

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
JUDITH GALLANT

SPECTROSCOPIE ET PROPRIÉTÉS INTERFACIALES DU PHOTOSYSTÈME II EN
FILM MONOMOLÉCULAIRE À L'INTERFACE AIR-EAU

DÉCEMBRE 1997

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.

RÉSUMÉ

Le photosystème II "core complex" (PS II CC) des membranes du chloroplaste est le plus petit complexe protéique apte à oxyder l'eau, produisant ainsi l'oxygène moléculaire. Ce complexe photosynthétique est composé de plusieurs polypeptides transmembranaires dont la structure secondaire est riche en hélices- α . Il contient également des pigments dont la chlorophylle *a*. La structure tridimensionnelle du PS II CC est, à ce jour, encore inconnue. Dans le but ultime de produire des cristaux bidimensionnels de PS II CC à l'interface air-eau, nous avons caractérisé les propriétés de surface et spectroscopiques de ce complexe en monocouche à l'interface air-eau. Plus particulièrement, nous avons étudié les isothermes de pression et de potentiel de surface, les spectres d'absorption, de fluorescence et de PM-IRRAS ("polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy"), la microscopie de fluorescence ainsi que la réflectivité des rayons-X du PS II CC étalé à l'interface air-eau.

Deux conditions expérimentales d'étalement du PS II CC à l'interface air-eau ont été étudiées. Ainsi, dans un premier temps, le PS II CC a été étalé à une pression de surface initiale de 5.7 mN/m et immédiatement comprimé à trois différentes vitesses de compression soit 10, 40 et 80 nm²/molécule·min. Puis, dans un second temps, le PS II CC a été étalé à une pression de surface de 0.6 mN/m, et la compression, aux trois mêmes vitesses, a été effectuée après une période d'incubation de 30 minutes.

L'incubation du PS II CC à faible pression de surface modifie toutes ses propriétés de

surface et ses caractéristiques spectroscopiques. En effet, nous avons démontré que ce complexe est dénaturé et forme des feuilletts- β lorsqu'il est étalé dans de telles conditions à l'interface air-eau. Ce type de structure secondaire est conservé tant que la pression de surface reste inférieure à 30 mN/m. Au-delà de cette valeur, le PS II CC subit une seconde modification de la structure qui génère de nouvelles hélices- α . Cependant, la quantité d'hélices- α produites est proportionnelle à la vitesse de compression. Nos résultats démontrent que la réduction de la température réduit considérablement la dénaturation du PS II CC incubé aux faibles pressions de surface.

Nos résultats montrent que lorsque le PS II CC est étalé à 5.7 mN/m et comprimé immédiatement après son étalement, il conserve toujours sa structure secondaire native. Lorsque la vitesse de compression est grande (80 nm²/molécule·min), il y a cependant formation d'agrégats de PS II CC qui peuvent être détectés à la fois par la spectroscopie d'absorption, par les isothermes de potentiel de surface ainsi que par la microscopie de fluorescence. Aussi, lorsque le PS II CC est comprimé trop lentement (10 nm²/molécule·min), il subit une légère dénaturation qui modifie seulement ses propriétés d'absorption. La vitesse de compression idéale permettant d'éviter la formation d'agrégats de PS II CC et de maintenir toutes ses propriétés spectroscopiques natives est de 40 nm²/molécule·min.

Par nos résultats en réflectivité des rayons-X, nous démontrons l'état monomoléculaire du PS II CC à l'interface air-eau. En effet, le film de PS II CC possède une épaisseur totale de $58 \pm 8 \text{ \AA}$, ce qui correspond à la dimension transmembranaire du PS II CC publiée dans la littérature.

REMERCIEMENTS

Cette thèse est l'aboutissement de nombreuses années de recherche. Mais elle représente le fruit du soutien constant de plusieurs personnes. Je prends ici quelques lignes pour souligner l'apport de chacun.

Je dois énormément de gratitude à mon directeur de recherche, Christian Salesses pour m'avoir accepté au sein de son équipe, malgré les péripéties et les nombreuses difficultés de mes premières années passées au doctorat. Si j'obtiens ce diplôme, c'est en premier lieu grâce à lui. Merci infiniment, Christian, pour ta confiance et ton soutien.

Je veux maintenant exprimer ma reconnaissance à de nombreux amis et collègues de travail, dont Michèle J., Sonya, Philippe B., Hugo, Maryse, Steff, qui tous, à tour de rôle et à leur façon, ont su m'aider et/ou m'encourager dans les moments difficiles. Certains parmi eux croiront qu'ils ont fait très peu. Vous ne pouvez pas connaître, mes amis, l'ampleur du soutien que votre présence à mes côtés a su m'apporter. Merci à tous.

À titre de collaborateurs, je voudrais remercier Dr. David Vaknin et Dr. Bernard Desbat qui ont enrichi cette thèse de leur savoir et de leur savoir-faire. L'étape la plus cruciale lorsqu'on travaille avec des échantillons biologiques est l'extraction. Pour obtenir des échantillons actifs, le matériel de départ se doit d'être de première qualité. À ce titre, je dois remercier Monsieur Réal Hamelin de m'avoir fourni les épinards les plus frais qu'on

puisse trouver au Québec.

Je me dois également de remercier Sacha Bonenfant et Prof. Michel Pézolet du CERSIM pour l'aide reçue lors des mesures infrarouge en ATR. Enfin, je désire remercier Prof. Robert Carpentier et Prof. Mario Fragata pour avoir bien voulu répondre à mes questions, m'avoir fait partager un peu de leurs connaissances et dans le cas du Prof. Carpentier, m'avoir permis d'utiliser son appareil de dégagement d'oxygène. Enfin, je désire remercier le CERSIM pour son soutien financier lors de ma participation au congrès LB8.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
CHAPITRES	
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Photosynthèse.....	1
1.2 Photosystème II.....	6
1.3 PS II CC.....	13
1.4 Propriétés spectroscopiques du PS II CC.....	15
1.4.1 Absorption.....	15
1.4.2 Fluorescence.....	20
1.4.3 Infrarouge.....	22
1.5 Cristallisation bidimensionnelle du PS II CC.....	23
1.6 Méthode des monocouches et cristallisation bidimensionnelle des protéines.....	24
1.7 Monocouches de protéines photosynthétiques.....	26
1.7.1 Rôle du détergent dans les propriétés de surface.....	27
1.7.2 Solubilité des protéines photosynthétiques dans la sous-phase.....	27
1.7.3 Dénaturation des protéines photosynthétiques à l'interface air-eau.....	30
1.7.4 Épaisseur et rugosité des films de protéines photosynthétiques et	

dimensions de ces complexes.....	31
1.7.5 Orientation des protéines photosynthétiques à l'interface air-eau.....	32
1.8 Objectifs spécifiques de ce travail de recherche.....	34
1.9 Références.....	38
2. SURFACE AND SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEX AT THE NITROGEN/WATER INTERFACE.....	48
2.1 Abstract.....	50
2.2 Introduction.....	51
2.3 Materials and methods.....	54
2.3.1 Photosystem II core complex isolation and purification.....	54
2.3.2 Photosystem II core complex characterization.....	54
2.3.3 Isotherm measurements of photosystem II core complex.....	56
2.3.4 Design of the instrument for <i>in situ</i> spectroscopic measurements at the air-water interface.....	57
2.3.5 Fluorescence microscopy.....	59
2.4 Results and discussion.....	61
2.4.1 Characterization of photosystem II core complex in solution	61
2.4.2 Conditions that maintain native characteristics of PS II CC in monolayers.....	62
2.4.2.1 Effect of compression speed on surface pressure isotherms of PS II CC.....	62
2.4.2.2 Effect of compression speed on surface pressure isotherms of DM.....	63
2.4.2.3 Effect of compression speed on PS II CC surface potential isotherms.....	64
2.4.2.4 Spectroscopic characteristics of intact PS II CC at the	

interface.....	65
2.4.2.5 Fluorescence microscopy of intact PS II CC monolayers.....	67
2.4.2.6 Molecular area of PS II CC in monolayers.....	68
2.4.3 Conditions that alter PS II CC structure in monolayers.....	70
2.4.3.1 Effect of compression speed on surface pressure and surface potential isotherms of PS II CC.....	70
2.4.3.2 Spectroscopic characteristics of PS II CC at the interface.....	71
2.4.3.3 Fluorescence microscopy of PS II CC at the interface.....	74
2.5 Conclusion.....	75
2.6 References.....	77
TABLE AND FIGURES.....	81
3. POLARIZATION MODULATED INFRARED SPECTROSCOPY AND X- RAY REFLECTIVITY OF PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEX AT THE GAS-WATER INTERFACE.....	91
3.1 Abstract.....	93
3.2 Introduction.....	94
3.3 Materials and methods.....	97
3.3.1 Purification and characterization of photosystem II core complex.....	97
3.3.2 Film Formation.....	98
3.3.3 ATR infrared spectroscopy.....	99
3.3.4 PM-IRRAS measurements.....	99
3.3.5 X-ray reflectivity measurements.....	100
3.4 Results and discussion.....	102
3.4.1 Infrared spectroscopy.....	102
3.4.2 PM-IRRAS.....	103
3.4.2.1 Compression speed has no effect on the structure of intact	

