéine de Rieske. En revanche, ceci est en désaccord avec mes conclusions que la protéine de Rieske est une protéine extrinsèque, et cela suggère que les critères généralement utilisés pour déterminer le caractère intrinsèque ou extrinsèque d'une protéine membranaire ne sont pas universels (notamment qu'une protéine intégrale reste monomérique en l'absence de détergent et ne lie pas de détergent en présence de micelles)... Les manip mériteraient peut-être d'être refaites (utilisation de colonnes de tamis moléculaires plus performantes, ultracentrifugation analytique plutôt que migration sur gradient de saccharose...). Si les résultats sont confirmés, le comportement particulier de la protéine de Rieske pourrait peut-être s'expliquer par une réorganisation conformationnelle de la protéine lors de son extraction hors de la membrane, qui cacherait en partie son hélice hydrophobe au solvant, à la manière des colicines. L'utilisation des agents chaotropes

également est à utiliser avec précaution, puisqu'ils déstabilisent suffisamment la membrane pour en extraire une protéine membranaire intégrale.

Un second résultat intéressant est la présence de trois lipides résolus dans la structure. Sur le côté stromal, une molécule de sulphoquinovosyldiacylglycérol est partiellement tracée : outre le fait que le groupement sulfonate est en interaction avec la lysine 272 du cytochrome *f*, ses chaînes grasses se fauillent entre l'hélice de la Rieske, du cytochrome *f* et l'hélice E de la sous-unité IV. Les chaînes grasses de deux autres lipides sont également partiellement tracées sur le côté luminal de la protéine prises en sandwich entre les hélices de différentes sous-unités. Une analyse de la présence de lipides dans la préparation à l'époque de ma thèse avait conclu à l'absence de lipides endogènes (la limite de détection avait été établie à un lipide par monomère). Le protocole de purification suivit pour l'obtention des cristaux (en DDM) est différent de celui d'alors (en micelles mixtes hécameg/PC), expliquant une composition en lipide différente. La purification en hécameg, détergent à haute CMC (concentration micellaire critique), a entraîné la délipidation du complexe, rendant l'ajout d'un lipide exogène nécessaire à la stabilité du complexe. La présence de ces lipides faisant partie intégrante de la structure du complexe explique les résultats de déstabilisation du complexe en excès de détergent : la solubilisation de ces lipides déstabilise la structure comme on déstabilise un édifice en enlevant des briques. On peut se demander si, dans la préparation issue de la purif hécameg/PC les sites des lipides "manquants" sont occupés par de la PC (le groupement phosphate pourrait également interagir avec la lysine 272 !), ou si la PC forme un anneau protecteur autour de la protéine...

2. Etude des supercomplexes de la chaîne photosynthétique

Collaboration avec Giovanni Finazzi (UMR7141) et Giles Johnson (Université de Manchester).
Publication 4 Breyton et coll, 2006 en Annexe.

Après avoir étudié les propriétés biochimiques du complexe b_6f isolé, je me suis plus récemment intéressée à son interaction possible avec les autres complexes de la chaîne photosynthétique. L'assimilation du CO_2 dans la photosynthèse oxygénique repose sur l'utilisation du pouvoir réducteur (NADPH) et de l'ATP générés par le transfert d'électrons de l'eau au NADP qui a lieu dans la membrane des thylacoïdes. Le rapport ATP/NADPH issu du transfert linéaire d'électron de l'eau au NADPH (Fig. 1) n'est pas suffisant pour la fixation de CO_2 , et le transfert d'électron cyclique autour du PSI et du

b₆f pourrait fournir l'ATP supplémentaire nécessaire *via* le gradient de proton généré (Allen 2002, Fig. 1). Joliot et Joliot (2002) ont proposé que le système cyclique, afin d'empêcher toute fuite d'électrons, fonctionne au sein de supercomplexes formés de PSI, *b₆f*, plastocyanine et ferrédoxine (deux transporteurs solubles) en quantité stœchiométrique. Les deux voies de transfert d'électron fonctionneraient de façon concomitante.

Giovanni Finazzi et Giles Johnson ont mis en évidence que le transfert cyclique était important, voire maximal, dans des conditions de stress osmotique ou d'adaptation à l'obscurité. Pour identifier les supercomplexes, j'ai utilisé la méthode mise au point pour isoler les supercomplexes mitochondriaux (Schägger et Pfeiffer, 2000). Après avoir testé dans les conditions physiologiques favorisant le cyclique, dans différents organismes, de nombreuses conditions de solubilisation des membranes, je n'ai pas pu mettre en évidence la présence de supercomplexes, ni une différence de comportement des complexes solubilisés dans des conditions favorisant ou non le transfert cyclique (Fig. 4). Ces résultats, intégrés à une analyse fonctionnelle plus poussée, nous a conduit à proposer un modèle de régulation des flux linéaires et cyclique reposant sur une balance des conditions redox des accepteurs du PSI : en condition oxydante, le flux d'électron permettrait la réduction du NADP, conduisant à l'assimilation du CO₂ alors qu'en conditions réductrices l'accumulation du NADPH favoriserait le transfert cyclique (Breyton et coll. 2006).

Je continue à collaborer avec Giovanni Finazzi, notamment sur la caractérisation biochimique des complexes photosynthétiques de *Ostreococcus tauri*, une algue verte unicellulaire, la plus petite parmi les cellules eucaryotes, émergeant comme un nouvel organisme modèle (Cardol et coll. 2008).

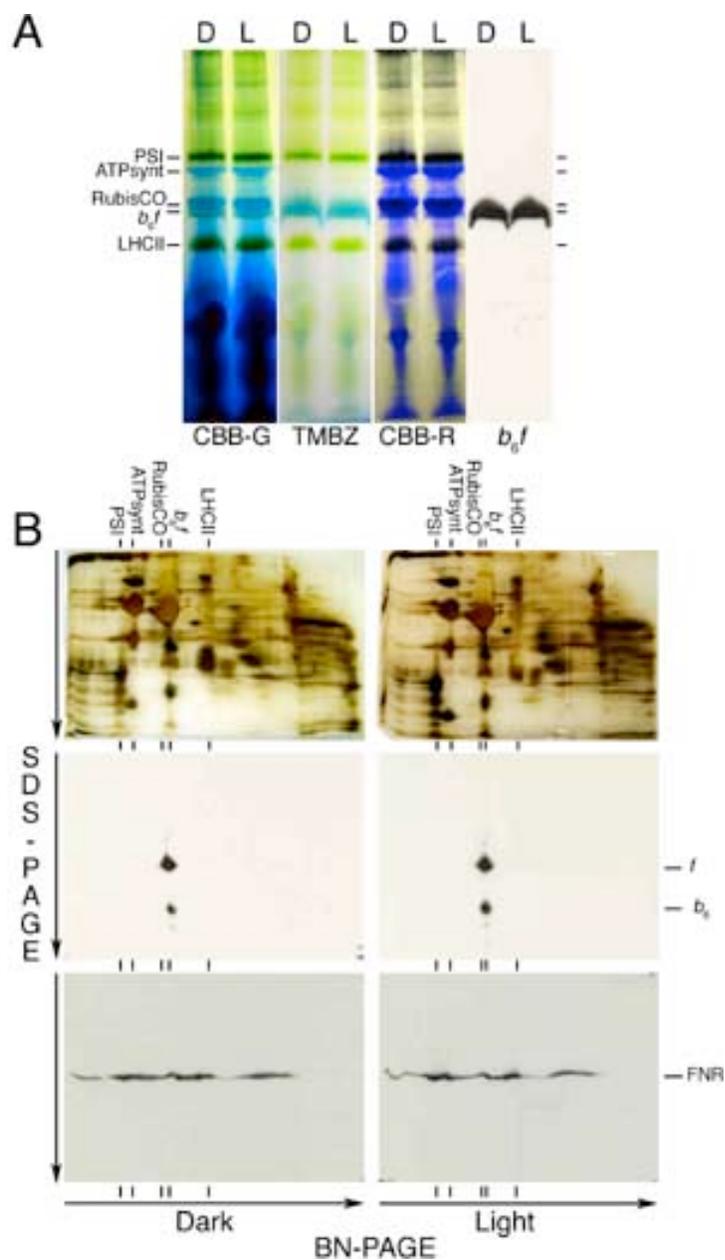


Figure 4: Analyse biochimique de chloroplastes de feuilles d'épinard adaptées à l'obscurité (D) ou à la lumière (L) solubilisées en digitonine. **A.** Gel Bleu Natif 4-13% après migration (CBB-G), après décoloration et coloration au TMBZ (TMBZ), recoloration (CBB-R), ou transfert et révélation ECL des cytochromes (b_6f). **B.** Gels 2D BN/SDS des mêmes échantillons colorés au TMBZ et à l'argent ou transférés et révélation des cytochromes. Les deux cytochromes du b_6f sont visibles (cyt. f et b_6). Le complexe b_6f migre en une seule bande correspondant au dimère. Les membranes de transfert ont également été traitées avec un anticorps dirigé contre la FNR. Pas de différence majeure entre le mode d'association de la FNR avec le PSI ou le b_6f n'est observée. La position des complexes majeurs est indiquée de (Breyton et coll 2006).

3. Etude structurale du complexe cytochrome b_6f

Travail de post-doc chez Werner Kühlbrandt (Francfort, Allemagne). *Publication 10 et 9.*

Publication 9 Breyton, 2000a en Annexe.

Les conditions de manipulation du complexe actif que j'ai déterminées au cours de ma thèse ont facilité la mise au point de conditions de cristallisation en deux dimensions du complexe b_6f (collaboration avec G. Mosser, Institut Curie). Ces cristaux ne sont pas de véritables cristaux 2D, mais de très fins cristaux 3D, empilement parfaitement en registre de cristaux 2D. Ils sont donc malheureusement inappropriés

pour la détermination de la structure 3D de la protéine. Cependant, le travail en projection a quand même permis d'avancer dans la connaissance du complexe b_6f : deux cartes de projection du complexe à une résolution de 8Å en coloration négative, et à 9Å en « cryo » ont été calculées pendant ma thèse (Mosser et coll. 1997, Bron et coll. 1999).

