

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

À L'OBTENTION DU GRADE DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

ERIC TRUDEL, B.Sc. (BIOPHYSIQUE)

IMMOBILISATION DU PHOTOSYSTÈME II EN MONOCOUCHE À L'AIDE DE
LIPIDES FONCTIONNALISÉS

JANVIER 2001

1995

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Mon grand intérêt pour la recherche, particulièrement en biophysique, est sans aucun doute en partie issu de mes années de baccalauréat lorsque je travaillais dans le laboratoire du Dr Daniel Ducharme. Je tiens à remercier Daniel qui m'a montré les rudiments de la recherche, mais avant tout de m'avoir initié et inculqué les rigueurs du domaine dans lequel il excelle, les monocouches.

Je voudrais également remercier deux personnes qui ont toujours su me donner leurs précieux conseils au sujet de mes travaux, les Drs Stéphane Mons et Luc Lebeau. Ils m'ont permis d'approfondir mes connaissances dans le domaine exigeant qu'est celui de la cristallisation des protéines.

J'aimerais aussi mentionner les encouragements et les très bons moments que j'ai passés avec les étudiants du laboratoire, sans tous les nommer, ils se reconnaissent. Je souhaite aussi remercier le centre de recherche en science et ingénierie des macromolécules (CERSIM) pour son soutien financier.

Finalement, lors de ma maîtrise, j'ai su apprécier les grandes qualités de chercheur que possède mon directeur, le Dr Christian Salesse. J'aurai encore la chance d'apprendre beaucoup de lui au cours de mes études doctorales sous sa direction, j'en suis tout à fait convaincu. Je te remercie Christian de m'avoir offert, à moi et aux autres étudiants du laboratoire, un environnement stimulant et propice à la recherche, mais aussi, merci pour ta confiance et ton soutien.

RÉSUMÉ

Le photosystème II core complex (PSII CC) est le plus petit complexe protéique capable d'oxyder l'eau, produisant ainsi de l'oxygène moléculaire. Ce complexe de protéines membranaires est situé dans la membrane thylacoïde des chloroplastes qui est le siège des premières réactions de la photosynthèse. Jusqu'à maintenant, la structure tridimensionnelle du PSII CC n'a pas encore été déterminée à haute résolution. La cryomicroscopie électronique permettrait de fournir un modèle à haute résolution du PSII CC à la condition d'obtenir des cristaux bidimensionnels de PSII CC. Dans le but ultime de produire de tels cristaux, des lipides fonctionnalisés, spécialement conçus pour lier et ancrer le PSII CC en monocouche à l'interface air-eau, ont été synthétisés et caractérisés. Ces lipides comportent un groupement chimique liant spécifiquement le site Q_b du PSII CC.

La mesure des isothermes de pression de surface des lipides fonctionnalisés a permis de déterminer que les propriétés des lipides à long espaceur étaient plus appropriées pour les expériences de cristallisation bidimensionnelle. Par la mesure de l'inhibition du dégagement d'oxygène du PSII CC, nous avons démontré que les lipides fonctionnalisés à long espaceur se lient spécifiquement au PSII CC lorsqu'ils sont solubilisés par un détergent. L'utilisation de la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie optique en champ proche (SNOM) a permis de visualiser des domaines de PSII CC liés à

une monocouche de lipides fonctionnalisés. La microscopie SNOM a permis de confirmer que les domaines observés par AFM sont composés de PSII CC. En effet, ces domaines sont fluorescents, ce qui indique la présence de la chlorophylle du PSII CC dans ces domaines. Nos résultats démontrent donc que le PSII CC peut, non seulement lier les lipides fonctionnalisés en solution mais aussi, grâce à l'imagerie par AFM et SNOM, lier ces lipides en monocouche.

Un grand nombre de paramètres expérimentaux ont ensuite été testés en microscopie électronique pour la cristallisation en deux dimensions du PSII CC. Une méthode récente de cristallisation des protéines membranaires a été adaptée et présente des résultats préliminaires prometteurs.

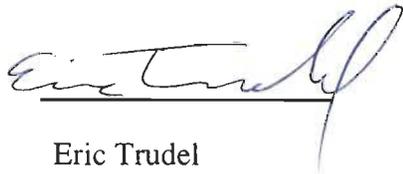
CONTRIBUTION DE CHACUN DES AUTEURS DE L'ARTICLE PRÉSENTÉ DANS
CE MÉMOIRE

Étant donné que ce mémoire de maîtrise est rédigé sous forme d'article, il importe de mentionner la contribution de chacun des auteurs à la partie expérimentale et à la rédaction de cet article.

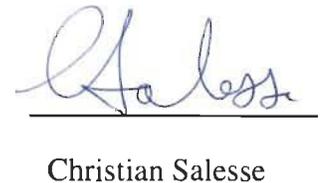
La synthèse organique et les analyses par résonance magnétique nucléaire des lipides-DCPU et des analogues DCMU ont été effectuées par M. Stéphane Mons qui était alors étudiant au doctorat sous la supervision des Drs Luc Lebeau et Charles Mioskowski du laboratoire de synthèse bioorganique de l'Université Louis Pasteur à Strasbourg en France. Les mesures de dégagement d'oxygène des analogues DCMU ont été effectuées par Mme Judith Gallant qui était sous la supervision du Dr Christian Salesse.

Les observations par microscopie à force atomique (AFM) et par microscopie optique en champ proche (SNOM) ont été effectuées au cours d'un stage dans le laboratoire de photochimie et de spectroscopie du Dr Frans De Schryver de l'Université de Leuven en Belgique. Cet appareillage sophistiqué qui a été mis à ma disposition a nécessité l'aide de deux étudiants au doctorat, étant donné la complexité de cet appareillage, M. Phillippe Foubert pour les expériences en AFM et Mme Karin Jeuris en SNOM.

J'ai entièrement rédigé l'article constituant le chapitre 2 intitulé « Design of functionalized lipids and evidence for their binding to photosystem II core complex by oxygen evolution measurements, AFM, and SNOM», à l'exception de la section 3.2, traitant de la synthèse des lipides-DCPU, qui a été écrite par M. Stéphane Mons. Tous les autres résultats présentés dans ce travail découlent de manipulations que j'ai planifiées et effectuées.



Eric Trudel



Christian Salesse

TABLES DES MATIÈRES

Remerciements	i
Résumé	ii
Contribution de chacun des auteurs de l'article présenté dans ce mémoire	iv
Tables des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Les deux phases de la photosynthèse	1
1.2 Structures impliquées dans la phase lumineuse	2
1.3 Mécanisme général de la phase lumineuse	6
1.4 Photosystème II : structure et fonction.	10
1.4.1 Sous-unités composant le photosystème II	11
1.4.2 Les constituants du photosystème II core complex	14
1.4.2.1 Polypeptides D1 et D2	15

1.4.2.2 Polypeptides CP43 et CP47	17
1.4.2.3 Cytochrome b559	17
1.4.2.4 Protéine extrinsèque de 33kDa	18
1.4.2.5 Protéine extrinsèque de 23 kDa.....	19
1.4.2.6 Protéine extrinsèque de 17 kDa	19
1.4.2.7 Protéines de faible poids moléculaire.....	20
1.4.3 Forme oligomérique du photosystème II	21
1.4.4 État des connaissances sur la structure tridimensionnelle du PSII.....	23
1.5 La microscopie à force atomique et la microscopie optique en champ proche	31
1.5.1 La microscopie à force atomique en mode non-contact.....	31
1.5.2 La microscopie optique en champ proche	40
1.6 Objectifs du projet de recherche.....	49
 Chapitre 2: Design of Functionalized Lipids and Evidence for their Binding to Photosystem II Core Complex by Oxygen Evolution Measurements, AFM, and SNOM	
2.1 Abstract.....	54
2.2 Introduction	55
2.3. Materials and Methods.....	57

2.3.1 Purification of PSII CC	57
2.3.2 Synthesis and Characterization of DCPU-Lipids	57
2.3.3 Measurement of PS II CC Oxygen Evolution	59
2.3.4 Monolayer Characterization of the DCPU-Lipids	60
2.3.5 AFM and SNOM Measurements of Lipid Bound PSII CC	61
2.3.6 Crystallization Trials and Electron Microscopy	62
2.4 Results and Discussion	64
2.4.1 PSII CC Oxygen Evolution Inhibition by DCPU Analogs	64
2.4.2 Monolayer Characterization of DCPU-Lipids.....	65
2.4.3 Evidence for the Binding of DCPU-Lipids to PSII CC by Oxygen Evolution Measurements	67
2.4.4 AFM and SNOM Imaging of PSII CC Bound to DCPU-Lipid Films.....	68
2.5. Conclusion.....	74
2.6. References	75
Chapitre 3: Conclusion et perspectives de recherche	
3.1 Récapitulation des résultats.....	88
3.2 Comparaison entre les résultats obtenus en AFM et ceux publiés précédemment	93

3.3 Développements récents en cristallisation des protéines membranaires en deux dimensions.....	98
3.3.1 Cristallisation par la méthode impliquant les Biobeads.....	98
3.4 Perspectives de recherche	102
4 Références.....	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Liste de toutes les sous-unités comprises dans le PSII et de leurs caractéristiques.....	13
Tableau 2.1. I_{50} values calculated from oxygen evolution measurements of DCMU and its DCPU analogs.....	79

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Le chloroplaste et ses constituants	3
Figure 1.2. Éléments de la membrane thylacoïde impliqués dans la phase lumineuse.....	5
Figure 1.3. Organisation et disposition des composantes des thylacoïdes.....	7
Figure 1.4. Modèle schématique du PSII.....	12
Figure 1.5. Structure du centre réactionnel du PSII présentant la région liant la chlorophylle.	16
Figure 1.6. Carte tridimensionnelle d'un monomère de PSII CC sans le OEC.....	25
Figure 1.7. Projection du côté luminal de la structure du PSII CC incluant le complexe producteur d'oxygène.	27
Figure 1.8. Modèle du supercomplexe PSII.....	30
Figure 1.9. Courbe de van der Waals de la force inter-atomique.	33
Figure 1.10. Représentation schématique d'un AFM.....	35
Figure 1.11. Différence entre les images qu'on peut observer grâce aux modes de mesure non-contact et contact.....	39
Figure 1.12. Génération d'ondes évanescentes par une petite ouverture.	42
Figure 1.13. Représentation schématique de l'appareillage requis pour un microscope optique en champ proche.....	45

Figure 1.14. Images en microscopie électronique à balayage de pointes utilisées en SNOM.....	47
Figure 2.1. Structure of DCMU analogs and functionalized DCPU-lipids.	80
Figure 2.2. Surface pressure-area isotherms of DCPU-lipids 6-9	81
Figure 2.3. Effect of DCPU-lipids 8 and 9 on the oxygen evolution of PSII CC.	82
Figure 2.4. AFM topography image in non-contact mode of PSII CC bound to a DCPU-lipid 8 layer.....	83
Figure 2.5. Various representative x-z line scans calculated from the AFM images.....	84
Figure 2.6. Proposed model for the binding of PSII CC to the DCPU-lipid monolayer.....	85
Figure 2.7. SNOM images of a film of PSII CC bound to a layer of DCPU-lipid 8	86
Figure 2.8. Electron micrograph of a typical negatively stained 2D close-packing of PSII CC.....	87
Figure 3.1. Modèle de la liaison du PSII CC aux lipides-DCPU	91
Figure 3.2. Représentation d'un puits en teflon utilisé lors des essais de cristallisation avec les Biobeads.	100
Figure 3.3. Illustration du processus de cristallisation en trois étapes	101
Figure 3.4. Micrographies électronique supplémentaires de structures organisées de PSII CC.....	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	adénosine diphosphate
AFM	microscopie à force atomique (atomic force microscopy)
ATP	adénosine triphosphate
FAD	flavine adénine dinucléotide
NADP ⁺ /NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OEC ou OEE	Complexe producteur d'oxygène
PS II	photosystème II
PS II CC	photosystème II core complex
SNOM	microscopie optique à balayage en champ proche (scanning near-field optical microscopy)
RC	Centre réactionnel

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Les deux phases de la photosynthèse

Les organismes doués du pouvoir de photosynthèse, appelés phototropes, comprennent certaines bactéries, les cyanobactéries, les algues, ainsi que les plantes vasculaires supérieures et avasculaires. Même si on s'attarde surtout à la photosynthèse chez les plantes supérieures, il faut remarquer que la plupart des découvertes fondamentales ont été obtenues en étudiant des espèces plus rudimentaires d'organismes photosynthétiques, notamment les bactéries. À l'exception de certaines bactéries anaérobiques, tous les phototropes rejettent, comme produit de la photosynthèse, de l'oxygène. On pense que c'est l'évolution de certaines bactéries productrices d'oxygène qui ont modifié, il y a quelques milliards d'années, l'atmosphère initialement réductrice de la terre en un environnement oxydant. Maintenant, la photosynthèse chez les plantes permet de convertir le gaz carbonique en oxygène qui est nécessaire à la vie animale.

La photosynthèse peut être divisée en deux grands processus. Dans le premier, la phase lumineuse, des protons puisés dans l'eau servent à la synthèse chimiosmotique d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique, pendant qu'un atome d'hydrogène de

l'eau sert à réduire le NADP^+ en NADPH. Ces réactions induites par la lumière se caractérisent par une production d'oxygène gazeux qui a pour origine le clivage d'une molécule d'eau. La deuxième phase photosynthétique consiste en l'utilisation du NADPH et de l'ATP dans une série de réactions qui mènent à la réduction de l'anhydride carbonique gazeux en glucides. Comme ces dernières réactions ne dépendent pas directement de la présence de lumière, mais seulement d'un apport de NADPH et d'ATP, on les qualifie de réactions obscures.

1.2 Structures impliquées dans la phase lumineuse

Chez les algues et les plantes supérieures, la photosynthèse a lieu dans des organites spécialisés appelés chloroplastes (voir figure 1.1). L'architecture fondamentale du chloroplaste consiste en un réseau membraneux interne appelé membrane thylacoïde, siège des réactions lumineuses de la photosynthèse. Cette membrane thylacoïde constitue un réseau continu, finement plissé qui baigne dans la matrice aqueuse du cytoplasme. On appelle cette matrice aqueuse le stroma et c'est cette région qui est le siège des réactions obscures en photosynthèse.

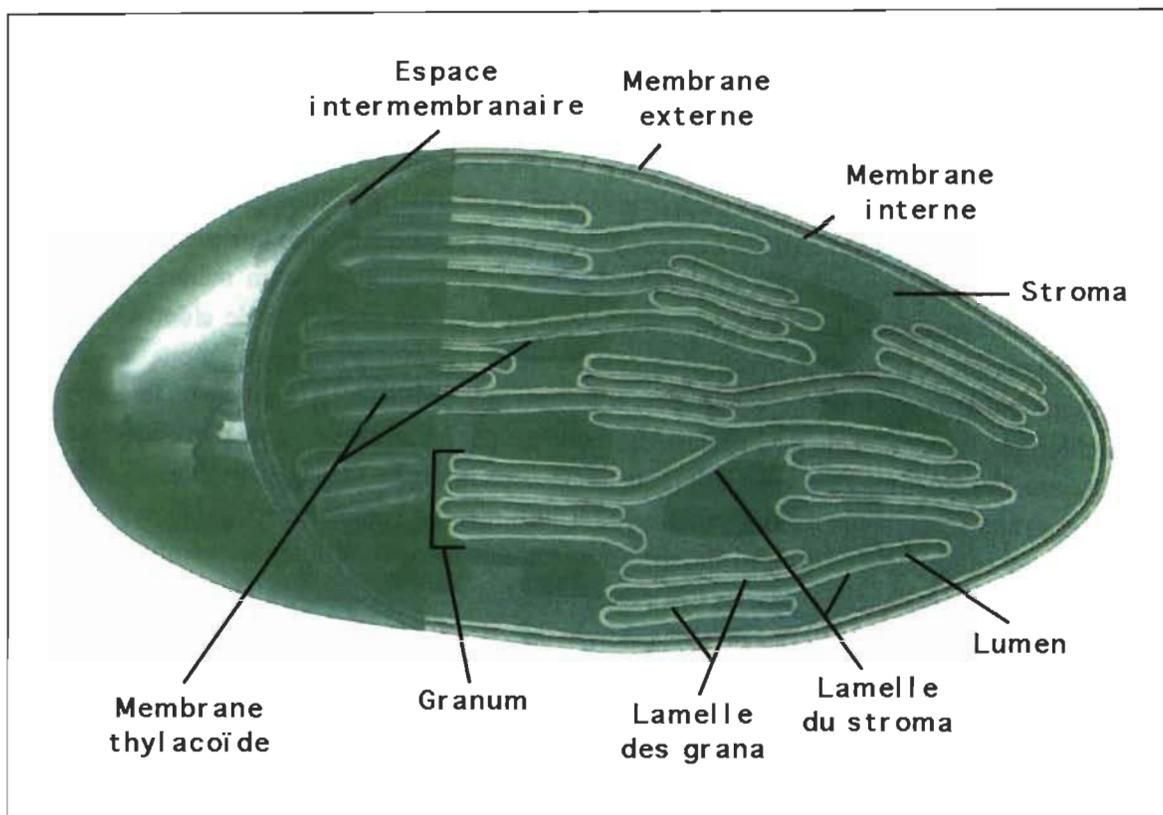


Figure 1.1. Le chloroplaste et ses constituants (adapté de Horton *et al.*, 1993).

Le chloroplaste est délimité par une paire de membranes très perméables au CO_2 et sélectivement perméables à d'autres métabolites. L'espace aqueux que renferme la membrane thylacoïde est le lumen (voir figure 1.2). Les empilements de membranes thylacoïdes sont appelés grana. Les grana peuvent être composés de vésicules aplaties prenant la forme d'empilements complets ou de vésicules uniques, libres dans le stroma et reliant entre eux différents grana. Les zones de membranes thylacoïdes empaquetées en grana et sans contact avec le stroma sont les lamelles des grana, tandis que les zones accessibles au stroma sont les lamelles du stroma.

Deux types de complexes, appelés photosystèmes, représentent les unités fonctionnelles au sein desquelles se déroulent les réactions photo-induites de la photosynthèse. Les deux photosystèmes, le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII), font partie de la membrane thylacoïde, ainsi que d'autres composants actifs de la photosynthèse qui y sont enfouis ou associés. La figure 1.2 présente les constituants de la membrane thylacoïde qui sont impliqués dans la phase lumineuse. Il est évident que cette membrane possède une composition élevée en protéines intrinsèques, en plus des protéines périphériques. Bien que toutes les étapes de la phase lumineuse soient présentées dans cette figure, uniquement celles impliquant le PSII seront discutées plus en détail dans le présent travail.

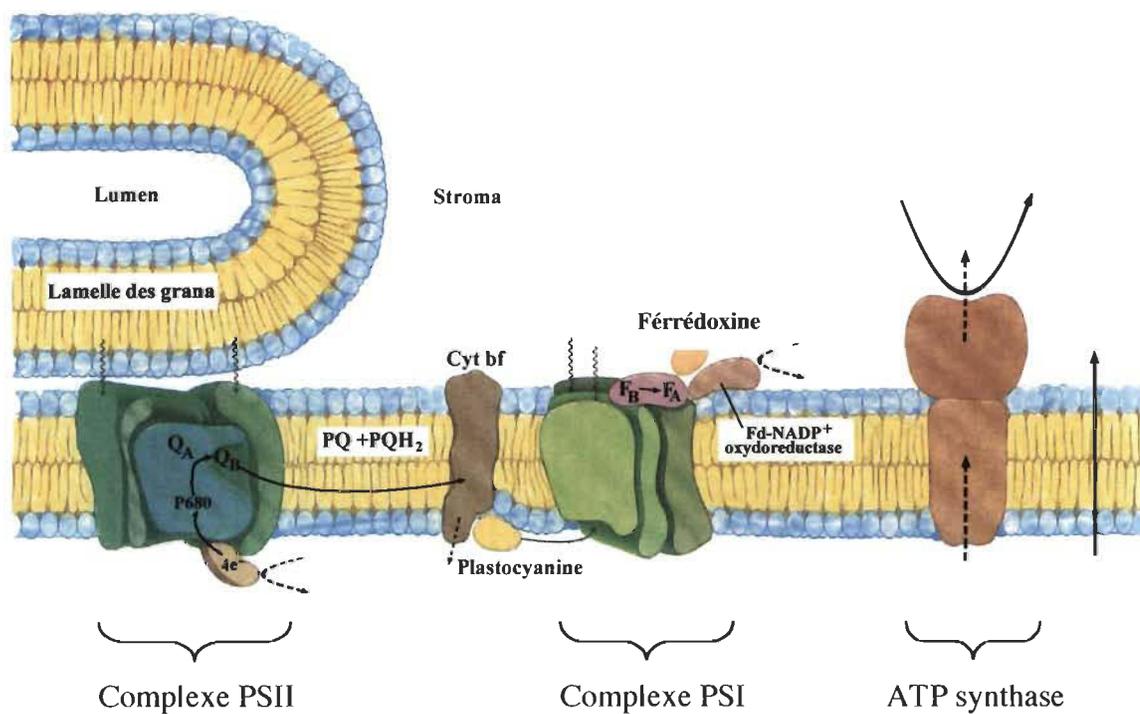


Figure 1.2. Éléments de la membrane thylacoïde impliqués dans la phase lumineuse (adapté de Horton *et al.*, 1993).

La figure 1.3 montre la disposition spécifique des constituants de la membrane thylacoïde. Le PSI est localisé principalement dans les régions non empilées de la membrane thylacoïde tandis que le PSII se situe principalement dans des régions empilées. L'évidence de cette distribution a été obtenue d'études où les membranes thylacoïdes ont été fragmentées en vésicules par ultrasons (Andersson *et al.*, 1982). Les vésicules empilées et non-empilées ont ensuite été fractionnées par centrifugation. Leur composition en chlorophylle a ensuite été déterminée par spectroscopie, ce qui a permis l'identification des photosystèmes. Cette distribution particulière des constituants de la membrane thylacoïde a également été observée par cryofracture (Miller et Cushman, 1978). Cet aspect sera discuté plus en détail plus loin dans ce travail.

1.3 Mécanisme général de la phase lumineuse

La fonction élémentaire du PSII est d'arracher des électrons de l'eau afin de produire de l'oxygène moléculaire. Un fait surprenant est que la structure du PSII ressemble à celle du centre réactionnel bactérien qui ne produit pas d'oxygène. Quand le PSII absorbe un photon d'une longueur d'onde maximale de 680 nm, il déclenche la perte d'un électron d'une

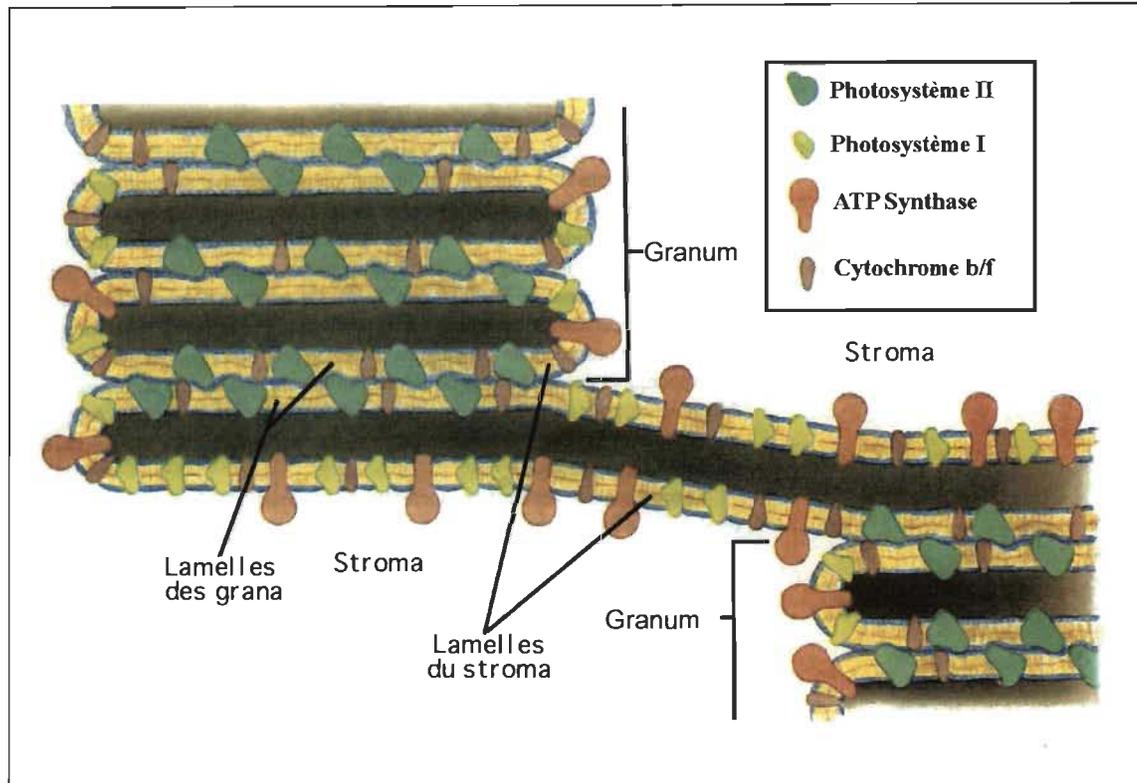


Figure 1.3. Organisation et disposition des composantes des thylacoïdes (adapté de Horton *et al.*, 1993).

chlorophylle du centre réactionnel, la chlorophylle P_{680} , formant ensuite la P_{680}^+ . Tout comme chez la bactérie photosynthétique, l'électron est transporté successivement via une phéophytine, une quinone (Q_A) et un atome de fer au dernier accepteur d'électron, une autre quinone (Q_B), sur la surface stromale de la membrane thylacoïde (Babcock, 1993). La chlorophylle P_{680}^+ du centre réactionnel (voir figure 1.2), oxydée photochimiquement, est le plus puissant oxydant biologique connu. Il est suffisamment puissant pour oxyder l'eau, qui est un donneur d'électron plus abondant que le H_2S et le H_2 , utilisés par les bactéries; celles-ci ne peuvent oxyder l'eau puisque le P^+ du centre réactionnel bactérien n'est pas un oxydant assez puissant. Les électrons servant à la réduction du P_{680}^+ sont obtenus d'une molécule d'eau liée, à la surface luminale de la membrane thylacoïde, à un complexe de trois protéines, appelé complexe producteur d'oxygène. Un total de deux molécules d'eau sont clivées en quatre protons, quatre électrons et une molécule d'oxygène. Les électrons sont transférés sur le polypeptide D1 au centre réactionnel P_{680} où ils vont régénérer la chlorophylle réduite (Babcock, 1993). Les protons issus du clivage de l'eau demeurent du côté du lumen thylacoïdal.