PS II CC.....	103
3.4.2.2 Determination of the α -helix angle relative to the interface normal.....	104
3.4.2.3 Evidence for the elimination of the excess detergent into the subphase.....	105
3.4.2.4 Surface pressure has no effect on the structure of intact PS II CC.....	105
3.4.2.5 Stability of the α -helix secondary structure.....	106
3.4.2.6 Effect of low surface pressure incubation on PS II CC structure.....	106
3.4.2.6.1 Formation of β -sheets.....	107
3.4.2.6.2 No effect of surface pressure and of compression speed on β -sheets under 30 mN/m.....	107
3.4.2.6.3 Formation of new α -helices at surface pressures higher than 30 mN/m.....	108
3.4.2.6.4 State of PS II CC immediately after spreading.....	110
3.4.2.7 Effect of low temperature on PS II CC.....	111
3.4.3 X-ray reflectivity.....	111
3.4.3.1 Monolayer vs bilayer.....	112
3.4.3.2 Surface roughness.....	113
3.4.3.3 Film thickness.....	114
3.5 Conclusion.....	118
3.6 References.....	120
FIGURES.....	126
4. CONCLUSION.....	137

4.1 Rôle du détergent.....	139
4.2 Conditions qui maintiennent l'intégrité du PS II CC.....	140
4.2.1 Effet de la vitesse de compression et de la pression de surface.....	140
4.2.2 Agrégation.....	142
4.2.3 Stabilité du film <i>versus</i> solubilité du PS II CC.....	143
4.2.4 Aire moléculaire.....	144
4.2.5 Orientation des hélices- α	144
4.2.6 Épaisseur et rugosité du film, orientation du PS II CC et état monomoléculaire.....	145
4.3 Conditions qui dénaturent le PS II CC.....	146
4.3.1 Dénaturation par l'incubation aux faibles pressions de surface.....	146
4.3.2 Agrégation.....	149
4.3.3 Effet de la réduction de la température.....	150
4.4 Conditions expérimentales idéales.....	150
4.5 Nouvelle avenue de recherche.....	151
4.6 Références.....	156
ANNEXE.....	158

LISTE DES ABRÉVIATIONS

33, 23 et 17 kDa.....	Polypeptides de régulation du dégagement d'oxygène du PS II
α -cyt b ₅₅₉	Sous-unité α du cytochrome b ₅₅₉ du centre réactionnel du PS II
β -cyt b ₅₅₉	Sous-unité β du cytochrome b ₅₅₉ du centre réactionnel du PS II
λ_A	Maximum d'absorption de la bande rouge du PS II
λ_F	Maximum de fluorescence du PS II
β -car.....	β -carotène
ΔV	Potentiel de surface
γ	Tension superficielle
π	Pression de surface
π_i	Pression de surface initiale à l'étalement
θ	Angle entre le faisceau du rayon-X avec la normale à l'interface
σ	Rugosité
σ_{CW}	Composante de la rugosité due aux vagues capillaires à l'interface air-eau
σ_I	Composante de la rugosité due aux molécules étalées à l'interface air-eau
A.....	Aire moléculaire
A ₀	Chlorophylle <i>a</i>
A ₁	Phylloquinone
ADP.....	Adénosine diphosphate
ATP.....	Adénosine triphosphate
ATR.....	Attenuated total reflection
b _{6f}	Cytochrome b _{6f}

C*	Cytochrome du centre réactionnel bactérien
CHAPS.....	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
Chl.....	Chlorophylle
CP29, CP26 et CP24.....	Antennes intermédiaires du PS II
CP47 et CP43.....	Antennes intrinsèques du PS II
Cyt.....	Cytochrome
D1 et D2.....	Polypeptides du centre réactionnel du PS II
DM.....	<i>n</i> -Dodécyl- β -D-maltoside
d_{TOT}	Épaisseur totale de films à l'interface air-eau
E_m	Potentiel standard
F_0 et F_1	Sous-unités de l'ATPase
Fd.....	Ferredoxine
$FeS_{X, A}$ et B.....	Centres 4Fe-4S
FNR.....	Ferredoxine-NADP oxydoréductase
FPLC.....	Fast protein liquid chromatography
H*	Polypeptide hydrophile du centre réactionnel bactérien
H.....	Polypeptide du PS II
I.....	Polypeptide du centre réactionnel du PS II
I_A	Intensité du maximum d'absorption de la bande rouge du PS II
I_F	Intensité du maximum de fluorescence du PS II
K.....	Polypeptide du PS II
L*	Polypeptide hydrophobe du centre réactionnel bactérien
L.....	Polypeptide du PS II
LDAO.....	Lauryldiméthylamineoxide
LHC.....	Complexe collecteur de lumière du PS II
M*	Polypeptide hydrophobe du centre réactionnel bactérien

Mn ₄	Amas tétramère de manganèse
NADP ⁺	Forme oxydée de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH.....	Forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
P680.....	Donneur initial d'électrons du PS II - Chlorophylle (s) <i>a</i>
P700.....	Donneur initial d'électron du PS I - Chlorophylles <i>a</i>
Pc.....	Plastocyanine
Phéo.....	Phéophytine
PM-IRRAS.....	Polarization modulated infrared reflection absorption spectroscopy
PQ.....	Plastoquinone oxydée
PQH ₂	Plastoquinone réduite
PRU.....	Unité photoréactive bactérienne
PS I.....	Photosystème I
PS II.....	Photosystème II
PS II CC.....	Photosystème II core complex
Q _A et Q _B	Plastoquinones
Q _Z	Moment de transfert
RC.....	Centre réactionnel
R/R _F	Réflectivité normalisée des rayons-X
S.....	Polypeptide du PS II
W.....	Polypeptide du PS II
X.....	Polypeptide du PS II
Y _D	Tyrosine 161 du polypeptide D2
Y _Z	Tyrosine 161 du polypeptide D1

* Étant donné que les mêmes abréviations sont utilisées pour certains polypeptides du PS II CC et du RC bactérien, ceux qui proviennent des bactéries ont été mis en gras pour éviter toute confusion.

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schéma d'un chloroplaste.....	3
1.2 Schéma de la membrane thylacoïdienne. PSII: photosystème II; PQ et PQH ₂ : formes oxydée et réduite de la plastoquinone; b ₆ f: cytochrome b ₆ f; Pc: plastocyanine; PS I: photosystème I; Fd: ferredoxine; FNR: ferredoxine-NADP oxydoréductase; F ₀ et F ₁ : sous-unités de l'ATPase; NADP ⁺ et NADPH: formes oxydée et réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; ADP: adénosine diphosphate; ATP: adénosine triphosphate. Figure adaptée du site web: http://mendel.berkeley.edu/~wzh/chapter3/figure31.html	4
1.3 Diagramme en Z des diverses étapes de la phase lumineuse de la photosynthèse. Mn ₄ : amas tétramère de manganèse; Y _Z : tyrosine 161 du polypeptide D1; PS II: photosystème II; Phéo: phéophytine a; Q _A et Q _B : plastoquinones; cyt b ₆ f: cytochrome b ₆ f; Pc: plastocyanine; PS I: photosystème I; A ₀ : chlorophylle a; A ₁ : phylloquinone; FeS _{x, A} et B: centres 4Fe-4S; Fd: ferredoxine; NADP ⁺ : nicotinamide adénodine dinucléotide phosphate. Figure adaptée de Fleischman (1995) et Joshi et Monhanti (1995).....	7
1.4 Schéma du photosystème II. Voir le texte, le Tableau 1.1 et la liste des abréviations pour leur définition. Figure adaptée du site web: http://mendel.berkeley.edu/~wzh/chapter3/figure32.html	9
1.5 Schéma du photosystème II "core complex" (PS II CC). Voir le texte, le Tableau 1.1 et la liste des abréviations pour leur définition. Figure adaptée du site web:	