En coloration négative (Fig. 5A), la carte de projection est dominée par les régions extramembranaires du complexe, c'est-à-dire principalement par les domaines extramembranaires du cytochrome f et de la protéine de Rieske. Nous avons attribué les deux densités principales à ces deux sous-unités. L'étude cristallographique du complexe bc_1 , l'homologue mitochondrial du b_6f , a montré que la protéine de Rieske peut adopter différentes conformations en fonction de l'inhibiteur utilisé pour la cristallisation. La Rieske aurait un mouvement de va-et-vient entre deux positions assurant ainsi le transfert d'électron au sein du complexe (Iwata et coll. 1999, Zhang et coll. 1998, Kim et coll. 1998). En allant à Francfort pour mon stage post-doctoral, j'ai repris ce sujet et ai cristallisé le b_6f en présence de stigmatelline, qui est également un inhibiteur du complexe chloroplastique. La carte de projection en coloration négative de ces cristaux montre un changement de forme de l'une des deux densités principales (Fig. 5A,B), qui a permis d'une part de localiser la protéine de Rieske sur la carte de projection. D'autre part, nous avons ainsi visualisé le changement de conformation de cette sous-unité suite à la fixation de l'inhibiteur, indiquant probablement le même type de mécanisme de transfert d'électron que pour le bc_1 , bien que les cytochromes f et c_1 ne partagent aucune homologie de séquence ou de structure (Breyton, 2000b).

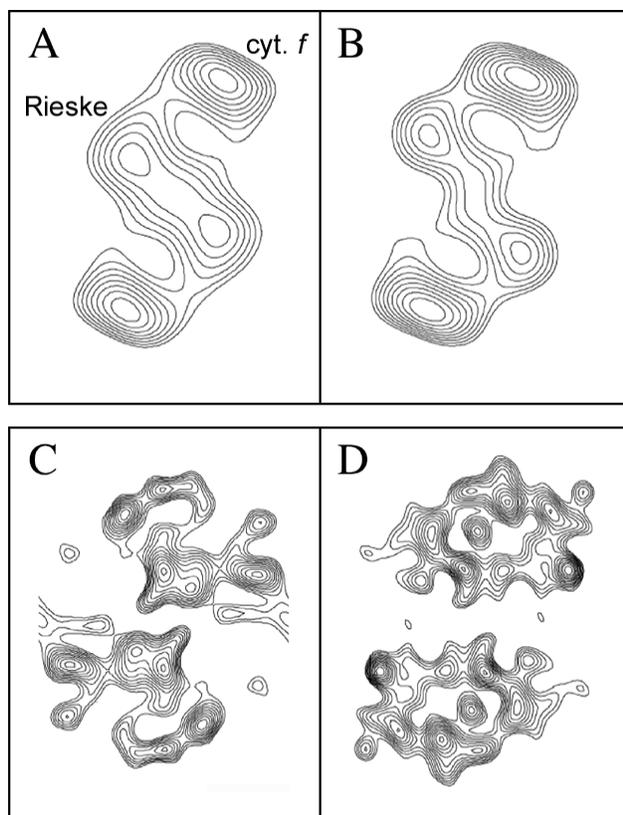


Figure 5 : Cartes de projection du dimère du complexe cytochrome *b₆f* en coloration négative (A,B), ou en cryo-microscopie électronique (C,D), en absence (A,C), ou en présence de l'inhibiteur stigmatelline. Les cartes en coloration négative montrent principalement les domaines extramembranaires du complexe, alors que les cartes en « cryo » présentent principalement les hélices transmembranaires. La liaison de stigmatelline se traduit par un large changement conformationnel du domaine extramembranaire de la protéine de Rieske ; la région transmembranaire présente également des changements conformationnels plus difficiles à interpréter (Breyton, 2000a, Breyton, 2000b).

Dans la carte de projection du complexe en « cryo » (Fig. 5C), en revanche, prédomine la région transmembranaire : du fait de leur position perpendiculaire à la membrane, les hélices présentent de forts pics de densité en projection. La comparaison avec une carte de projection calculée à partir de la structure cristallographique du complexe *bc*, mitochondrial (Xia et coll. 1997, Iwata et coll. 1998, Zhang et coll. 1998), a confirmé les homologies structurales, notamment au niveau du cœur du complexe (Bron et coll. 1999, Breyton, 2000b). La carte « cryo » en présence de stigmatelline, de façon inattendue, a montré des différences avec la carte sans inhibiteur, alors que la région transmembranaire du cytochrome *bc*, ne présentait aucune modification suite à la fixation de stigmatelline (Fig. 5D). A l'époque, j'ai prudemment proposé que des changements de conformation spécifiques au *b₆f* avaient lieu au sein de la partie transmembranaire du complexe (Breyton, 2000b).

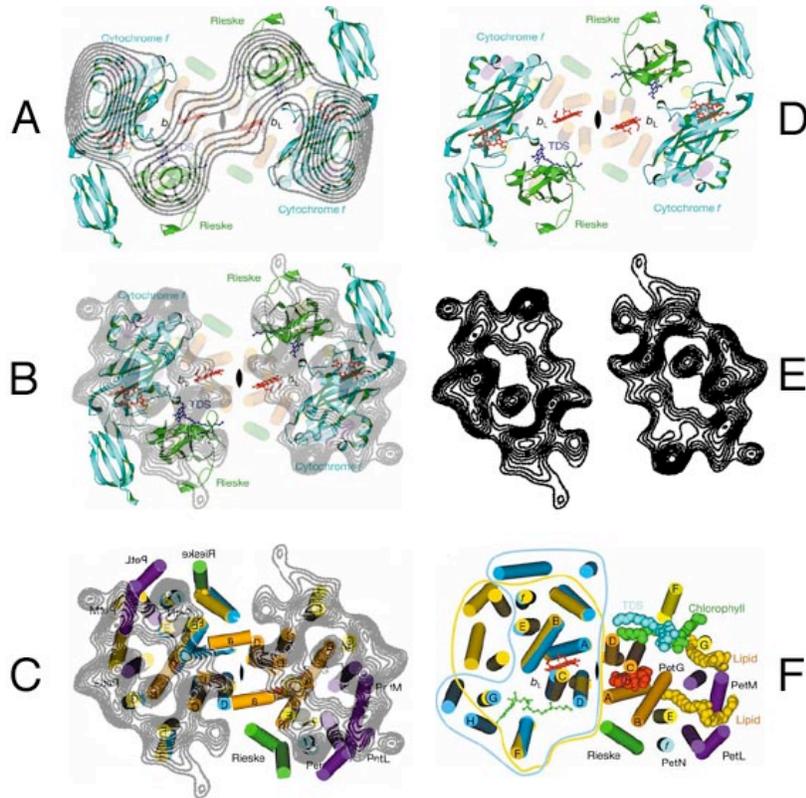


Figure 6 : Comparaison des cartes de projection du complexe b_6f en coloration négative (A) et en cryo (B, C, E) avec la position des domaines extramembranaires de la protéine de Rieske et du cytochrome f (A, B, D) et les hélices transmembranaires dans la structure 3D (C superposition des 2 vues luménale et stromale, F vue côté lumen, de Stroebel et coll 2003).

Ici encore ces résultats peuvent être revisités aux vues de la structure : que ce soit en présence de stigmatelline ou de DBMID (inhibiteurs du site Q_o), ou de NQNO (inhibiteur du site Q), aucune modification au sein de la région transmembranaire du b_6f n'a été mise en évidence dans les structures cristallines (Stroebel et coll. 2003, Kurisu et coll. 2003, Yan et coll. 2006, Yamashita et coll. 2007). Il apparaît clairement aujourd'hui que la carte « cryo » calculée en microscopie électronique en l'absence de stigmatelline était incomplète, peut-être dûe au désordre de la protéine de Rieske et/ou à la nature particulière des cristaux. Il faudrait reprendre les données originales pour comprendre d'où peut venir la défaillance. En effet, il y a une bien meilleure adéquation entre la position des hélices de la structure (Stroebel et coll. 2003), et la carte « cryo » obtenue en présence de stigmatelline (Fig. 6C). Il faut toutefois garder en tête que nous regardons une carte de projection, qui inclut tous les domaines extramembranaires (incluant les boucles) ce qui en complique l'interprétation. En effet, certaines densités de la carte 2D pourraient être expliquées par les domaines extramembranaires de la protéine de Rieske et du cytochrome f (Fig. 6B). Par ailleurs, quand nous comparons la carte en coloration négative et la carte 3D, dans les deux cas en présence de stigmatelline, il y a parfaite

adéquation entre les deux densités et la position des domaines extramembranaires de la Rieske et du cytochrome *f*, hormis pour le petit domaine du cytochrome *f* (Fig. 6A). Ce petit domaine « flotte » au-dessus du complexe, et il est possible que le colorant ne puisse l'enrober, le rendant invisible.

Mes compétences dans l'analyse de cristaux bidimensionnels m'a permis de donner un coup de main à Simon Scheuring lors de son analyse comparée AFM/cryo-ME de cristaux de LHII (Scheuring *et al.*, 2003).

II. Etude structurale du complexe membranaire de translocation de la voie Sec.

Travail de stage post-doctoral, en collaboration avec Ian Collinson (Francfort, Allemagne).
Publications 7 et 8. Publication 7 Breyton et coll, 2002 en Annexe.

Le trafic des protéines entre différents compartiments nécessite une machinerie spécifique transportant ces substrats hydrophiles de part et d'autre de la barrière hydrophobe constituée par les membranes. La voie Sec est une voie ubiquitaire et l'une des voies de transport les plus importantes dans le règne vivant. Chez *E. coli*, les protéines nouvellement synthétisées sont prises en charge par les protéines solubles SecB, puis SecA qui les accompagne jusqu'à un canal membranaire formé par l'association de trois sous-unités, SecY, SecE et SecG. Elles sont alors transloquées par SecYEG de part et d'autre de la membrane grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP par SecA. Les protéines de la membrane interne sont également prises en charge par cette voie. On retrouve l'homologue de SecYEG dans toutes les cellules vivantes, et son dysfonctionnement entraîne la mort cellulaire. A l'époque de cette étude, le mécanisme de translocation était encore mal connu, et l'état d'oligomérisation fonctionnel du canal, déterminé à partir d'études faites sur particules isolées oscillaient entre 3 et 4 copies de SecYEG (*e.g* Beckmann et coll. 2001, Morgan et coll. 2002).

Ian Collinson du laboratoire de Francfort a surexprimé, purifié à l'aide d'une étiquette histidine, et cristallisé en deux dimensions le complexe SecYEG de *E. coli* par dialyse de la protéine purifiée en présence de lipides de *E. coli*. J'ai calculé une carte de projection du complexe SecYEG à 9Å de résolution, qui semblait indiquer que le complexe cristallisait sous forme de monomère, alors que la protéine était en équilibre entre dimère et tétramère en solution (Collinson et coll. 2001). J'ai ensuite déterminé la structure tridimensionnelle de SecYEG à 8Å de résolution dans le plan de la membrane

et 16Å de résolution perpendiculairement au plan membranaire. Les cristaux sont composés de deux membranes reliées entre elles par une symétrie à vis d'ordre deux (Fig. 7a). Cette architecture cristalline atypique a été confirmée par l'étude de sections minces et de cryo-fractures. La cellule unitaire contient deux unités asymétriques, chacune composée d'un dimère de SecYEG. Une symétrie non-cristallographique d'ordre deux relie les deux monomères au sein du dimère, et les 15 hélices prédites par l'analyse de séquence de SecY, SecE et SecG sont résolues. Elles apparaissent sous forme de densités allongées d'environ 8-10Å de diamètre et de 30-40Å de longueur. Grâce au marquage des cristaux avec des anticorps spécifiques, nous avons pu déterminer l'orientation du complexe dans le cristal. L'interface entre deux monomères délimite une cavité, fermée du côté périplasmique du complexe par une hélice très inclinée (Fig. 7b, c, d, hélice 10).