Comme le montre la figure 1.2, le PSI et le PSII sont spatialement séparés dans la membrane thylacoïde. Il existe des transporteurs d'électrons comme la plastoquinone et la plastocyanine qui transfèrent des électrons entre les deux photosystèmes. Les électrons libérés de la chlorophylle P_{680} se déplacent vers un accepteur, une quinone, à la surface

stromale de la membrane thylacoïde (Barber *et al.*, 1997; Nugent, 1996). Après l'absorption d'un second photon, la quinone Q accepte un second électron de P_{680} et, ainsi, avec deux protons venant du stroma, forme la quinone réduite QH_2 . La QH_2 diffuse au travers de la membrane jusqu'au cytochrome b/f où elle relâche simultanément ses deux électrons au site Q_B de la surface luminale et ses deux protons dans le lumen; le largage de ces protons ajoute à la force proton-motrice (Bricker, 1990). Dans le lumen, les protons transportés avec ceux qui sont relâchés par l'eau génèrent un gradient de pH de part et d'autre de la membrane thylacoïde. Ce gradient sera mis à profit pour produire de l'énergie grâce à l'ATPsynthase (Nugent, 1996).

Le PSI est localisé dans des endroits non-empilés de la membrane thylacoïde (comme mentionné ci-haut) et contient la chlorophylle P_{700} au niveau du centre réactionnel (voir figure 1.3). Les électrons du cytochrome b/f sont acheminés au PSI par la plastocyanine, une protéine soluble transporteur d'électrons qui diffuse dans le lumen thylacoïdal (Fromme, 1996). Cette plastocyanine transfère son électron à la chlorophylle P_{700}^+ . Cette dernière est formée lors de l'absorption d'un photon du complexe collecteur de lumière (l'antenne) du PSI. L'électron relâché par le P_{700} est transporté, par une série de transporteurs, du centre réactionnel jusqu'à la surface stromale où la ferrédoxine :NADP⁺ réductase transfère l'électron de la ferrédoxine au NADP⁺. L'accumulation de protons dans le lumen sert au fonctionnement de l'ATPsynthase. Tout comme dans les mitochondries, le

mouvement de trois protons au travers du complexe CF_0CF_1 de l'ATPsynthase est couplé à la synthèse d'un ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (P_i). L'ATP et le NADPH sont générés dans le stroma du chloroplaste, là où il sont utilisés pour la fixation du CO_2 . D'un point de vue fonctionnel, l'orientation du PSII et du PSI doit être respectée afin que le gradient de pH s'établisse pour faire fonctionner l'ATPsynthase (figure 1.2).

1.4 Photosystème II : structure et fonction

Martin Kamen et Sam Ruben à la fin des années '30 ont conduit les premières expériences utilisant des isotopes radioactifs pour étudier la photosynthèse (Ruben et ses collaborateurs, 1941 et Kamen, 1982). Ils ont renversé l'opinion courante à l'époque, en suggérant que la source de l'oxygène produit par les plantes provient de l'eau. Hill et Scarisbrick (1940) ont formulé le modèle des réactions photosynthétiques de transfert d'électrons qui est toujours en vigueur, c'est-à-dire en établissant que l'absorption de la lumière par les pigments permet de réduire un accepteur d'électrons, tel le ferricyanure de potassium. Il sera établi plus tard que l'enzyme impliquée dans cette fonction est le PSII (Emmerson et Rabinowitch, 1959).

Quoique la fonction du PSII soit bien connue, son fonctionnement du point de vue moléculaire n'est pas parfaitement élucidé. Cependant, l'aspect qui demeure le moins bien

compris au sujet du PSII est sa structure. Cette section mettra en évidence les relations entre les différents composants du PSII et leurs fonctions respectives, en plus de présenter l'état des connaissances au sujet de la structure tridimensionnelle du PSII.

1.4.1 Sous-unités composant le photosystème II

On peut qualifier le PSII comme étant une H₂O-plastoquinone oxydoréductase. Le PSII est un gros complexe comprenant plus de 25 protéines différentes. Le meilleur modèle jusqu'à maintenant, montré à la figure 1.4, représentant la disposition approximative des sous-unités entre elles, tient compte des résultats de cross-linking, de cryo-fracture et de microscopie électronique de particules isolées (Hankamer et Barber, 1997). Comme montré au tableau 1.1, le nom des sous-unités provient souvent du nom du gène qui code la sous-unité en question. Ce tableau regroupe toutes les sous-unités composant le PSII et inclut: le gène codant, le nom, le poids moléculaire et le nombre d'hélices alpha transmembranaires de chaque protéine composant le PSII (Hankamer et Barber, 1997). Ce tableau présente aussi la composition en sous-unités du centre réactionnel (RC). À la figure 1.4, les sous-unités en rouge constituent le photosystème II core complex (PSII CC). Toutes ces sous-unités ont été étudiées en détail et une liste de références pertinentes est donnée dans la revue de Hankamer et Barber (1997).

Gène	Sous-unité	Poids moléculaire (kDa)	Nombre d'hélices α transmembranaires
*PsbA	D1	38.0	5
*PsbD	D2	39.4	5
*PsbE	a-Cyt b559	9.2	1
*PsbF	b-Cyt b559	4.4	1
*PsbI	protéine I	4.1	1
*PsbB	CP47	56.2	6
*PsbC	CP43	50.0	6
PsbG	?	-	1
*PsbH	protéine H	7.6	1
PsbJ	protéine J	4.1	1
*PsbK	protéine K	4.2	1
*PsbL	protéine L	4.3	1
PsbM	protéine M	3.7	1
PsbN	protéine N	4.7	0
*PsbO	protéine de 33 kDa	26.5	0
*PsbP	protéine de 23 kDa	20.2	0
*PsbQ	protéine de 16 kDa	16.5	0
PsbR	protéine de 10 kDa	10.2	4
*PsbS	protéine Lhc-like	21.7	1
PsbT	protéine Ycf8	3.8	0
PsbT	protéine de 5 kDa	3.2	0
PsbU	protéine U	~10	0
PsbV	Cyt c550	15.1	1
*PsbW	protéine W	5.9	1
*PsbX	protéine X	4.2	1
PsbY	protéine Y	4.7	1
Lhcb1	Lhcb1	25	3
Lhcb2	Lhcb2	25	3
Lhcb3	Lhcb3	25	3
Lhcb4	CP29	29	3
Lhcb5	CP26	26	3
Lhcb6	CP24	24	3

} RC

Tableau 1.1 Liste de toutes les sous-unités comprises dans le PSII et de leurs caractéristiques. RC désigne les sous-unités composant le centre réactionnel. Les sous-unités composant le PSII CC sont définies par un astérisque. Adapté de Hankamer et Barber (1997).

1.4.2 Les constituants du photosystème II core complex

Le traitement du PSII par des détergents doux, comme le dodécyl maltoside ou l'octyl glucoside, à des ratios détergent:chlorophylle peu élevés, produit un complexe de PSII qui peut être séparé par des moyens conventionnels de purification (Rutherford, 1989). L'utilisation de plus de détergent occasionne la dissociation d'une partie du complexe et spécialement les protéines servant d'antenne (LHCB 1,2,3 et CP24, 26 et 29). Par ce traitement, on obtient donc le PSII CC. Les sous-unités composant le PSII CC sont indiquées au tableau 1.1. Le PSII CC a comme propriété de conserver son activité de dégagement d'oxygène par le clivage d'une molécule d'eau. Un traitement plus sévère du PSII CC permet de le séparer en ses constituants. Cependant, il n'a pas encore été possible d'isoler le centre réactionnel en préservant l'activité de clivage de l'eau, mais cette structure conserve la fonction de transférer un électron par l'activation par la lumière.

Chez les plantes supérieures, le PSII CC est connu comme étant constitué de plusieurs protéines membranaires (Rutherford, 1989). Les plus importantes sont : D1, D2, les deux sous-unités du cytochrome b559 et les deux polypeptides CP43 et CP47 liant la chlorophylle (voir tableau 1.1). Les protéines extrinsèques de 17, 23 et 33 kDa sont aussi associées au PSII CC. Les autres polypeptides associés au PSII CC sont de faible poids moléculaire et peuvent être séparés par électrophorèse sur un gel spécifique pour les faibles

masses moléculaires (Hansson et Wydrzynski, 1990). Ces protéines sont appelées : H, I, J, K, L, M, N, R, S, T, U, V, W, X et Y. Leurs masses moléculaires apparentes varient entre 4 et 22 kDa et la plupart de leurs fonctions respectives restent encore mal connues.

1.4.2.1 Polypeptides D1 et D2

Les polypeptides D1 et D2 sont homologues et forment un hétérodimère au sein du centre réactionnel. D'ailleurs, ces protéines sont hautement conservées entre les espèces de plantes supérieures et possèdent également un degré d'homologie significatif avec les sous-unités L et M des bactéries photosynthétiques (Nugent, 1996). Un modèle théorique du centre réactionnel du PSII a été calculé (Nugent, 1996) à partir des coordonnées du centre réactionnel bactérien (de la bactérie *Rps. viridis*) qui a été cristallisé par Deisenhofer et ses collaborateurs (Deisenhofer *et al.*, 1984). Une image de ce modèle est présentée à la figure 1.5 qui montre que les deux sous-unités D1 et D2 possèdent entre elles un bon degré d'homologie structurale. De plus, il a été proposé que D1 correspond à la sous-unité bactérienne L et D2 à la sous-unité M (Michel *et al.*, 1988, Hansson et Wydrzynski, 1990.). D1 lie la majorité des cofacteurs impliqués dans le transport d'électrons.

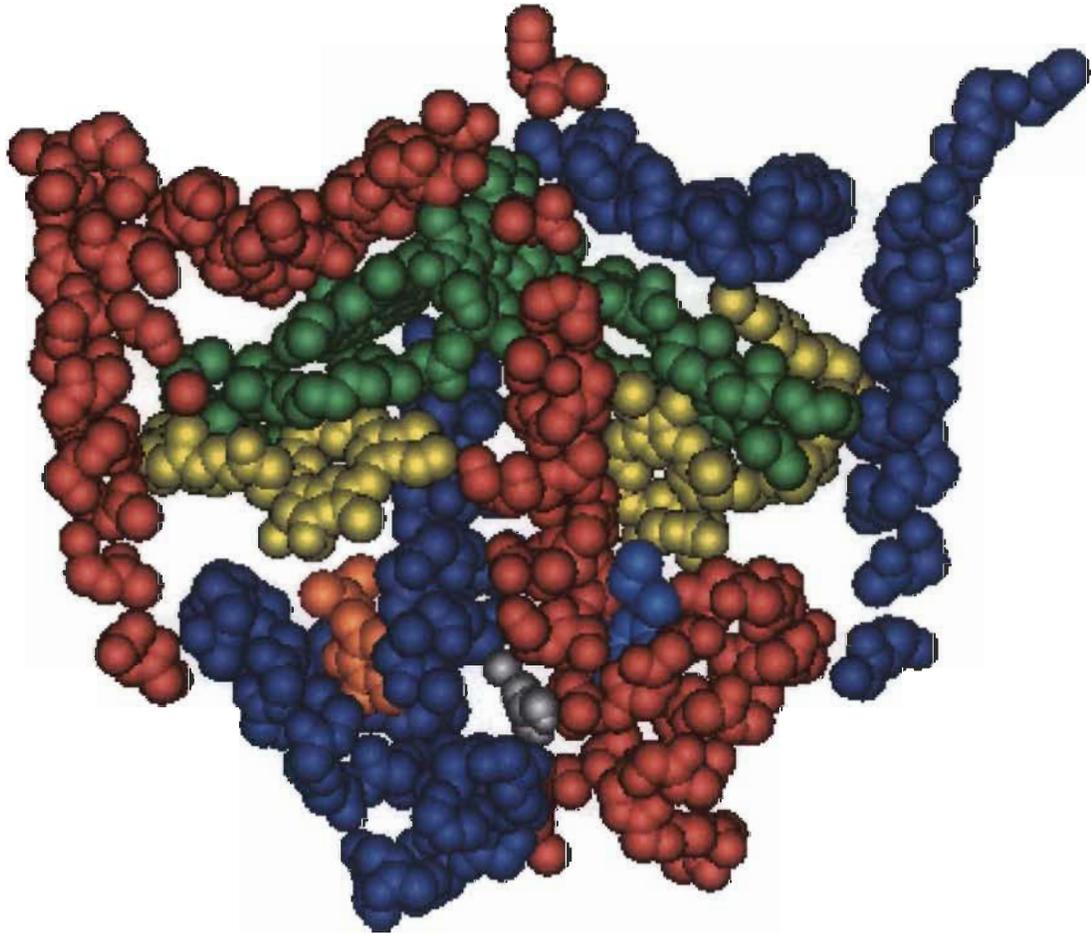


Figure 1.5. Structure du centre réactionnel du PSII présentant la région liant la chlorophylle. La sous-unité D1 est en bleu foncé, la D2 en rouge, les chlorophylles en vert, les phéophytines en jaune, Q_A en bleu clair, Q_B en orange et le bicarbonate en gris (Nugent, 1996).

1.4.2.2 Polypeptides CP43 et CP47

Les sous-unités CP43 et CP47, qui sont très apparentées, contiennent environ 500 acides aminés formant 6 hélices alpha transmembranaires (Bricker, 1990). Elles contiennent toutes deux un grand nombre d'histidines, lient une même quantité de caroténoïdes et possèdent une grande boucle luminale entre les hélices alpha 5 et 6 qui pourrait jouer un rôle directement ou indirectement dans la réaction de l'oxydation de l'eau. Les résultats de la délétion du gène codant pour la CP47 et d'une variété de mutagénèses dirigées suggèrent que la CP47 joue un rôle important dans l'assemblage et la fonction du PSII (Vermaas, 1993). La CP47 semble aussi agir comme une antenne pour le PSII CC et est nécessaire à l'activité d'oxydation de l'eau (Vermaas, 1993).

1.4.2.3 Cytochrome b559

Le cytochrome b559 est composé de deux sous-unités, α et β (tableau 1.1). Ces

deux protéines sont étroitement associées aux sous-unités D1 et D2 et forment probablement un hétérodimère pour lier un groupement hème via l'unique histidine contenue dans leur séquence (Babcock *et al.*, 1985). Il y a eu beaucoup de spéculation concernant la fonction du cytochrome b559, mais l'idée qui est la plus acceptée à présent est qu'il joue un rôle protecteur comme accepteur ou donneur d'électrons sous des conditions où le flux d'électrons au travers du PSII n'est pas optimisé (Barber *et al.*, 1997). Des expériences de cross-linking ont indiqué que ce cytochrome est situé près de la sous-unité D1 puisqu'une liaison est survenue entre la partie N terminale de la sous-unité α et la boucle hydrophobe près du site de liaison Q_B (Barbato *et al.*, 1992a et 1992b).

1.4.2.4 Protéine extrinsèque de 33 kDa

En contraste avec son poids moléculaire calculé de 26.5 kDa, la protéine extrinsèque est appelée « 33 kDa » (tableau 1.1) (Nixon *et al.*, 1992). Cette sous-unité joue un rôle important dans le maintien d'un environnement optimal pour l'oxydation de l'eau. D'autres études démontrent que la 33kDa stabilise le coeur manganèse (« Mn cluster »), mais il n'y a pas d'évidence montrant qu'elle le lie directement. Des études de cross-linking indiquent

qu'elle est située près de la boucle luminale de la CP47 (figure 1.4) (Odom et Bricker, 1992).

1.4.2.5 Protéine extrinsèque de 23 kDa

Après maturation, la protéine appelée 23 kDa codée par le gène PsbP possède 186 acides aminés et a une masse moléculaire calculée de 20 kDa (tableau 1.1). Bien qu'elle est retrouvée chez les plantes supérieures et les algues, cette protéine n'est pas conservée chez les cyanobactéries (Debus, 1992). Sa fonction semble d'optimiser les niveaux de Ca^{2+} et Cl^- nécessaires à l'oxydation de l'eau (Debus, 1992) et elle est située à proximité de la protéine de 33 kDa (figure 1.4).

1.4.2.6 Protéine extrinsèque de 17 kDa

La protéine mature issue du gène PsbQ contient 149 acides aminés. Elle est localisée, tout comme la protéine de 23 kDa, à proximité de la protéine de 33 kDa et du coeur manganèse (figure 1.4). Elle semble aussi posséder la fonction d'optimiser l'environnement ionique pour l'oxydation de l'eau (Debus, 1992). Cette protéine, ainsi que

celles de 23 et de 33 kDa, fait partie du groupe appelé "oxygen evolving complex" (OEC) ou encore le complexe "oxygen evolution enhancing" (OEE) qui peuvent se traduire par le « complexe producteur d'oxygène ».

1.4.2.7 Protéines de faible poids moléculaire

Sans entrer dans les détails de chacune des sous-unités de faible poids moléculaire du PSII, mentionnons que la plupart d'entre elles jouent des rôles qui sont encore inconnus. Ces protéines associées sont nommées : H, I, J, K, L, M, N, R, S, T, U, V, W, X et Y (tableau 1.1). Parmi celles dont on suppose un rôle, il y a la protéine H. Cette protéine de 7,7 kDa possède une seule hélice α et effectuerait la régulation du transport d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B (Packham, 1988). De plus, la protéine I de 4,2 kDa joue probablement un rôle de ligand pour la chlorophylle (Staehelin, 1986). La protéine L est hautement conservée chez les plantes supérieures et les algues. Cette protéine semble être requise pour le fonctionnement normal au site de la Q_A , puisque l'activité de cette quinone est dramatiquement diminuée quand le PSII CC est dépourvu de ce polypeptide (Staehelin, 1986). La protéine S de 22 kDa joue un rôle présumé de chaperone qui aide l'incorporation de molécules de chlorophylle dans les protéines liant des pigments (Barber *et al.*, 1997).

1.4.3 Forme oligomérique du photosystème II

Bien que l'organisation dimérique du PSII chez les cyanobactéries soit généralement acceptée, un long débat se perpétue au sujet de la forme monomérique *versus* dimérique du PSII dans les grana. La revue de Hankamer et Barber (1997) semble être plus en faveur de la forme dimérique. En effet, par l'analyse de particules de PSII isolées contenant les antennes, ces complexes avaient des poids moléculaires d'environ 700 kDa, dont 450 kDa sont attribués à un dimère de PSII CC. Le 250 kDa résiduel est attribué aux protéines CAB (Boekema *et al.*, 1995). Les protéines potentiellement incluses dans ce complexe CAB sont : 2 LHC-II, 2 CP29, 2 CP26, 2 CP24, 2 CP47, 2 CP43, 2 D1, 2 D2, 2 cytb559 α et 2 cytb559 β . Boekema et ses collaborateurs (1995) mentionnent également que la présence de protéines de faible poids moléculaire devrait être prise en considération. Par contre, l'identification des composantes de ces dimères reste délicate, comme le cite l'auteur lui-même. D'autres dimères de PSII ont aussi été observés à partir de membranes de chloroplastes hautement enrichies en protéines, dépourvues des polypeptides composant le OEC (Seibert, 1995). L'analyse de ces membranes démontre que les particules de PSII ont une apparence de tétramères du côté de la surface luminale. La conclusion de Seibert est que les complexes observés sont des dimères de supercomplexes PSII-antenne et que

l'apparence tetramérique de la surface luminale reflète l'organisation de deux copies du OEC (Seibert, 1995).

L'argument qui est le plus accepté en faveur de la forme monomérique vient de considérations à propos de la taille du complexe monomérique *versus* l'espace disponible dans la maille cristalline 2D observée dans les grana (Nicholson *et al.*, 1996). La plus petite valeur obtenue par analyse 3D du complexe PSII donne un volume de 1000 nm³. Ce volume se calcule aisément lorsqu'on connaît le groupe d'espace auquel appartient le cristal 2D. Le groupe d'espace, ou encore le groupe plan puisque le cristal est bidimensionnel, est déterminé en examinant les éléments de symétrie de la maille. En prenant une valeur standard pour le volume partiel spécifique (généralement de 1.35 g/cm³ pour les protéines, ou encore 1.2 Å³/Dalton), la masse qui pourrait être comprise dans ce volume est de 700 à 800 kDa. C'est d'ailleurs une masse de 700 kDa qui a été calculée par Boekema *et al.* (1995) pour le PSII. Cependant, un dimère du complexe de PSII doit avoir une masse d'au moins 1100 kDa. De plus, l'espace disponible dans la maille cristalline ne permet pas du tout d'inclure le nombre minimal de complexes collecteurs de lumière (14 LHCB) et de lipides membranaires (Holzenburg *et al.*, 1993). Donc, selon Nicholson et ses collaborateurs (1996), la forme native doit être monomérique et posséder une structure très compacte au sein du cristal. Le PSII CC devrait alors être une unité très compacte d'environ 130 nm³ ou moins dans la membrane. L'aspect discutable de cette interprétation vient de

l'incertitude assez grande qui a été obtenue dans la construction des modèles 3D du PS II par microscopie électronique. Il est donc plus probable que le PSII existe sous forme de dimère. La prochaine section décrit les avancements récents dans la résolution de la structure du PSII qui a également permis d'obtenir de l'information quant à son organisation oligomérique.

1.4.4 État des connaissances sur la structure tridimensionnelle du PSII

Un prérequis essentiel pour comprendre et, possiblement, imiter le mécanisme moléculaire des réactions impliquées dans l'action du PSII, est la compréhension détaillée de la structure tridimensionnelle des sous-unités macromoléculaires composant ce complexe. Déterminer la structure du PSII est aujourd'hui l'un des plus grand défis en biologie structurale et en photosynthèse.

Lors de l'absence de cristaux tridimensionnels hautement ordonnés appropriés pour la diffraction des rayons X, la microscopie électronique offre une approche alternative intéressante. Deux techniques sont disponibles : l'analyse de particules isolées et la cristallographie électronique avec des cristaux bidimensionnels. Ces deux techniques ont

déjà été utilisées pour étudier la structure du PSII. En principe, elles pourraient même permettre d'atteindre la résolution atomique (Henderson, 1995).

La microscopie électronique s'est avérée une approche très efficace pour la détermination des détails structuraux du PSII. Toutefois, au cours des dernières années, la plupart des équipes de chercheurs à travers le monde dans ce domaine ont utilisé des complexes de PSII variant dans la composition de ses sous-unités. Il est donc difficile, parmi la grande quantité de publications disponibles sur ce sujet, de déterminer quel est le meilleur modèle disponible actuellement. D'un autre côté, la compilation de tous ces résultats permet, par déduction, de faciliter la localisation de certaines sous-unités à l'intérieur du PSII. C'est ce que Rogner et ses collaborateurs (1996) ont mis à profit en proposant un modèle basé en partie sur des calculs de différence de projections bidimensionnelles de complexes de PSII.

Jusqu'à maintenant, la structure disponible avec la plus grande résolution consiste en une partie biochimiquement stable du PSII CC appelée CP47-RC et constituée des protéines D1 et D2, CP47, cytochrome b559 et de quelques protéines de faible poids moléculaire. Cette structure, présentée à la figure 1.6, a été obtenue par cristallographie des électrons à une résolution de 8 Å (Rhee *et al.*, 1998). Cette première détermination tridimensionnelle du PSII révèle l'organisation relative des 23 hélices transmembranaires,

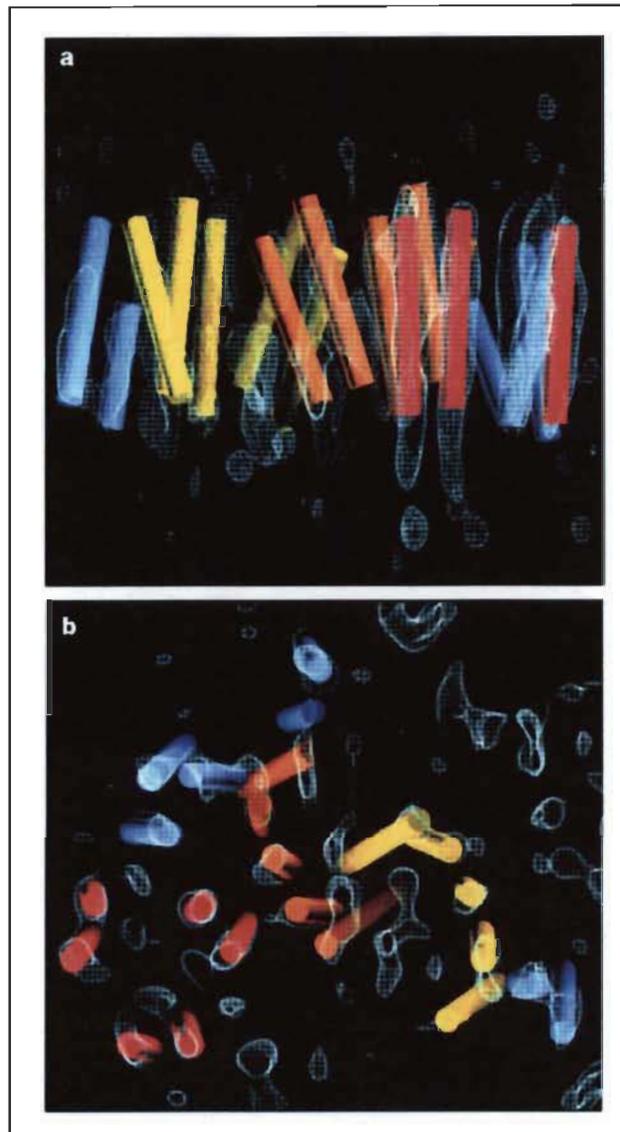


Figure 1.6. Carte tridimensionnelle d'un monomère de PSII CC sans le OEC. La couleur des cylindres représente les hélices alpha des différentes sous-unités : D1 en jaune, D2 en orange, CP47 en rouge et les autres en bleu. Le contour de densité électronique calculé est en blanc. **A)** Vue de côté du PSII CC (surface lumineuse en bas) où les cylindres indiquent la position des hélices transmembranaires. **B)** Vue du côté luminal des 23 hélices alpha du monomère du PSII CC sans le OEC (adapté de Rhee *et al.*, 1998).

la position présumée des cofacteurs tetrapyroles de l'hétérodimère D1-D2 et la présence présumée d'approximativement 14 molécules de chlorophylle a à l'intérieur de CP47. Ce dernier aspect a d'ailleurs pu être utilisé afin de démontrer qu'il y a un lien évolutif étroit entre les trois types de centres réactionnels dans les organismes photosynthétiques : il y a d'abord un lien entre le PSII et le centre réactionnel de la bactérie pourpre et un lien entre le PSII et le PSI. Cette relation a depuis longtemps été postulée (Fromme, 1996), mais c'est par l'obtention de données structurales que la validité de cette ressemblance a été démontrée. En effet, malgré une homologie de séquence différente, certaines hélices sont de structure très apparentées (Vermaas, 1994).