	http://mendel.berkeley.edu/~wzh/chapter3/figure32.html	14
1.6	Structure de la chlorophylle <i>a</i>	18
1.7	Spectres d'absorption et de fluorescence du PS II CC en solution. Tampon: 20 mM Bis(2-hydroxyéthyl)imino-tris(hydroxyméthyl)méthane, pH 6,5; 20 mM MgCl ₂ ; 5mM CaCl ₂ ; 400 mM sucrose et 0.03% dodécyl-β-D-maltoside. Concentration en chlorophyll = 0,17 μM.....	19
1.8	Orientation des centres réactionnels bactériens en fonction de l'espèce bactérienne et des polypeptides qui les composent. M et L : polypeptides hydrophobes; H : polypeptide hydrophile; C : cytochrome hydrophile (voir la liste des abréviations et le texte pour une définition plus élaborée de ces sous-unités) (Zaitsev <i>et al.</i> , 1992).....	33
2.1	Schematic representation of the spectrofluorometer-spectrophotometer designed for <i>in situ</i> measurements at the air/water interface. ph: photodiodes; pm: plan mirror; em: ellipsoidal mirror; M: monochromator; PBS: Polka beam splitter.....	82
2.2	Effect of different compression speeds on π-A (A) and ΔV-A (B) isotherms of PS II CC (curves a-c) and of DM (curves d-f) spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m. Curves a and d : 80 nm ² /molecule·min; Curves b and e : 40 nm ² /molecule·min and Curves c and f : 10 nm ² /molecule·min. All compressions were started immediately after spreading. Subphase buffer contained 10 mM Tris(hydroxyméthyl)aminomethane buffer at pH 8, 2 mM ascorbic acid and 500 mM NaCl.....	83
2.3	<i>In situ</i> absorption (A) and fluorescence (B) spectra at the nitrogen/water interface of PS II CC spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m and compressed immediately at 80 nm ² /molecule·min. <i>In situ</i> fluorescence measurements, λ _{exc} = 440 nm. Curves a : 10 mN/m; Curves b : 20 mN/m; Curve c : 30 mN/m.....	84

- 2.4 *In situ* fluorescence microscopy of PS II CC at the nitrogen/water interface. **A - C**: Initial surface pressure of spreading (π_i) = 5.7 mN/m, immediate compression, speed = 80 nm²/molecule·min, **A**: π = 5.9 mN/m ; **B**: π = 25.0 mN/m; **C**: π = 30.0 mN/m; **D - E**: π_i = 5.7 mN/m, immediate compression, speed = 10 nm²/molecule·min, **D**: π = 30.0 mN/m; **E**: π = 7.7 mN/m. Scale bar on micrograph **A** = 100 μ m..... 86
- 2.5 Effect of different compression speeds on π -A (**A**) and ΔV -A (**B**) isotherms of PS II CC spread at initial surface pressure of 0.6 mN/m. Curves **a**: 80 nm²/molecule·min; Curves **b**: 40 nm²/molecule·min; Curves **c**: 10 nm²/molecule·min. All compressions started after a 30 minutes incubation time 87
- 2.6 *In situ* absorption (**A**) and fluorescence (**B**) spectra at the nitrogen/water interface of PS II CC spread at an initial surface pressure of 0.6 mN/m followed by a 30 minutes incubation time prior to compression at 10 nm²/molecule·min. *In situ* fluorescence measurements, λ_{exc} = 440 nm. Curves **a**: 10 mN/m; Curves **b**: 20 mN/m; Curves **c**: 30 mN/m; Curve **d**: 40 mN/m..... 88
- 2.7 *In situ* fluorescence microscopy of PS II CC spread at the nitrogen/water interface, incubation time = 30 minutes, π_i = 0.6 mN/m, **A**: compression speed = 80 nm²/molecule·min, π = 5.0 mN/m; **B**: compression speed = 40 nm²/molecule·min, π = 41.0 mN/m; **C**: compression speed = 10 nm²/molecule·min, π = 11.0 mN/m. See Figure 2.4 for scale bar..... 90
- 3.1 Schematic representation of Photosystem II core complex. The reaction center (RC) contains the polypeptides D1, D2 and the two subunits of cytochrome b₅₅₉. Those polypeptides bind the following co-factors: the redox-active tyrosine Z, the RC primary electron donor P680 (chlorophyll), pheophytin (Pheo), plastoquinones (Q_A and Q_B) and a nonheme iron. CP47 and CP43 are chlorophyll *a* binding proteins that act as intrinsic antenna. The extrinsic 33 kDa

- polypeptide, essential for high oxygen evolution rates, protects the tetramanganese cluster which is the water binding site. Hydrophobic part of PS II CC is approximately located at the same position as the detergent alkyl chains..... 126
- 3.2 FTIR-ATR spectrum of PS II CC spread as a hydrated amorphous thin film on a Ge crystal..... 127
- 3.3 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface. Initial surface pressure was set at 5.7 ± 0.2 mN/m. Compression at **A** - 80 nm²/molecule·min, **B** - 40 nm²/molecule·min and **C** - 10 nm²/molecule·min was started immediately after spreading of 40 μ L of PS II CC. Spectra were measured at surface pressures of **a** - 10 mN/m, **b** - 20 mN/m and **c** - 30 mN/m.... 129
- 3.4 Comparison of normalized PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface spread at an initial surface pressure of 5.7 ± 0.2 mN/m. Compression at 80 nm²/molecule·min was started immediately after spreading of 40 μ L of PS II CC. Spectra were measured at **a** - 10 mN/m, **b** - 30 mN/m..... 130
- 3.5 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen/buffer interface. Initial surface pressure was set at 5.7 ± 0.2 mN/m. Compression at 80 nm²/molecule·min was started immediately after spreading of 40 μ L of PS II CC. Surface pressure was maintained at 20 mN/m. Spectra were measured at: **a** - 15 min, **b** - 30 min, **c** - 45 min, **d** - 75 min, and **e** - 120 min after reaching 20 mN/m..... 131
- 3.6 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen/buffer interface. Initial surface pressure was set at 0.6 ± 0.1 mN/m. Compression at **A** - 80 nm²/molecule·min, **B** - 40 nm²/molecule·min and **C** - 10 nm²/molecule·min was started 30 minutes after spreading of 20 μ L of PS II CC. Spectra were measured at **a** - 0.6 mN/m, **b** - 10 mN/m, **c** - 20 mN/m, **d** - 30 mN/m and **e** - 40 mN/m..... 133

3.7	PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface. Surface pressure was set at 0.6 ± 0.1 mN/m and the film was not compressed. Spectra were recorded at: a - 0 min (20 scans), b - 30 min after spreading 20 mL of PS II CC.....	134
3.8	PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface at 4 °C. Initial surface pressure was set at 0.6 ± 0.1 mN/m. Compression at 40 nm ² /molecule·min was started 43 minutes after spreading of 20 µL of PS II CC. Spectra were measured at a - 0.6 mN/m, b - 10 mN/m, c - 20 mN/m, d - 30 mN/m and e - 40 mN/m.....	135
3.9	X-ray reflectivity (normalized to the Fresnel reflectivity R_F of ideally flat subphase) <i>versus</i> momentum transfer, Q_z , of a PS II CC monolayer. The solid curve is the calculated reflectivity obtained from the scattering length density profile shown in solid line in the inset. The dotted line in the inset corresponds to the <i>box model</i> that is smeared by a Gaussian to give the solid curve. Surface pressure was maintained at 30 mN/m during the measurement.....	136
4.1	Structures de A - l'herbicide DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée) et B - l'accepteur d'électrons DCBQ (2,5-dichloro- <i>p</i> -benzoquinone).....	152
4.2	Structures des différents analogues du DCMU synthétisés et valeurs des I_{50} (concentration inhibant 50% du dégagement d'oxygène) obtenues.....	154
4.3	Structures des lipides synthétisés dans le but d'induire la cristallisation bidimensionnelle du PS II CC en monocouche à l'interface air-eau.....	155
A.1	Spectre PM-IRRAS du <i>n</i> -dodécyl-β-D-maltoside à l'interface air-eau.....	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Polypeptides du PS II CC de l'épinard (tiré de Hankamer <i>et al.</i> , 1997).....	16
1.2 Fréquences de vibration amide I de différentes structures secondaires des protéines.....	22
2.1 <i>In situ</i> absorption and fluorescence characteristics of PS II CC monolayers. π_i is the initial spreading surface pressure, λ_A and λ_F are respectively the absorption red band and fluorescence maxima whereas I_A and I_F are the corresponding intensities of those maxima.....	81

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Photosynthèse

La photosynthèse est le processus par lequel les plantes produisent de l'énergie chimique grâce à l'absorption de photons. Ce processus se produit en deux phases. La première, appelée la phase lumineuse, comporte toutes les réactions qui, comme son nom l'indique, nécessitent directement la lumière comme source d'énergie. La seconde, la phase obscure, se caractérise par des réactions complémentaires qui ne nécessitent que les produits résultant de la phase lumineuse pour avoir lieu. L'équation 1.1 présente, toutes phases confondues, la réaction globale de la photosynthèse (pour une revue sur la photosynthèse, voir Fleischman, 1995).