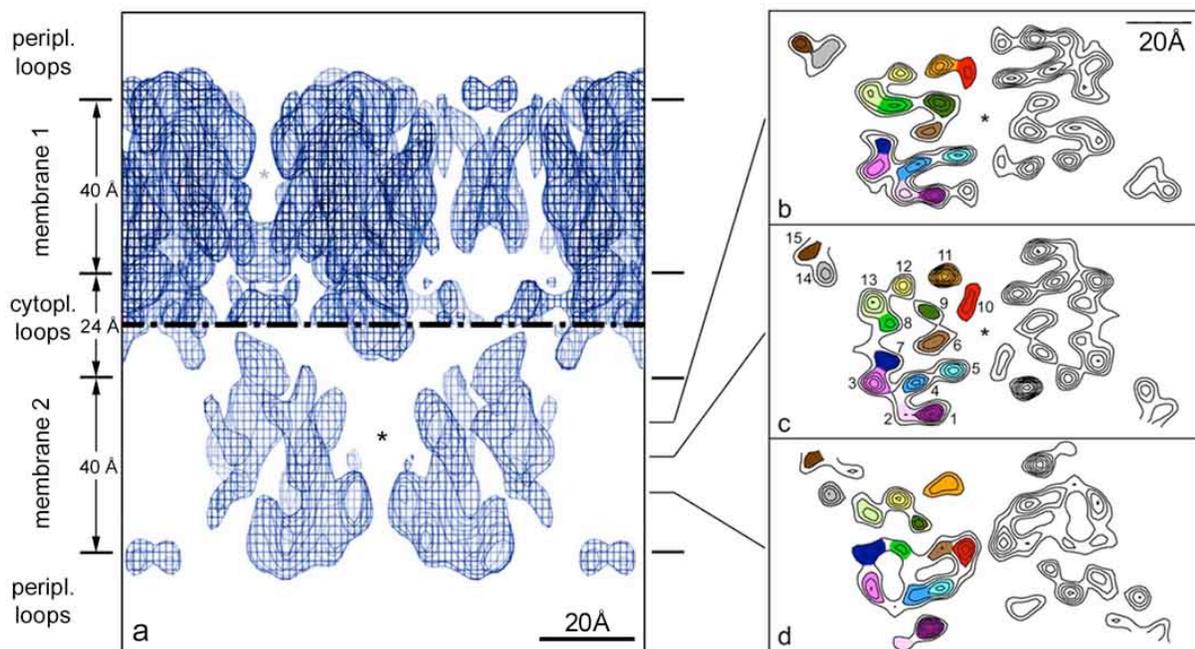


Figure 7 : **a.** Vue de côté de la carte de SecYEG à 8Å de résolution. Les deux membranes sont reliées par une symétrie à vis d'ordre deux, et séparées par une zone de plus faible densité correspondant aux boucles cytoplasmiques. La membrane du haut est une section d'une cellule unitaire de profondeur, alors que la membrane du bas est une section plus fine centrée sur l'axe deux non-cristallographique du dimère, révélant un canal putatif (astérisque). **b, c et d :** Sections horizontales, espacées de 8Å, au travers du dimère de SecYEG, ainsi qu'indiqué en **a.**

Dans chaque section, 15 densités circulaires, correspondant à des hélices α transmembranaires, sont résolues. Elles sont arbitrairement numérotées de 1 à 15 (de Breyton et coll. 2002).

Nous avons proposé que la cavité que nous observons à l'interface entre les deux monomères serait le canal, fermé puisque le complexe est cristallisé en l'absence de substrat à transporter. L'ouverture du canal lors de la translocation de substrat protéique pourrait se faire par un redressement de l'hélice inclinée. L'insertion dans la membrane de segments transmembranaires ne nécessiterait pas non plus de grands changements de conformation (Breyton et coll. 2002).

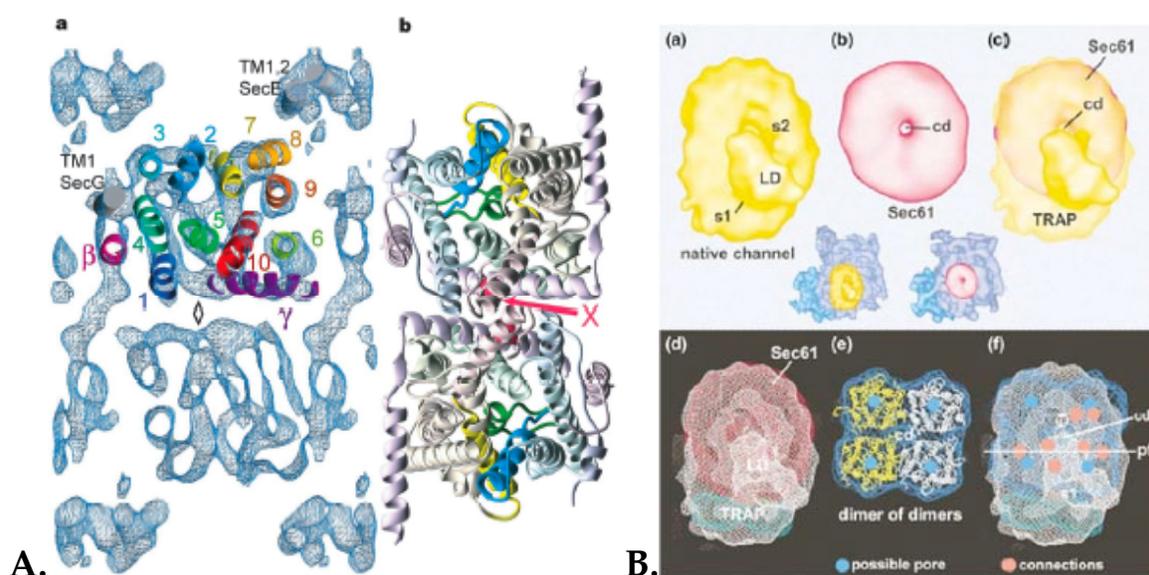


Figure 8 : **A :** a. superposition de la carte de microscopie électronique de SecYEG de *E. coli* et de la structure atomique de SecYE β de *M. jannaschii*. Les hélices présentes dans SecYEG absentes dans SecYE β sont modélisées par les cylindres. b. Modélisation du dimère de SecYE β d'après la carte de microscopie électronique. Une cystéine introduite à la position indiquée par la sphère rose résulte en un pontage efficace entre les deux sous-unités γ (Van den Berg et coll. 2004). **B :** Etude par particules isolées du translocon "natif" de réticulum endoplasmique de chien associé au ribosome (a), comparé (c,d) à la structure de Sec61 purifié associé au ribosome (b). e. Modélisation d'un tétramère de Sec à partir de la structure dimérique des cristaux 2D (bleu) et de la structure atomique monomérique (jaune et blanc). La position des pores est notée d'un point bleu. Dans cet arrangement, on retrouve la dépression centrale (cd) observée sur les cartes "particules isolées". f. Ajustement du tétramère (bleu) dans la densité du "canal natif" (blanc). La position des pores (point bleu), de la sortie du polypeptide du ribosome (point blanc) et des connections entre translocon et ribosome (points roses) sont notées. Un seul pore semblerait accessible au polypeptide naissant. Les autres complexes seraient présents pour recruter les protéines membranaires annexes comme TRAP (Ménétré et coll. 2005).

Comme pour le *b,f*, ces résultats peuvent être ré-analysés au vu de la structure atomique du complexe SecYE β d'une bactérie thermophile, *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg et coll. 2004). Ce complexe en détergent a été cristallisé en 3D sous forme

de monomère, et la structure explique très bien la translocation de protéine au sein d'un monomère. L'ajustement de la structure atomique du monomère dans la carte de microscopie électronique confirme l'arrangement très similaire des hélices dans ce complexe dans les deux organismes, confirmant une structure identique du complexe en membrane ou en détergent (Fig. 8, Van den Berg et coll. 2004). Notre carte à moyenne résolution a permis également de proposer un arrangement du tétramère dans les densités du translocon associé au ribosome déterminé par particule isolée en microscopie électronique (Fig. 8, Ménétret et coll. 2005).

B. Travaux actuels et perspectives

Ainsi que par le passé, je continue à m'intéresser aux deux aspects, biochimique et structural, de l'étude des protéines membranaires, et ma recherche est bicéphale. D'un côté, je développe l'application de nouveaux tensioactifs fluorés et hémifluorés pour la manipulation des protéines membranaires, en étroite collaboration avec B. Pucci de l'Université d'Avignon. D'un autre côté, je m'intéresse aux interactions phage-bactérie, avec l'étude structurale du complexe FhuA-pb5, un complexe très stable entre une protéine de phage et son récepteur sur la bactérie, en collaboration avec Pascale Boulanger (UMR8619).

I. Développement de nouveaux tensioactifs fluorés

Collaboration avec Bernard Pucci, Université d'Avignon, et Christine Ebel, IBS, Grenoble. En grande partie le travail de thèse de Florence Lebaupain. Participation de stagiaires de 3 mois : Jérémy Frandemiche (BTS), Estelle Rousselet (école d'ingénieur), et Nicolas Sissourat (M1). Ce projet est financé par un contrat Européen porté par J.-L. Popot (2006-2009), et par une ANR-PCV que j'ai obtenue avec Bernard Pucci et Christine Ebel (2008-2011). Je serai bientôt rejointe par Natahlie Hauet en post-doc. *Publication 2, 3 et 5. Publication 2 Lebaupain et coll, 2006 en Annexe.*

L'étude structurale des protéines membranaires se heurte à des problèmes de stabilisation en solution détergente de ces dernières. Je m'intéresse à la conception et au développement de nouvelles molécules fluorées pour leur manipulation (Barthélémy et coll. 1999, Gohon et Popot 2003). Ces molécules, développées en étroite collaboration avec le laboratoire de B. Pucci, ont été dessinées pour être le moins dénaturant possible, et maintenir les protéines membranaires stables sur les grandes plages de temps nécessaires aux études biochimique, biophysique et structurale. L'idée de base est l'introduction d'atomes de fluor dans la chaîne hydrophobe de tensioactifs de structure

par ailleurs classique, ce qui diminue leur miscibilité avec les lipides et leur caractère dissociant. Afin de favoriser leur interaction avec la partie hydrophobe des protéines membranaires, l'extrémité de la chaîne carbonée peut être hydrogénée (Fig. 9). Ces molécules *hémifluorées* sont en cours d'optimisation, et nous utilisons comme modèle des protéines membranaires de structure et d'origine très différentes : *i*) le cytochrome *b_f* présenté ci-dessus, dont la biochimie nous est bien connue et qui est particulièrement sensible à la délipidation en excès de détergent (Breyton et coll 1997). *ii*) La bactériorhodopsine (BR) de *Halobacterium salinarum*, également une protéine photosynthétique, organisée en faisceau de sept hélices transmembranaires, et liant une molécule de rétinol et *iii*) la région transmembranaire de OmpA (tOmpA), formée d'un tonneau de huit brins β .