Les cristaux bi-dimensionnels utilisés pour obtenir le modèle présenté à la figure 1.6 étaient dépourvus du complexe producteur d'oxygène. En 1999, Hankamer et ses collaborateurs sont parvenus à cristalliser le PSII CC. Ce complexe contenait, en plus des sous-unités contenues dans CP47-RC, la protéine extrinsèque de 33 kDa, l'antenne CP43 ainsi que d'autres protéines de faible poids moléculaire. Jusqu'à maintenant, le meilleur modèle consiste en une carte bidimensionnelle, c'est-à-dire une carte de projection à une résolution de 9 Å, représenté à la figure 1.7. Ce complexe cristallise sous forme de dimère avec une symétrie p2. Il est intéressant de remarquer que le modèle obtenu, bien que la résolution de 9 Å soit assez bonne, ne constitue pas un modèle tridimensionnel, mais bel

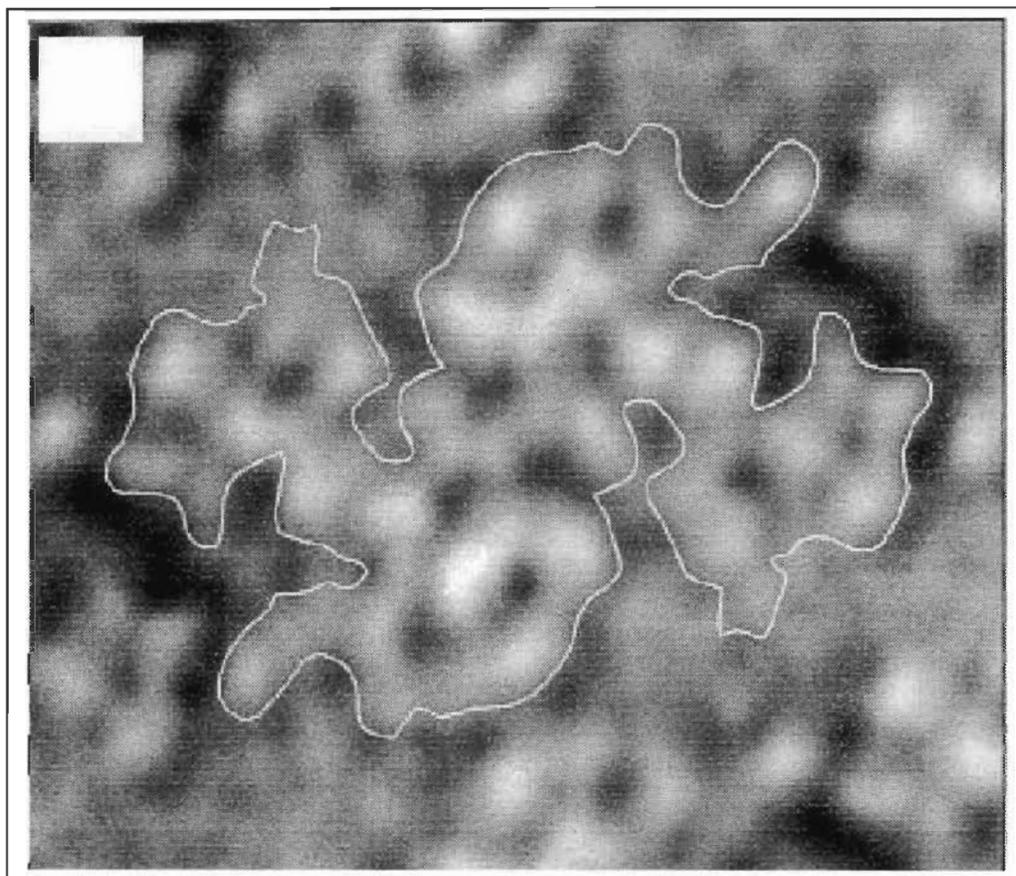


Figure 1.7. Projection du côté luminal de la structure du PSII C incluant le complexe producteur d'oxygène obtenue par cristallographie électronique à partir de cristaux bidimensionnels. Le contour blanc délimite un dimère de PSII CC. Bien que la résolution soit de 9 Å dans le plan, il demeure difficile d'en tirer un modèle tridimensionnel valable (Hankamer *et al.*, 1999).

et bien une projection dans le plan de la membrane du complexe protéique. La résolution dans la direction perpendiculaire à ce plan n'est pas mentionnée dans l'article original mais, en général, la résolution dans cette direction est souvent au minimum le double de celle dans le plan, ce qui correspondrait à 18 Å dans ce cas-ci. C'est le cas par exemple des modèles précédents du PSII (Ford *et al.*, 1995; Mayanagi *et al.*, 1998) et de ceux de la rhodopsine. En effet, jusqu'à tout récemment, la meilleure information structurale disponible sur la rhodopsine était une projection du plan de la membrane à une résolution de 5 Å (Davies *et al.*, 1996). Cependant, le meilleur modèle tridimensionnel ne possédait qu'une résolution de 7.5 Å dans le plan et de 16.5 Å dans l'axe perpendiculaire (Unger *et al.*, 1997). Il faut donc rester prudent dans l'interprétation des différents modèles qui sont issus de la microscopie électronique, à savoir qu'une résolution d'une carte bidimensionnelle ne reflète pas nécessairement un modèle tridimensionnel valable.

Plus récemment, l'équipe de James Barber et ses collaborateurs a réussi à analyser l'un des plus gros complexes de PSII obtenus jusqu'à maintenant, le supercomplexe PSII, isolé de chloroplastes d'épinards (Nield *et al.*, 2000). Ce supercomplexe constitue en fait un dimère de PSII. Chacun des monomères qui constitue le supercomplexe contient les protéines D1 et D2, CP43 et CP47. Il comprend également un trimère de LHCII et une seule copie des protéines CP26 et CP29. Un monomère comprend aussi les trois protéines extrinsèques du complexe producteur d'oxygène, soit les protéines de 33, 23 et 17 kD. Il est

à remarquer que ce supercomplexe est hautement actif dans la production d'oxygène induite par la lumière. La résolution atteinte par analyse de particules isolées de ce supercomplexe est de 24 Å et démontre la nature dimérique du PSII. En effet, comme le montre la figure 1.8 A), les particules isolées sont en fait des dimères de supercomplexe, qui comportent donc quatre monomères de PSII. À partir d'un très grand nombre d'images de particules, classées automatiquement par un logiciel selon leur orientation, un modèle tridimensionnel a pu être construit et est présenté à la figure 1.8 B). Cette figure démontre bien les dimensions relatives du supercomplexe et plus particulièrement du complexe producteur d'oxygène. Comme mentionné ci-haut, la position de la majorité des hélices alpha transmembranaires du PSII CC ont été décrites dans un modèle présenté par Hankamer et ses collaborateurs (1999) ainsi que de Rhee et ses collaborateurs (1998). En superposant ce modèle à celui du supercomplexe, les hélices du PSII CC ont été positionnées à l'intérieur de la région centrale du supercomplexe.

Non seulement cette structure permet de fournir un cadre de référence pour l'incorporation des hélices alpha des sous-unités intrinsèques, mais il permet aussi de faire ressortir l'arrangement des protéines du complexe producteur d'oxygène. Ce modèle appuie l'existence de la forme dimérique du PSII *in vivo* et, ainsi, que le supercomplexe est une

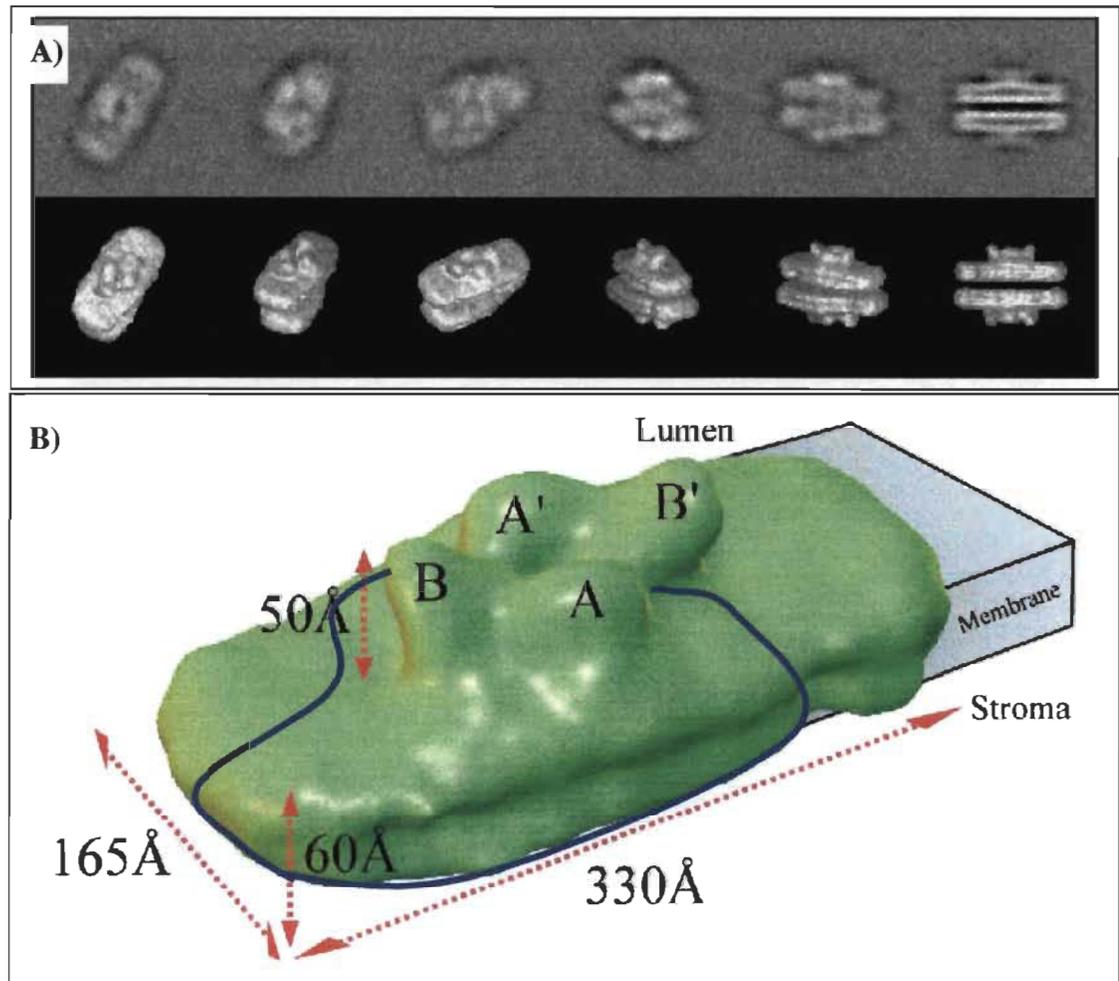


Figure 1.8 Modèle du supercomplexe PSII. **A)** Sur fond gris, différentes particules de dimères de supercomplexe PSII observées en microscopie électronique et classées selon leur orientation. Sur fond noir, modélisation de la surface des particules à partir de chacune des classes d'orientation. **B)** Modèle tridimensionnel du supercomplexe PSII à une résolution de 24 Å correspondant à un dimère de PSII. Le complexe collecteur de lumière correspond à la protubérance du côté luminal : les structures A/A' ont été attribuées à la protéine de 33 kDa et B/B' aux protéines de 23 et 17 kDa. Le trait bleu délimite approximativement un monomère de PSII CC, i.e. excluant le LHCII. Adapté de Nield et ses collaborateurs (2000).

unité structurale de base du PSII dans les membranes thylakoïdes des plantes (Boekema *et al.*, 1998).

Dans la prochaine section, je décrirai le principe de fonctionnement de la microscopie à force atomique et la microscopie optique en champ proche, car ces méthodes ne sont pas utilisées de façon courante et sont encore, malgré leur popularité dans certains milieux, assez méconnues. Cette information devrait ainsi permettre au lecteur de mieux apprécier les résultats.

1.5 La microscopie à force atomique et la microscopie optique en champ proche

1.5.1 La microscopie à force atomique en mode non-contact

La microscopie à force atomique (AFM), technique ayant été largement utilisée en science des surfaces solides, se prête maintenant, par le développement de nouveaux modes de mesure, aux échantillons biologiques, appelés communément matériaux « mous ». Le principe de la microscopie à force atomique trouve ses racines dans le travail de Tabor et de Israelachvilli (Tabor et Winterton, 1969; Israellachvilli et Tabor, 1973; Israellachvilli et Adam, 1978), pionniers en sciences des interactions moléculaires. Les inventeurs du microscope à effet tunnel, précurseur du microscope à force atomique, Gerd Binnig et

Heinrich Rohrer ont d'ailleurs reçu le prix nobel de physique en 1986 pour cette découverte. Le but de cette section est de traiter de ces nouveaux modes de mesure qui sont maintenant utilisés pour les matériaux « mous ». Afin de mieux comprendre les distinctions entre ces modes de mesure, quelques principes de base de la technique seront expliqués. Pour plus de détails quant aux fondements de la microscopie à force atomique, il existe une littérature très abondante. Pour des revues intéressantes, le lecteur est référé entre autres à celles de Albrecht *et al.* (1988), Binning et Quate (1986) et Hansma *et al.*, (1988).

La détection des forces inter-atomiques peut s'effectuer dans deux modes différents (voir figure 1.9) : un mode attractif correspondant à des distances relativement grandes (de quelques nanomètres à quelques dixièmes de nanomètres) et un mode répulsif dans le cas où les distances sont inférieures à la distance d'équilibre. Ce dernier cas sera expérimentalement réalisé en effectuant un contact « doux » entre les particules en question.

Le principe consiste à balayer la surface de l'objet avec une pointe ayant à son extrémité un atome unique et à détecter l'effet de l'interaction de cet atome avec la surface en termes de forces. Ceci est pour l'instant impossible à réaliser expérimentalement du fait de la difficulté de manipuler un seul atome isolé. Par contre, pour le cas d'une pointe placée au voisinage d'un objet, cette sonde va interagir, par le biais de ses atomes les plus proches

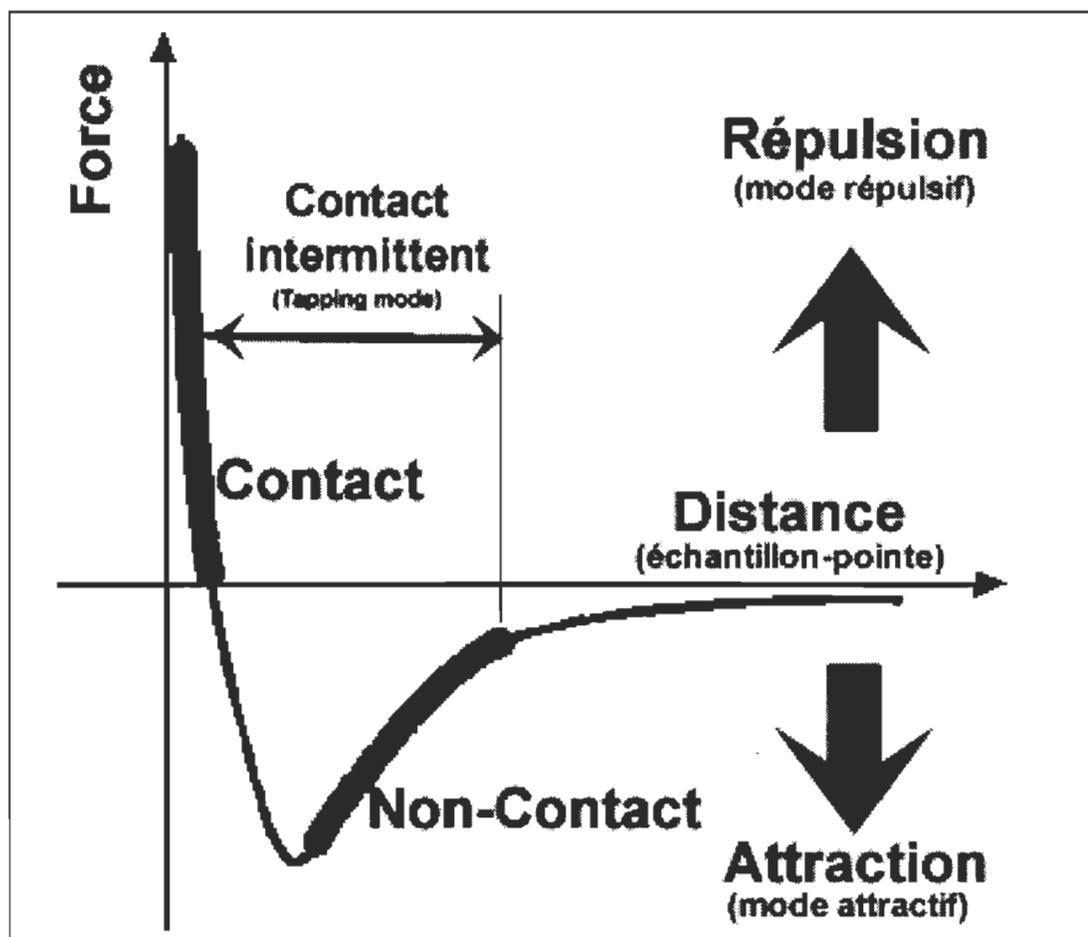


Figure 1.9. Courbe de van der Waals de la force inter-atomique en fonction de la distance.

de la surface d'un objet, avec les atomes de cet échantillon. On peut alors comprendre que seuls les quelques atomes de l'extrémité de la sonde vont intervenir dans le processus d'interaction avec les atomes de la surface. Ceci est dû au fait que les forces atomiques mises en jeu décroissent rapidement quand la distance augmente.

Comme pour les autres microscopies en champ proche, l'AFM admet deux modes de détection :

- A) Détection à pression variable où la pointe, en contact avec l'objet, va suivre les aspérités de l'objet en faisant fléchir un microlevier (voir figure 1.10). La position verticale de ce dernier va constituer le signal utile.
- B) Détection à pression constante (utilisée en mode non-contact) où la position d'un microlevier (voir figure 1.10) est asservie, par voie électronique (en anglais le « feedback loop »), à une valeur de référence correspondant généralement à une faible pression de la pointe sur l'objet. Le signal enregistré est alors la tension appliquée sur la céramique piézo-électrique contrôlant la distance en z.

La pointe du microscope doit être particulièrement fine et sa composition chimique doit lui conférer des propriétés de dureté évidentes. La pointe est montée sur un microlevier qui doit aussi comporter des propriétés particulières. En effet, il doit avoir à la fois une

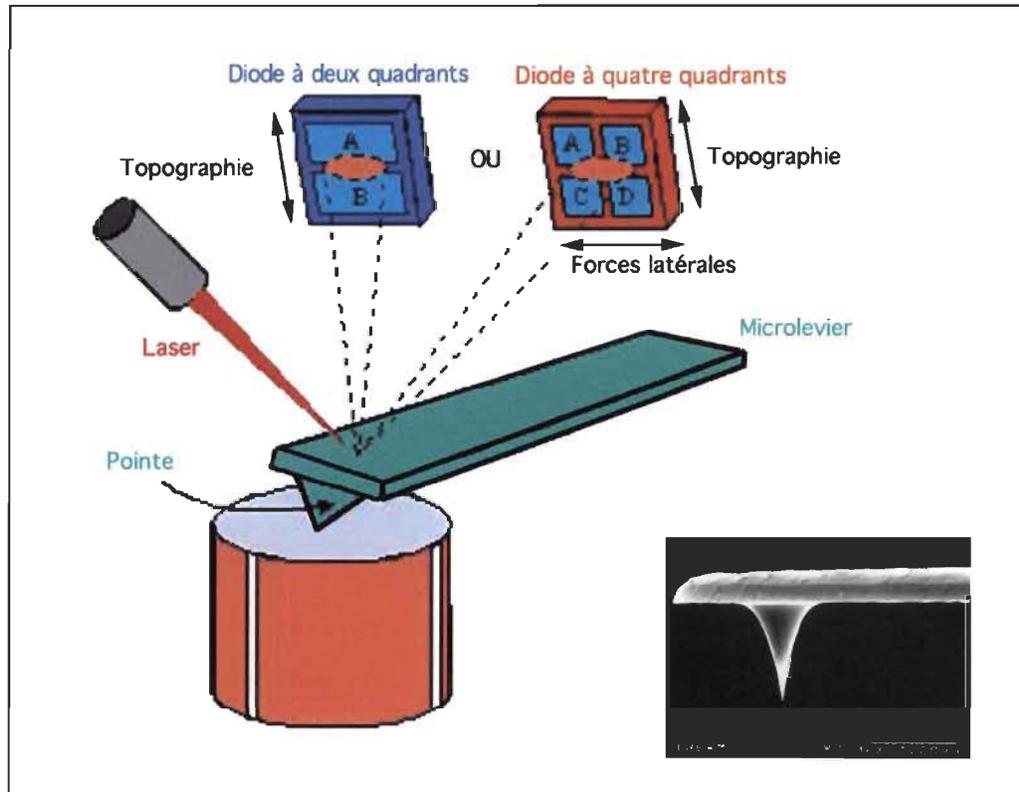


Figure 1.10. Représentation schématique d'un AFM. Le tube piézo-électrique est représenté en orange. En bas à droite, une image d'une pointe montée sur un microlevier a été obtenue en microscopie électronique à balayage.

grande fréquence de résonance et une faible raideur (Hansma *et al.*, 1997). La constante de ressort du microlevier dépend de sa forme, de ses dimensions et du matériel avec lequel il est fabriqué. Ces constantes varient au-delà de quatre ordres de grandeur, de millièmes de newton/mètre à des dizaines de newton/mètre. La fréquence de résonance varie de quelques kilohertz à des centaines de kilohertz, ce qui procure une réponse très rapide et permet d'opérer dans le mode non-contact. Les pointes et les microleviers sont assemblés d'un seul bloc de silicium ou de nitrite de silicium par des procédés photolithographiques (voir figure 1.10). Les microleviers en forme de V sont les plus populaires puisqu'ils démontrent peu de résistance mécanique à la déflexion verticale et une haute résistance à la torsion latérale. Ils ont en général 100 à 200 μm de longueur, 40 μm de largeur et de 0.3 à 2 μm d'épaisseur. Les pointes sont de dimensions variables, mais les plus pointues disponibles commercialement possèdent un rayon de courbure aussi petit que 50 \AA (Hansma *et al.*, 1997; Hansma *et al.*, 1988). Parce que la surface d'interaction entre la pointe et l'échantillon est une fraction du rayon de la pointe, ces pointes peuvent permettre d'atteindre une résolution latérale entre 10 et 20 \AA (Moller *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2000). Une photographie par microscopie électronique à balayage d'une pointe est montrée à la figure 1.10.

La figure 1.10 présente également le fonctionnement d'un AFM typique. L'échantillon est porté par un ensemble de piézo-électriques, arrangés sous forme d'un tube

séparé en quatre quadrants, ce qui permet de déplacer l'objet dans toutes les directions. Le microlevier est placé au voisinage de l'objet de telle sorte que la pointe soit en contact avec la surface (mode contact) ou à quelques Å de cette dernière (mode non-contact) (Radmacher *et al.*, 1995). Le balayage consiste à déplacer l'objet et non pas la pointe. Ceci est dû au fait que la position du microlevier doit être fixe par rapport au détecteur. Le balayage est piloté par micro-ordinateur. Le détecteur est une photodiode à quatre quadrants (pour la détection des déplacements latéraux et transversaux du microlevier) ou à deux quadrants (détection des déplacements transversaux seulement).

Le mode de détection non-contact fait intervenir une autre caractéristique particulière de fonctionnement. Ce mode consiste à faire vibrer, dans un plan vertical, l'ensemble pointe-microlevier avec une amplitude de l'ordre d'une dizaine d'Å. Cet espacement correspond au régime non-contact sur la courbe de van der Waals à la figure 1.9. L'amplitude de vibration va dépendre de la distance séparant la position moyenne de la pointe par rapport à l'objet. En effet, lorsque la pointe va interagir avec la surface de l'objet, les forces résultantes auront tendance à modifier le facteur de qualité relatif à cette vibration (Morita *et al.*, 1996). Ce facteur de qualité sert soit à décrire une fréquence précise, en général la fréquence de résonance de l'ensemble pointe-microlevier, ou soit une amplitude de vibration constante. En asservissant, par voie électronique, un ordinateur mesure en continu la fréquence de vibration de la pointe (ou l'amplitude) et la garde

constante par le mouvement vertical du piézo-électrique. Le signal détecté sera donc le voltage appliqué au piézo-électrique. En gardant la fréquence de résonance ou l'amplitude constantes, le système maintient constante également la distance pointe-objet.

L'avantage indéniable du mode non-contact est évidemment que la pointe ne touche jamais à l'échantillon. Le mode non-contact ne souffre pas des effets de dégradation de l'échantillon par la pointe qui sont souvent observés avec des matériaux mous par AFM en mode contact (Morita *et al.*, 1996; Moller *et al.*, 1999). Dans le cas d'échantillons rigides, les images en modes contact et non-contact peuvent se ressembler. Cependant, si, par exemple, de l'eau est présente à la surface d'une surface rigide, les images peuvent différer. En mode contact, la pointe va pénétrer la surface du liquide et imager la surface rigide tandis qu'en mode non-contact, la surface de l'eau sera détectée également (voir figure 1.11). Le mode non-contact est donc nettement avantageux pour l'imagerie des matériaux mous, comme des macromolécules (Hinterdorfer *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1994), des lipides (Grandbois *et al.*, 1998) et même des cellules (Hansma *et al.*, 1997).