Ainsi, par le processus de la photosynthèse, les plantes fixent le gaz carbonique de l'atmosphère (CO_2) pour synthétiser des sucres qui sont conservés sous forme d'amidon, un polymère de glucose. La photosynthèse permet ainsi l'emmagasinage de 686 kcal d'énergie libre par mole de glucose (Fleischman, 1995). Par conséquent, la matière inorganique (CO_2 et H_2O) est transformée en produits organiques qui sont par la suite utilisés par la plante ou par les organismes qui s'en nourrissent. Aussi, la photosynthèse, en utilisant l'eau

comme abondante source d'électrons et de protons, produit l'oxygène moléculaire, ce précieux produit de rejet qui sera ensuite mis à profit par les plantes de même que par les animaux lors de la respiration. L'unique source d'énergie qui permet d'oxyder l'eau en oxygène et qui soutient donc toute la vie animale de la Terre est la lumière du soleil. Aussi, puisque les plantes sont à la base de la chaîne alimentaire, presque toute l'énergie chimique disponible pour les organismes vivants est donc elle aussi, tout comme l'oxygène que nous respirons, dérivée de l'énergie du soleil.

La photosynthèse se produit dans un organite cellulaire spécifique, le chloroplaste, où on retrouve tout le matériel moléculaire nécessaire au processus. La Figure 1.1 présente le schéma d'un chloroplaste. Il est formé d'une enveloppe externe ainsi que d'une membrane interne. Cette dernière se replie sur elle-même pour former des vésicules aplaties, appelées thylacoïdes, qui sont empilées les unes sur les autres et qui baignent dans un milieu aqueux nommé stroma. Les empilements de thylacoïdes forment les grana alors que l'intérieur des membranes délimitent le lumen. Les membranes entre les grana sont aussi appelées lamelles du stroma ou lamelles stromatiques. Les protéines qui se retrouvent dans les membranes granaires sont différentes de celles présentes dans les lamelles stromatiques. Cette séparation latérale est montrée à la Figure 1.2. En effet, les membranes granaires empilées contiennent principalement le photosystème II (PS II) alors que le photosystème I (PS I) se retrouve essentiellement dans les lamelles stromatiques ainsi que les régions périphériques des grana. Le transport d'électrons entre les deux photosystèmes est assuré par le cytochrome (cyt) b_6f qui est uniformément distribué dans toutes les régions de la membrane thylacoïdienne. Enfin, un dernier complexe protéique se retrouve dans les membranes internes du chloroplaste. Il s'agit de l'ATPase qui est exclusivement présente dans les régions lamellaires des thylacoïdes.

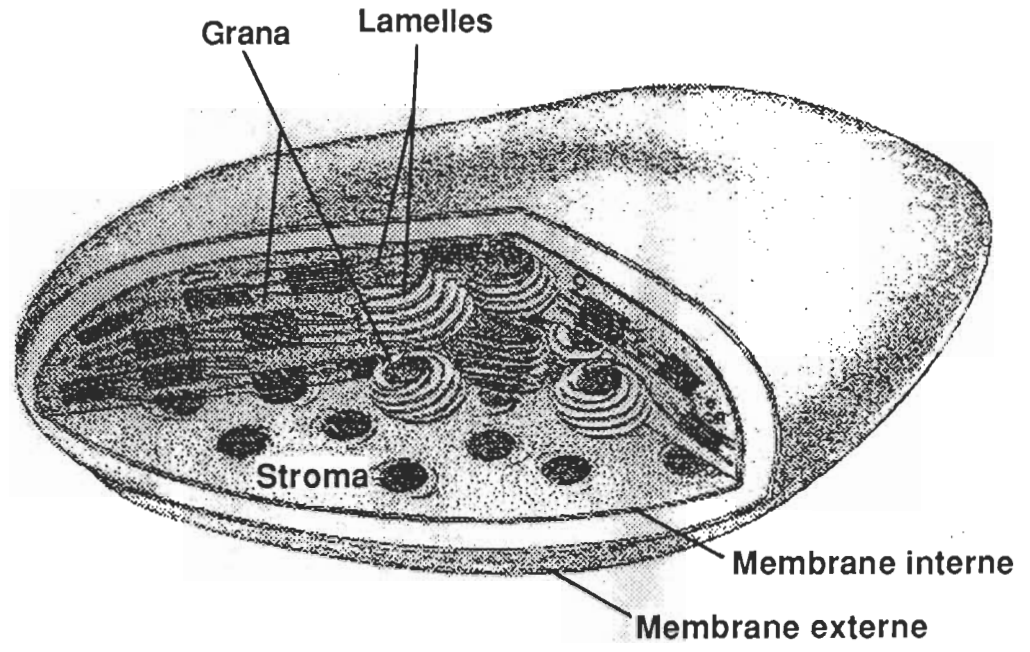


Figure 1.1 Schéma d'un chloroplaste

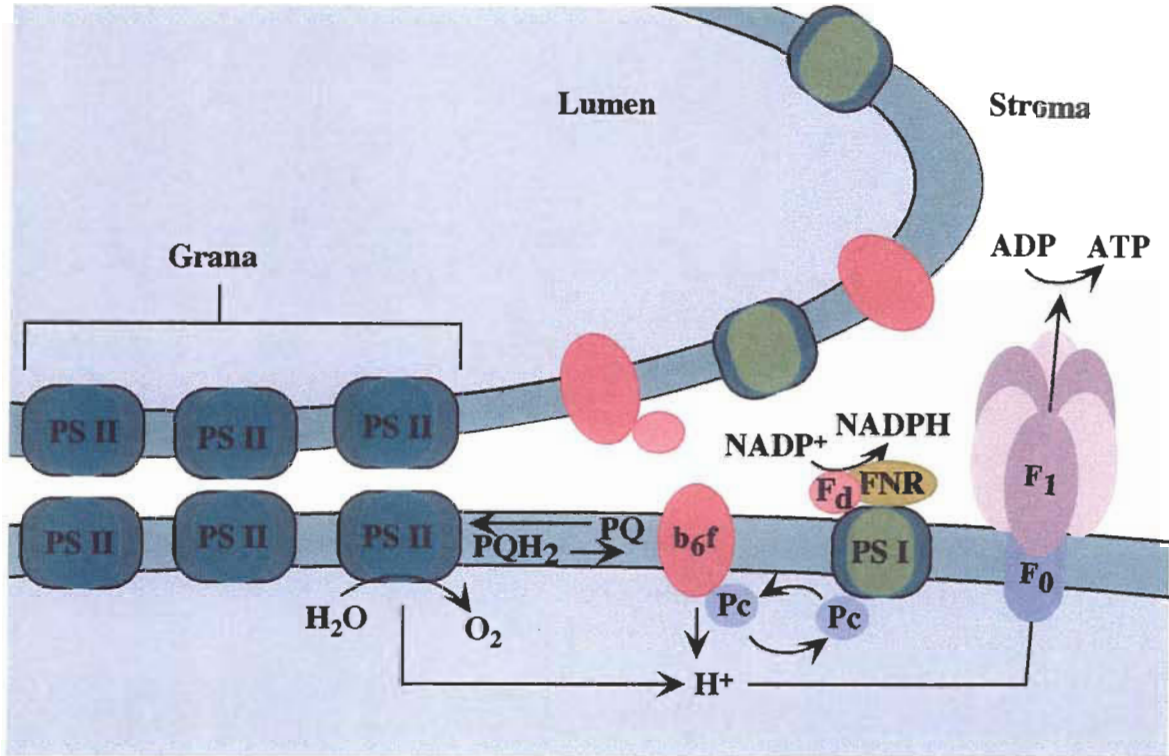


Figure 1.2 Schéma de la membrane thylacoïdienne. PSII: photosystème II; PQ et PQH₂: formes oxydée et réduite de la plastoquinone; b₆f: cytochrome b₆f; Pc: plastocyanine; PS I: photosystème I; Fd: ferredoxine; FNR: ferredoxine-NADP oxydoréductase; F₀ et F₁: sous-unités de l'ATPase; NADP⁺ et NADPH: formes oxydée et réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; ADP: adénosine diphosphate; ATP: adénosine triphosphate. Figure adaptée du site web: <http://mendel.berkeley.edu/~wzh/chapter3/figure31.html>