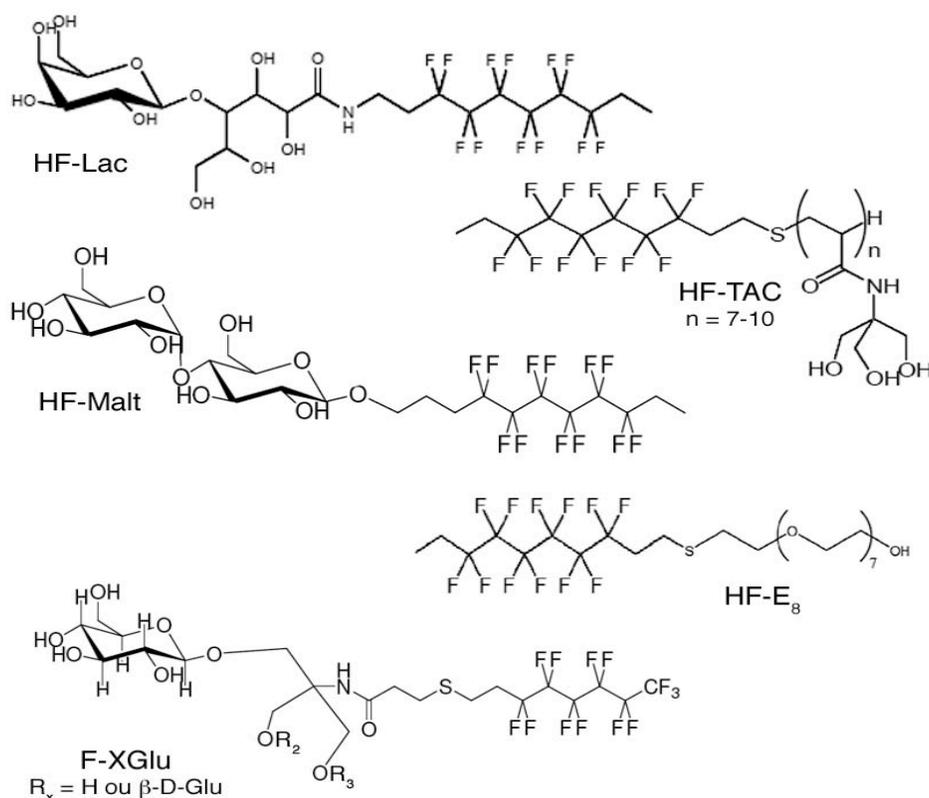


Figure 9. Tensioactifs (hemi)fluorés étudiés ou en cours d'étude.

Nous avons validé cette approche avec un tensioactif dont la tête hydrophile est polydisperse (les (H)F-TAC, Fig. 9, Breyton et coll. 2004). En effet, les trois protéines test sont maintenues en solution sous forme monodisperse (bande unique et fine sur gradient de saccharose), et dans le cas de la BR et du *b_f*, sous forme native et active.

Toutefois, la nature polymérique de la tête est un handicap pour le biochimiste, la composition du tensioactif pouvant varier de lot à lot...

Mes projets s'articulent donc autour de deux axes principaux : d'une part l'optimisation de la structure chimique des tensioactifs (collaboration avec B. Pucci), afin de s'affranchir de la tête polydisperse des (H)F-TAC, l'étude de leurs propriétés physico-chimiques, et leur validation en biochimie. Les nouvelles molécules doivent satisfaire les exigences du chimiste (relativement simple à synthétiser et à purifier, rendements de synthèse raisonnables), et du biochimiste (structure chimique définie, stable dans le temps, soluble à suffisamment haute concentration, CMC relativement basse, formant de petites micelles et surtout, maintenant en solution sous forme homogène et active les protéines membranaires). D'autre part, je m'intéresse à l'utilisation des molécules existantes pour développer certaines applications biochimiques pour lesquelles nous pensons que les tensioactifs fluorés, du fait de leurs propriétés particulières liées à la présence des atomes de fluor, peuvent apporter un plus par rapport à l'utilisation de détergents.

1. Lien étroit entre physico-chimie et biochimie

a. Nouvelles molécules, physico-chimie et impact sur la biochimie

Cette partie du projet vise à développer de nouvelles molécules, en conservant le principe de base des tensioactifs (hémi)fluorés, mais en explorant de nouvelles structures nous permettant de nous affranchir de la tête polydisperse des (H)F-TAC, et de faciliter les chemins et réduire les coûts de synthèse. Bien que parfaitement monodisperses du point de vue de la structure chimique, les premières molécules synthétisées et testées ((H)F-Lac, Lebaupain et coll. 2006, (H)F-Malt, Polidori et coll. 2006, et (H)F-E_s, Fig. 9) se sont avérées décevantes, car elles forment de gros agrégats hétérogènes, probablement des micelles cylindriques. Cette hétérogénéité se répercute sur la polydispersité des complexes protéine/tensioactif : dans le cas du (H)F-Lac, nous avons entrepris un travail de caractérisation physico-chimique des complexes protéine/(hémi)fluoré et des micelles de tensioactifs seuls. Des résultats d'ultracentrifugation analytique montrent que le détergent seul forme des structures de tailles variées, vraisemblablement des micelles cylindriques dont la taille augmente avec la concentration. Lorsqu'une protéine est solubilisée dans ce milieu, le complexe protéine/tensioactif est de taille plus homogène, et nous avons pu calculer la quantité

de tensioactif lié à la protéine. Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que pour la liaison de dodécylmaltoside, malgré des propriétés physico-chimiques relativement différentes, comme par exemple l'aire occupée par molécule de tensioactif. Nous avons également pu montrer que le complexe b_f est moins sensible à des concentrations plus élevées de tensioactif qu'à des concentrations plus élevées de détergent. En effet, il monomérise beaucoup plus facilement en DDM qu'en (H)F-Lac, ce qui est de très bon augure pour toute étude structurale, nécessitant des concentrations de protéine et de tensioactif élevées (Lebaupain et coll. 2006).

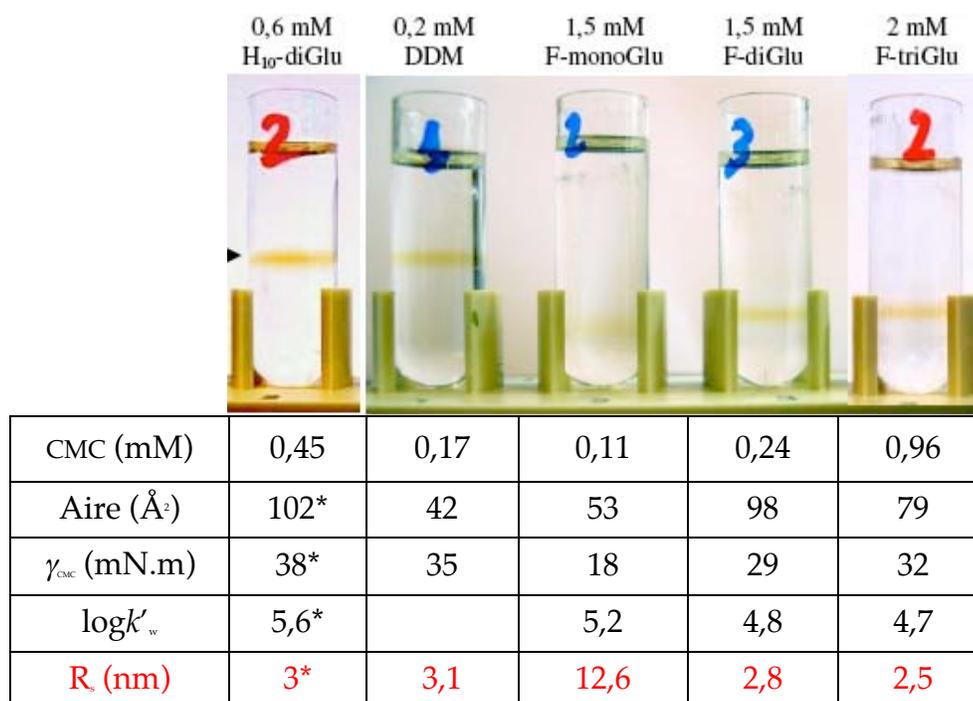


Figure 10 : Analyse biochimique et propriétés physico-chimiques des tensioactifs de la série Glu. Le complexe b_f purifié en DDM est transféré sur gradient de saccharose 10-30% (p/p) contenant le tensioactif noté, et centrifugé 4 h à 200,000 g. La protéine migre sous forme de dimère bien défini en détergent (H-diGlu et DDM) et en F-di- et tri-Glu, mais sous forme d'une bande large et diffuse en F-mono-Glu. Le b_f migre plus bas dans les gradients contenant des tensioactifs fluorés du fait de la densité plus importante de ces derniers. A noter que la différence de couleur de la bande est uniquement due à une différence de traitement d'image.

Données physico-chimiques. La CMC, l'aire par molécule et la tension de surface à la CMC (γ_{CMC}) sont déterminées par tensiométrie à 25°C. Le $\log k'_w$ reflète le coefficient de partage de la molécule entre l'eau et une colonne hydrophobe en C_{18} , et le rayon de Stokes des agrégats micellaires a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière. * Les données sont celles pour le H₁₀-diGlu.

La différence de taille entre les micelles de tensioactifs (hémi)fluorés et de détergents pour une même tête polaire met en évidence l'influence de la nature de la queue du tensioactif sur le type de micelle formé. Du fait de leur chaîne carbonée plus

volumineuse et plus rigide, les tensioactifs (hémi)fluorés changeraient les paramètres géométriques régissant le type d'agrégat formé (v_0/al_0 , où v_0 et l_0 sont les volumes et la longueur de la chaîne carbonée et a l'aire de la tête polaire). Les travaux de nombreux physico-chimistes, Israelachvili en particulier, ont souligné l'importance de la taille de la tête dans ce processus (Israelachvili et coll. 1977). En résumé, une "grosse tête" permet d'augmenter le rayon de courbure et ainsi de former des micelles sphériques de plus petite taille. Nous sommes en train de tester cette hypothèse en modulant la taille de la tête des tensioactifs synthétisés en greffant un, deux, ou trois glucoses sur un motif Tris (Fig. 9), la queue restant la même par ailleurs. Les résultats montrent que le F-monoGlu forme en effet de gros agrégats, alors que le F-di- et le F-triGlu semblent former de petites micelles (Fig. 10). Ceci est directement répercuté sur l'aspect de la bande de protéine sur le gradient de saccharose : le b_5f transféré en F-monoGlu migre sous une forme d'une bande large et diffuse, alors qu'en F-di et triGlu, il migre sous forme d'une bande fine et bien définie, correspondant au dimère de b_5f (Fig. 10). Nous retrouvons la même observation dans le cas de la BR. Ce travail est en cours, mais nous pouvons dès à présent constater que le HF-diGlu est très efficace du point de vue du maintien des protéines en solution, nous tenons peut-être là la molécule que nous recherchons depuis une dizaine d'années !