Il existe un troisième mode de mesure en AFM appelé mode contact intermittent ou communément en anglais le « tapping mode ». Il est similaire au mode non-contact, excepté que l'oscillation de l'ensemble pointe-microlevier est amené plus près de l'échantillon pour qu'à la fin de sa course il entre en contact léger avec la surface (Moller *et al.*, 1999). Le

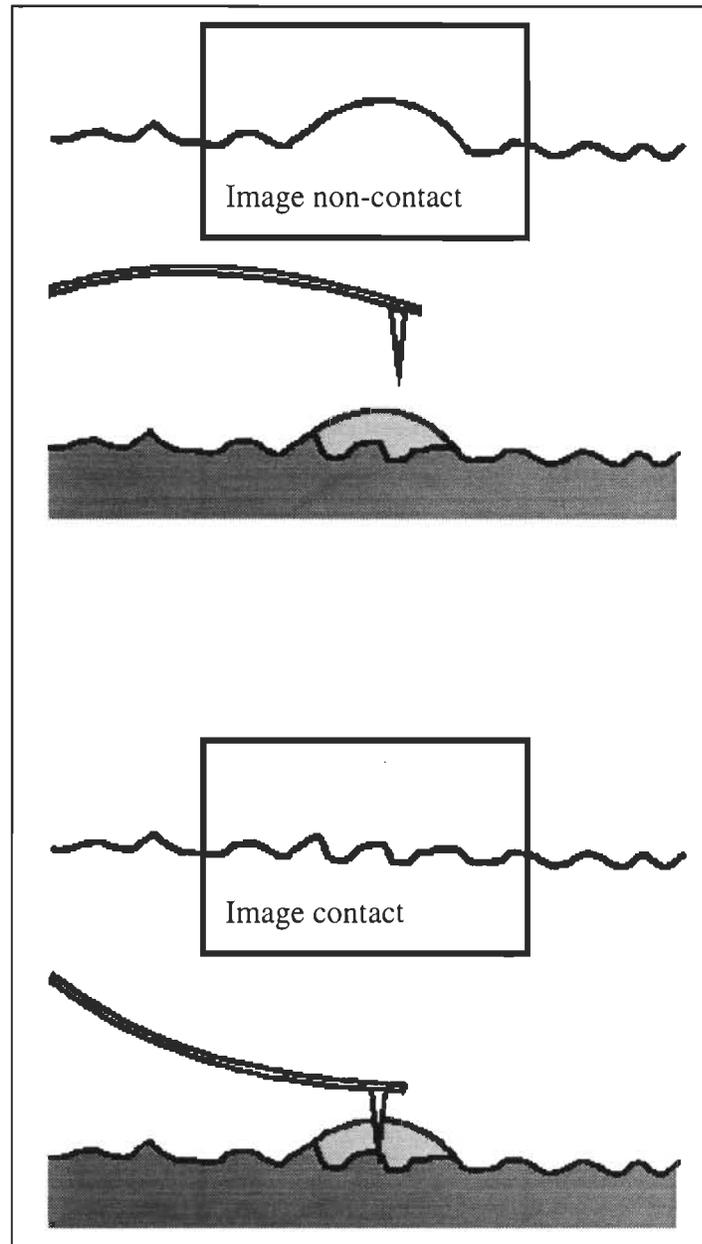


Figure 1.11. Différence entre les images qu'on peut observer grâce aux modes de mesure non-contact et contact.

mode intermittent utilise la région sur le graphique de van der Waals qui est appelée « contact intermittent » à la figure 1.9. Le mode intermittent consiste à bouger la pointe d'un mouvement semblable à celui d'une aiguille d'une machine à coudre, la pointe ne touchant l'objet qu'aux points de mesure. Ce mode a l'avantage d'éliminer les forces latérales entre la pointe et l'échantillon. Cependant, contrairement au mode intermittent, le mode non-contact ne touche pas directement à la surface et détecte les variations en composition, adhésion, friction, viscolélasticité et probablement d'autres propriétés de surface. Le mode non-contact est aussi rapide et facile d'utilisation que le mode intermittent et possède également les mêmes bénéfices pour l'imagerie des échantillons « mous », adhésifs, facilement endommageables ou faiblement liés au substrat.

1.5.2 La microscopie optique en champ proche

L'imagerie optique classique atteint une limite dans l'impossibilité de séparer les images de deux objets éloignés d'une distance inférieure à la moitié de la longueur d'onde du rayonnement utilisé. En effet, le critère de Rayleigh stipule que deux points ne sont vus séparément que si la distance qui les sépare est supérieure à $\lambda/(2n \sin\theta)$, où λ est la longueur d'onde du rayonnement utilisé, n est l'indice de réfraction du milieu ambiant et θ

est le demi-angle d'ouverture du système optique. Ce résultat, exprimé sous la forme d'un critère, se retrouve dans le principe d'incertitude de Heisenberg (Vigoureux et Courjon, 1992). Pour cette raison, les microscopistes ont longtemps pensé qu'il ne serait jamais possible d'atteindre une résolution en dessous de la limite imposée par le critère de Rayleigh et donc d'observer des objets de dimension plus petite que la longueur d'onde. En fait, les relations d'incertitude ne limitent en rien la résolution théorique d'un instrument; elles nous indiquent seulement quelle précision nous pouvons espérer sur la position d'un objet pour une valeur donnée du vecteur d'onde. Si le vecteur d'onde utilisé pouvait être infini, la résolution serait infinie. Les ondes progressives (à l'opposé des ondes non progressives, i.e. évanescentes) vérifient toujours la relation d'indétermination; elles ne peuvent donc conduire qu'à une résolution vérifiant le critère de Rayleigh (Vigoureux et Courjon, 1992). Rien n'interdit pourtant de dépasser ce critère.

Lorsqu'un faisceau frappe une ouverture assez grande, une grande partie de la lumière traverse l'ouverture sans subir aucune modification mais une faible partie, dû à la diffraction de la lumière par les bords de l'ouverture, va émerger en s'éloignant de la direction de l'onde incidente avec un angle « α » (voir la figure 1.12 A)). Plus le diamètre du trou est petit, plus l'angle « α » est grand (la composante tangentielle du vecteur d'onde augmente). Quand l'ouverture aura un diamètre équivalent à la limite de Rayleigh, l'angle

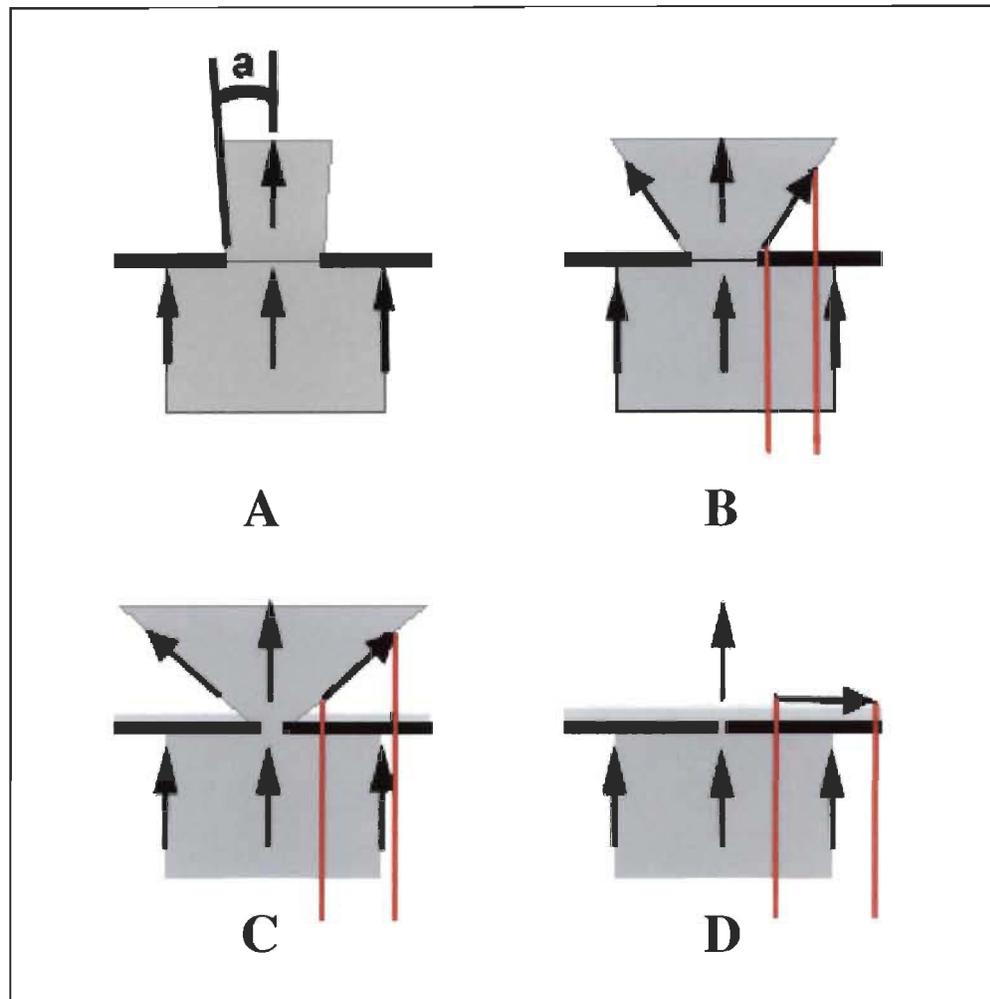


Figure 1.12. Génération d'ondes évanescentes par une petite ouverture. **A)** Lorsque le trou est assez grand, une grande partie de la lumière traverse le trou sans subir aucune modification et une faible partie de la lumière, dû à la diffraction par les bords du trou, va émerger en s'éloignant de la direction de l'onde incidente avec un angle "a". **B)** et **C)** Plus le diamètre du trou est petit, plus l'angle "a" est grand (la composante tangentielle du vecteur d'onde augmente). **D)** Quand le trou aura un diamètre équivalent à la limite de Rayleigh, l'angle "a" tendra vers 90° et la lumière, à la sortie du trou, diffractera dans tout un demi espace et conduit à la génération d'ondes évanescentes.

« a » tendra vers 90° et le faisceau lumineux ne pourra traverser l'ouverture. Le SNOM tire profit de ce qui va se passer au-delà de cette valeur d'ouverture : la lumière ne peut être diffractée au-delà de 90° mais la composante tangentielle du vecteur d'onde continue à augmenter, conduisant ainsi à la génération d'ondes évanescentes (Isaacson *et al.*, 1986). Pour un trou de dimension infiniment petite, la composante tangentielle du vecteur d'onde va être infiniment grande et l'onde évanescente équivalente va être caractérisée par une décroissance exponentielle, suivant la direction transversale, beaucoup plus rapide que dans le cas de la réflexion totale. Pour un traitement mathématique plus détaillé voir Courjon *et al.* (1989) et Vigoureux et Courjon (1989). Ces ondes auront une profondeur de pénétration beaucoup plus faible que l'onde de Fresnel et leur détection nécessite l'emploi d'une sonde (communément appelée «pointe», par analogie avec l'appellation utilisée en AFM) capable de capter ces ondes puisqu'elle entre presque en contact avec la surface de l'objet. Cette sonde, dont il sera question plus tard, est en fait une fine pointe de fibre optique.

Les ondes évanescentes peuvent être converties, selon le principe du retour inverse de la lumière, en ondes progressives par simple diffraction à l'aide d'un deuxième objet de dimension plus petite que celle du trou (par exemple une sonde ayant une extrémité très pointue). En effet, si un objet de dimension de l'ordre du nanomètre peut convertir par diffraction une onde progressive en ondes évanescentes, il peut, de la même manière,

transformer, par diffraction, des ondes évanescentes en onde progressive. Le signal résultant de la double diffraction sera constitué, en grande partie, d'ondes homogènes porteuses d'informations et pouvant se propager, dans l'air, ou dans tout autre milieu diélectrique, jusqu'au détecteur (Vigoureux *et al.*, 1989). L'amplitude de ces ondes décroît exponentiellement avec la distance d'analyse et les informations qu'elles contiennent ne peuvent pas être détectées en champ lointain. Les informations relatives aux détails de l'objet doivent donc être captées sur leur lieu d'existence, c'est à dire au voisinage de l'objet. Le détecteur doit remplir certaines exigences: avoir une dimension de l'ordre du nanomètre et pouvoir s'approcher à quelques nanomètres de la surface de l'échantillon. La résolution absolue en champ proche ne dépend plus de la longueur d'onde mais de la grandeur de l'ouverture de la sonde utilisée et de la distance entre cette ouverture et l'échantillon. De plus, la limite de résolution sera dépendante de la qualité des composantes du microscope.

Le SNOM peut fonctionner soit avec un éclairage en réflexion externe où la sonde joue le rôle de pointe émettrice et détectrice à la fois, ou encore, fonctionner en transmission, où la pointe éclaire l'objet et la détection s'effectue en champ lointain sous l'échantillon par utilisation d'une lentille collectrice, comme représenté à la figure 1.13 (Meixner *et al.*; 1995; Meixner et Knepe, 1998; Subramaniam *et al.*, 1998). Dans une expérience typique en champ proche, la sonde est tenue fixe pendant que l'échantillon est

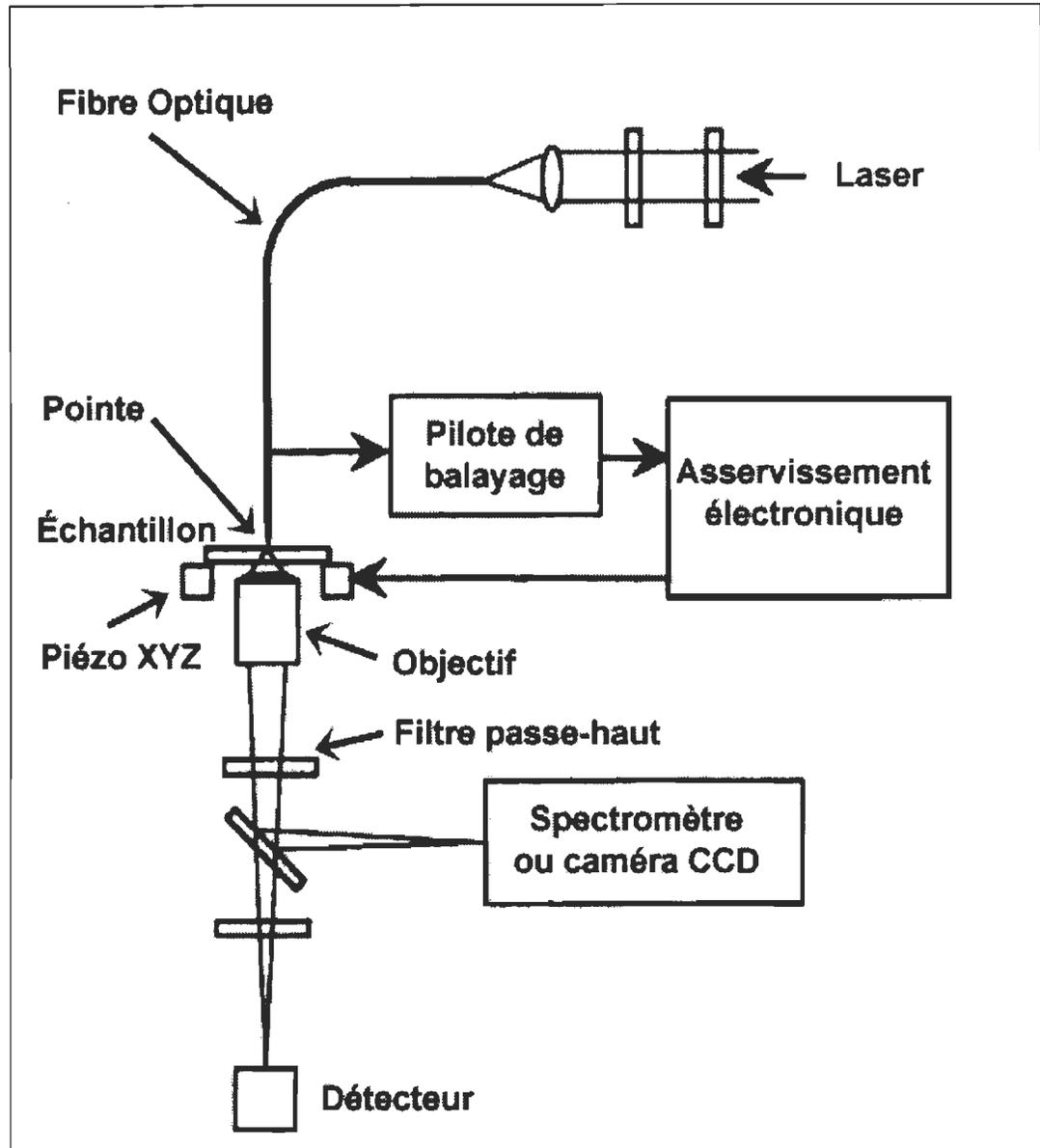


Figure 1.13. Représentation schématique de l'appareillage requis pour un microscope optique en champ proche (adapté de Meixner et Knepe, 1998).

déplacé par le piézo-électrique. Des surfaces de balayage allant de quelques nanomètres carrés à quelques centaines de microns carrés sont ainsi obtenues. Dans les appareils plus modernes, la distance pointe-échantillon peut être contrôlée par un système d'asservissement de la force de cisaillement (« tuning fork-based shear-force feedback ») (Meixner et Knepe, 1998). L'utilisation de cette technique élimine la nécessité d'utiliser une diode laser pour la détection en z de la position de la pointe, ce qui occasionnerait une interférence entre la source d'excitation et cette diode.

Deux modes de détection sont utilisés en microscopie optique en champ proche. Le premier, dit à altitude constante, consiste à balayer la surface de l'objet en gardant la pointe à distance constante d'un plan de référence. La sonde détecte la distribution de l'intensité lumineuse dans le plan de référence au-dessus de l'objet. Le second, dit à intensité constante, consiste à asservir, par voie électronique, l'intensité du signal lumineux détectée à une valeur de référence. Le signal enregistré est, dans ce cas, la tension électrique de commande du piézo qui est directement liée à la position en z de la sonde détectrice. Ce mode de détection fournit une topographie dont l'intensité lumineuse est égale partout au-dessus de l'objet.

L'élément essentiel d'un microscope en champ proche est la sonde. Une image en microscopie électronique à balayage d'une pointe est présentée à la figure 1.14. Le type de

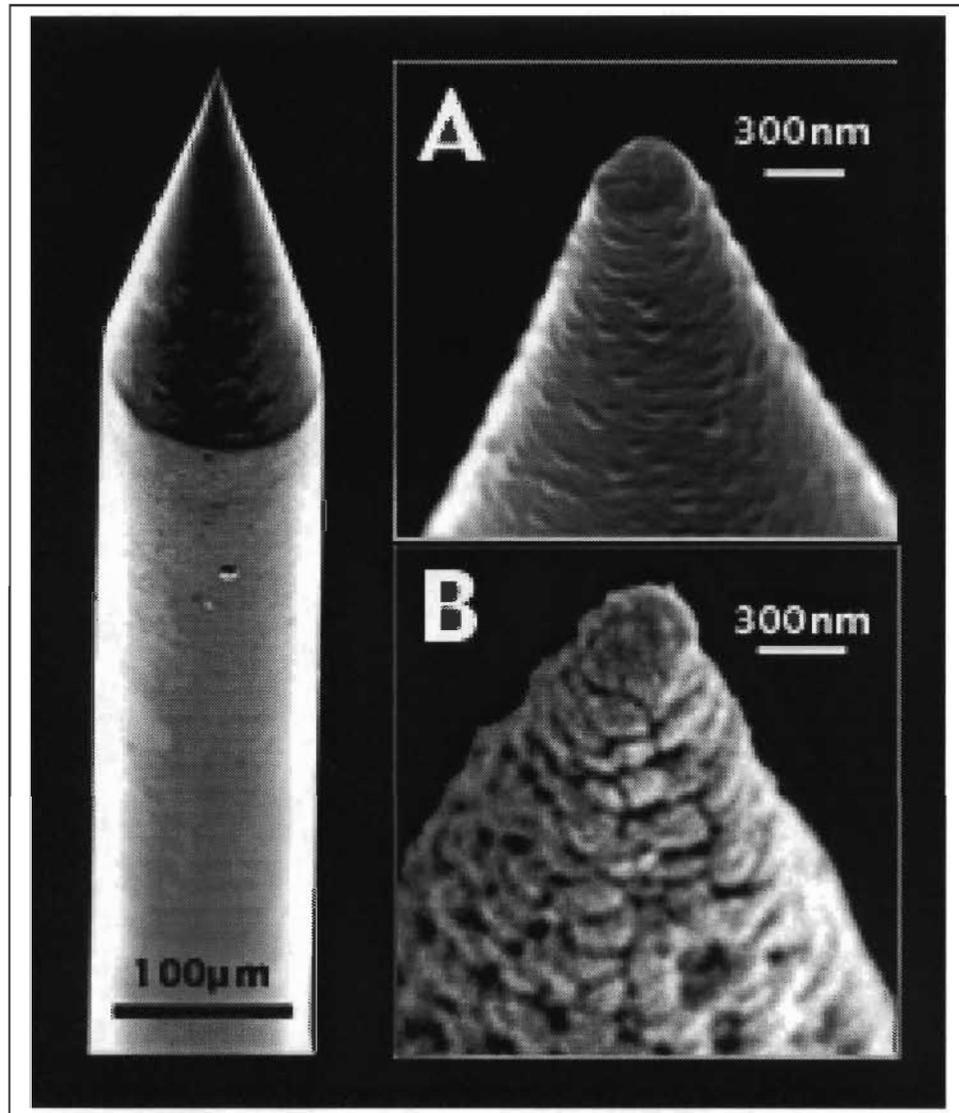


Figure 1.14. Images en microscopie électronique à balayage de pointes utilisées en SNOM. À gauche, on peut voir que le diamètre de la fibre optique est d'environ $100\ \mu\text{m}$. Par une nouvelle technique de fabrication (Stöckle *et al.*, 1999), la pointe de la fibre optique est beaucoup plus lisse et effilée **A**) que les pointes conventionnelles **B**).

sonde le plus couramment utilisé est une fibre optique effilée en fine pointe. Cet effilement sera ensuite recouvert d'une couche métallique permettant à la lumière d'être réfléchié tout au bout de la pointe. En figure 1.14 A), on peut voir une pointe de bonne qualité et une pointe de mauvaise qualité en figure 1.14 B). De nouveaux développements dans la fabrication de ces pointes, ayant des dimensions d'ouverture très réduites de l'ordre de 80 à 120 nm, permettent d'atteindre des résolutions de l'ordre d'environ 100 nm (Muramatsu *et al.*, 1999; Stöckle *et al.*, 1999).

Pour l'observation de films étalés sur un substrat transparent comme le verre, la lumière provenant du laser sera acheminée vers l'échantillon et la fluorescence qui sera émise sera collectée vers le bas par l'objectif et acheminé vers un photomultiplicateur. La lumière d'excitation est bloquée par un filtre passe haut. Le balayage de l'échantillon grâce au piézo-électrique permettra de lire une mesure de la fluorescence en chaque point. Une caractéristique intéressante du SNOM, c'est qu'il permet non seulement l'acquisition d'une image de la fluorescence de l'échantillon mais, grâce à son système de détection de la force de cisaillement, il permet d'obtenir simultanément une image de la topographie de l'échantillon, tout comme un AFM. Par contre, dû à la taille considérablement plus grande de la pointe comparativement à celle d'un AFM, la résolution du SNOM en topographie est moins grande. Dans le cas de la résolution en AFM, on peut atteindre maintenant une résolution de l'ordre d'un dixième de nm (Schabert et Engel, 1994). Typiquement, la

résolution dans le plan pour les images en fluorescence (SNOM) peut atteindre jusqu'à 20 nm, comparativement à environ 250 nm pour la microscopie optique conventionnelle et à 125 nm pour la microscopie confocale. L'incertitude en z du déplacement de la fibre est de quelques nanomètres. Elle dépend essentiellement de la qualité de l'électronique de commande.

1.6 Objectifs du projet de recherche

Le travail de recherche qui est présenté dans ce mémoire a pour but ultime de développer une méthode afin de cristalliser le PSII CC en deux dimensions. Ces cristaux pourront alors être analysés par cryomicroscopie électronique afin de fournir un modèle tridimensionnel du PSII CC. L'approche de cristallisation qui a été envisagée est une méthode bien établie pour les protéines solubles. Elle consiste à former une monocouche de lipides fonctionnalisés comportant un groupement chimique qui permet de lier spécifiquement et d'ancrer la protéine d'intérêt en monocouche à l'interface air-eau. Cette augmentation de la concentration interfaciale de la protéine va promouvoir sa cristallisation en deux dimensions. Une littérature abondante existe dans ce domaine. Pour des revues

intéressantes, voir Brisson *et al.* (1994a), Chiu *et al.* (1997) ainsi que Kornberg et Darst (1991).

Cette approche de cristallisation par l'utilisation de lipides fonctionnalisés a donc aussi été utilisée pour le PSII CC. Au préalable, une sélection a été effectuée parmi plusieurs composés afin de déterminer lequel allait constituer le groupement chimique actif servant à la synthèse des lipides fonctionnalisés. Le groupement chimique choisi pour lier le PSII CC, le 1-butyl-3-(3,4-dichlorophényl)-1-méthyl urée, appelé DCPU, est un dérivé d'un composé communément utilisé comme herbicide, le dichlorométhyl urée (DCMU). Ce travail a fait l'objet d'une petite partie de la thèse de doctorat de Mme. Judith Gallant. Ensuite, des lipides appelés lipides-DCPU ont été synthétisés par M. Stéphane Mons qui faisait partie de l'équipe des Drs Luc Lebeau et Charles Mioskowski à Strasbourg en France.

Les objectifs de mon projet de recherche étaient les suivants :

- 1) Caractériser les monocouches des lipides fonctionnalisés. Une cuve de Langmuir a servi à mesurer les isothermes de pression de surface des lipides-DCPU. Cette mesure nous a permis de connaître l'état physique de ces lipides en monocouche, d'évaluer la stabilité de ces films en fonction du temps et de déterminer leur aire moléculaire.