Les étapes déterminantes de la phase lumineuse sont la réduction du NADP^+ en NADPH et la conversion de l'ADP en ATP. Ces deux produits sont par la suite utilisés dans une multitude de réactions biochimiques de la phase obscure dont la synthèse des sucres. Les principales étapes de la photosynthèse sont aussi représentées à la Figure 1.2. Chez les algues et les plantes supérieures, l'unique source d'électrons et de protons est l'eau. Afin d'extraire ces particules de l'eau, la nature a développé un ingénieux système capable de canaliser l'énergie lumineuse du soleil et de la transformer en équivalents très oxydants. La lumière est absorbée par différents pigments, principalement les chlorophylles (chl) *a* et *b* ainsi que divers caroténoïdes, dont les propriétés d'absorption couvrent la plus grande partie du spectre solaire visible. Ainsi, l'énergie lumineuse absorbée par ces divers pigments est ultimement acheminée à des pigments spécifiques qui forment le centre réactionnel (RC) des photosystèmes. L'énergie acheminée au RC du PS II provoque une séparation de charges et un transfert d'électron subséquent qui produit, au sein même du PS II, une espèce capable d'oxyder l'eau, ce qui libère l'oxygène moléculaire (O_2). Les électrons extraits de l'eau sont pris en charge par des plastoquinones (PQ) qui sont les transporteurs d'électrons entre le PS II et le $\text{cyt } b_6f$ (voir Figure 1.2). Avant de quitter le PS II, la PQ^{2-} se neutralise en captant deux protons du côté stromal du thylacoïde (PQH_2). Par la suite, en réduisant le $\text{cyt } b_6f$, la PQH_2 relargue ses deux protons du côté lumenal, ce qui régénère ce transporteur d'électrons sous sa forme oxydée (PQ). La réduction de la plastocyanine (Pc, Figure 1.2) par le $\text{cyt } b_6f$ et son déplacement subséquent amène les électrons jusqu'au PS I où s'achèvent les réactions rédox par la production du NADPH. Un gradient de protons de part et d'autre de la membrane du thylacoïde est donc créé par l'oxydation de l'eau en oxygène ainsi que par le transport des électrons du PS II au $\text{cyt } b_6f$ (couple PQH_2 -PQ), ce qui permet la phosphorylation de l'ADP grâce retour des protons vers le stroma à travers l'ATPase.

Notre compréhension des diverses réactions de transfert d'électrons a longtemps été basée sur le "schéma en Z" tel qu'il apparaît à la Figure 1.3. Ce modèle où le PS I et le PS II opèrent en série permet d'expliquer la plupart des phénomènes fondamentaux du système de transfert d'électrons du chloroplaste. Bien que ce modèle ne présente pas toutes les réactions observées expérimentalement et dont certaines semblent contradictoires - telle que la réduction du NADP^+ dans les mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* qui sont complètement dépourvus de PS I - il a l'avantage de présenter les propriétés rédox des cofacteurs en fonction de leur état d'excitation (ex: P680 vs P680*) de même que la séquence temporelle des diverses étapes du transfert d'électrons. Les valeurs en ordonnée sont les potentiels standards (E_m). Il s'agit de la différence de potentiel qui existe entre une solution contenant, en concentration équimolaire, les formes oxydée et réduite de chacune des espèces et une électrode standard à l'hydrogène. Plus les molécules ont de grands potentiels négatifs, plus elles sont aptes à donner des électrons (Fleischman, 1995). On remarque également, d'après le temps indiqué pour chacune des étapes, que l'électron se rendra à Q_A avant que P680^+ ne soit réduit par la Tyrosine Y_Z . Aussi, on reconnaît que, d'après son potentiel rédox, l'amas de manganèse (Mn_4) pourra réduire la tyrosine Y_Z et oxyder l'eau. Dans ce contexte, on peut finalement remarquer que P680 et P700 sont des pompes à électrons, activées par l'absorption lumineuse. En effet, lorsque excitées, ces espèces deviennent très réductrices et actionnent alors la cascade du transfert d'électrons à la fois du côté réducteur et oxydant des deux photosystèmes. Puisque c'est le PS II qui a fait l'objet de ce travail, nous le décrivons donc maintenant plus en détail.

1.2 Photosystème II

Les études du fonctionnement et de la structure du PS II qui est responsable du transfert photoinduit des électrons à partir de l'eau jusqu'à la PQ, ont fait l'objet de

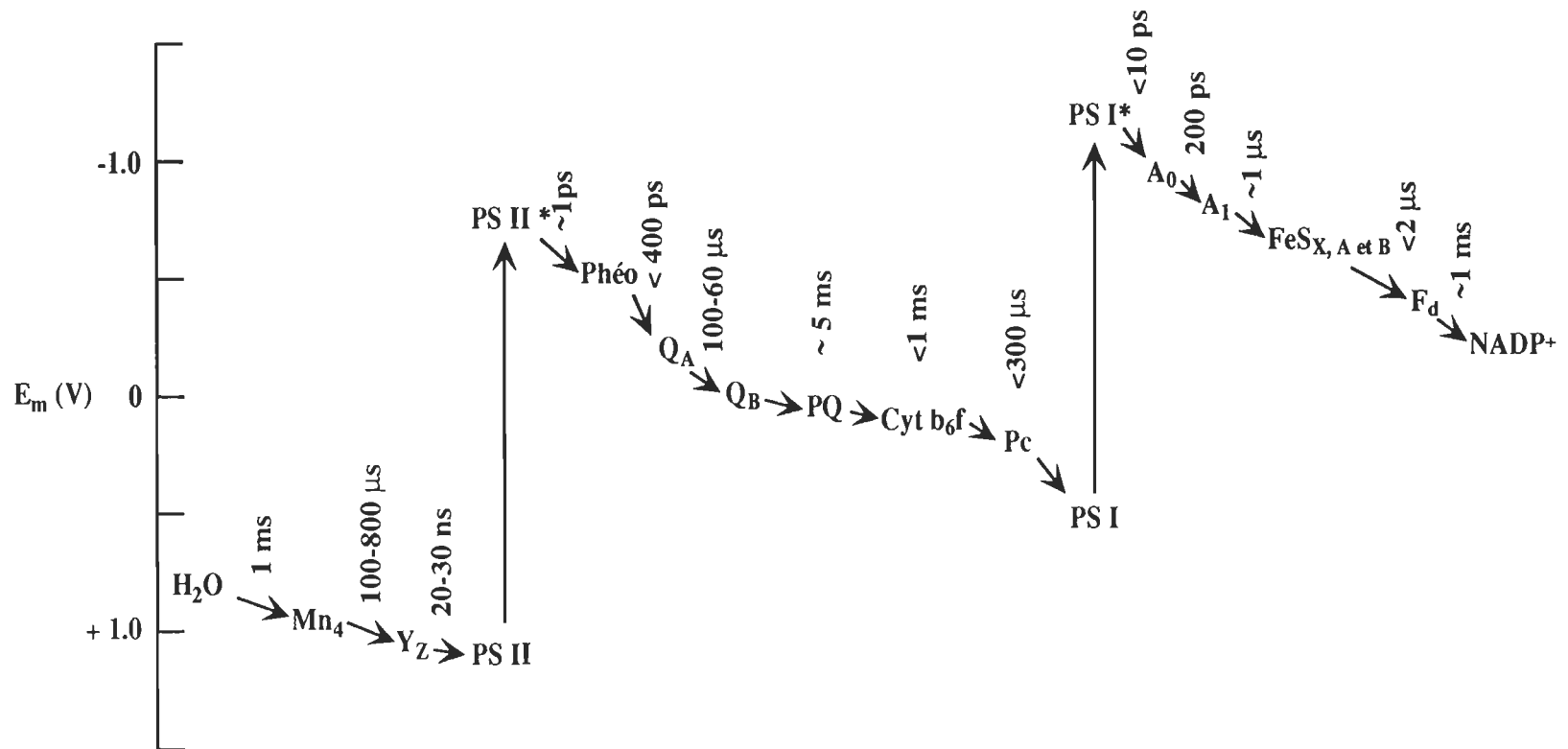


Figure 1.3 Diagramme en Z des diverses étapes de la phase lumineuse de la photosynthèse. Mn_4 : amas tétramère de manganèse; Y_Z : tyrosine 161 du polypeptide D1; PS II: photosystème II; Phéo: phéophytine a ; Q_A et Q_B : plastoquinones; cyt b_6f : cytochrome b_6f ; Pc: plastocyanine; PS I: photosystème I; A_0 : chlorophylle a ; A_1 : phylloquinone; $FeS_{X, A \text{ et } B}$: centres 4Fe-4S; F_d : ferredoxine; $NADP^+$: nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate. Figure adaptée de Fleischman (1995) et Joshi et Monhanty (1995).