Les études ci-dessus soulignent, si besoin en était, l'importance d'une étude physico-chimique approfondie des molécules synthétisées avant leur utilisation en biochimie. Ceci va de la détermination de la solubilité et de la CMC à la détermination de la nature, taille, homogénéité des agrégats (micelles) formées, et idéalement, détermination du diagramme de phase du tensioactif (mais qui demande beaucoup de travail et de matériel...). En ce sens, nous avons établi une collaboration avec Christine Ebel et Frank Gabel afin d'étudier, par ultracentrifugation analytique et diffusion des neutrons et des rayons X aux petits angles, les agrégats formés par les molécules synthétisées en régime dilué, et nous sommes en train d'étudier la série des F-X-Glu. A terme, nous envisageons d'étudier les complexes protéine/tensioactif avec ces techniques de diffusion de la lumière.

Nous envisageons par ailleurs de moduler la taille du groupe hydrocarboné terminal des tensioactifs hémifluorés en remplaçant le groupe éthyle actuel par un

groupe propyle. L'idée sous-jacente est d'augmenter éventuellement l'affinité de ces molécules pour la surface transmembranaire (hydrocarbonée) des protéines complexées, mais surtout, de simplifier la synthèse des précurseurs hémifluorés afin d'en rendre la diffusion plus importante (nous travaillons toujours à l'économie maximale avec les produits hémifluorés, ne nous laissant pas beaucoup de marge pour les manips à faire !). D'autres molécules sont également envisagées, dans le cas où le diGlu ne tiendrait pas ses promesses : l'une d'entre elles porte une tête phosphatidylcholine ; la tête d'une autre serait constituée d'un petit peptide.

b. Interaction tensioactif fluoré – protéine membranaire

Véronique Peyre (UMR 7575, Université Paris 6) a développé une méthode potentiométrique permettant de doser les monomères de tensioactifs ioniques ou zwitterioniques. Elle a ainsi pu caractériser d'une part des mélanges détergent – tensioactifs fluorés (composition des micelles mixtes, activité des composants de la phase micellaire, enthalpies libres de mélange, Peyre et coll. 2007), et d'autre part l'adsorption de monomères de détergents sur des protéines solubles ayant des sites hydrophobes (détermination du nombre de sites et des constantes d'affinité, Peyre et coll. 2005). Nous envisageons d'utiliser cette technique pour caractériser l'adsorption des tensioactifs (hémi)fluorés sur la surface transmembranaires de FhuA, protéine de la membrane externe de *E. coli*, cette protéine supportant d'être manipulée en détergents ioniques (voir § II ci-dessous).

2. Développement des applications des tensioactifs fluorés pour la biochimie des protéines membranaires

a. Manipulation des protéines membranaires dans leur état natif

L'un des problèmes que pose l'utilisation des détergents pour manipuler les protéines membranaires en solution est leur capacité à dissocier les oligomères. Un bon exemple est le cas de la BR, qui est trimérique dans la membrane, mais solubilisée en détergent sous forme de monomère. En accord avec leurs propriétés peu délipidantes et peu dénaturantes, nous avons observé que différents oligomères de BR peuvent être stabilisés en (H)F-TAC (Fig. 11). S'agit-il du monomère-dimère-trimère ou du monomère-trimère-hexamère ? Nous avons entrepris une caractérisation fine de ces oligomères du point de vue biochimique, en combinant la détermination du rayon de Stokes par tamis moléculaire, du coefficient de sédimentation et de la quantité de

tensioactif liée par ultracentrifugation analytique, et de la quantité de lipides liés. Une étude fonctionnelle est également en cours avec l'étude du photocycle des différents oligomères (collaboration avec Giovanni Finazzi). La stabilisation de formes oligomériques natives, dissociées en détergents classiques, est l'une des grandes potentialités des tensioactifs fluorés, et je compte étudier "l'universalité" de ce phénomène en comparant le comportement de la BR dans d'autres tensioactifs (hémi)fluorés, et en étendant notre étude à d'autres protéines membranaires oligomériques. En particulier, des résultats très prometteurs de stabilisation du dimère ont été obtenus par Jean-Louis Banères avec le récepteur au leukotriène couplé aux protéines G, BLT1.

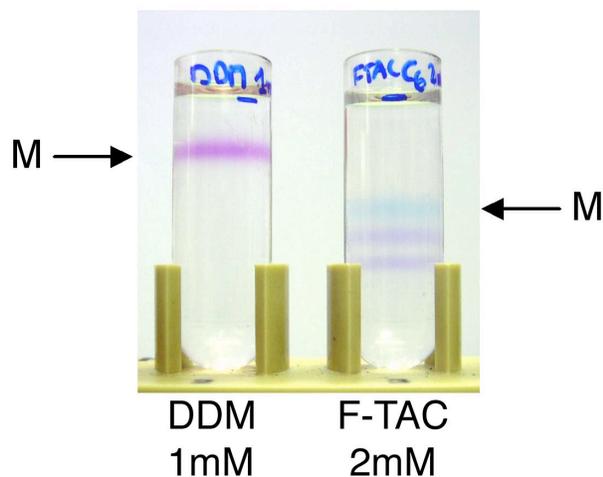


Figure 11 : Mise en évidence de différents états oligomériques de la BR en F-TAC. La BR, solubilisée en octylthiogluco-side (OTG) est diluée à 11mM OTG, incubée 24h et est déposée sur gradients de saccharose (10-30%, p/p) contenant 1mM DDM ou 2mM F-TAC, et est centrifugée 4 h à 200,000 g. Alors qu'en DDM, la BR migre sous forme de monomère, 3 bandes sont visibles en F-TAC. La bande la plus légère correspond au monomère, l'analyse des bandes plus basses est en cours (Lebaupain 2007).

b. Renaturation de protéines membranaires

L'étape de surexpression des protéines membranaires constitue un des goulots d'étranglement dans l'analyse *in vitro* de ces protéines : la surexpression dans une cellule hôte conduit souvent soit à la mort cellulaire du fait de la toxicité de la protéine surexprimée, soit à son accumulation sous forme dénaturée et précipitée dans le cytoplasme de la cellule hôte. La protéine est alors synthétisée en quantité, mais une étape de renaturation – souvent avec de très faibles rendements – est nécessaire pour la poursuite de l'étude. L'utilisation de tensioactifs (hémi)fluorés comme milieu d'accueil pour la renaturation des protéines est donc en cours d'étude, avec la BR comme protéine test. Des résultats préliminaires sont très encourageants, la BR ne se renaturant pas en détergent, mais prenant sa couleur pourpre caractéristique en (H)F-TAC. Les

tensioactifs (hémi)fluorés semblent tout à fait prometteurs dans la renaturation des protéines membranaires en faisceaux d'hélices α (la région transmembranaire de OmpA (petit tonneau β) est bien moins efficacement renaturée en tensioactif (hémi)fluoré qu'en détergent). Je continuerai cette étude, en cherchant à comprendre le rôle des lipides, l'influence de la concentration de tensioactif, ainsi que l'influence de la longueur de la chaîne hydrophobe dans le processus de renaturation. Nous étendrons également cette étude à d'autres protéines d'intérêt biologique, *par ex.* avec BLT1, le récepteur du leucotriène, couplé aux protéines G en collaboration avec Jean-Louis Banères (Montpellier). D'autre part, il sera intéressant d'étudier les liens entre conditions de renaturation et de synthèse *in vitro* (Collaboration avec Francesca Zito)

c. Réinsertion de protéines membranaires dans des membranes lipidiques préformées

La réinsertion dans une membrane naturelle ou artificielle est, dans l'étude des protéines membranaires, une étape souvent incontournable pour comprendre la fonction de la protéine étudiée. Nous avons montré que les tensioactifs (hémi)fluorés ne solubilisent pas les membranes de thylacoïde, et Alexandre Ghazi (IBBMC, Orsay), en étudiant l'effet de l'ajout de (H)F-TAC sur des films noirs, a conclu que l'intégrité membranaire n'était pas affectée jusqu'à des concentrations supérieures à la CMC. D'autre part, il a été montré qu'il était possible d'insérer une protéine dans une membrane lipidique préformée sans solubiliser cette dernière (Palchevskyy et coll. 2006, Park et coll. 2007). Nous envisageons, avec Sophie Cribier au laboratoire, de continuer dans cette direction : dans un premier temps, nous travaillerons avec MscL, le canal mécanosensible de *E. coli*, dans des membranes contenant la « flippase », protéine membranaire transportant activement certains lipides d'un feuillet à l'autre de la membrane (Devaux et coll. 2006). Ce transport de lipides provoque un déséquilibre de surface entre les deux feuillets, qui induit une tension au sein de la membrane. Cette tension pourrait être suffisante pour ouvrir MscL (visualisable par le passage d'une petite molécule colorée), ou pour abaisser la tension nécessaire à son ouverture (accessible par électrophysiologie).

Par ailleurs, Florence Lebaupain a montré, en collaboration avec Jacqueline Barra (Institut Pasteur), que des cellules en culture (fibroblastes ou cellules souches embryonnaires) supportent des concentrations de tensioactifs fluorés supérieures à la CMC, alors qu'elles meurent immédiatement lorsque incubées en présence de détergents.

Les tensioactifs (hémi)fluorés pourraient ainsi être utilisés pour l'insertion de protéines membranaires à la membrane de cellules vivantes : nous pourrions insérer FhuA et suivre l'insertion par la liaison à la surface des cellules du phage T5.

d. Etude structurale de protéines membranaires

Les tensioactifs (hémi)fluorés permettant la stabilisation des protéines membranaires, en particulier à des concentrations de tensioactif relativement élevées (Lebaupain et coll. 2006), une application qui s'impose naturellement est la cristallisation en vue d'études structurales. Du fait de la phobie mutuelle entre chaînes hydrogénées et fluorocarbonées, l'idée est que la cristallisation en tensioactif (hémi)fluoré peut représenter une alternative à la cristallisation en phase cubique pour la formation de cristaux de type I (empilements de cristaux 2D). J'explorerai la possibilité de cristalliser des protéines membranaires en tensioactifs fluorés d'une part avec la BR et de ses lipides endogènes, et d'autre part avec le complexe *b₆f*. En effet, une structure à meilleure résolution est nécessaire afin d'en comprendre le cycle enzymatique. Un paramètre important à étudier sera la quantité de lipides dans la préparation protéique.