- 2) Démontrer la liaison des lipides-DCPU au PSII CC en solution par la mesure du dégagement d'oxygène. En utilisant la technique permettant d'évaluer l'affinité d'inhibiteurs pour le PSII CC, les lipides-DCPU sont solubilisés à l'aide d'un détergent. La diminution du dégagement d'oxygène du PSII CC indique une liaison spécifique des lipides-DCPU au PSII CC.
- 3) Démontrer la liaison du PSII CC à une monocouche de lipide-DCPU par microscopie à force atomique et microscopie optique en champ proche. L'utilisation de ces deux techniques permet d'imager, de façon unique, la liaison du PSII CC à la monocouche de lipides-DCPU.
- 4) Parallèlement à ces travaux, il s'agira également de tester des conditions expérimentales pour la cristallisation du PSII CC en deux dimensions. En variant un grand nombre de paramètres expérimentaux de cristallisation, la microscopie électronique permet l'observation des échantillons et de noter la présence de structures organisées de PSII CC.

CHAPITRE 2

DESIGN OF FUNCTIONALIZED LIPIDS AND EVIDENCE FOR THEIR BINDING TO
PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEX BY OXYGEN EVOLUTION
MEASUREMENTS, AFM AND SNOM

Soumis à la revue :

BIOPHYSICAL JOURNAL

Design of Functionalized Lipids and Evidence for their Binding to Photosystem II Core Complex by Oxygen Evolution Measurements, AFM, and SNOM

**Eric Trudel¹, Judith Gallant¹, Stéphane Mons², Charles Mioskowski², Luc Lebeau²,
Karin Jeuris³, Phillipe Foubert³, Frans De Schryver³ and Christian Salesse^{1*}**

¹Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières. C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

²Laboratoire de Synthèse Bioorganique associé au CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, 74, route du Rhin BP 24, 67 401 Illkirch Cedex, France

³Department of Chemistry, Katholieke Universiteit Leuven, Celestijnenlaan 200F, 3001 Heverlee-Leuven, Belgium

Key Words: Photosystem II, DCMU derivatives, oxygen evolution, scanning-near field optical microscopy, atomic force microscopy, lipid monolayer.

*Corresponding Author

2.1 Abstract

Photosystem II core complex (PSII CC) absorbs light energy and triggers a series of electron transfer reactions by oxidizing water while producing molecular oxygen. Synthetic lipids with different alkyl chains and spacer lengths bearing functionalized head groups were specifically designed to bind the Q_B site and to anchor this large photosynthetic complex (240 kDa) in order to attempt two-dimensional crystallization. Among the series of different compounds that have been tested, oxygen evolution measurements have shown that dichlorophenyl urea (DCPU) binds very efficiently to the Q_B site of PSII CC and, therefore, that moiety has been linked covalently to the head group of synthetic lipids. The analysis of the monolayer behavior of these DCPU-lipids has allowed to select ones bearing long spacers for the anchoring of PSII CC. Oxygen evolution measurements demonstrated that these long spacer DCPU-lipids specifically bind to PSII CC and inhibit electron transfer. With the use of atomic force microscopy (AFM) and scanning near-field optical microscopy (SNOM), it was possible to visualize domains of PSII CC bound to DCPU-lipid monolayers. SNOM imaging has enabled to confirm that domains observed by AFM were composed of PSII CC. Indeed, the SNOM topography images presented similar domains as those observed by AFM but, in addition, it allowed to determine that these domains are fluorescent. Electron microscopy of these domains however has shown that the bound PSII CC was not crystalline.

2.2 Introduction

Photosystem II (PSII) is a multisubunit complex comprising more than 25 different proteins and photosynthetic pigments, such as chlorophyll (Chl).¹ In higher plants, PSII is located in the thylakoid membrane of chloroplasts, where the first light-driven steps of photosynthesis occur. Upon light absorption, PSII catalyses electron transfer reactions from water to the electron carrier plastoquinone.¹⁻³ This photooxidation process is coupled to the evolution of oxygen and is essential to any animal life.

A large number of structural studies of PSII by electron microscopy were conducted to produce three-dimensional models of the complex.⁴⁻⁹ For a review of the advances on PSII structure, see Hankamer and Barber¹ and Barber and Kühlbrandt⁴. A high resolution structure of PS II has not been determined so far, but two different PSII complex structures have been obtained to a resolution that reveals the secondary structure of the membrane protein.⁹⁻¹² There is still substantial research going on to improve the models and determine the structure of PSII at higher resolution. Until now, electron crystallography has revealed the location of important subunits and photoactive pigment molecules within PSII proteins.⁴ The development of new methods to obtain high quality crystals of this protein complex could allow to get new insights into the structure of PSII.

Hirata and Miyake¹³ have shown that functionalized lipids can be designed to bind the bacterial photosynthetic reaction center onto monolayers at the air-water interface on

the basis of the pioneering work by Kornberg's group with soluble proteins.¹⁴ Such an approach could thus be used to anchor PSII CC and, eventually, prepare 2D crystals if proper binding to a lipid monolayer can be achieved.

In this work, we investigated PSII core complex (PSII CC) which is the smallest complex (with molecular weight of 240 kDa) able to evolve molecular oxygen. This sub-complex of PSII contains CP47, CP43, D1, D2, and subunits of cytochrome (cyt) b_{559} , psbI gene product, and the extrinsic 33 kDa protein, as well as all functional cofactors located in those polypeptides which are essential to photosynthesis. Many herbicides have been shown to specifically bind the Q_B site on the D1 protein, by competition with plastoquinone, and could thus be used for PSII CC anchoring onto a lipid support.¹⁵

Herein we present the design and the monolayer characterization of functionalized lipids bearing a dichlorophenyl urea (DCPU) group. Binding of PSII CC to DCPU-lipids has been investigated in a micellar solution by oxygen evolution measurements, as well as by atomic force microscopy (AFM), and scanning near-field optical microscopy (SNOM). Though the resolution of SNOM is limited when compared to AFM, it has the advantage of combining both topography and fluorescence imaging capabilities. By using these techniques, we were able to correlate fluorescence and topography of PSII CC bound to the functionalized DCPU-lipids. Preliminary 2D crystallization trials were performed and protein close-packing were analyzed by transmission electron microscopy (TEM).

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Purification of PSII CC

PSII CC was extracted from fresh spinach leaves by the method described by Gallant *et al.*¹⁶ on the basis of the original method of van Leeuwen *et al.*¹⁷. Sample buffer (BTS) used to prepare PSII CC contained 20 mM bis(2-hydroxyethyl) imino-tris (hydroxymethyl) methane (Bis-Tris, Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) at pH 6.5, 20 mM MgCl₂ (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ), 5 mM CaCl₂ (Omega Chemical Co., Québec, QC), 75 mM MgSO₄ (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO), 400 mM sucrose (ACP Chemicals Inc., Montreal, QC), and 0,03% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DM) (Calbiochem, San Diego, CA). The concentration of PSII CC samples was determined spectroscopically according to the method of De Las Rivas *et al.*¹⁸ using the known extinction coefficient for cyt b₅₅₉. All manipulations involving PSII CC samples were performed under dim green light.

2.3.2 Synthesis and Characterization of DCPU-Lipids

Compounds **1-4** were prepared using previously described procedures.¹⁹⁻²² Compound **5** resulted from the reaction of the tetrahydropyranyl ether of 2-{2-[2-(2-methylamino-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethanol with 3,4-dichlorophenyl isocyanate and subsequent removal of the hydroxyl protective group using pTsOH/methanol. The DCPU-

lipids **6** and **7** were synthesized from 3,4-dichlorophenyl isocyanate and the corresponding 1,3-dialkoxy-2-(α -methylamino) acetamido propane. DCPU-lipids **8** and **9** were obtained through oxidation of **5** and coupling of the resulting carboxylic acid with the corresponding 1,3-dialkoxy-2-amino propane.

3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-{2-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethyl)-1-methylurea

(**5**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) 8.16 (s, 1 H); 7.56 (dd, $J = 1.1, 1.9$ Hz, 1 H); 7.30 (dd, $J = 1.1, 7.5$ Hz, 1 H); 7.29 (dd, $J = 1.9, 7.5$ Hz, 1 H); 3.76-3.49 (m, 16 H); 3.01 (s, 3 H).

2-[3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-methylureido]-N-(2-octadecyloxy-1-octadecyloxymethyl-ethyl)

acetamide (**6**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) 7.63 (d, $J = 2.6$ Hz, 1 H); 7.49 (s, 1 H); 7.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H); 7.24 (dd, $J = 2.6, 9.0$ Hz, 1 H); 6.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H); 4.30-4.18 (m, 1 H); 3.97 (s, 2H); 3.56 (dd, $J = 4.5, 9.4$ Hz, 2H); 3.47 (dd, $J = 6.0, 9.4$ Hz, 2H); 3.44 (t, $J = 6.8$ Hz, 4 H); 3.10 (s, 3 H); 1.61-1.48 (m, 4 H); 1.39-1.20 (m, 60 H); 0.95-0.85 (m, 6 H).

2-[3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-methylureido]-N-(2-octadec-8-enyloxy-1-octadec-8-

enyloxymethyl-ethyl) acetamide (**7**): $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) 7.63 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H); 7.57 (s, 1 H); 7.32 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H); 7.24 (dd, $J = 2.2, 8.6$ Hz, 1 H); 6.38 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H); 5.44-5.27 (m, 4 H); 4.30-4.18 (m, 1 H); 3.96 (s, 2 H); 3.55 (dd, $J = 4.5, 9.4$ Hz, 2 H); 3.46 (dd, $J = 6.0, 9.4$ Hz, 2 H); 3.43 (t, $J = 6.8$ Hz, 4 H); 3.09 (s, 3 H); 2.12-1.92 (m, 8 H); 1.62-1.47 (m, 4 H); 1.42-1.18 (m, 44 H); 0.96-0.82 (m, 6 H).

2-[2-(2-[2-[3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-methylureido]-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy]-N-(2-octadecyloxy-1-octadecyloxymethyl-ethyl) acetamide (8): ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) 8.16 (s, 1 H); 7.52 (dd, *J* = 2.2, 8.7 Hz, 1 H); 7.31 (dd, *J* = 2.2, 8.7 Hz, 1 H); 7.29 (dd, *J* = 2.2, 8.7 Hz, 1 H); 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H); 4.29-4.18 (m, 1 H); 4.09 (s, 2 H); 3.76-3.65 (m, 10 H); 3.57-3.39 (m, 10 H); 3.01 (s, 3 H); 1.60-1.48 (m, 4 H); 1.38-1.21 (m, 60 H); 0.92-0.84 (m, 6 H).

2-[2-(2-[2-[3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-methylureido]-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy]-N-(2-octadec-8-enyloxy-1-octadec-8-enyloxymethyl-ethyl) acetamide (9): ¹H-NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) 8.22 (s, 1 H); 7.61 (m, 1 H); 7.32 (m, 1 H); 7.29 (m, 1 H); 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H); 5.42-5.32 (m, 4 H); 4.24-4.14 (m, 1 H); 3.97 (s, 2 H); 3.77-3.65 (m, 10 H); 3.56-3.41 (m, 10 H); 3.00 (s, 3 H); 2.19-1.95 (m, 8 H); 1.62-1.50 (m, 4 H); 1.47-1.23 (m, 44 H); 0.96-0.86 (m, 6 H).

2.3.3 Measurement of PS II CC Oxygen Evolution

Oxygen evolution measurements were performed with a Clark-type electrode cell (Hansatech Ltd., England). The cell contained PSII CC at a Chl concentration of 5 μM and 1 mM 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone (DCBQ) (Aldrich, Inc., Oakville, ON), a plastoquinone analog which acts as an electron acceptor. The solution was kept at 20 °C during experiments. We used a saturating red light centered at 660 nm to induce oxygen evolution.

The measured oxygen evolution of PSII CC was $1235 \pm 30 \mu\text{mole O}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$ which is similar to other results reported in the literature.^{23,24} For affinity measurements with water soluble derivatives of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), i.e. compounds **1-5** (DCPUs), oxygen evolution was detected for concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-3} M. Affinity of DCPU-lipids **6-9** towards PSII CC has been measured in the same conditions as for the water soluble compounds, except that (4.4% w/v) DM was used to solubilize the lipids.

2.3.4 Monolayer Characterization of the DCPU-Lipids

Surface pressure isotherms were measured on a home-made Langmuir trough which has recently been described.¹⁶ DCPU-lipids were dissolved in chloroform (Megasolv-HPLC 99.98%, Omega Chemical Company Inc.) and spread over nano-pure water filtered from a four cartridge system (NANOpure SYBRON, Barnstead). Surface pressure (π) was detected with a Wilhelmy plate system using a filter paper.²⁵ Monolayers were compressed at $7 \text{ \AA}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, and each experiment was run in triplicate, the experimental error being smaller than $1 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$.

2.3.5 AFM and SNOM Measurements of Lipid Bound PSII CC

Atomic force microscopy images of the films were recorded in non-contact mode with a commercially available instrument (model Discoverer, TopoMetrix, Sunnyvale, CA).

The SNOM apparatus was a modified commercially available instrument (model Aurora, Topometrix). In order to allow detection of fluorescence up to 800 nm, the laser diode used for the shear force feedback was replaced by an external laser diode with a wavelength of 980 nm (EG&G, model C86147E). The photomultiplier tube was replaced by a more sensitive detector with single-photon avalanche photodiode module (EG&G, model SPM-CD1718). As excitation source, an argon ion laser tuned to 458 nm was used. The laser light was coupled into the SNOM filter probe *via* a single-mode fiber coupler. Excitation light to the detector was blocked by a holographic laser notch filter (Kaiser optical systems, Ann Arbor, MI). Additional IR short-pass filters (CVI SPF-900) were used to block the light from the shear force measurement module. Fluorescence was measured in transmission mode by collecting the emitted light with an objective (Nikon 60X/NA 0.70). Home-made SNOM probes were used. The experimental setup is described in more detail elsewhere.²⁶

Custom designed Teflon[®] wells used for the protein binding experiments on lipid films were 18 mm in diameter and 4 mm deep. PSII CC in BTS buffer (1.2 ml, 250 µg/ml)

was first deposited into the wells. Then, a DCPU-lipid solution (24 μ l, 0.5 mg/ml) was spread on the surface of this protein solution. After 2 hr incubation, silanized glass plates (18 mm X 18 mm) were horizontally deposited on top of the wells and withdrawn after 1-2 seconds adsorption. The plates were rinsed with nano-pure water and stored in a dessicator at 4° C in darkness until use.

2.3.6 Crystallization Trials and Electron Microscopy

Two-dimensional crystallization trials of PSII CC were performed by spreading 0.5 μ l DCPU-lipids at the surface of a solution containing 36 μ l of PSII CC (50-500 mg/ml in BTS buffer) in Teflon[®] wells (4 mm in diameter and 4 mm deep). DCPU-lipids (0.1-1.0 mg/ml in chloroform) were assayed either pure or as mixtures (1-10 mol%, 0.1-1.0 mg/ml) with phospholipids. Saturated DCPU-lipids **6** and **8** were mixed with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DPPC) whereas unsaturated DCPU-lipids **7** and **9** were mixed with 1,2-dioleoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DOPC). Incubation with PSII CC was run in a closed humid chamber to prevent buffer evaporation. A carbon coated grid was then placed on the top of the well, withdrawn and negatively stained with two drops of 1% uranyl acetate. Crystallization trials involving detergent removal by Bio-Beads SM2 (Bio-Rad, Hercules, CA) were performed as described by Levy *et al.*²⁷ with slight modifications. The home-made Teflon[®] wells were 4 mm in diameter and 5 mm deep with a hole on the

side for the injection of the Bio-Beads and the lipid-protein solution at the bottom of the wells.²⁷ A DCPU-lipid solution (0.5 μ l, 0.1 mg/ml in chloroform) was spread at the surface of a droplet of the BTS buffer (without PSII CC) in the wells and incubated for 15 min. Six μ l of lipid-PSII CC solution (0.1 mg/ml PSII CC mixed with 0.1 mg/ml monogalactosyl diglyceride (MGDG) (Matreya, Pleasant Gap, PA) containing 10 mM DM and 0.02 % (w/v) sodium azide) in BTS was then injected into the wells. After 1 hr incubation under gentle stirring, 5 mg Bio-Beads were injected into the wells. After 2 hr incubation, an additional 5 mg Bio-Beads portion was added. After a total incubation time of 4 hr, films were transferred onto carbon coated grids and negatively stained with 1% (w/v) uranyl acetate. Micrographs were taken with a Philips EM-208s transmission electron microscope operating at 80 kV.

2.4 Results and Discussion

2.4.1 PSII CC Oxygen Evolution Inhibition by DCMU Analogs

Many herbicides compete with the natural electron carrier plastoquinone for the binding to the Q_B site of PSII CC. Because they do not act as electron acceptors, they competitively block the light-induced electron transfer from water to the Q_B site, thereby inhibiting oxygen evolution. Ultimately, the whole photosynthesis process is interrupted. A considerable amount of data is available on PSII specific herbicides, but still, the action mode is not understood at the molecular level for most of these compounds due to the lack of a high resolution structure of PSII.

Among herbicides binding the Q_B site of PSII CC, different classes of compounds can be found including: phloroglucinols, cyanoacrylates, triazines and phenylurea.²⁸ Due to the possible degradation of the D1 polypeptide of PSII CC by phloroglucinols,^{29,30} to the water sensitivity of the ester function in acrylates, and to the sharp dependence of affinity for the Q_B site on steric factors in triazines, we considered phenylureas as the best candidates for chemical modifications allowing to preserve binding to the Q_B site of PSII CC (for a review see Bowyer *et al.*³¹). Consequently we designed ligands able to bind the Q_B site of PSII CC based on the DCMU structure. The modification of DCMU analogs through the introduction of a linker to be further connected to a lipid will presumably modify its affinity for the Q_B site of PSII CC. In order to check that, four different structural

analogs of DCMU (figure 2.1) were synthesized and their affinity for PSII characterized by measurements of oxygen evolution in the presence of a competitive electron acceptor of similar structure, DCBQ. The I_{50} values for the DCMU analogs, which correspond to the concentration of a compound needed to reduce the initial oxygen evolution of PSII CC by 50% are presented in Table 2.1. Our results show that compound **4** exhibits the highest affinity for the Q_B site of PSII CC ($I_{50} = 1.2 \cdot 10^{-7}$ M), even higher than DCMU ($I_{50} = 9.0 \cdot 10^{-7}$ M). The differences in affinity between compound **1** ($I_{50} > 10^{-3}$) and compound **2** ($I_{50} = 1.2 \cdot 10^{-4}$) indicates that a second chlorine atom on the aromatic ring is critical for binding to the Q_B site, which is consistent with the work of Satoh *et al.*³² Finally, Table 2.1 clearly indicates that the polarity of the nitrogen substituents (figure 2.1, R^2) has a strong influence on affinity for the Q_B site of PSII CC. The more hydrophilic is the spacer, the more the affinity for the Q_B site of PSII CC of the analog will be reduced (caproic acid (**2**) < hydroxypolyether (**5**) < butyl (**4**)). Compound **4** has thus been used for the synthesis of DCPU-lipids.

2.4.2 Monolayer Characterization of DCPU-Lipids

Surface pressure versus molecular area (π -A) isotherms of the four DCPU-lipids are presented in figure 2.2. Both saturated DCPU-lipids **6** and **8** show a liquid-expanded (LE) to solid-condensed (SC) phase transition at approximately 25 mN/m whereas the two

unsaturated DCPU-lipids **7** and **9** show a LE state throughout the isotherm. Collapse of DCPU-lipids **6**, **7**, **8** and **9** occurs at approximately 30, 20, 36 and 36 mN/m, respectively. Molecular area at collapse for lipids **6**, **7**, **8** and **9** occurs at 40, 60, 42 and 80 Å²/molecule, respectively. DCPU-lipids **8** and **9**, bearing a long ethylene oxide spacer, obviously occupy a much larger area than DCPU-lipids **6** and **7** which do not contain such a spacer. Indeed, the molecular area of 80 and 95 Å²/molecule at the lift-off pressure of DCPU-lipids **6** and **7**, respectively, is much smaller than in the case of DCPU-lipids **8** and **9** (145 and 150 Å²/molecule, respectively).

Films prepared with DCPU-lipids **8** and **9** collapse at higher surface pressures and their surface pressure is much more stable over time than DCPU-lipids **6** and **7** (data not shown). Obviously, the hydrophilic ethylene oxide spacer provides more stability to these lipids. The increased hydrophilicity of the polar head group is likely providing DCPU-lipids **8** and **9** with a more adequate hydrophilic/hydrophobic balance. The ability of these lipids to form stable monolayers is of great importance for protein anchoring and two-dimensional crystallization purposes, since monolayers of functionalized lipids are incubated over a few hours at high surface pressure. Thus DCPU-lipids **8** and **9** were chosen for binding and anchoring of PSII CC.

2.4.3 Evidence for the Binding of DCPU-Lipids to PSII CC by Oxygen Evolution

Measurements

Oxygen evolution experiments with DCPU-lipids were performed to demonstrate the specific binding between these lipids and the Q_B site of PSII CC. These affinity measurements were performed with the two long spacer DCPU-lipids **8** and **9**. Figure 2.3 shows that both DCPU-lipids **8** and **9** are able to compete with DCBQ to bind the Q_B site of PSII CC and inhibit electron transport, thus reducing oxygen evolution. The I_{50} values calculated from oxygen evolution are 2×10^{-4} M and 7×10^{-5} M for DCPU-lipids **8** and **9**, respectively. The I_{50} value obtained for DCPU-lipid **9** is very close to the one obtained for compound **5** (Table 2.1), indicating in this case that the lipid moiety does not alter the ligand-protein recognition process. On the other hand, with DCPU-lipid **8** the I_{50} value decreased by one order of magnitude. Nonetheless, the observation of a reduction of oxygen evolution of PSII CC by DCPU-lipids **8** and **9** suggests that these lipids bind specifically to the Q_B site of PSII CC, thereby replacing the electron acceptor DCBQ. This result suggests that these lipids can be used for anchoring PSII CC and, eventually, for two-dimensional crystallization experiments.

2.4.4 AFM and SNOM Imaging of PSII CC Bound to DCPU-Lipid Films

Non-contact mode AFM is a well established method to obtain high resolution topography images of biological material.³³⁻³⁵ SNOM is particularly useful for the present study as it combines the ability of obtaining topography and fluorescence images of the sample, since PSII CC is highly fluorescent. The presence of PSII CC can thus be directly assayed by the observation of the fluorescence distribution in the sample. AFM and SNOM imaging were used to show that the binding of PSII CC to DCPU-lipids in micellar solutions (figure 2.3) is also occurring with monolayers of DCPU-lipids. DCPU-lipids spread over a solution of PSII CC were transferred onto a solid substrate after 2 hr of incubation and then observed by AFM and SNOM.

Figure 2.4 shows a typical AFM image of PSII CC adsorbed onto a film of DCPU-lipid **8** where numerous large domains can be observed. These domains appear to be constituted of small globular shapes, presumably made of PSII CC. From various line scans calculated from the AFM topography images, the thickness of these domains vary from 20 to 30 nm in average (figure 2.5), but can be as large as 40 to 60 nm (figure 2.4). The uniformity between domains, which corresponds to the darker areas on the AFM images, suggests that a rather homogeneous lipid film covers the glass substrate. The same type of structure was also observed when using pure DCPU-lipid **9**. Moreover, when PSII CC is adsorbed onto a film of DPPC instead of DCPU-lipids **8** or **9**, films are homogeneous,

similar to the dark areas observed in figure 2.4 and do not show any structure thicker than 2 nm (result not shown). This result suggests that the domains observed in the presence of DCPU-lipid layers consist of PSII CC and that DCPU-lipids are necessary for the binding of PSII CC. Previously published results of AFM measurements with transferred PSII membranes by the Langmuir-Blodgett method showed a similar distribution and globular appearance of the PSII particles.³⁶ However, the authors used the tapping-mode AFM which is known to damage soft samples with forces larger than 2 nN.³⁷⁻³⁹ Their observation of a cavity in the central region of the PSII particles may thus be induced by the use of the tapping-mode.

According to previously published models of PSII, the dimensions of a PSII CC dimer are approximately 15 X 20 nm in the membrane plane and 11 nm perpendicular to this plane.^{1,12} Another model of the PSII core dimer from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus* was recently presented by Nield *et al.*⁶ They estimated the overall dimensions of the PSII core dimer to 15 X 22 nm in the plane of the membrane and 9.5 nm in the axis perpendicular to the membrane. Despite the subunit composition of the cyanobacterium core dimer differs from that of the spinach PSII CC in our experiments, their structure is remarkably similar.⁴⁰ There is a general consensus emerging from numerous structural studies in favor of the dimerization state of PSII.^{6,12,41,42} Such an organization would lead to a minimum thickness of approximately 20 nm which is

comparable to the thickness of the domains observed by AFM and SNOM. A possible molecular organization of PSII CC that would explain the dimensions of the domains observed by AFM would thus be that dimers of PSII CC are bound to DCPU-lipids at the Q_B site of PSII CC. The 20-30 nm thickness values measured by AFM and SNOM would thus correspond to the dimensions of PSII CC organized as a dimer as postulated in figure 2.6. On the other hand, from the AFM image one can see that the dimensions of the globular shaped domains in the plane of the monolayer are variable in size, and do not present any ordered, crystalline pattern.

The same type of protein domains can also be distinguished in the SNOM topography images as shown in figure 2.7. The smaller globular domains of PSII CC observed by AFM (figure 2.4) are not apparent in the SNOM topography and fluorescence images. This can be explained by the lower resolution obtained by SNOM (approximately 20-30 nm) compared to AFM (approximately 1-5 nm) because of the size of the probing tip.⁴³ On the other hand, the film thickness obtained by SNOM is in good agreement with the one measured by AFM (compare figures 2.5 and 2.7 A).

PSII CC shows strong excitation and emission bands centered at 440 and 680 nm, respectively.⁴⁴ The images shown in figure 2.7B is generated by exciting the film with a laser at 458 nm and collecting the fluorescence with a 515 nm long pass filter. The fluorescence observed in this image should thus unambiguously originate from PSII CC.⁴⁴

It can be seen that globular domains of 20 to 40 nm thickness present a high fluorescence compared to the background, where fluorescence intensity values are approximately as high as the noise level. SNOM images demonstrated a clear correlation between topography and fluorescence, showing that those transferred domains emit fluorescence above 515 nm and can thus assigned to the presence of bound PSII CC.