nombreuses publications au cours des dernières décennies (pour d'excellentes revues sur le PS II, voir: Hankamer *et al.*, 1997; Vermaas, 1993; Hansson et Wydrzynski, 1990). Un schéma présentant quelques uns des principaux constituants du PS II apparaît à la Figure 1.4. P680 est le donneur primaire d'électrons qui, dans le cas des plantes supérieures, est constitué d'une ou de deux molécules de chl *a*. P680 peut être activé soit par l'absorption directe d'un photon de longueur d'onde appropriée, soit par l'acheminement d'une excitation captée par les pigments-antennes du PS II. Un électron π de P680 est alors excité et capté par une phéophytine (phéo) *a*. Il s'agit dès lors de l'initiation de la séparation de charges. Il y a donc formation d'une charge positive au niveau de l'espèce P680 alors que la phéo *a* devient chargée négativement. Q_A est la première PQ réduite par le passage subséquent de l'électron provenant de la phéo *a*. Cette dernière est solidement fixée au squelette polypeptidique du RC. L'électron est ensuite acheminé vers Q_B , une seconde PQ. Au cours de ce premier événement photochimique, la PQ liée au site Q_B se réduit en anion semiquinone qui est stabilisé par la matrice protéique environnante. Lors d'un second événement photochimique (nouvelle séparation de charges et transport d'un second électron jusqu'à Q_B), la semiquinone liée à ce site devient entièrement réduite. Elle s'associe alors à deux protons venant du stroma et est relâchée du site de liaison de Q_B sous la forme d'un plastoquinol (PQH_2). Ce processus biélectronique se répète lorsqu'une nouvelle PQ se lie au site de Q_B . Le bassin de PQ des thylacoïdes est régénéré par l'oxydation des PQ par le cyt b_6f .

La tyrosine Y_Z est le donneur d'électrons à la forme oxydée du P680 ($P680^+$). Cette dernière est régénérée par l'acceptation d'un électron provenant de Mn_4 , une composante ionique contenant quatre atomes de manganèse, un atome de calcium et un nombre indéterminé d'atomes de chlore. Cet amas ionique est impliqué dans la liaison et l'oxydation de l'eau produisant ainsi le dégagement d'oxygène.

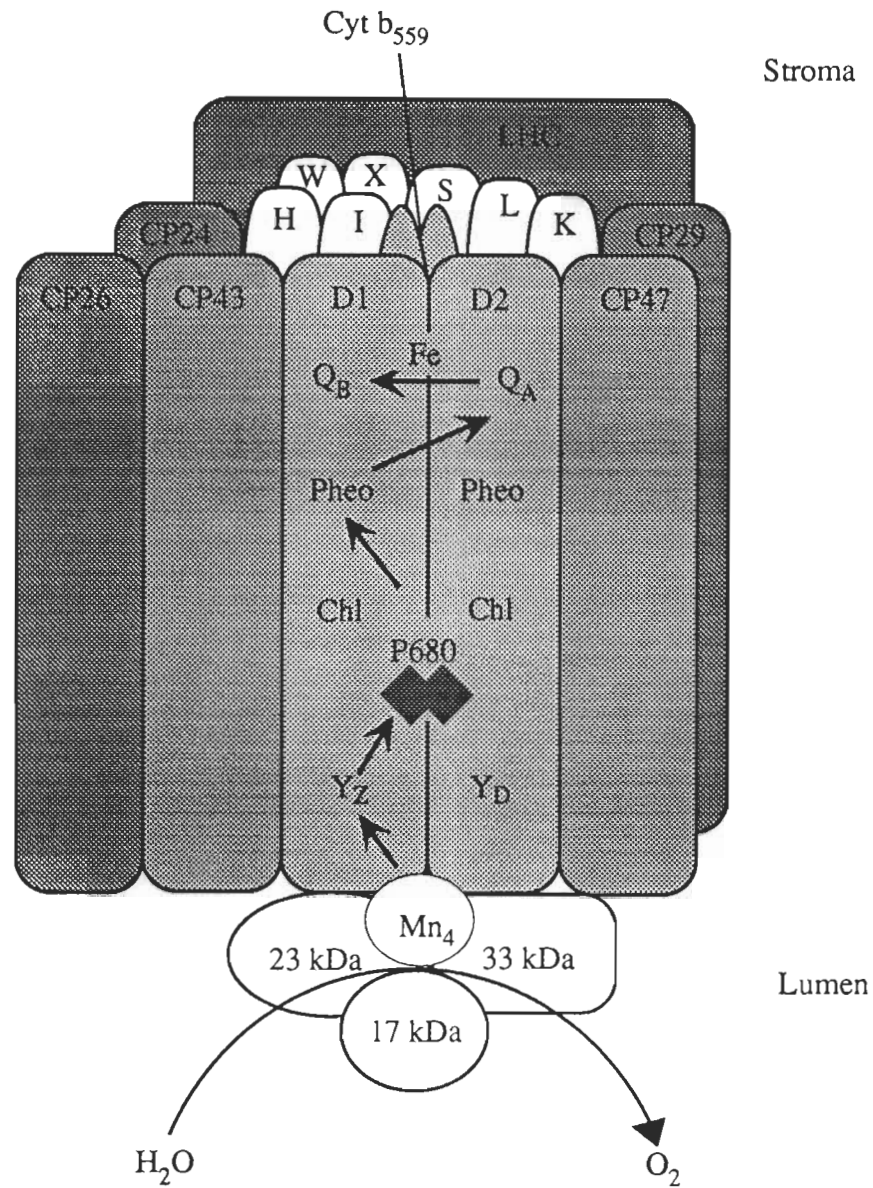


Figure 1.4 Schéma du photosystème II. Voir le texte, le Tableau 1.1 et la liste des abréviations pour leur définitions. Figure adaptée du site web: <http://mendel.berkeley.edu/~wzh/chapter3/figure32.html>.

Il existe d'autres composantes du PS II qui peuvent interagir avec le flux d'électrons qui passe à travers le PS II, de l'eau à la PQ, mais qui ne sont pas mentionnées dans la séquence de réactions décrites ci-haut. Il s'agit, entre autres, du cyt b₅₅₉, d'un atome de fer (Fe) non-hème qui est associé aux quinones Q_A et Q_B, de deux β-carotènes (β-car), des formes monomériques de chl *a* ainsi que d'une seconde phéo *a*. Brièvement, le cyt b₅₅₉ lie un groupement hème, à proximité de la face stromale du PS II, grâce à deux résidus histidines dans chacune des sous-unités α et β du cyt b₅₅₉. Bien qu'il existe diverses formes de cyt b₅₅₉, dépendant de son potentiel rédox, tout porte à croire que dans le cas de PS II actifs, le cyt b₅₅₉ possède un potentiel de +380 mV (Whitmarsh et Pakrasi, 1996). Le cyt b₅₅₉ serait impliqué dans un transfert d'électrons cyclique autour du RC du PS II, court-circuitant le trajet normal des électrons jusqu'à la réduction des PQ et ce, afin de réduire l'espèce P680⁺ et ainsi éviter la photoinactivation du PS II. Ce transfert d'électrons se ferait *via* une des chls monomériques du RC.

Au cours des dernières années, il a été démontré que plus de 20 polypeptides pourraient être associés au PS II (Hankamer *et al.*, 1997). Les polypeptides qui le composent (voir Figure 1.4) peuvent être rassemblés en cinq groupes fonctionnels: (1) les polypeptides du centre réactionnel (RC) qui lient les réactifs primaires de la séparation de charges (D1, D2, cyt b₅₅₉), (2) une capsule de régulation composée de protéines hydrophiles extrinsèques qui sont liées à la surface luménale de la membrane (33, 23 et 17 kDa), aussi appelé le complexe de dégagement d'oxygène et qui inclut la composante Mn₄, (3) les polypeptides de l'antenne intrinsèque non-mobile (CP43, CP47), (4) les polypeptides de l'antenne intermédiaire non-mobile (CP29, CP26, CP24) et, enfin, (5) les polypeptides de l'antenne distale mobile qui forment le complexe collecteur de lumière (LHC) (voir Figure 1.4).