II. Etude structurale du complexe FhuA-pb5

Collaboration avec Pascale Boulanger, IBPMC, Orsay. Travail avec Ali Flayhan, étudiant en M2, qui va continuer en thèse sur le sujet.

L'étude des bactériophages, ou virus bactériens, connaît actuellement un regain d'intérêt. Ils représentent le groupe d'organismes le plus important et le plus abondant sur terre, et on les retrouve dans *tous* les biotopes (Ackermann et DuBow, 1987). Du fait de leur abondance et de la présence de prophages dans les génomes bactériens, entre autre, les phages jouent un très grand rôle dans l'écologie et l'évolution des bactéries. La plupart des phages sont capables de détruire les bactéries avec une grande spécificité, ce qui a très tôt suggéré la possibilité d'applications thérapeutiques pour lutter contre les infections bactériennes (d'Herelle 1922, revue dans Hanlon, 2007, cette application toutefois a longtemps été mise de côté suite au succès des antibiotiques). Le séquençage d'un nombre toujours plus important de génomes, les analyses protéomiques, la détermination de la structure des particules virales à différents niveaux de résolution sont autant d'informations nouvelles qui aident à mieux

comprendre l'histoire des phages au cours de l'évolution ainsi que la diversité des mécanismes infectieux.

Les phages, dans leur grande majorité, sont constitués d'une capsidie icosaédrique contenant un ADN linéaire double brin, et d'une queue plus ou moins longue, contractile ou non, dont l'extrémité permet l'ancrage du virus à la bactérie (Ackermann, 2007). La première étape de l'infection est celle de la reconnaissance et l'interaction moléculaire entre le phage et la bactérie. L'ADN est ensuite éjecté hors de la capsidie et transféré à travers l'enveloppe bactérienne au cytoplasme de la cellule hôte. La machinerie biosynthétique de la cellule hôte est alors détournée au profit de la synthèse des protéines et de l'ADN du phage, conduisant à la production de nouveaux virions.

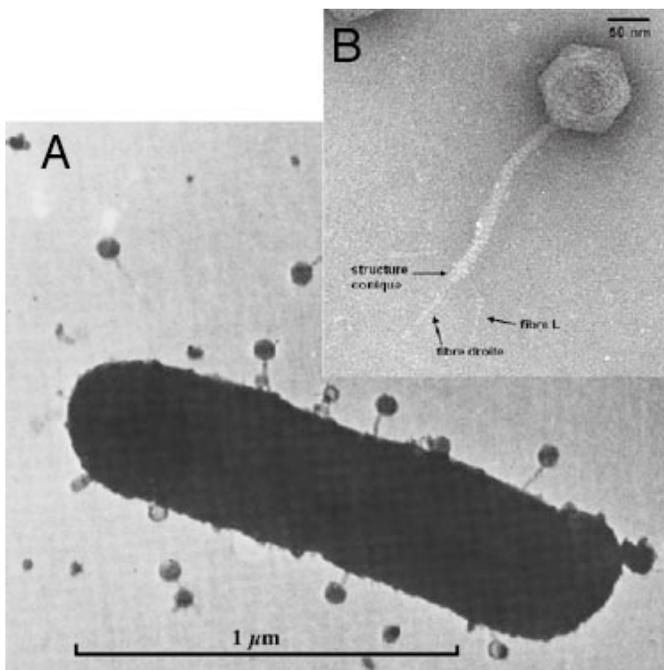


Figure 12 : A. Bactérie infectée par un phage caudé vue en microscopie électronique en coloration négative. B. Le bactériophage T5 est constitué d'une capsidie icosaédrique de 90 nm de diamètre contenant un ADN double brin de 121750 pb, et une queue flexible non contractile de 200nm de long. La queue se termine par trois fibres longues (L) attachées au niveau d'une structure conique qui se prolonge par une fibre droite. Les fibres L se fixent de façon réversible au LPS, alors que la fibre droite, constituée de pb5 et pb2, assure la liaison irréversible du phage à son récepteur ainsi que la formation du canal permettant à l'ADN de pénétrer dans la bactérie.

T5 est un phage caudé (figure 12) : la reconnaissance entre phage et la bactérie se fait de façon réversible par les trois fibres longues du bout de la queue, qui se lient aux lipopolysaccharides (LPS). Le phage « marche » alors à la surface de la bactérie jusqu'à ce que la fibre droite entre en contact avec son récepteur, auquel elle se lie de façon irréversible. Cette liaison implique l'interaction entre la protéine pb5, qui se trouve dans la fibre droite, et FhuA, le transporteur de ferrichrome de la membrane externe de *E. coli*, son récepteur sur la bactérie (Bonhivers et coll. 1996). Cette interaction est le commencement du processus d'infection : l'information de la liaison est transmise le

long de la queue, ouvrant la capsid et libérant l'ADN. Parallèlement, pb2, composant principal de la fibre droite, subit un changement de conformation, permettant à la fibre droite de perforer la paroi bactérienne et de former un canal par lequel l'ADN pénètre dans la cellule (Böhm et coll. 2001).

Pascale Boulanger et son groupe ont surexprimé pb5 dans *E. coli*, et caractérisé le complexe FhuA-pb5 *in vitro* (Plançon et coll. 2002). Le complexe, obtenu après mélange de FhuA (78kDa) et pb5 (71kDa) purifiées indépendamment, est de stoechiométrie 1:1, et est très stable (non dissocié par le SDS jusqu'à une température de 70°C, et jusqu'à de très faibles concentrations, Fig. 12). D'autre part, l'interaction entre FhuA et pb5 stabilise les deux protéines, la température de fusion du complexe étant plus élevée que la température de fusion des deux protéines prises indépendamment. Ceci confirme un probable changement de conformation des deux protéines au sein du complexe, notamment de pb5 qui est par ailleurs très instable en solution (elle s'agrège et précipite à une concentration supérieure à 0,5 mg/ml, pendant une dialyse, en présence d'imidazol, avec l'ajout de détergent... ; oui, elle est un peu capricieuse !). La structure de FhuA a été déterminée par cristallographie (Ferguson et coll 1998, Locher et coll. 1998). En revanche, aucune donnée structurale n'est disponible pour pb5, et une recherche BLAST ne « pêche » que la « receptor binding protein » de BF23, un phage cousin de T5 qui reconnaît BtuB de la membrane externe de *E. coli* (Bradbeer et coll. 1976).

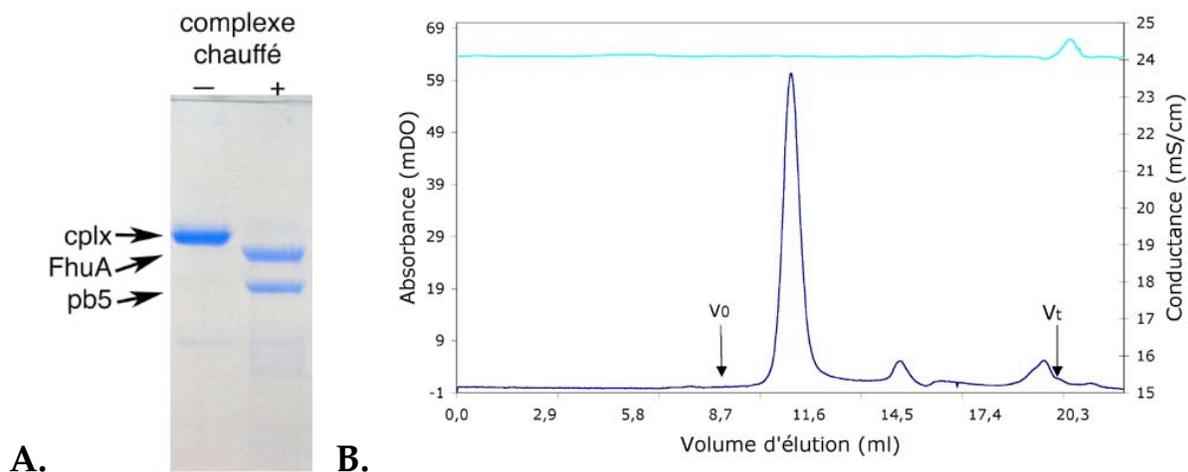


Figure 12 : **A** : gel d'acrylamide 10% du complexe tel (-) ou chauffé à 100°C pendant 2 min (+). La position de migration du complexe, de FhuA et pb5 sont indiquées. **B** : tamis moléculaire du complexe sur une colonne SD200HR (Amersham) en 20mM Tris pH 8, 250mM NaCl, 0,05% C₁₂DAO. FhuA est contaminée par une protéine qui se retrouve dans le complexe, qui élue à un volume de 14,5ml.

1. Etude structurale de pb5 et du complexe FhuA-pb5

Collaboration également avec Mohamed Chami (Biozentrum, Bâle) pour la cristallo 2D.

Alors que l'obtention de cristaux 3D de pb5 est plus délicate, lié aux problèmes d'agrégation mentionné précédemment, une étude structurale du complexe semble tout à fait favorable : les deux protéines constituant le complexe peuvent être obtenues dans des quantités raisonnables (10 et 20 mg de FhuA et pb5 purifié à partir de 3l de culture de *E. coli*), le complexe est stable, il peut être concentré à des concentrations compatibles avec la cristallisation 3D (au moins 20 mg/ml), et la structure de FhuA est connue. L'élucidation de la structure à résolution atomique du complexe sera tout à fait passionnante quant à l'étude de l'interaction irréversible entre les deux protéines et les changements de conformation induits par la formation du complexe, notamment au niveau de pb5 qui transmet l'information de la liaison au phage.

Une fois la structure du complexe déterminée, nous pouvons espérer comprendre le comportement de pb5 en solution, et construire des mutants augmentant la solubilité de la protéine pour permettre sa cristallisation seule : nous aurons ainsi accès au changement de conformation induit par la liaison à FhuA.

Par ailleurs, nous allons également étudier le complexe par cristallisation bidimensionnelle et analyse par microscopie électronique. Une telle approche ne permettra pas de déterminer la structure atomique du complexe, mais pourra donner une enveloppe du complexe à plus basse résolution.