In a previous work, Miyake *et al.*¹³ studied the binding of quinone-depleted bacterial photosynthetic reaction centre (RC) to quinonylphospholipids in the scope to use this system for the preparation of new molecular devices. The binding of the RC to the lipid monolayer was first demonstrated by the increase in molecular area of the film. Non-specific interaction between the protein and the lipid interface could also contribute to this increase in molecular area. Thus, this measure is not sufficient to demonstrate specific binding of the RC to the functionalized lipids. In the case of the photosynthetic RC, the photobleaching of the film indicates the binding of the quinone moiety, as it is incorporated into its binding site of RC. In the present work, we showed the presence of PSII CC on the DCPU-lipid film by AFM, as well as by SNOM topography imaging. The specific binding of PSII CC to the DCPU-lipids is directly visualised with the SNOM images. Indeed, the absence of PSII CC when DPPC was used instead of DCPU-lipids suggests that a specific binding is taking place between PSII CC and DCPU-lipids.

Since we have demonstrated that specifically bound PSII CC to DCPU-lipid films can be transferred onto solid hydrophobic substrates, two-dimensional crystallization trials were then performed under a large number of experimental conditions. Parameters that were varied included: protein, salt and detergent concentration of the solubilization buffer, temperature, incubation time, concentration of the DCPU-lipids and use of different natural lipid matrices for the DCPU-lipids. However, no crystalline structure could be observed by electron microscopy. This could be due to the presence of the detergent used to solubilize PSII CC which, in turn, can disrupt the lipid monolayer. Nonetheless, Levy *et al.*²⁷ recently succeeded to prepare 2D crystals of two large membrane proteins with functionalized lipids using a new approach where the detergent is removed by adsorption on polystyrene beads. The use of a detergent to solubilize PSII CC is necessary to prevent protein aggregation and possible denaturation in solution. On the other hand, the presence of a detergent in the crystallization trials may disrupt the functionalized DCPU-lipid film. The method of Levy *et al.* thus provides a way to gradually adsorb the detergent present in solution onto polystyrene beads which are present into the wells where PSII CC was deposited. Crystallization trials using this method did not yield PSII CC crystals, but has enabled us to obtain large domains of close-packed protein (figure 2.8). Preliminary results obtained by electron microscopy demonstrates the promising avenues for the crystallization of PSII CC with DCPU-lipids and additional experimental parameters must be investigated in order to

produce two-dimensional crystals. Systematic crystallization trials are now being conducted.

2.5. Conclusion

In the work presented here, we describe functionalized lipids bearing a DCPU moiety in their polar head group, which is a structural analog of DCMU, a well known herbicide which binds PSII CC. These lipids were designed for PSII CC immobilization onto a lipid layer and, eventually, for two-dimensional crystallization. We have characterized the surface pressure isotherm of these lipids in monolayers at the air-water interface. The binding of these DCPU-lipids to PSII CC was demonstrated by the reduction of the oxygen evolution of PSII CC in micellar solutions as well as by AFM and SNOM imaging. The use of AFM in combination with SNOM fluorescence imaging provides a unique way of studying the specific binding of PSII CC to the lipid monolayer. The two-dimensional crystallization of PSII CC using functionalized DCPU-lipids and analysis of the 2D crystals by electron crystallography could provide a way to a high resolution 3D model of PSII CC.

Acknowledgements

The authors are indebted to Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds FCAR for financial support. C. Salette is a Chercheur Boursier Senior from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

2.6. References

- (1) Hankamer, B.; Barber, J. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1997**, *48*, 641-671.
- (2) Vermaas, W. F. J. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1993**, *44*, 457-481.
- (3) Hansson, O.; Wydrzynski, T. *Photosynth. Res.* **1990**, *23*, 131-162.
- (4) Barber, J.; Kühlbrandt, W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 469-75.
- (5) Nield, J.; Orlova, E. V.; Morris, E. P.; Gowen, B.; van Heel, M.; Barber, J. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 44-7.
- (6) Nield, J.; Kruse, O.; Ruprecht, J.; da Fonseca, P.; Buchel, C.; Barber, J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27940-27946.
- (7) Marr, K. M.; McFeeters, R. L.; Lyon, M. K. *J. Struct. Biol.* **1996**, *117*, 86-98.
- (8) Marr, K. M.; Mastronarde, D. N.; Lyon, M. K. *J. Cell Biol.* **1996**, *132*, 823-33.
- (9) Hasler, L.; Ghanotakis, D.; Fedtke, B.; Spyridaki, A.; Miller, M.; Müller, S. A.; Engel, A.; Tsiotis, G. *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*, 273-83.
- (10) Mayanagi, K.; Ishikawa, T.; Toyoshima, C.; Inoue, Y.; Nakazato, K. *J. Struct. Biol.* **1998**, *123*, 211-24.
- (11) Rhee, K. H.; Morris, E. P.; Barber, J.; Kühlbrandt, W. *Nature* **1998**, *396*, 283-6.
- (12) Hankamer, B.; Morris, E. P.; Barber, J. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 560-4.
- (13) Hirata, Y.; Miyake, J. *Thin Solid Films* **1994**, *244*, 865-868.
- (14) Uzgiris, E. E.; Kornberg, R. D. *Nature* **1983**, *301*, 125-9.
- (15) Petrouleas, V.; Diner, B. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *893*, 126-131.
- (16) Gallant, J.; Desbat, B.; Vaknin, D.; Salesse, C. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2888-99.

- (17) van Leeuwen, P. J.; Nieven, M. C.; van de Meent, E. J.; Dekker, J. P.; van Gorkom, H. J. *Photosynth. Res.* **1991**, *28*, 149-154.
- (18) De Las Rivas, J.; Klein, J.; Barber, J. *Photosynth. Res.* **1995**, *46*, 193-202.
- (19) Schneider, P.; Goodrow, M. H.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 413-422.
- (20) Karu, A. E.; Chmidt, D. J. S.; Richman, S. J.; Cooper, C.; Tran, D.; Hsu, J. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 310-315.
- (21) Schenach, T. A.; Brown, J. J.; Wysocki, A. J.; Yackovich, F. *J. Med. Chem.* **1966**, *9*, 426-428.
- (22) Ibanez, P. G. *C.A.* **1976**, *85*, 159731.
- (23) Rogner, M.; Boekema, E. J.; Barber, J. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 44-9.
- (24) Fotinou, C.; Kokkinidis, M.; Haase, W.; Michel, H.; Ghanotakis, D. *Photosynth. Res.* **1993**, *37*, 41-48.
- (25) Albrecht, O. *Thin Solid Films* **1983**, *99*, 227-231.
- (26) Vanoppen, P.; Hofkens, J.; Jeuris, K.; Faes, H.; Kerimo, J.; Barbara, P. F.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; De Schryver, F. C. *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*; Springer-Verlag: New York, 1998.
- (27) Levy, D.; Mosser, G.; Lambert, O.; Moeck, G. S.; Bald, D.; Rigaud, J. L. *J. Struct. Biol.* **1999**, *127*, 44-52.
- (28) Oettmeier, W. Herbicides of Photosystem II. In *The Photosystems: Structure, Function and molecular biology*; Barber, J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1992; pp 349-408.

- (29) Nakajima, Y.; Yoshida, S.; Inoue, Y.; Yoneyama, K.; Ono, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1230*, 38-44.
- (30) Kirilovsky, D.; Rutherford, A. W.; Etienne, A. L. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3087-95.
- (31) Bowyer, J. R.; Camilleri, P.; Vermaas, W. F. J. Photosystem II and its Interaction with Herbicides. In *Herbicides, Topics in Photosynthesis*; Baker, N. R., Percival, M. P., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1991; Vol. 10; pp 27-85.
- (32) Satoh, K.; Oh-hashii, M.; Kashino, Y.; Koike, H. *Plant Cell Physiol.* **1995**, *36*, 597-605.
- (33) Radmacher, M.; Fritz, M.; Hansma, P. K. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 264-70.
- (34) Dinte, B. P.; Watson, G. S.; Dobson, J. F.; Myhra, S. *Ultramicroscopy* **1996**, *63*, 115-125.
- (35) Morita, S.; Fujisawa, S.; Kishi, E.; Ohta, M.; Ueyama, H.; Sugawara, Y. *Thin Solid Films* **1996**, *273*, 138-142.
- (36) Shao, L.; Tao, N. J.; Leblanc, R. M. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *273*, 37-41.
- (37) Grandbois, M.; Clausen-Schaumann, H.; Gaub, H. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2398-404.
- (38) Muller, D. J.; Heymann, J. B.; Oesterhelt, F.; Moller, C.; Gaub, H.; Buldt, G.; Engel, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1460*, 27-38.
- (39) Yip, C. M.; Yip, C. C.; Ward, M. D. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5439-49.
- (40) Boekema, E. J.; Hankamer, B.; Bald, D.; Kruip, J.; Nield, J.; Boonstra, A. F.; Barber, J.; Rogner, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 175-9.
- (41) Lyon, M. K. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1364*, 403-19.
- (42) Kruse, O.; Hankamer, B.; Konczak, C.; Gerle, C.; Morris, E.; Radunz, A.; Schmid, G. H.; Barber, J. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 6509-14.

- (43) Moller, C.; Allen, M.; Elings, V.; Engel, A.; Muller, D. J. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1150-8.
- (44) Haag, E.; Irrgang, K. D.; Boekema, E. J.; Renger, G. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *189*, 47-53.

Table 2.1. I_{50} values calculated from oxygen evolution measurements of DCMU and its DCPU analogs in the presence of 1 mM DCBQ.

Compound	I_{50} (M)
DCMU	9.0×10^{-7}
1	$> 10^{-3}$
2	1.2×10^{-4}
3	2.0×10^{-6}
4	1.2×10^{-7}
5	5.0×10^{-5}

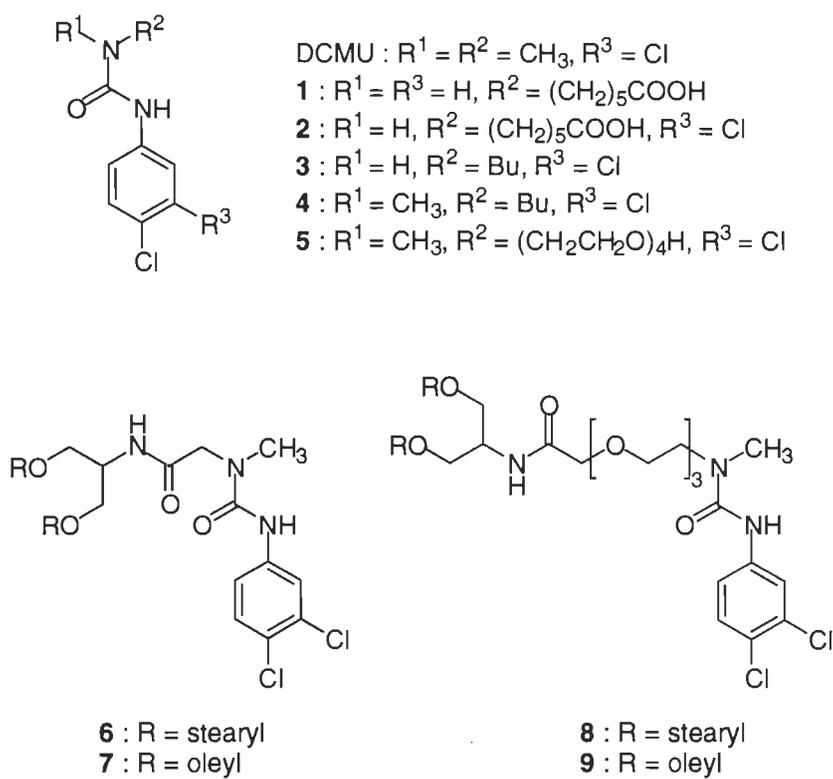


Figure 2.1. Structure of DCMU analogs and functionalized DCPU-lipids.

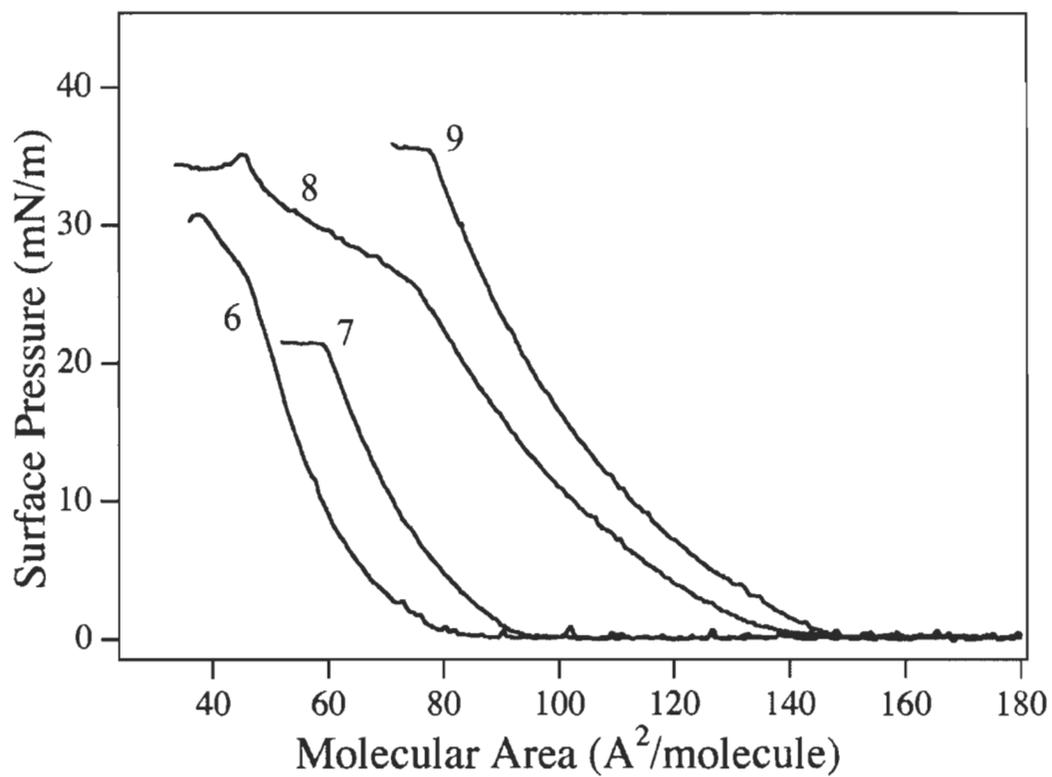


Figure 2.2. Surface pressure-area isotherms of DCPU-lipids **6-9** on pure water at $20 \pm 0,5$ °C.

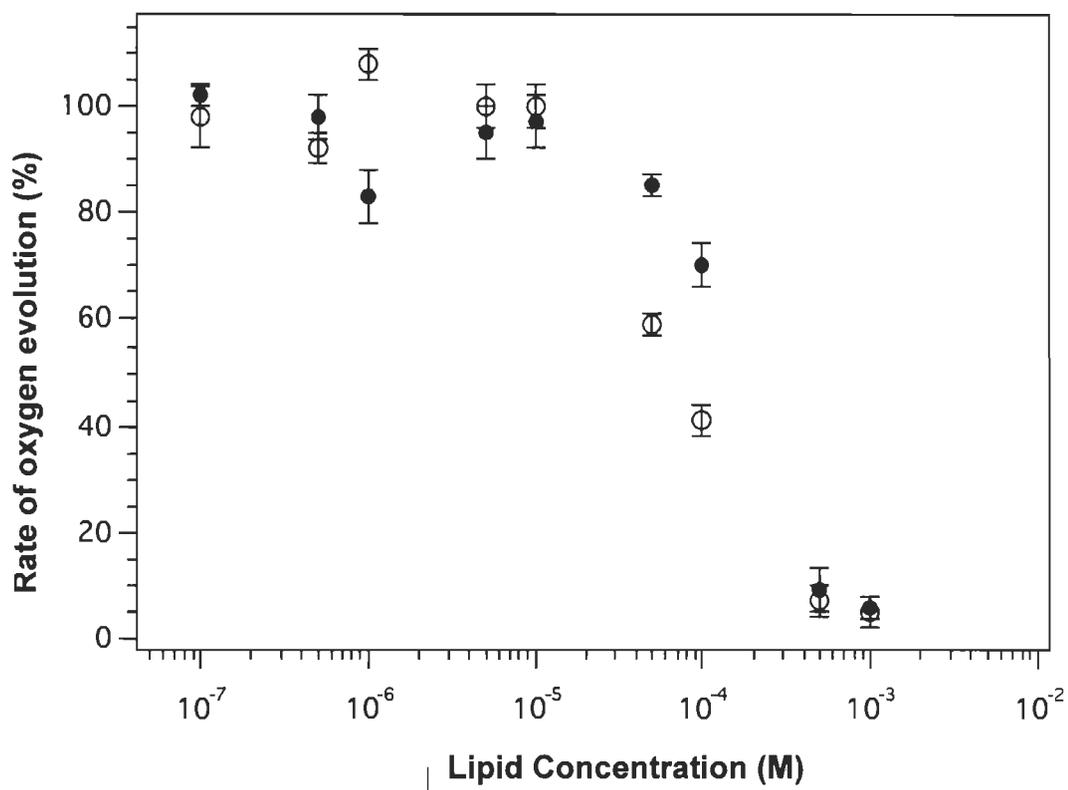


Figure 2.3. Effect of DCPU-lipids **8** (●) and **9** (○) on the oxygen evolution of PSII CC determined in the presence of 1 mM DCBQ and 4,4% w/v DM.

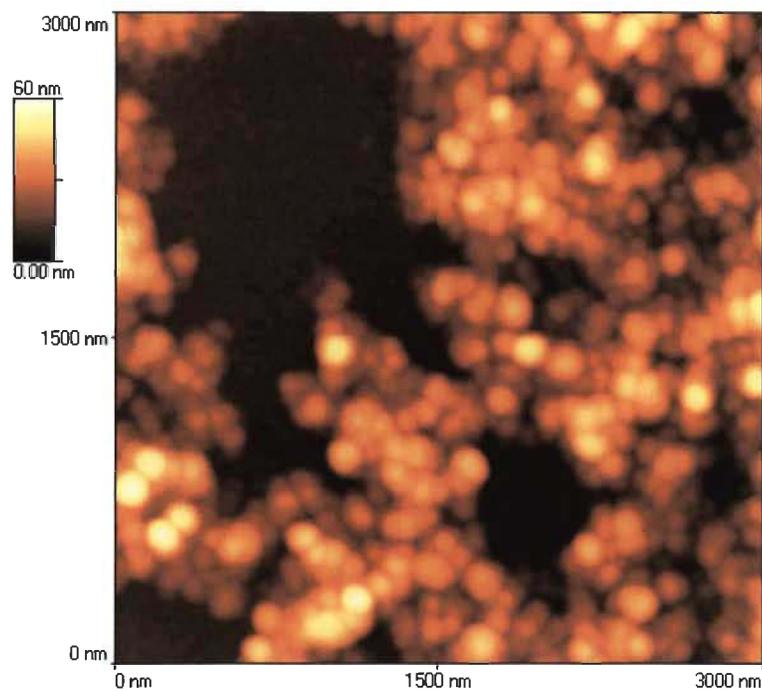


Figure 2.4. AFM topography image in non-contact mode of PSII CC bound to a DCPU-lipid **8** layer. Pure DCPU-lipids in chloroform are spread onto a droplet of a PSII CC solution. After 2 hr incubation, lipid-protein complexes are then transferred onto a silanized glass plate.

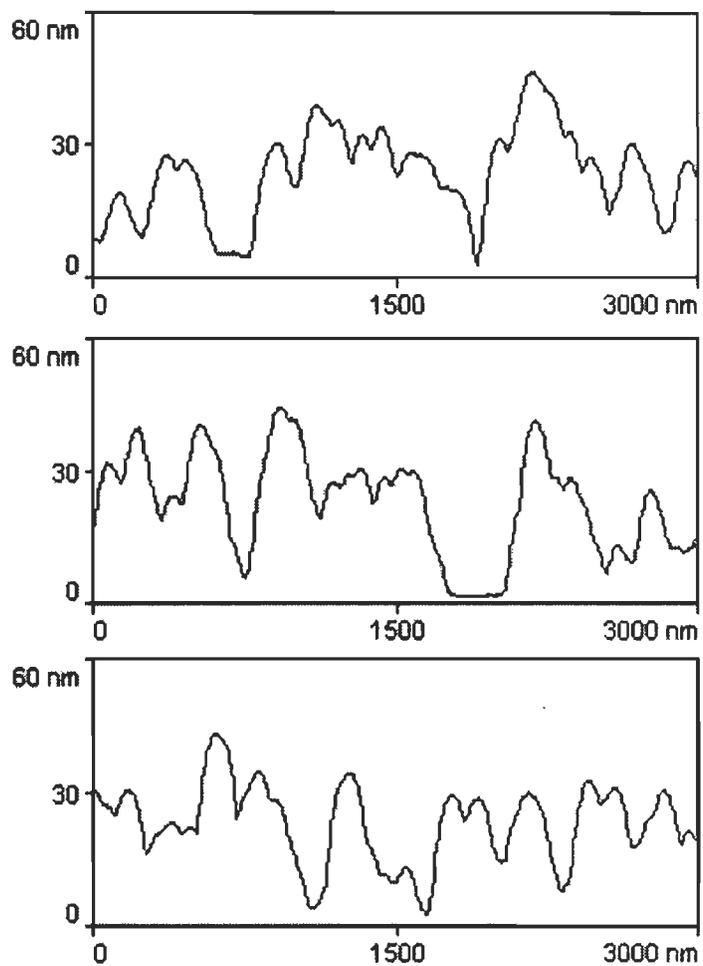


Figure 2.5. Various representative x-z line scans calculated from the AFM images. The smaller globular domains can be recognized as peaks of approximately 150 to 375 nm wide and have a average thickness of 20 to 30 nm.

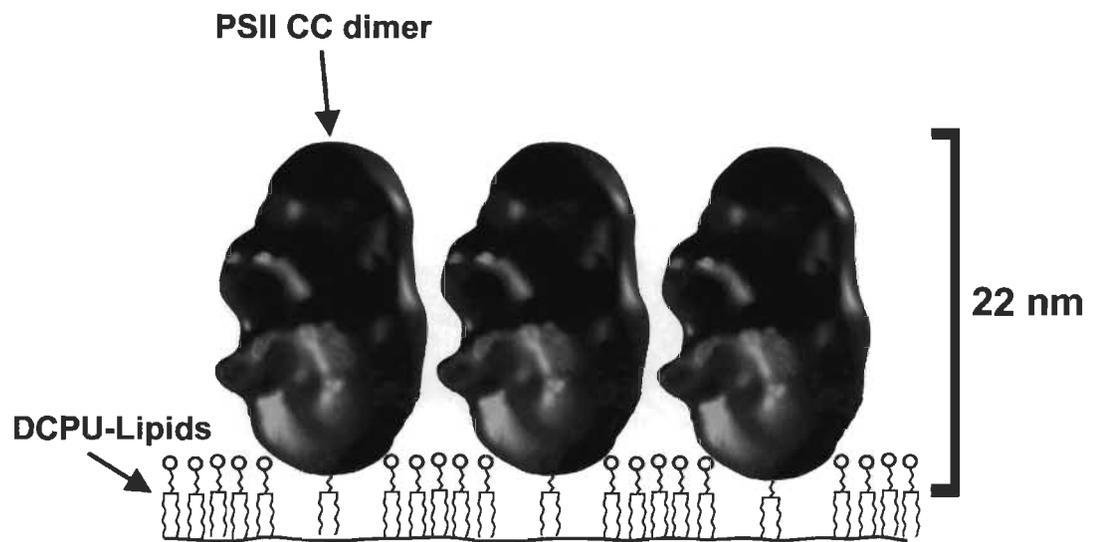


Figure 2.6. Proposed model for the binding of PSII CC to the DCPU-lipid monolayer. The model of PSII CC comes from the data published by Nield *et al.*⁶

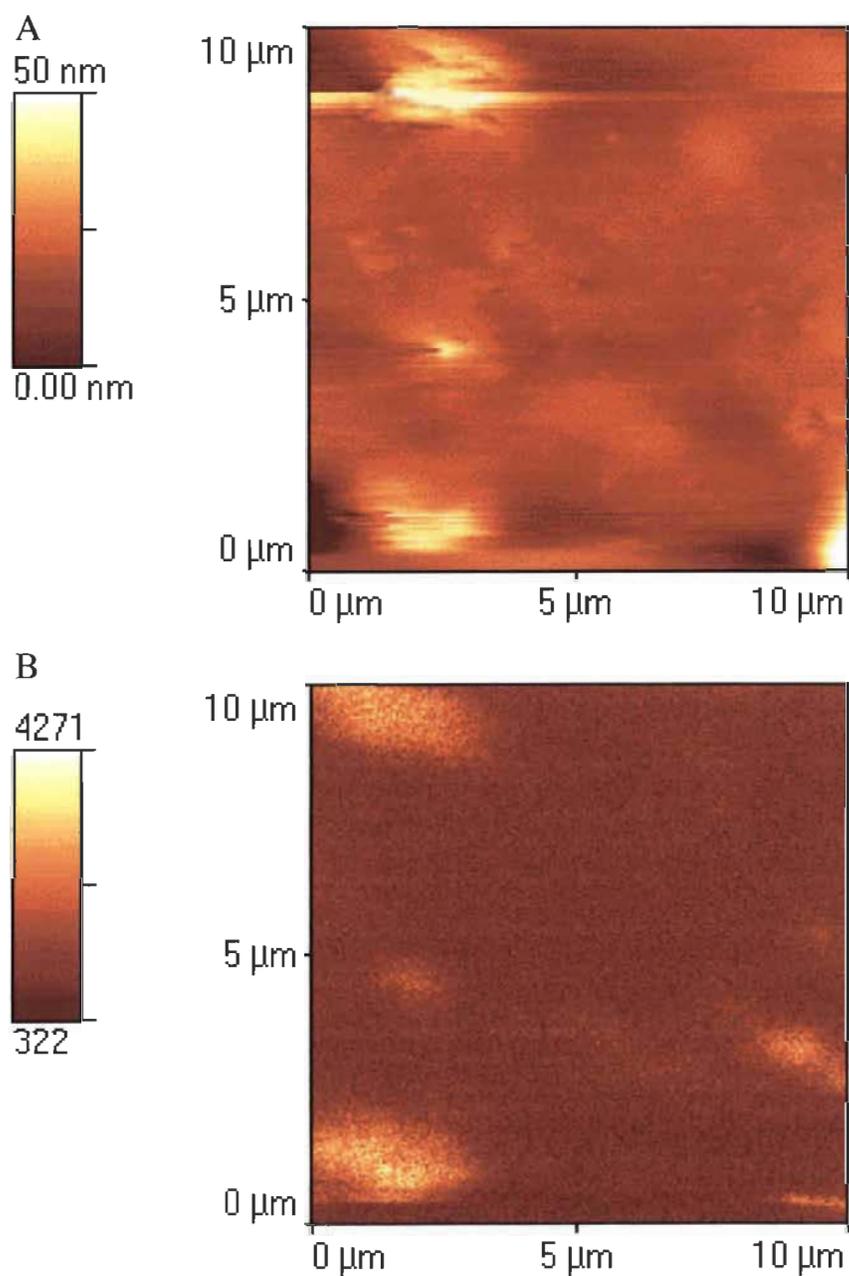


Figure 2.7. SNOM images of a film of PSII CC bound to a layer of DCPU-lipid **8**. A: Topography mode. B: Fluorescence mode using a 458 nm excitation wavelength and a 515 nm long pass filter. The color scale bar to the left is in count per seconds.