Le RC est constitué de quatre polypeptides, soit D1, D2 et des deux sous-unités du cyt b₅₅₉ (voir Figure 1.4). Ces polypeptides lient les pigments et cofacteurs actifs lors de la séparation de charges (voir ci-dessus). Les deux quinones Q_A et Q_B sont absentes des échantillons de RC extraits, probablement à cause du traitement au détergent. Lorsqu'il est isolé, le RC est un complexe très instable.

Le complexe de dégagement d'oxygène est composé de trois polypeptides (connus sous les appellations de 33 kDa, 23 kDa et 17 kDa) ainsi que des cofacteurs actifs lors de l'oxydation de l'eau. Ensemble, ils forment une capsule à la surface luménale de la membrane thylacoïdienne (pour une revue, voir Seidler, 1996). Ce complexe est fixé au RC près du P680 (voir Figure 1.4), stabilisant ainsi les cofacteurs responsables de sa réduction. Parmi ces cofacteurs, il y a quatre atomes de manganèse qui sont probablement le ou les sites de liaison et d'oxydation de l'eau et qui sont disposés sous la forme d'amas. La nature des ligands des atomes de Mn aux polypeptides est inconnue, mais il est généralement accepté qu'il s'agit d'acides aminés du PS II (Yachandra *et al.*, 1993). Le complexe de dégagement d'oxygène catalyse donc l'oxydation de deux molécules d'eau pour obtenir une molécule d'O₂. Les séparations de charges successives au niveau du RC induisent une accumulation d'états rédox intermédiaires très oxydants au niveau de l'amas de Mn. Ces états sont identifiés S₀ à S₄, où S₀ est l'état le plus réduit. À mesure qu'il y a séparation de charges dans le centre réactionnel, l'amas de Mn fournit des électrons au P680 provoquant ainsi des changements d'états rédox vers des niveaux d'oxydation supérieurs, S₁, S₂ et S₃. La molécule d'oxygène est larguée durant la transition S₃ vers S₄. L'état S₄ est un état transitoire qui retourne immédiatement à l'état de départ S₀. Le complexe de dégagement d'oxygène est connecté au centre photochimique du PS II via le composé Y_Z (voir Figure 1.4), la tyrosine 161 du polypeptide D1. Il existe une controverse dans la littérature au sujet de la stoechiométrie des polypeptides de la capsule de régulation

du dégagement d'oxygène. Il est d'avis général que les trois polypeptides sont en quantité équimolaire (Seidler, 1996). Cependant, une évidence présentée par Xu et Bricker (1992) évoque la possibilité qu'il y ait deux polypeptides de 33 kDa par centre réactionnel.

L'antenne intrinsèque est responsable de l'absorption et du transfert de l'énergie lumineuse par la présence de deux polypeptides (CP47 et CP43) liant des pigments qui acheminent l'énergie vers le P680 du RC (voir Figure 1.4). Les polypeptides de l'antenne intrinsèque qui sont ancrés à l'aide de 5 segments transmembranaires, ne contiennent que de la chl *a* (pas de chl *b*) et que du β -carotène (aucun autre caroténoïde). Leur séquence en acides aminés est riche en histidine, un des candidats le plus probable pour lier la chl *a*. La quantité de chl *a* liée à ces polypeptides est un sujet de controverse. Certains auteurs (Barbato *et al.*, 1991) affirment que CP47 et CP43 pourraient chacun lier de 9 à 12 chls *a*. D'autres stipulent qu'ils en lient une trentaine (Vermaas et Ikeuchi, 1991; Xu et Bricker, 1992). Enfin, certains poussent cette composition jusqu'à 40 molécules de chl *a* (Thomber *et al.*, 1991). Dans ce cas, ces polypeptides ne sont pas suffisamment riches en histidine pour coordonner tout le pigment. Cependant, il y a suffisamment d'histidine, d'asparagine et de glutamine pour lier autant de chl *a*. L'antenne intrinsèque est très fortement liée au RC et on croit donc qu'elle se situe très près du RC. Mais puisqu'elle peut être séparée du RC avec efficacité par des moyens biochimiques simples, on croit qu'elle possède tout de même une situation topographique périphérique au RC (voir Figure 1.4).

Associé au PS II, on retrouve aussi trois autres antennes intermédiaires CP29, CP26 et CP24. Elles lient à la fois des chls *a* et *b*. Elles se distinguent donc de CP47 et CP43 par la présence de chl *b* (de 3 à 7 chls *b* par polypeptide). De plus, on y rencontre trois autres espèces de pigments soit des lutéïnes, néoxanthines et violaxanthines (il y a entre un et deux de chacun de ces caroténoïdes par polypeptide). Ces antennes peuvent donc capter un

spectre plus large de longueurs d'onde, ce qui porte à croire qu'elles acheminent l'énergie recueillie vers les antennes intrinsèques, ces dernières étant plus près du RC (voir Figure 1.4). De plus, elles semblent être impliquées dans la liaison de l'antenne principale, le LHC, au PS II.

Le LHC, dont la structure est connue, est un trimère de polypeptides transmembranaires qui lient plusieurs types de pigments dont les principaux sont la chl *a* et *b* ainsi que la lutéine (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Ce complexe particulier lie 80% de la chl présente dans tout le PS II (van Leeuwen *et al.*, 1991). La fonction du LHC est de capter l'énergie lumineuse qui sera acheminée jusqu'au PS II. Le LHC est mobile dans la membrane. Si les conditions lumineuses sont telles que le PS II est surchargé par rapport au PS I, une phosphorylation de la thréonine (Thr6) du LHC se produit, ce qui le détache du PS II. Il peut alors migrer dans la membrane, s'associer au PS I et ainsi augmenter son potentiel d'absorption de la lumière. L'équilibre entre l'activité des deux photosystèmes est alors rétabli, ce qui optimise l'activité globale de la photosynthèse.

Plus spécifiquement, c'est une composante du PS II, appelée PS II CC, que nous avons étudiée dans ce travail. La section suivante en donne les caractéristiques.

1.3 PS II CC

La plus petite unité photosynthétique qui, lorsqu'elle est extraite, reste active au niveau du dégagement d'oxygène est nommée, en anglais, le "PS II Core Complex", que nous nommerons dans le présent document "PS II CC". Une illustration du PS II CC apparaît à la Figure 1.5. Ce complexe, plus petit que le PS II (comparer les Figures 1.4 et 1.5) tel qu'on le retrouve dans les membranes thylacoïdiennes, est composé des sous-unités

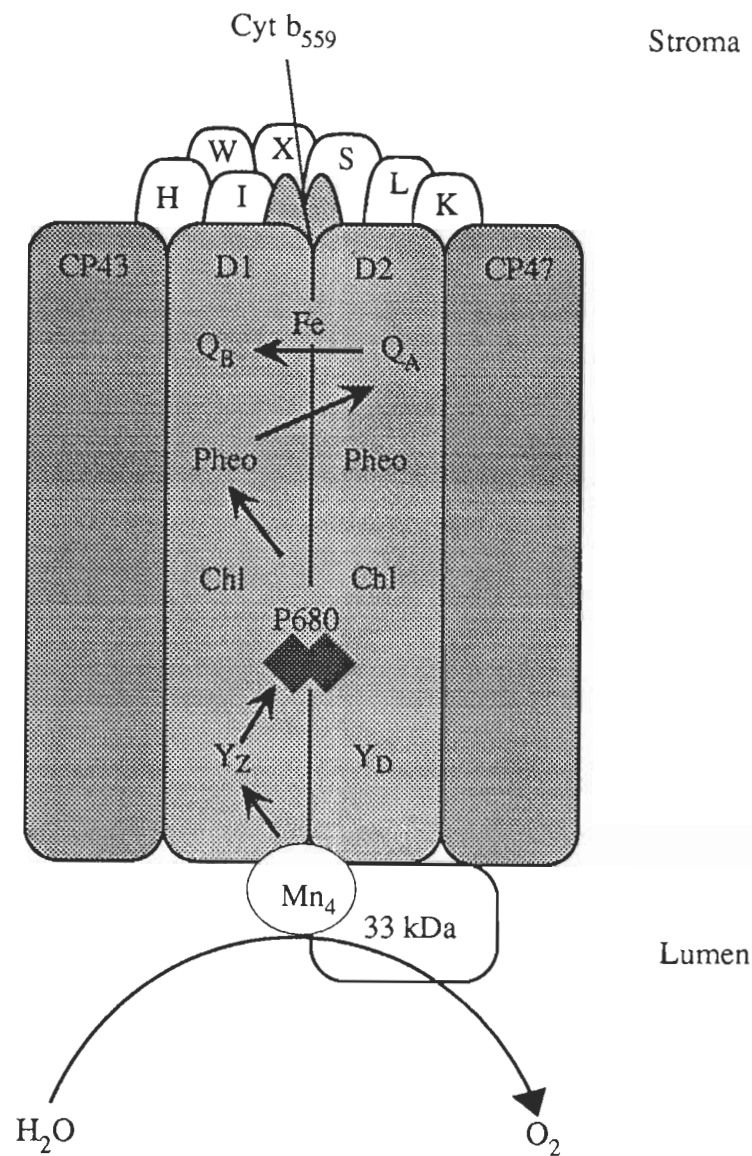


Figure 1.5 Schéma du photosystème II "core complex" (PS II CC). Voir le texte, le Tableau 1.1 et la liste des abréviations pour leur définition. Figure adaptée du site web: <http://mendel.berkeley.edu/~wzh/chapter3/figure32.html>.

polypeptidiques suivantes: D1, D2, Cyt b₅₅₉, CP47, CP43, ainsi que du polypeptide extrinsèque de 33 kDa. Une description plus complète des tous les polypeptides inclus dans le PS II CC apparaît au Tableau 1.1 (Hankamer *et al.*, 1997).