2. Interaction pb5-pb2

pb5 est localisée dans la fibre droite au bout de la queue du phage. Cette fibre est principalement constituée de pb2 : une analyse de la séquence de pb2 prédit trois domaines : un grand domaine N-terminal structuré en « coiled-coil » suggérant que cette protéine remonte sur toute la longueur de la queue jouant le rôle de « règle moléculaire », un deuxième domaine formé de deux hélices transmembranaires putatives, et le domaine C-terminal, contenant un motif à metallopeptidase. Pascale et Lucienne ont surexprimé une partie tronquée de pb2 contenant les deux domaines C-terminaux (Boulangier et coll. 2008) : elles ont pu confirmer la nature membranaire de pb2 tronquée, ainsi que son activité d'hydrolyse du peptidoglycane. Nous nous proposons d'étudier les interactions entre les deux protéines de la pointe, de déterminer des conditions d'association entre les deux protéines (éventuellement en présence de

FhuA), de caractériser et cristalliser le complexe pb5-pb2. Nous pourrions d'une part exprimer et purifier les deux protéines séparément et analyser le complexe formé par leur mise en présence, ou d'autre part les co-exprimer au sein de la même bactérie : cette deuxième alternative pourrait permettre de former la pointe droite dans le cytoplasme de la cellule. Nous pourrions ainsi provoquer et étudier le changement de conformation induisant la formation du canal par incubation avec FhuA. L'étude de la pointe droite et des interactions entre protéines pourra également se faire à partir du phage lui-même. Dans le cas où pb2 et pb5 n'interagissent pas ensemble, nous envisageons de les coexprimer avec pb3 et pb4, dont les cadres de lecture sont en tandem avec celui de pb2 et qui participent probablement à la formation de la plaque entre la fibre droite et la queue.

Conclusion

Les raisons qui poussent à présenter une HDR sont multiples. Celle qui me motive la plus est la possibilité d'encadrer des étudiants en thèse, *i.e.* sur une durée un peu plus longue que quelques semaines ou quelques mois. Je prends beaucoup de plaisir à travailler avec des plus jeunes : leur transmettre mes connaissances, partager mon savoir-faire, leur donner quelques clefs pour poser les bonnes questions et des outils pour essayer d'y répondre... \$ à compléter.

Bibliographie

- Ackermann H.-W., et M.S. DuBow. 1987. *from "Viruses of prokaryotes 1"*, General properties of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton.
- Ackermann, H-W. 2007. "5500 Phages examined in the electron microscope." *Arch. Virol.* 152:227-43.
- Allen, J. F. 2002. "Photosynthesis on ATP-Electrons, Proton Pumps, Rotos, and Poise." *Cell* 110:273-276.
- Anderson, J.M. 2007. "Thylakoid membrane landscape in the sixties: a tribute to Andrew Benson." *Photosynt. Res.* 92:193-7.
- Barthélémy, P, B Ameduri, E Chabaud, J L Popot, et B Pucci. 1999. "Synthesis and preliminary assessments of ethyl-terminated perfluoroalkyl nonionic surfactants derived from tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane." *Org. lett.* 1:1689-92.
- Beckmann, R. et coll. 2001. "Architecture of the Protein-Conducting Channel Associated with the Translocating 80S Ribosome." *Cell* 107:361-372.

- Bengis, C, et N Nelson. 1975. "Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts." *J. Biol. Chem.* 250:2783-8.
- Benson, A A. 1966. "On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes." *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43:265-70.
- Bonhivers, M., A. Ghazi, P. Boulanger, et L. Letellier. 1996. "FhuA, a transporter of the Escherichia coli outer membrane, is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5." *EMBO J.* 15:1850-1856.
- Boulanger, P. et coll. 2008. "Phage T5 straight tail fiber is a multifunctional protein acting as a tape measure and carrying fusogenic and muralytic activities." *J. Biol. Chem.* 283:13556-13564
- Böhm, J et coll. 2001. "FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study." *Curr. Biol.* 11:1168-75.
- Bothorel, P., et C. Lussan. 1970. "Quelques aspects nouveaux d'un modèle dynamique de la membrane biologique." *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D* 680-683.
- Bradbeer, C, M L Woodrow, et L I Khalifah. 1976. "Transport of vitamin B12 in Escherichia coli: common receptor system for vitamin B12 and bacteriophage BF23 on the outer membrane of the cell envelope." *J. Bacteriol.* 125:1032-9.
- Branton, D. 1966. "Fracture faces of frozen membranes." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 55:1048-56.
- Breyton, C. 2000a. "Conformational changes in the cytochrome *b_f* complex induced by inhibitor binding." *J. Biol. Chem.* 275:13195-201.
- Breyton, C. 2000b. "The cytochrome *b(6)f* complex: structural studies and comparison with the *bc₁* complex." *Biochim. Biophys. Acta* 1459:467-74.
- Breyton, C, C Tribet, J Olive, J P Dubacq, et J L Popot. 1997. "Dimer to monomer conversion of the cytochrome *b_f* complex. Causes and consequences." *J. Biol. Chem.* 272:21892-900.
- Breyton, C. 1997. "Contribution à l'étude structurale et fonctionnelle du complexe cytochrome *b_f* de la chaîne photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii*." Doctorat, Université Paris-VI, .
- Breyton, C., E. Chabaud, Y. Chaudier, B. Pucci, et J.-L. Popot. 2004. "Hemifluorinated surfactants: a non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions?." *FEBS letters* 564:312-8.
- Breyton, C., W. Haase, T. A. Rapoport, W. Kühlbrandt, et I. Collinson. 2002. "Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG." *Nature* 418:662-5.
- Breyton, C., B. Nandha, G. N. Johnson, P. Joliot, et G. Finazzi. 2006. "Redox modulation of cyclic electron flow around photosystem I in C3 plants." *Biochem.* 45:13465-75.
- Breyton, C., C. de Vitry, et J.-L. Popot. 1994. "Membrane association of cytochrome *b_f* complex subunits : the Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii* is an extrinsic protein." *J. Biol. Chem.* 269:7597-7602.
- Bril, C. 1958. "Action of a non-ionic detergent on chromatophores of *Rhodospseudomonas spheroides*." *Biochim. Biophys. Acta* 29:458.

- Bron, P, J J Lacapère, C Breyton, et G Mosser. 1999. "The 9 Å projection structure of cytochrome *b_f* complex determined by electron crystallography." *J. Mol. Biol.* 287:117-26.
- Bruni, A., et E. Racker. 1968. "Resolution and reconstitution of the mitochondrial electron transport system. I. Reconstitution of the succinate-ubiquinone reductase." *J. Biol. Chem.* 243:962-71.
- Cardol, P. et coll. 2008. "An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Sous Presse.
- Collinson, I et coll. 2001. "Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase." *EMBO J.* 20:2462-71.
- Cowan, S.W. et coll. 1992. "Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins." *Nature* 358:727-733.
- Criddle, R S, R M Bock, D E Green, et H D Tisdale. 1961. "Specific interaction of mitochondrial structural protein (S.P.) with cytochromes and lipid." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5:75-80.
- d'Herelle, F. 1922. *The Bacteriophage: Its Role in Immunity*. Waverly Press. Baltimore, USA.
- Danielli, J.F., et H. Davson. 1935. "A contribution to the theory of permeability of thin films." *J. Cell Comp. Physiol.* 5:495-508.
- Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber, et H. Michel. 1985. "Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution." *Nature* 318:618-624.
- Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber, et H. Michel. 1984. "X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*." *J. Mol. Biol.* 180:385-398.
- Devaux, P. F, I. López-Montero, et S. Bryde. 2006. "Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells." *Chem. Phys. Lipids* 141:119-32.
- Dutzler, Raimund, Ernest B Campbell, Martine Cadene, Brian T Chait, et Roderick MacKinnon. 2002. "X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity." *Nature* 415:287-94.
- Ferguson, A.D., E. Hofmann, J.W. Coulton, K. Diederichs, et W. Welte. 1998. "Siderophore-mediated iron transport : crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide." *Science* 282:2215-2220.
- Fernandez Moran, H, T Oda, P V Blair, et D E Green. 1964. "A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function. correlated electron microscopic and biochemical studies of isolated mitochondria and submitochondrial particles of beef heart muscle." *J. Cell Biol.* 22:63-100.
- Garavito, R.M., J. Jenkins, J.N. Jansonius, R. Karlsson, et J.P. Rosenbusch. 1983. "X-ray diffraction analysis of matrix porin, an integral membrane protein from *Escherichia coli* outer membranes." *J. Mol. Biol.* 164:313 -327.
- Glaser, M, H Simpkins, S J Singer, M Sheetz, et S I Chan. 1970. "On the interactions of lipids and proteins in the red blood cell membrane." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 65:721-8.

- Gohon, Y., et J.-L. Popot. 2003. "Membrane protein-surfactant complexes." *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8:15-22.
- Gorter, E., et F. Grendel. 1925. "On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood." *J. Exp. Med.* 41:439-443.
- Green, D E, et J F Perdue. 1966. "Membranes as expressions of repeating units." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 55:1295-302.
- Griffiths, D E, et D C Wharton. 1961. "Studies of the electron transport system. XXXV. Purification and properties of cytochrome oxidase." *J. Biol. Chem.* 236:1850-6.
- Hanlon, G. W. 2007. "Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections." *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30:118-28.
- Helenius, A., et K. Simons. 1972. "The Binding of Detergents to Lipophilic and Hydrophilic Proteins." *J. Biol. Chem.* 247:3656-3661.
- Henderson, R., et P.N.T. Unwin. 1975. "Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy." *Nature* 257:28-32.
- Horie, S, et M Morrison. 1963. "Cytochrome c oxidase components. I. Purification and properties." *J. Biol. Chem.* 238:1855-60.
- Israelachvili, J.N., D.J. Mitchell, et B.W. Barry W. Ninham. 1977. "Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles." *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 470:185-201.
- Iwata, M, J Björkman, et S Iwata. 1999. "Conformational change of the Rieske [2Fe-2S] protein in cytochrome *bc*₁ complex." *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:169-75.
- Iwata, S. et coll. 1998. "Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex." *Science* 281:64-71.
- Joliot, P., et A. Joliot. 2002. "Cyclic electron transfer in plant leaf." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:10209-10214.
- Jordan, P. et coll. 2001. "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution." *Nature* 411:909-917.
- Kim, H. et coll. 1998. "Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial *bc*₁ complex from bovine heart." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8026-33.
- Kurusu, G., H. Zhang, J.L. Smith, et W.A. Cramer. 2003. "Structure of the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity." *Science* 302:1009-1014.
- Lebaupain, F. 2007. "Développement de l'utilisation des tensioactifs fluorés pour la biochimie des protéines membranaires." Doctorat, Université Paris-VII, .
- Lebaupain, F. et coll. 2006. "Lactobionamide surfactants with hydrogenated, perfluorinated or hemifluorinated tails: physical-chemical and biochemical characterization." *Langmuir* 22:8881-90.
- Lee, A.G. 2003. "Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective." *Biochim. Biophys. Acta* 1612:1-40.