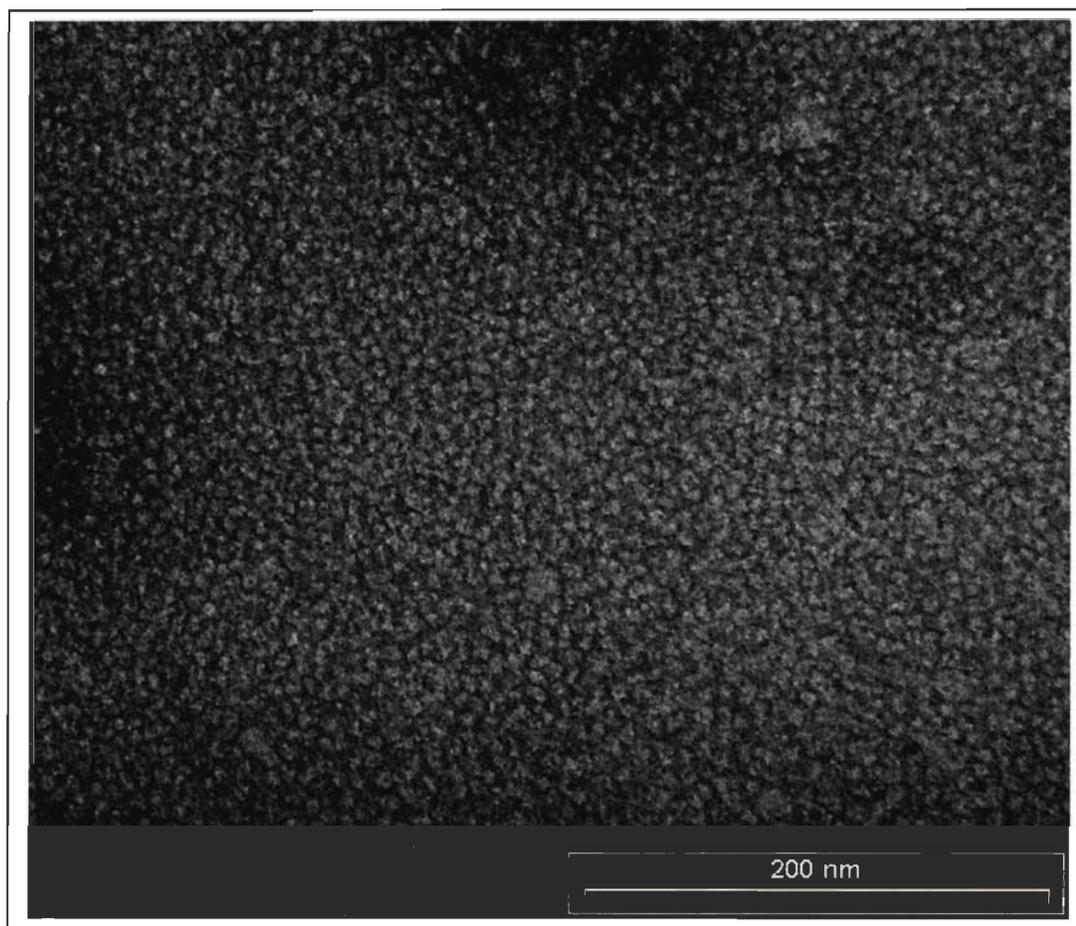


Figure 2.8. Electron micrograph of a typical negatively stained 2D close-packing of PSII CC obtained during crystallization trials.

Chapitre 3

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

3.1 Récapitulation des résultats

Malgré le fait que le but ultime d'obtenir des cristaux de PSII CC n'a pu être atteint au cours du projet de maîtrise. Il n'en reste pas moins que des aspects importants entrant dans le processus de cristallisation ont pu être étudiés par l'ensemble des techniques utilisées dans ce travail. Les résultats obtenus par les différentes techniques pourront faciliter l'optimisation des conditions expérimentales dans les essais futurs de cristallisation. Dans ce dernier chapitre, l'ensemble des résultats sera intégré, ce qui permettra de tirer des conclusions sur l'interaction entre les lipides-DCPU et le PSII CC.

Deux critères sont essentiels afin d'utiliser les lipides-DCPU pour des expériences de cristallisation. L'un d'eux est la capacité des lipides fonctionnalisés de former des monocouches et, de plus, ces monocouches doivent présenter une bonne stabilité en fonction du temps. L'autre critère essentiel est la capacité de lier le PSII CC. Dans un premier temps, les isothermes de pression de surface des quatre lipides ont été mesurées avec une cuve de Langmuir. La caractérisation des isothermes permet de déterminer l'état physique

des lipides, à savoir s'ils sont dans un état liquide-expansé (LE) ou solide-condensé (SC). Tout comme des lipides naturels, les lipides-DCPU insaturés ne démontraient pas de transition de phase à cette température, tandis que les lipides-DCPU saturés présentaient une transition de phase LE à SC. Cependant, il est important de noter que les lipides insaturés montrent aussi une transition de phase mais à une température plus basse que 0°C. Les résultats en monocouche suggèrent également que les lipides-DCPU à long espaceur permettent l'incorporation de la tête polaire DCPU entre les chaînes aliphatiques à grande aire moléculaire. Par contre, à mesure que la pression de surface augmente et donc que l'aire moléculaire diminue, l'effet d'insertion semble s'éliminer, de telle façon qu'à haute pression de surface, la tête polaire DCPU devrait être orientée vers la sous-phase. En fonction du temps, nous avons noté également que les monocouches des lipides-DCPU à court espaceur sont instables puisque leur pression de surface chute rapidement. Les mesures en monocouche nous ont permis de sélectionner les lipides-DCPU à long espaceur pour les essais de cristallisation puisqu'ils sont très stables en fonction du temps.

Le deuxième critère qui a dû être évalué est la capacité des lipides-DCPU à lier le PSII CC. Sachant que les herbicides abaissent la production d'oxygène du PSII CC quand ils se lient au site Q_B , nous avons donc utilisé cette méthode pour mesurer l'affinité des lipides-DCPU pour le PSII CC. Il s'agit de mesurer l'inhibition de la capacité de dégagement d'oxygène du PSII CC par la compétitivité entre un lipide-DCPU et le DCBQ

qui est un accepteur d'électrons couramment utilisé lors de ce type de mesure. Pour les deux lipides-DCPU, les I_{50} mesurés (concentration nécessaire en inhibiteur pour réduire de 50% le dégagement d'oxygène) sont de 2×10^{-4} M et 7×10^{-5} M, pour le lipide à long espaceur saturé et insaturé, respectivement. Les lipides-DCPU sont donc effectivement capables de lier le PSII CC lorsqu'ils sont solubilisés dans une solution micellaire de détergent.

L'AFM et le SNOM sont deux techniques permettant d'observer la surface de nos échantillons. Les mesures en AFM et SNOM ont été faites en utilisant les mêmes conditions expérimentales que pour les essais de cristallisation en microscopie électronique, excepté que les puits devaient être légèrement plus gros pour les lamelles de verre silanisées que pour les grilles à microscopie électronique. Grâce à l'AFM, il nous a été possible d'observer de gros domaines de protéines. Cependant, ces domaines sont d'une épaisseur variant entre 20 et 30 nm, ce qui est de l'ordre de grandeur des dimensions d'un dimère de PSII CC. En se basant sur des modèles de PSII publiés (Barber et Kühlbrandt, 1999; Hankamer *et al.*, 1999; Nield *et al.*, 2000), nous suggérons un modèle pour l'organisation du PSII CC lié aux lipides-DCPU. La figure 3.1 schématise comment les dimères PSII CC liés aux lipides-DCPU pourraient être organisés pour donner une épaisseur de l'ordre de 20 à 30 nm. Par ailleurs, l'observation de ces échantillons en SNOM nous a permis de

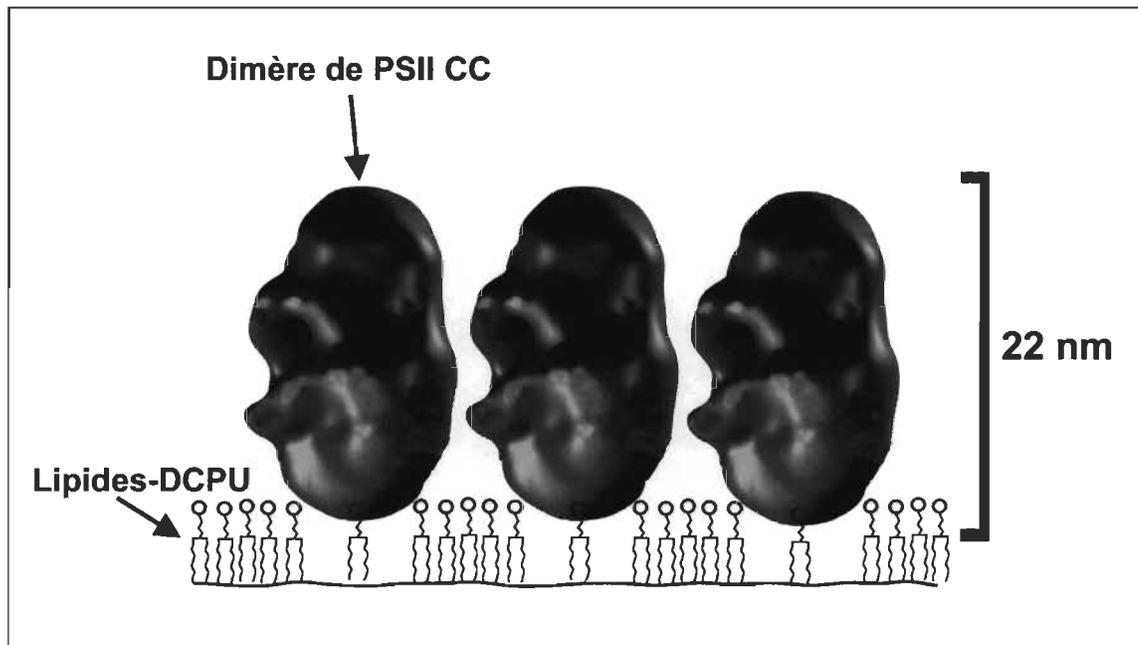


Figure 3.1. Modèle de la liaison du PSII CC aux lipides-DCPU transférés sur un substrat solide. Étant donné qu'il s'agit d'un dimère, deux sites Q_B sont présents aux extrémités du PSII (en haut et en bas du PSII sur cette figure). L'épaisseur du film de PSII CC lié aux lipides-DCPU est en accord avec les épaisseurs mesurées par AFM. Le modèle et les dimensions du PSII CC utilisés sont ceux obtenus par Nield et ses collaborateurs (2000).

confirmer que ces domaines étaient composés de PSII CC. En effet, en utilisant une lumière d'excitation de 458 nm et un filtre passe-haut à 515 nm, la fluorescence émise provenant de ces domaines est due à la chlorophylle contenue dans le PSII CC. En utilisant un lipide autre que les lipides-DCPU, comme du DPPC, aucune présence de PSII CC n'a été observée à la surface des échantillons. Les résultats obtenus en AFM et en SNOM suggèrent donc que les lipides-DCPU sont capables de lier le PSII CC lorsqu'ils sont en monocouche. Cependant, aucun domaine de protéine ne présentait une organisation ordonnée.

Tout au long de ce projet de recherche, des essais systématiques de cristallisation du PSII CC en deux dimensions ont été tentés en utilisant les lipides-DCPU. Comme la cristallogénèse est un domaine où, dans la grande majorité des cas, les conditions de cristallisation sont déterminées de façon empirique, les premiers essais ont été basés sur les conditions expérimentales de protéines ayant déjà été cristallisées. Donc, au moment du début du projet de recherche, pas plus d'une vingtaine de protéines avait été cristallisées en deux dimensions en utilisant des lipides fonctionnalisés (Brisson *et al.*, 1999). Ces protéines étaient toutes solubles, autrement dit, aucune protéine membranaire n'avait été cristallisée par cette méthode. La cristallisation s'est avérée infructueuse malgré la variation systématique des paramètres expérimentaux, tels qu'observé en microscopie électronique.

Toutefois, même si des cristaux n'étaient pas observés, les échantillons présentait un patron qui ressemblait à des protéines disposées de façon aléatoire à la surface du film lipidique. Cependant, nous ne pouvions être absolument certains d'être en présence de protéines. Ceci est dû à la résolution de la microscopie électronique. En effet, bien que la résolution en x et y soit très grande en microscopie électronique, la résolution en z est beaucoup moins bonne. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'utiliser deux autres méthodes nous permettant d'identifier le PSII CC à la surface du film lipidique.

Quoique les lipides-DCPU peuvent lier le PSII CC, les essais de cristallisation se sont toujours avérés infructueux. L'approche utilisée pour la cristallisation en deux dimensions a donc été révisée suite à la publication récente d'une nouvelle méthode appliquée aux protéines membranaires. Cette méthode sera discutée dans la section 3.3.

3.2 Comparaison entre les résultats obtenus en AFM et ceux publiés précédemment

D'une façon assez surprenante, même si le PSII est étudié depuis longtemps, très peu d'études par microscopie en champ proche ont été effectuées avec ce complexe protéique. Essentiellement, les seuls travaux publiés sont ceux de Lukins et ses collaborateurs (1998), Seibert (1995), ainsi que de Shao et ses collaborateurs (1997).

Tout d'abord, la première utilisation de la microscopie en champ proche par Seibert (1995), a été effectué en observant des répliqués de PSII recouverts de platine. Ainsi, tout détail structural interne est perdu dû au recouvrement de platine par cette méthode. Aucune information quant à l'arrangement des protéines ainsi qu'à l'état d'oligomérisation n'as pu être fourni par cette méthode. Ces données ne peuvent donc pas être comparées aux nôtres.

Ensuite, Lukins et Oates (1998) ont utilisé la microscopie à effet tunnel (scanning tunneling microscopy, STM) pour obtenir les premières images de particules isolées de PSII. Le STM a rarement été utilisé pour des spécimens biologiques (Engel, 1991). La plupart des matériaux biologiques sont considérés comme étant des isolants étant donné leur faible conductivité et peuvent donc générer de trop faibles courants tunnel. L'utilisation du STM avec du matériel biologique est donc très difficile de par la faible conductance, la « malléabilité » et la « mobilité » des spécimens biologiques en plus du choix limité du substrat adéquat pour favoriser l'interaction avec l'échantillon. Pour ces raisons, les modes « courant constant » et « hauteur constante » qui sont utilisés de façon standard ne permettent pas de produire des images de protéines interprétables en STM. Lukins et Oates (1998) ont utilisé un mode appelé « hauteur quasi-constante », où un asservissement permet à la pointe, lorsqu'elle rencontre un point d'élévation topographique, une rétractation de la pointe. Ce mode de détection a permis de démontrer que la microscopie à effet tunnel pouvait être utilisée afin d'imager une simple molécule de PSII.

De surcroît, il est intéressant de noter que la composition en sous-unité du complexe étudié est presque identique à celle que nous avons utilisée. En effet, le complexe que nous avons purifié comprenait les mêmes sous-unités que pour les travaux de Lukins et Oates (1998), à l'exception des protéines CP24, CP26 et CP29, qui ne sont pas considérées comme faisant partie du PSII CC (Hankamer et Barber, 1997). Les résultats de microscopie à effet tunnel permet d'imager la surface avec une grande résolution (de 1 à 2 nm). Toutefois, les auteurs se basent essentiellement sur les résultats de microscopie électronique publiés précédemment dans de nombreux travaux, afin de localiser les sous-unités à l'intérieur du complexe. Bien que ce travail démontre la faisabilité de la technique, celle-ci est difficilement utilisable afin de déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine. La complexité de la technique rend beaucoup plus long et difficile l'acquisition d'un grand nombre d'images, réduisant par le fait même la qualité du modèle calculé, comparativement aux techniques utilisés en microscopie électronique. Cependant, même si la composition en sous-unités est différente de la plupart des autres résultats publiés, la taille et les dimensions du complexe PSII étudié par Lukins et Oates (1998) sont en accord avec les résultats en microscopie électronique. En effet, le dimère du complexe PSII mesuré par STM fait 23.9 par 14.4 nm. De plus, ces dimensions sont cohérentes avec l'épaisseur des films que nous avons observés en AFM, ce qui suggère encore une fois que les lipides-DCPU lient des dimères de PSII. Une lacune importante de ce type de mesure est qu'une valeur absolue de

l'épaisseur ne peut être mesurée, seul le courant tunnel mesuré donne une idée relative de l'épaisseur dans l'image STM.

Nos résultats en AFM et SNOM se comparent difficilement avec ce type de mesure. D'une part, aucune orientation du complexe PSII n'est privilégiée dans les mesures de STM puisque le PSII est étalé sur la surface du mica alors que, dans notre cas, les lipides-DCPU devraient permettre aux molécules de PSII CC d'adopter une orientation privilégiée par l'ancrage du DCPU au site Q_B . De plus, puisque nous nous intéressons à l'arrangement du PSII en relation avec une monocouche de lipide-DCPU, l'AFM et le SNOM nous a permis de mesurer l'épaisseur des complexes protéiques, contrairement au STM.

Comme mentionné dans le chapitre 2, Shao et ses collaborateurs (1997) ont utilisé le mode intermittent (ou le « tapping mode ») en AFM pour obtenir des images de membranes de PSII étalées sur du mica. L'inconvénient de ce mode de détection est que la pointe entre en contact, bien que pour un court laps de temps, avec l'échantillon. En utilisant la force la plus faible possible en mode intermittent, c'est-à-dire de 0.3 nN, la topographie peut ressembler à celle observée en mode non-contact (voir chapitre 2). Cependant, à une force de 5 nN, Shao et ses collaborateurs (1997) observent une cavité à l'intérieur des particules de PSII. À prime à bord, avec une telle force appliquée sur l'échantillon, il ne serait pas surprenant de dénaturer le PSII. En effet, il est bien connu que l'utilisation d'une force plus grande que 2 nN en mode intermittent cause des dommages

aux échantillons biologiques (Grandbois *et al.*, 1998; Muller *et al.*; 2000, Yip *et al.*, 1998). Cette cavité ne serait donc pas présente dans le PSII mais bel et bien induite par la pointe d'AFM. Deuxièmement, il est tout à fait étrange de voir que les cavités créées dans les particules soient aussi grandes et irrégulières. Bien qu'aucune échelle d'épaisseur en Z ne soit présentée avec les images AFM, étant donné que les cavités sont de couleur très foncée, les résultats de Shao et ses collaborateurs (1997) suggèrent qu'une grande cavité traverse de part et d'autre le PSII. Ces cavités possèdent un diamètre variant de 5 à 30 nm. On peut donc conclure que ce type de mesure n'est pas du tout représentatif de la topographie du PSII puisque, selon le type de préparation du PSII que Shao et ses collaborateurs (1997) ont utilisé, on s'attend à ce que les particules atteignent un diamètre maximal de 19 nm (Holzenburg *et al.*, 1993). Il est donc incohérent que la cavité puisse parfois être plus grande que le PSII lui-même. De plus, Shao et ses collaborateurs (1997) ne font référence qu'au travail de Holzenburg et ses collaborateurs (1993) et à aucun autre modèle pour comparer le type structure observée, malgré la multitude de modèles disponibles (voir chapitre 1). Il est important de mentionner que seul le modèle proposé de Holzenburg et ses collaborateurs (1993 et 1996) montre une cavité grande de 2 nm de diamètre. L'ordre de grandeur de la cavité mesurée par Shao et ses collaborateurs (1997) par AFM n'est donc pas du tout du même ordre de grandeur de celle mesurée par Holzenburg et ses collaborateurs (1993).

3.3 Développements récents en cristallisation des protéines membranaires en deux dimensions

3.3.1 Cristallisation par la méthode impliquant les Biobeads

La méthode de cristallisation en deux dimensions par l'utilisation de lipides fonctionnalisés s'est avérée remarquablement efficace pour cristalliser différentes macromolécules et permettre de fournir d'importantes informations structurales (Blankenburg *et al.*, 1989; Celia *et al.*, 1994; Ellis *et al.*, 1997; Mosser *et al.*, 1991; Ribi *et al.*, 1988). Toutefois, jusqu'à tout récemment, aucune protéine membranaire n'a été cristallisée en utilisant cette stratégie, et la question de savoir si cette méthode est applicable à ce groupe de protéines est restée sans réponse. Le facteur qui complique la cristallisation des protéines membranaires par cette méthode est la présence inévitable de détergent avec la protéine membranaire purifiée. Celui-ci peut désagréger la monocouche de lipides fonctionnalisés et empêcher la cristallisation à l'interface. Les récents travaux de Rigaud et ses collaborateurs (1997) ainsi que de Levy et ses collaborateurs (1999) ont permis d'étendre l'approche de cristallisation à l'aide de lipides fonctionnalisés en développant un protocole expérimental prévenant la solubilisation de la monocouche par le détergent. Ce protocole est basé sur une première étape de liaison des protéines incorporées

dans des micelles à la monocouche de lipides fonctionnalisés, suivie par une étape de reconstitution dans une bicouche induite par le retrait graduel du détergent des micelles. La faisabilité de cette méthode a été démontrée par la production de cristaux bi-dimensionnels de deux protéines membranaires, le FhuA, un récepteur de haute affinité de la membrane externe de *Escherichia coli* et la F_0F_1 -ATP, une ATP synthase de la bactérie thermophile *Bacillus PS3* (Levy *et al.*, 1999).

D'un point de vue pratique, la première étape consiste à étaler le lipide fonctionnalisé à la surface d'un tampon contenu dans un puits en teflon. La figure 3.2 représente un puits utilisé pour ces essais de cristallisation. La figure 3.3, schématise les étapes du mécanisme de cristallisation. Le lipide fonctionnalisé peut être utilisé pur ou, dans certaines occasions, dilué avec un autre lipide servant de matrice. Les critères du choix de la matrice restent cependant assez empiriques (Brisson *et al.*, 1999; Brisson *et al.*, 1994b; Lebeau *et al.*, 1992; Nuss *et al.*, 1999). Ensuite, une solution micellaire est injectée dans la sous-phase par un orifice (figure 3.2). Cette solution micellaire est composée de PSII CC et de son détergent de solubilisation ainsi que d'un lipide connu comme étant compatible avec le PSII CC(MGDG). Après un certain temps d'incubation, les Biobeads sont injectés dans la sous-phase afin d'adsorber le détergent, ce qui permet d'induire la cristallisation de la protéine. Les adsorbants Biobeads sont des billes poreuses faites d'un polymère

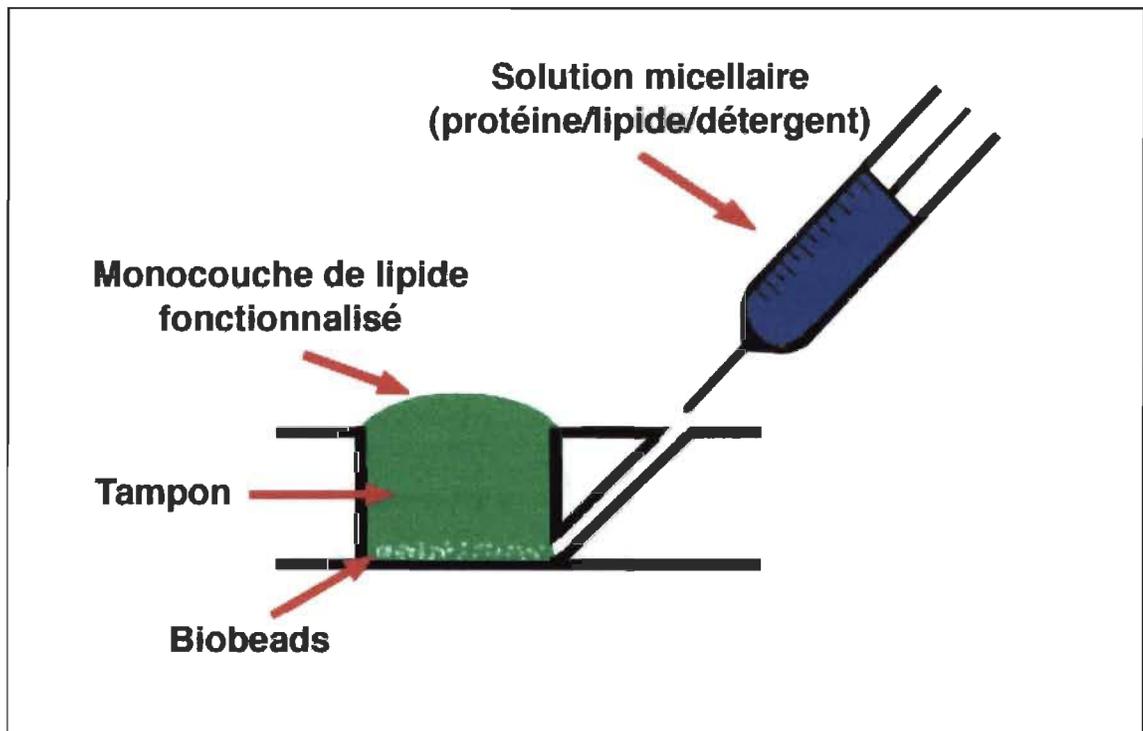


Figure 3.2. Représentation d'un puits en teflon utilisé lors des essais de cristallisation avec les Biobeads. Le diamètre du puits est de 4 mm et la profondeur est de 7 mm. Un orifice de diamètre de 2 mm permet l'injection de matériel au fond du puits sans endommager la monocouche en surface. Un grand nombre de puits peuvent être fabriqués sur une plaque de teflon et l'incubation se fait dans une chambre humide.

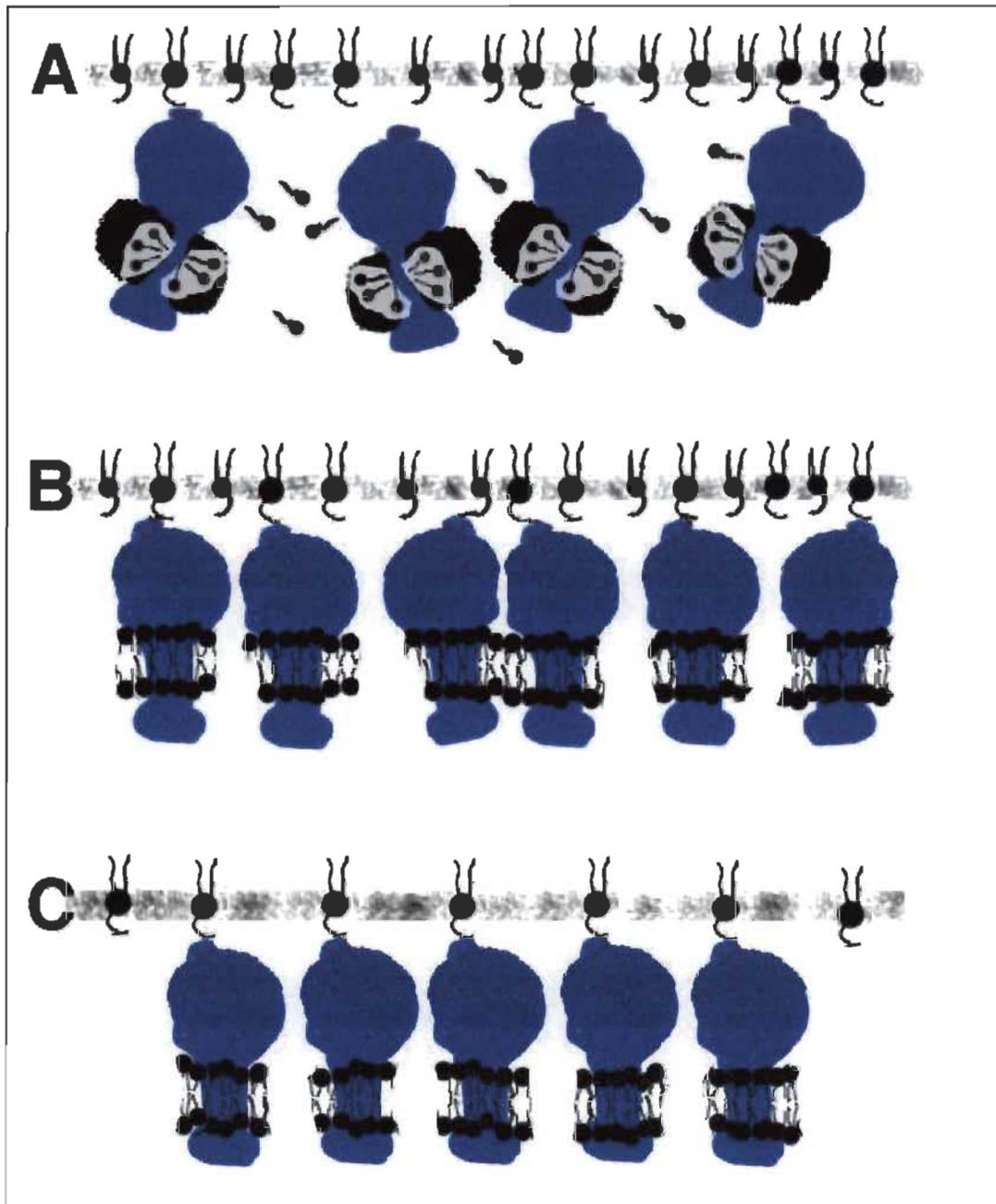


Figure 3.3. Illustration du processus de cristallisation en trois étapes. **A)** Les micelles de protéine-lipide-détergent injectées dans la sous-phase se lient aux lipides fonctionnalisés présents à l'interface air-eau. **B)** Reconstitution d'une bicouche lipidique autour de la protéine fixée au cours du processus d'élimination du détergent par les Biobeads. **C)** Diffusion et cristallisation des complexes protéiques (adapté de Lévy *et al.*, 1999).

(polystyrène divinylbenzène) possédant une masse moléculaire d'environ, au maximum, 2000 Da. Ces billes présentent une aire très grande d'environ 300 m²/g avec des pores de diamètre d'environ 90 Å. Dissoutes dans l'eau ou d'autres solvants organiques, les billes servent à adsorber des molécules non-polaires ou des surfactants à partir de solutions aqueuses.

Ce mécanisme de cristallisation impliquant l'élimination du détergent par les Biobeads a récemment été proposé par Lévy et ses collaborateurs (1999). Ce mécanisme suggère que les micelles de protéine-lipide-détergent se lient rapidement à la monocouche de lipides fonctionnalisés (voir figure 3.3A). Les prochaines étapes de la cristallogénèse résultent de l'élimination du détergent des micelles de protéines liées à la surface. Lévy et ses collaborateurs (1999) suggèrent que l'élimination du détergent permet la reconstitution d'une bicouche de lipides autour de la protéine (figure 3.3B), conduisant ainsi à des contacts protéine-protéine, ce qui favorise la cristallisation 2D (figure 3.3C).

3.4 Perspectives de recherche

C'est suite à la parution de l'article de Lévy et ses collaborateurs (1999), ainsi qu'aux nombreux essais systématiques infructueux de cristallisation du PSII CC par la

technique couramment utilisée pour les protéines solubles, que nous avons décidé de changer notre approche pour cristalliser le PSII CC. La méthode de Lévy et ses collaborateurs (1999), présentée à la section 3.2.1, a été adaptée à des essais de cristallisation du PSII CC. Les résultats de ces essais ont été présentés au Chapitre 2. La présente section traitera de certains aspects qui n'ont pu être expliqués en détail dans le Chapitre 2 à propos de certains paramètres expérimentaux.

Le lipide choisi pour constituer la solution micellaire de PSII CC est le MGDG. La raison pour laquelle il a été choisi est que ce lipide naturel constitue environ 50% de la composition en lipides de la membrane thylacoïde (Siegenthaler *et al.*, 1981). Le MGDG semble alors un lipide de choix pour la formation de micelles mixtes avec le PSII CC. Le ratio lipide:protéine est aussi un facteur critique parmi les paramètres expérimentaux. En effet, Lévy et ses collaborateurs (1999) ont observé que la cristallisation ne survient que dans une marge de rapport lipide:protéine précise, de 0.5 à 0.75 et de 0.75 à 1.25 (p/p) pour les protéines FhuA et TF₀F₁, respectivement. Pour les essais préliminaires, le rapport lipide MGDG:PSII CC a été maintenu à 1.0 (p/p). Par contre, il s'avèrerait important de faire varier ce rapport dans les essais de cristallisation futurs. Un autre paramètre important en cristallogénèse en deux dimensions est le temps d'incubation. En cristallisation conventionnelle, c'est-à-dire en trois-dimensions, le temps d'incubation est un paramètre généralement moins critique, et plus ce temps d'incubation est long, plus les cristaux seront

de grande taille. Par contre, en cristallisation en deux dimensions, il faut tenir compte de la stabilité de la monocouche de lipide. Dans le cas du PSII CC, les premiers essais de cristallisation utilisaient des temps courts, en deçà de 4 heures, afin de maximiser les chances de préserver le PSII CC dans son état natif et aussi de préserver la monocouche de lipide DPCU intacte.

Les résultats préliminaires, qui ont été présentés au chapitre 2, démontrent le grand potentiel de la méthode de cristallisation du PSII CC en utilisant les Biobeads et les lipides-DPCU. En effet, la microscopie électronique nous a permis d'observer des structures de protéines présentant un patron ordonné (voir figures 2.8 et 3.4). Ce point de départ pourra permettre de faciliter l'exploration des paramètres expérimentaux et conduire plus rapidement à la formation de cristaux. Cette approche semble donc posséder un potentiel important pour la cristallisation du PSII CC et la détermination éventuelle de sa structure.

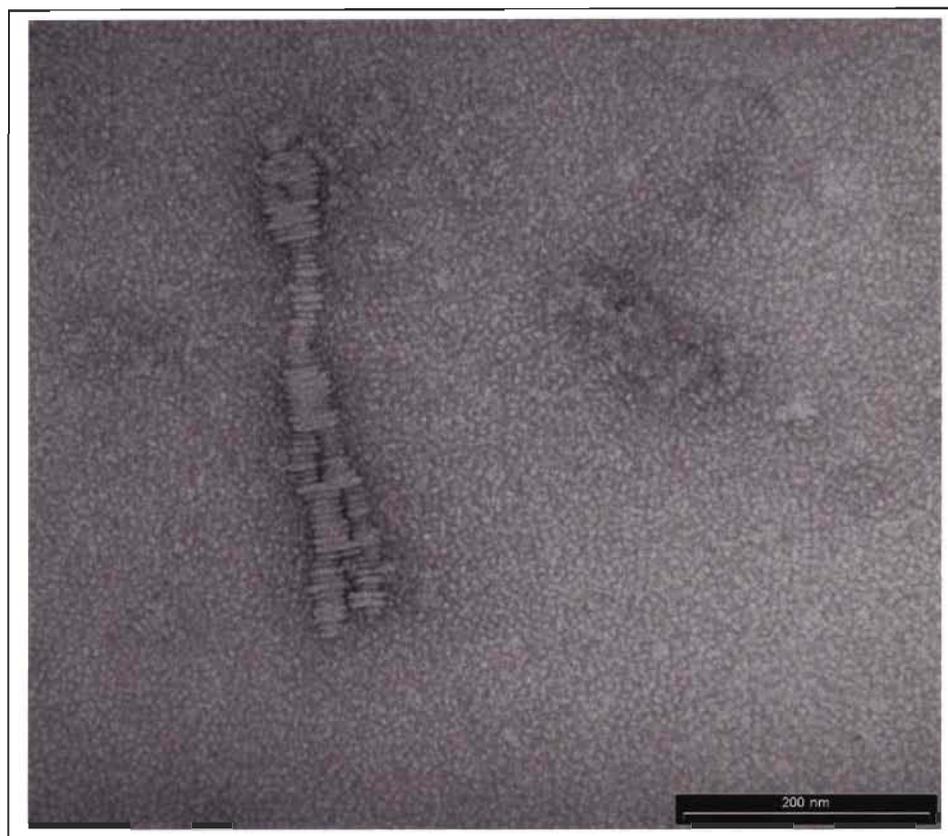


Figure 3.4. Micrographies électroniques supplémentaires de structures organisées de PSII CC. La méthode impliquant les Biobeads a été utilisée dans les deux cas.

4 Références

Albrecht, T.R., Dovek, M.M., Lang, C.A., Grütter, P., Quate, C.F., Kuan, S.W.J., Frank, C.W. et Pease, R.F.W. Imaging and modification of polymers by scanning tunneling and atomic force microscopy. J. Appl. Phys. 1988. 64:1178-1184.

Andersson, B., Anderson, J.M. et Ryrie, I.J. Transbilayer organization of the chlorophyll-proteins of spinach thylakoids. Eur. J. Biochem. 1982. 123:465-72.

Babcock, G.T. Proteins, radicals, isotopes, and mutants in photosynthetic oxygen evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1993. 90:10893-5.

Babcock, G.T., Widger, W.R., Cramer, W.A., Oertling, W.A. et Metz, J.G. Axial ligands of chloroplast cytochrome b-559: Identification and requirement for a heme-cross-linked polypeptide structure. Biochemistry 1985. 24:3638-45.

Barbato, R., Friso, G., Rigoni, F., Dalla Vecchia, F. et Giacometti, G.M. Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids. J. Cell. Biol. 1992a. 119:325-35.

Barbato, R., Frizzo, A., Friso, G., Rigoni, F. et Giacometti, G.M. Photoinduced degradation of the d1 protein in isolated thylakoids and various photosystem II particles after donor-side inactivations. Detection of a c-terminal 16 kda fragment. FEBS Lett. 1992b. 304:136-40.

Barber, J. et Kühlbrandt, W. Photosystem II. Curr. Opin. Struct. Biol. 1999. 9:469-75.

Barber, J., Nield, J., Morris, E.P., Zheleva, D. et Hankamer, B. The structure, function and dynamics of photosystem two. Physiol. Plant 1997. 100:817-827.

Binning, G. et Quate, C.F. Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett. 1986. 56:930-933.

Blankenburg, R., Meller, P., Ringsdorf, H. et Salesse, C. Interaction between biotin lipids and strptavidin in monolayers: Formation of oriented two-dimensional protein domains induced by surface recognition. Biochemistry 1989. 28:8214-8221.

Boekema, E.J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A.F., Barber, J. et Rogner, M. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995. 92:175-179.

Boekema, E.J., van Roon, H. et Dekker, J.P. Specific association of photosystem II and light-harvesting complex II in partially solubilized photosystem II membranes. FEBS Lett. 1998. 424:95-9.

Bricker, T.M. The structure and function of cpa-1 and cpa-2 in photosystem II. Photosynth. Res. 1990. 24:1-13.

Brisson, A., Bergsma-Schutter, W., Oling, F., Lambert, O. et Reviakine, I. Two-dimensional crystallization of proteins on lipid monolayers at the air-water interface and transfer to an electron microscopy grid. J. Cryst. Growth 1999. 196:456-471.

Brisson, A., Olofsson, A., Ringler, P., Schmutz, M. et Stoylova, S. Two-dimensional crystallisation of proteins on planar lipid films and structure determination by electron crystallography. Biol. Cell. 1994a. 80:221-228.

Brisson, A., Olofsson, A., Ringler, P., Schmutz, M. et Stoylova, S. Two-dimensional crystallization of proteins on planar lipid films and structure determination by electron crystallography. Biol. Cell. 1994b. 80:221-8.

Celia, H., Hoermann, L., Schultz, P., Lebeau, L., Mallouh, V., Wigley, D.B., Wang, J.C. et Oudet, P. Three-dimensional model of escherichia coli β -subunit crystallized in two-dimensions on novobiocin-linked phospholipid films. J. Mol. Biol. 1994. 236:618-628.

Chiu, W., Avila-Sakar, A.J. et Schmidt, M.F. Electron crystallography of macromolecular periodic arrays on phospholipid monolayers. Adv. Biophys. 1997. 34:161-172.

Courjon, D., Sarayedine, K. et Spajer, M. Scanning tunnelling optical microscopy. Opt. Commun. 1989. 71:15-28.

Davies, A., Schertler, G.F., Gowen, B.E. et Saibil, H.R. Projection structure of an invertebrate rhodopsin. J. Struct. Biol. 1996. 117:36-44.

Debus, R.J. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta 1992. 1102:269-352.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. et Michel, H. 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 *Rhodospirillum rubrum*. J. Mol. Biol. 1984. 180:385-98.

Ellis, M.J., Hebert, H. et Thelestam, M. Staphylococcus aureus alpha-toxin: Characterization of protein/lipid interactions, 2D crystallization on lipids monolayers, and 3D structure. J. Struct. Biol. 1997. 118:178-188.

Emerson, R. et Rabinowitch, E. Red drop and role of auxiliary pigments in photosynthesis. Plant Physiol. 1960. 35: 477-485.

Engel, A. Biological applications of scanning probe microscopes. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 1991. 20:79-108.

Ford, R.C., Rosenberg, M.F., Shepherd, F.H., McPhie, P. et Holzenburg, A. Photosystem II 3-D structure and the role of the extrinsic subunits in photosynthetic oxygen evolution. Micron 1995. 26:133-140.

Fromme, P. Structure and function of photosystem I. Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. 6:473-84.

Grandbois, M., Clausen-Schaumann, H. et Gaub, H. Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2. Biophys. J. 1998. 74:2398-404.

Hankamer, B. et Barber, J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. 48:641-671.

Hankamer, B., Morris, E.P. et Barber, J. Revealing the structure of the oxygen-evolving core dimer of photosystem II by cryoelectron crystallography. Nat. Struct. Biol. 1999. 6:560-4.

Hansma, H.G., Kim, K.J., Laney, D.E., Garcia, R.A., Argaman, M., Allen, M.J. et Parsons, S.M. Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review. J. Struct. Biol. 1997. 119:99-108.

Hansma, P.K., Elings, V.B., Marti, O. et Bracker, C.E. Scanning tunnelling microscopy and atomic force microscopy: Application to biology and technology. Science 1988. 242:209-16.

Hansson, O. et Wydrzynski, T. Current perceptions of photosystem II. Photosynth. Res. 1990. 23:131-162.

Henderson, R. The potential and limitations of neutrons, electrons and x-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. Q. Rev. Biophys. 1995. 28:171-93.

Hill, R. et Scarisbrick, R. Production of oxygen by illuminated chloroplasts. Nature 1940. 146:61-62.

Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher, K. et Schindler, H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996. 93:3477-81.

Holzenburg, A., Bewley, M.C., Wilson, F.H., Nicholson, W.V. et Ford, R.C. Three-dimensional structure of photosystem II. Nature 1993. 363:470-472.

Holzenburg, A., Flint, T.D., Shepherd, F.H. et Ford, R.C. Photosystem II: Mapping the location of the oxygen evolution-enhancing subunits by electron microscopy. Micron 1996. 27:121-129.

Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J., Scrimgeour, K. et Kalt, W., *La photosynthèse*, dans *Principes de biochimie*, Patterson, N. Editeur, 1993, De Boeck: Bruxelles.

Isaacson, M., Betzig, E., Harootunian, A. et Lewis, A. Scanning optical microscopy at $\lambda/10$ resolution using near-field imaging methods. Science 1986. 483:448-456.

Israellachvili, J.N. et Adam, G.J. Chemical Soc. Faraday Trans. 1978. 174:975.

Israellachvili, J.N. et Tabor, D. Progress in Surface and Membrane Science 1973. 7:

Kamen, D.M., From Cyclotrons to Cytochromes : Essays in molecular biology and chemistry, Kaplan, N.O. et Robinson, A., Editeurs. 1982, New York: Academic Press. p887.

Kornberg, R.D. et Darst, S.A. Two-dimensional crystals of proteins on lipid layers. Curr. Opin. Struct. Biol. 1991. 1:642-646.

Lebeau, L., Olland, S., Oudet, P. et Mioskowski, C. Rational design and synthesis of phospholipids for the two-dimensional crystallization of DNA gyrase, a key element in chromosome organization. Chem. Phys. Lipids 1992. 62:93-103.

Lee, G.U., Chrisey, L.A. et Colton, R.J. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. Science 1994. 266:771-3.

Levy, D., Mosser, G., Lambert, O., Moeck, G.S., Bald, D. et Rigaud, J.L. Two-dimensional crystallization on lipid layer: A successful approach for membrane proteins. J. Struct. Biol. 1999. 127:44-52.

Lukins, P.B. et Oates, T. Single-molecule high-resolution structure and electron conduction of photosystem II from scanning tunneling microscopy and spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta 1998. 1409:1-11.

Mayanagi, K., Ishikawa, T., Toyoshima, C., Inoue, Y. et Nakazato, K. Three-dimensional electron microscopy of the photosystem II core complex. J. Struct. Biol. 1998. 123:211-24.

Meixner, A.J. et Knepe, H. Scanning near-field optical microscopy in cell biology and microbiology. Cell. Mol. Biol. 1998. 44:673-688.

Meixner, A.J., Zeisel, D., Bopp, M.A. et Tarrach, G. Super-resolution imaging and detection of fluorescence from single molecules by scanning near-field optical microscopy. Optical Engineering 1995. 34:2314-2332.

Michel, H., Hunt, D.F., Shabanowitz, J. et Bennett, J. Tandem mass spectrometry reveals that three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain n-acetyl-o-phosphothreonine at their nh₂ termini. J. Biol. Chem. 1988. 263:1123-30.

Miller, K.R. et Cushman, R.A. A chloroplast membrane lacking photosystem II. Biochim. Biophys. Acta 1978. 546:481-489.

Moller, C., Allen, M., Elings, V., Engel, A. et Muller, D.J. Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. Biophys. J. 1999. 77:1150-8.

Morita, S., Fujisawa, S., Kishi, E., Ohta, M., Ueyama, H. et Sugawara, Y. Contact and non-contact mode imaging by atomic force microscopy. Thin Solid Films 1996. 273:138-142.

Mosser, G., Ravanat, C., Freyssinet, J.M. et Brisson, A. Sub-domain structure of lipid-bound annexin v resolved by electron image analysis. J. Mol. Biol. 1991. 217:241-245.

Muller, D.J., Heymann, J.B., Oesterhelt, F., Moller, C., Gaub, H., Buldt, G. et Engel, A. Atomic force microscopy of native purple membrane. Biochim. Biophys. Acta 2000. 1460:27-38.

Muramatsu, H., Homma, K., Chiba, N., Yamamoto, N. et Egawa, A. Dynamic etching method for fabricating a variety of tip shapes in the optical fibre probe of a scanning near-field optical microscope. J. Microsc. 1999. 194:383-387.

Nicholson, W.V., Ford, R.C. et Holzenburg, A. A current assessment of photosystem II structure. Biosci. Rep. 1996. 16:159-87.

Nield, J., Orlova, E.V., Morris, E.P., Gowen, B., van Heel, M. et Barber, J. 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. Nat. Struct. Biol. 2000. 7:44-7.

Nixon, P.J., Chisholm, D.A. et Diner, B.A., *Plant protein engineering*, Shewry, P.R. et Gutheridge, S., Éditeurs. Vol. 2. 1992, Cambridge: Cambridge University Press. 93-141.

Nugent, J.H. Oxygenic photosynthesis. Electron transfer in photosystem i and photosystem II. Eur. J. Biochem. 1996. 237:519-31.

Nuss, S., Mioskowski, C. et Lebeau, L. Synthesis of new fluidity-enhanced amphiphilic compounds for soluble protein two-dimensional crystallization purpose. Chem. Phys. Lipids 1999. 103:21-35.

Odom, W.R. et Bricker, T.M. Interaction of cpa-1 with the manganese-stabilizing protein of photosystem II: Identification of domains cross-linked by 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide. Biochemistry 1992. 31:5616-20.

Packham, N.K. Is the 9 kda thylakoid membrane phosphoprotein functionally and structurally analogous to the 'H' subunit of bacterial reaction centres? FEBS Lett. 1988. 231:284-90.

Radmacher, M., Fritz, M. et Hansma, P.K. Imaging soft samples with the atomic force microscope: Gelatin in water and propanol. Biophys. J. 1995. 69:264-70.

Rhee, K.H., Morris, E.P., Barber, J. et Kühlbrandt, W. Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. Nature 1998. 396:283-6.

Ribi, H.O., Ludwig, D.S., Mercer, K.L., Schoolnik, G.K. et Kornberg, R.D. Three-dimensional structure of cholera toxin penetrating a lipid membrane. Science 1988. 239:1272-1276.

Rigaud, J.L., Mosser, G., Lacapere, J.J., Olofsson, A., Levy, D. et Ranck, J.L. Bio-beads: An efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. J. Struct. Biol. 1997. 118:226-35.

Rogner, M., Boekema, E.J. et Barber, J. How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. Trends Biochem. Sci. 1996. 21:44-9.

Ruben, S., Randall, M., Kamen, M.D. et Hyde, J.L. Heavy oxygen (^{18}O) as a tracer in the study of photosynthesis. J. Am. Chem. Soc. 1941. 63:877-878

Rutherford, A.W. Photosystem II, the water-splitting enzyme. Trends Biochem Sci 1989. 14:227-32.

Schabert, F.A. et Engel, A. Reproducible acquisition of escherichia coli porin surface topographs by atomic force microscopy. Biophys. J. 1994. 67:2394-403.

Seibert, M. Reflections on the nature and function of the photosystem II reaction centre. Aust. J. Plant Physiol. 1995. 22:161-166.

Shao, L., Tao, N.J. et Leblanc, R.M. Probing the microelastic properties of nanobiological particles with tapping mode atomic force microscopy. Chem. Phys. Lett. 1997. 273:37-41.

Siegenthaler, P.-A., Rawlyer, A. et Henry, L.E.A., A new type of correlation between changes in lipid composition and loss of electron transport activities during aging in vitro, dans Photosynthesis II, Akoyunoglou, G. Editeur, 1981, Balaban International Science Services: Philadelphia, Pa. p. 167-174.

Staehelein, L.A., Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes, dans Photosynthesis III, Staehelein, L.A. et Arntzen, C.J. Editeur, 1986, Springer: Berlin. p. 1-84.

Stöckle, R., Fokas, C., Deckert, V., Zenobi, R., Sick, B., Hecht, B. et Wild, U.P. High-quality near-field optical probes by tube etching. Appl. Phys. Lett. 1999. 75:160-162.

Subramaniam, V., Kirsch, A.K. et Jovin, T.M. Cell biological applications of scanning near-field optical microscopy (SNOM). Cell. Mol. Biol. 1998. 44:689-700.

Tabor, D. et Winterton, R.H.S. Proc. Roy. Soc. 1969. A:451-466.

Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M. et Schertler, G.F. Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. Nature 1997. 389:203-6.

Vermaas, W.F.J. Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1993. 44:457-481.

Vermaas, W.F.J. Evolution of heliobacteria: Implications for photosynthetic reaction center complexes. Photosynth. Res. 1994. 41:285-294.

Vigoureux, J.M. et Courjon, D. Evanescent wave mixing on nonlinear surfaces. J. Mod. Opt. 1989. 36:1575-1580.

Vigoureux, J.M. et Courjon, D. Detection of non-radiative fields in light of the Heisenberg uncertainty principle and the rayleigh criterion. Appl. Opt. 1992. 31:3170-3177.

Vigoureux, J.M., Girard, C. et Courjon, D. General principles of scanning tunneling optical microscopy. Opt. Lett. 1989. 14:1039-1041.

Yip, C.M., Yip, C.C. et Ward, M.D. Direct force measurements of insulin monomer-monomer interactions. Biochemistry 1998. 37:5439-49.