- Locher, K.P. et coll. 1998. "Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor : crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes." *Cell* 95:771-778.
- Lussan, C., et P. Bothorel. 1969. "Quelques aspects nouveaux d'un modèle de membrane biologique." *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D* 268:1118-1120.
- Makino, S, J A Reynolds, et C Tanford. 1973. "The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins." *J. Biol. Chem.* 248:4926-32.
- Ménéret, Jean-François et coll. 2005. "Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes." *J. Mol. Biol.* 348:445-57.
- Michel, H. 1982. "Three-dimensional crystals of a membrane protein complex. The photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*." *J. Mol. Biol.* 158:567 -572.
- Michel, H., et D. Oesterhelt. 1980. "Three-dimensional crystals of membrane proteins : bacteriorhodopsin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1283-1285.
- Midgett, Charles R, et Dean R Madden. 2007. "Breaking the bottleneck: eukaryotic membrane protein expression for high-resolution structural studies." *J. Struct. Biol.* 160:265-74.
- Mitchell, P. 1957. "A general theory of membrane transport from studies of bacteria." *Nature* 180:134-6.
- Morgan, David Gene, Jean-François Ménéret, Andrea Neuhof, Tom A Rapoport, et Christopher W Akey. 2002. "Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17Å resolution." *J. Mol. Biol.* 324:871-86.
- Mosser, G, C Breyton, A Olofsson, J L Popot, et J L Rigaud. 1997. "Projection map of cytochrome *b_f* complex at 8 Å resolution." *J. Biol. Chem.* 272:20263-8.
- Murata, K. et coll. 2000. "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." *Nature* 407:599-605.
- Palchevskyy, S.S. et coll. 2006. "Chaperoning of membrane protein insertion into lipid bilayers by hemifluorinated surfactants: application to diphtheria toxin." *Biochem.* 45:2629-2635.
- Pardee, A B. 1968. "Membrane transport proteins. Proteins that appear to be parts of membrane transport systems are being isolated and characterized." *Science* 162:632-7.
- Park, Kyu-Ho et coll. 2007. "Fluorinated and hemifluorinated surfactants as alternatives to detergents for membrane protein cell-free synthesis." *Biochem. J.* 403:183-7.
- Peyre, V et coll. 2005. "Detergent binding as a sensor of hydrophobicity and polar interactions in the binding cavities of proteins." *Langmuir* 21:8865-75.
- Peyre, V., S. Patil, G. Durand, et B. Pucci. 2007. "Mixtures of hydrogenated and fluorinated lactobionamide surfactants with cationic surfactants: study of hydrogenated and fluorinated chains miscibility through potentiometric techniques." *Langmuir* 23:11465-74.
- Picot, D., P.J. Loll, et R.M. Garavito. 1994. "The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1." *Nature* 367:243-249.

- Pierre, Y et coll. 1997. "On the presence and role of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome *b_f* complex." *J. Biol. Chem.* 272:21901-8.
- Plançon, L. et coll. 2002. "Characterization of a high-affinity complex between the bacterial outer membrane protein FhuA and the phage T5 protein pb5." *J. Mol. Biol.* 318:557-569.
- Polidori, A et coll. 2006. "Fluorinated and hemifluorinated surfactants derived from maltose: synthesis and application to handling membrane proteins in aqueous solution." *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 16:5827-31.
- Privé, Gilbert G. 2007. "Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins." *Methods (San Diego, Calif.)* 41:388-97.
- Reynolds, J A, et C Tanford. 1970. "Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 66:1002-7.
- Richardson, S H, H O Hultin, et D E Green. 1963. "Structural proteins of membrane systems." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 50:821-7.
- Robertson, J.D. 1957. "New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers." *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:1043-1047.
- Rosenbusch, J.P. 2001. "Stability of membrane proteins: relevance for the selection of appropriate methods for high-resolution structure determinations." *J. Struct. Biol.* 136:144-57.
- Sanders, C.R., A.K. Hoffmann, D.N. Gray, M.H. Keyes, et C.D. Ellis. 2004. "French swimwear for membrane proteins." *ChemBioChem* 5:423-426.
- Schägger, H., et K. Pfeiffer. 2000. "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." *EMBO J.* 19:1777-1783.
- Scheuring S, Seguin J, Marco S, Lévy D, Breyton C, Robert B, Rigaud JL. 2003. AFM characterization of tilt and intrinsic flexibility of Rhodobacter sphaeroides light harvesting complex 2 (LH2). *J. Mol. Biol.* 325:569-80.
- Sekusu, I, P Jurtschuk, et D E Green. 1963. "Studies on the electron transfer system. LI. Isolation and characterization of the D-(-)-beta-hydroxybutyric apodehydrogenase from beef heart mitochondria." *J. Biol. Chem.* 238:975-82.
- Singer, S J, et G L Nicolson. 1972. "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175:720-31.
- Singer, S J, et G L Nicolson. 1971. "The structure and chemistry of mammalian cell membranes." *Am. J. Pathol.* 65:427-37.
- Stroebel, D., Y. Choquet, J.-L. Popot, et D. Picot. 2003. "An atypical haem in the cytochrome *b_f* complex." *Nature* 426:413-418.
- Takahashi, Y et coll. 1996. "The chloroplast ycf7 (petL) open reading frame of Chlamydomonas reinhardtii encodes a small functionally important subunit of the cytochrome *b_f* complex." *EMBO J.* 15:3498-506.
- Van den Berg, Bert et coll. 2004. "X-ray structure of a protein-conducting channel." *Nature* 427:36-44.

- Vanderkooi, G, et M Sundaralingam. 1970. "Biological membrane structure. II. A detailed model for the retinal rod outer segment membrane." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67:233-8.
- de Vitry, C, C Breyton, Y Pierre, et J L Popot. 1996. "The 4-kDa nuclear-encoded PetM polypeptide of the chloroplast cytochrome *b₆f* complex. Nucleic acid and protein sequences, targeting signals, transmembrane topology." *J. Biol. Chem.* 271:10667-71.
- Wainio, W. W. 1964. "A further purification of cytochrome oxidase ." *J. Biol. Chem.* 239:1402-5.
- Wallach, D F, et P H Zahler. 1966. "Protein conformations in cellular membranes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 56:1552-9.
- Weiss, M.S. et coll. 1991. "Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin." *Science* 254:1627-1630.
- Weiss, M.S., T. Wacker, J. Weckesser, W. Welte, et G.E. Schulz. 1990. "The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3 Å resolution." *FEBS Lett.* 267:268-272.
- White, S. H. 2004. "The progress of membrane protein structure determination." *Protein Sci.* 13:1948-9.
- Xia, D. et coll. 1997. "Crystal structure of the cytochrome *bc₁* complex from bovine heart mitochondria." *Science* 277:60-66.
- Yamashita, E, H Zhang, et W A Cramer. 2007. "Structure of the cytochrome *b₆f* complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme cn." *J. Mol. Biol.* 370:39-52.
- Yan, Jiusheng, Genji Kurisu, et William A Cramer. 2006. "Intraprotein transfer of the quinone analogue inhibitor 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone in the cytochrome *b₆f* complex." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103:69-74.
- Yernool, Dinesh, Olga Boudker, Yan Jin, et Eric Gouaux. 2004. "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." *Nature* 431:811-8.
- Zhang, Z. et coll. 1998. "Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc₁*." *Nature* 392:677-84.
- Ziegler, D M, D E Green, et K A Doeg. 1959. "Studies on the electron transfer system. XXV. The isolation and properties of a lipoflavoprotein with diaphorase activity from beef heart mitochondria." *J. Biol. Chem.* 234:1916-21.

Annexes : sélection de 5 articles

Lactobionamide surfactants with hydrogenated, perfluorinated or hemifluorinated tails: physical-chemical and biochemical characterization.

Florence Lebaupain, Andrés Salvay, Blandine Olivier, Grégory Durand, Anne-Sylvie Fabiano, Nicoals Michel, Jean-Luc Popot, Christine Ebel*, Cécile Breyton*, Bernard Pucci*. *Langmuir* **22**, 8881-90, 2006

Redox modulation of cyclic electron flow around Photosystem I in C3 plants

Cécile Breyton, Beena Nandha, Giles N. Johnson, Pierre Joliot et Giovanni Finazzi, *Biochemistry*. **45**, 13465-75, 2006

Three-dimensional structure of SecYEG, the bacterial protein translocation core complex.

Cécile Breyton*, Winfried Haase, Tom Rapoport, Werner Kühlbrandt et Ian Collinson. *Nature*, **418**, 662-665, 2002

Conformational changes in the cytochrome *b₆f* complex induced by inhibitor binding.

Cécile Breyton*, *J. Biol. Chem.* **275**, 13195-13201, 2000

Dimer to monomer conversion of the cytochrome *b₆f* complex : causes and consequence

Cécile Breyton, Christophe Tribet, Jacqueline Olive, Jean-Paul Dubacq et Jean-Luc Popot. *J. Biol. Chem.* **272**, 21892-21900, 1997

Résumé

La clef de voûte de mon travail de recherche est l'étude biochimique et structurale des protéines membranaires. Du fait de leur insertion au sein de la bicouche lipidique, les protéines membranaires nécessitent un traitement particulier pour les en extraire et les manipuler en solution. Pour cela, les détergents non-ioniques sont généralement utilisés : ces molécules amphiphiles se substituent aux lipides, formant une « bouée » autour de la région hydrophobe des protéines membranaires, rendant le complexe protéine/détergent soluble en solution aqueuse. Toutefois, la structure, la dynamique, les propriétés physico-chimiques des détergents ne sont pas équivalentes à celles des lipides, et la solubilisation des protéines membranaires par les détergents est souvent associée à une instabilité, inactivation et/ou dissociation de la protéine étudiée. Une étude biochimique poussée est alors nécessaire afin de déterminer des conditions de manipulation optimales (une protéine pure, active, stable, monodisperse) pour une étude fonctionnelle et structurale.

Lors de ma thèse dans l'équipe de Jean-Luc Popot à l'IBPC à Paris, j'ai développé la biochimie du complexe cytochrome *b₆f*, en étudiant son mécanisme d'inactivation par les détergents, et en caractérisant le complexe purifié en termes de sous-unités (nombre, topologie), de cofacteurs, et d'état d'oligomérisation. Ceci m'a mené à en étudier la structure à partir de cristaux bidimensionnels lors d'un stage post-doctoral à Francfort dans le labo de Werner Kühlbrandt, mais également, à mon retour en France, à développer de nouveaux tensioactifs (hémi)fluorés pour la biochimie des protéines membranaires. De mon séjour en Allemagne j'ai rapporté le goût et la culture de la structure des protéines membranaires, avec la résolution de la structure à 8Å du complexe SecYEG, le translocon de la membrane interne de *E. coli*. Je m'intéresse donc maintenant également au mécanisme de reconnaissance phage-bactérie et de l'injection de l'ADN phagique dans la bactérie d'un point de vue structural.