L'intérêt d'étudier le PS II CC, par rapport aux extraits contenant les antennes intermédiaires et le LHC, réside dans l'élimination de polypeptides et de pigments qui, du point de vue fonctionnel, ne servent apparemment qu'à acheminer l'énergie lumineuse au complexe central. Comparativement aux membranes enrichies en PS II, le PS II CC contient très peu des lipides associés aux membranes. D'un autre côté, comparativement aux complexes plus petits, tel que le RC, le PS II CC possède encore sa pleine capacité de transfert d'électrons et, par la présence du polypeptide extrinsèque de 33 kDa, sa faculté de dégagement d'oxygène et ce, pourvu qu'il ait accès à une source extrinsèque d'accepteurs d'électrons.

Maintenant que les caractéristiques structurales du PS II CC ont été décrites, nous allons faire une revue des propriétés spectroscopiques de ce complexe incluant l'absorption, la fluorescence et l'infrarouge. Ces propriétés seront ensuite utilisées aux Chapitres 2 et 3 afin de déterminer si l'étalement du PS II CC en monocouche à l'interface air-eau permet de maintenir son état natif ou s'il mène plutôt à sa dénaturation.

1.4 Propriétés spectroscopiques du PS II CC

1.4.1 Absorption

Le PS II, de par sa nature et sa fonction, contient différents pigments qui couvrent le spectre solaire visible, et ce, afin de maximiser l'absorption de l'énergie lumineuse. Parmi

Tableau 1.1 Polypeptides du PS II CC de l'épinard (tiré de Hankamer *et al.*, 1997).

Unité	Masse ^a (kDa)	Hélices- α ^b	Chl <i>a</i>	Phéo	β -car	Fonction ou contenu
D1	38	5				Y _Z , P680, Phéo, Q _B
D2	39	5				Y _D , P680, Phéo, Q _A
α -cyt b ₅₅₉	9	1	6 ^c	2 ^c	2 ^c	Photoprotection, Hème
β -cyt b ₅₅₉	4	1				Photoprotection, Hème
I	1	1				? ^d
CP47	56	6	10-25		3	Transfert d'énergie Antenne intrinsèque
CP43	50	6	9-25		5	Transfert d'énergie Antenne intrinsèque
H	8	1				Photoprotection
K	4	1				Stabilité du PS II
L	4	1				Impliqué dans la fonction de Q _A
33 kDa	26	0				Stabilité Mn ₄ , Ca ²⁺ , Cl ⁻
S	22	4	5? ^d			Chaperonine, Antenne
W	6	1				? ^d
X	4	1				Impliqué dans la fonction de Q _A

^aMasses moléculaires calculées à partir de leur séquence en acides aminés

^bNombre d'hélices- α transmembranaires

^cPigments retrouvés dans le centre réactionnel

^d? indique des fonctions inconnues ou des données qui restent à confirmer

les plus importants, se trouvent les chls *a* et *b*, les phéophytines, ainsi que plusieurs espèces de caroténoïdes. Cependant, le PS II CC contient seulement trois types de pigments, la chl *a*, la phéo *a* et le β -car. Ce sont donc ces espèces qui sont responsables des propriétés d'absorption du PS II CC dans le visible. D'ailleurs, une des caractéristiques principales qui permet de démontrer la pureté d'une préparation de PS II CC est son rapport chl *a*/chl *b*. En effet, la présence de chl *b* indique que le complexe est contaminé par le CP29 de l'antenne intermédiaire (Haag *et al.*, 1990). Parmi les pigments du PS II CC, la chl *a* est sûrement la plus importante, non seulement parce qu'il s'agit de l'espèce moléculaire la plus nombreuse, mais aussi parce que c'est le seul pigment qui émet de la fluorescence dans le complexe protéique. En effet, pratiquement toute l'énergie absorbée par le PS II émise sous forme de fluorescence le sera à partir de cet unique pigment. Ceci est dû au fait que le transfert de l'énergie vers la chl *a* est plus rapide que les mécanismes de fluorescence des autres pigments (Joshi et Mohanty, 1995).

La structure moléculaire de la chl *a* est présentée à la Figure 1.6. Il s'agit d'un composé tétrapyrrole cyclique possédant un atome de magnésium au centre ainsi qu'une chaîne phytyl hydrophobe. Les doubles liaisons du cycle tétrapyrrolique sont conjuguées, ce qui explique les propriétés d'absorption dans le visible du pigment. La perte du magnésium produit la phéo *a* et modifie ses propriétés spectroscopiques. Le spectre d'absorption du PS II CC, illustré à la Figure 1.7, est identique à celui publié par Haag *et al.* (1990). On y reconnaît les principales caractéristiques du spectre de la chl *a*, soit les bandes de Soret à 418 et 436 nm (transitions π - π^* ₂) ainsi que les bandes Q (transitions π - π^* ₁) dont la plus intense se situe à 676 nm. La contribution des caroténoïdes se distingue par les bandes apparaissant entre 450 et 530 nm.

Il a été démontré, dans le cas du RC du PS II, que la position de la principale bande

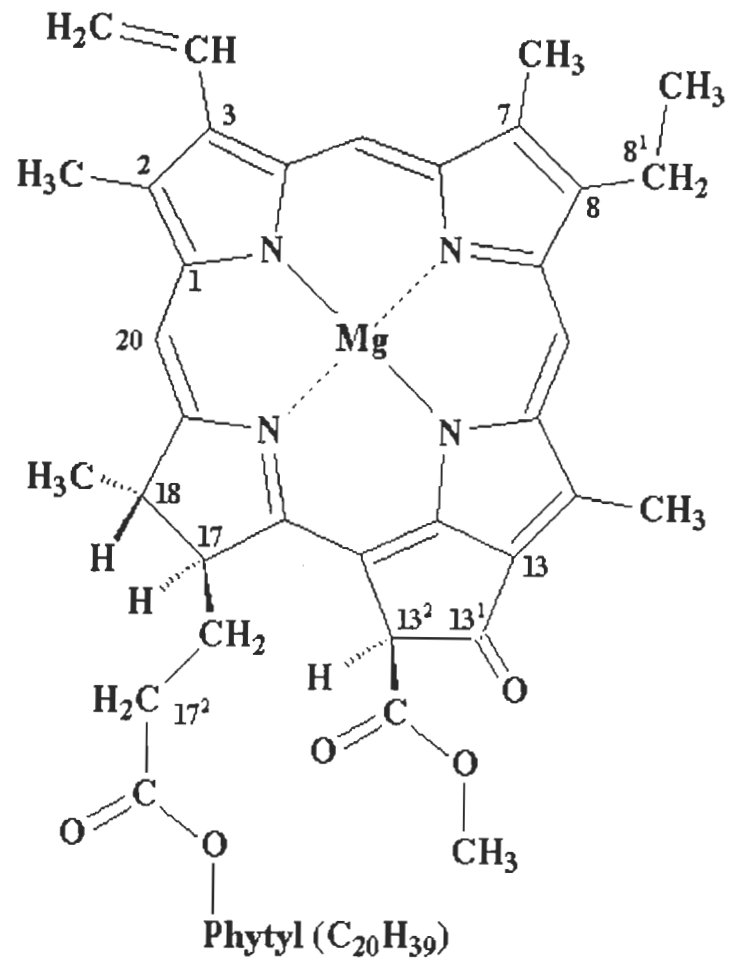


Figure 1.6 Structure de la chlorophylle *a*.

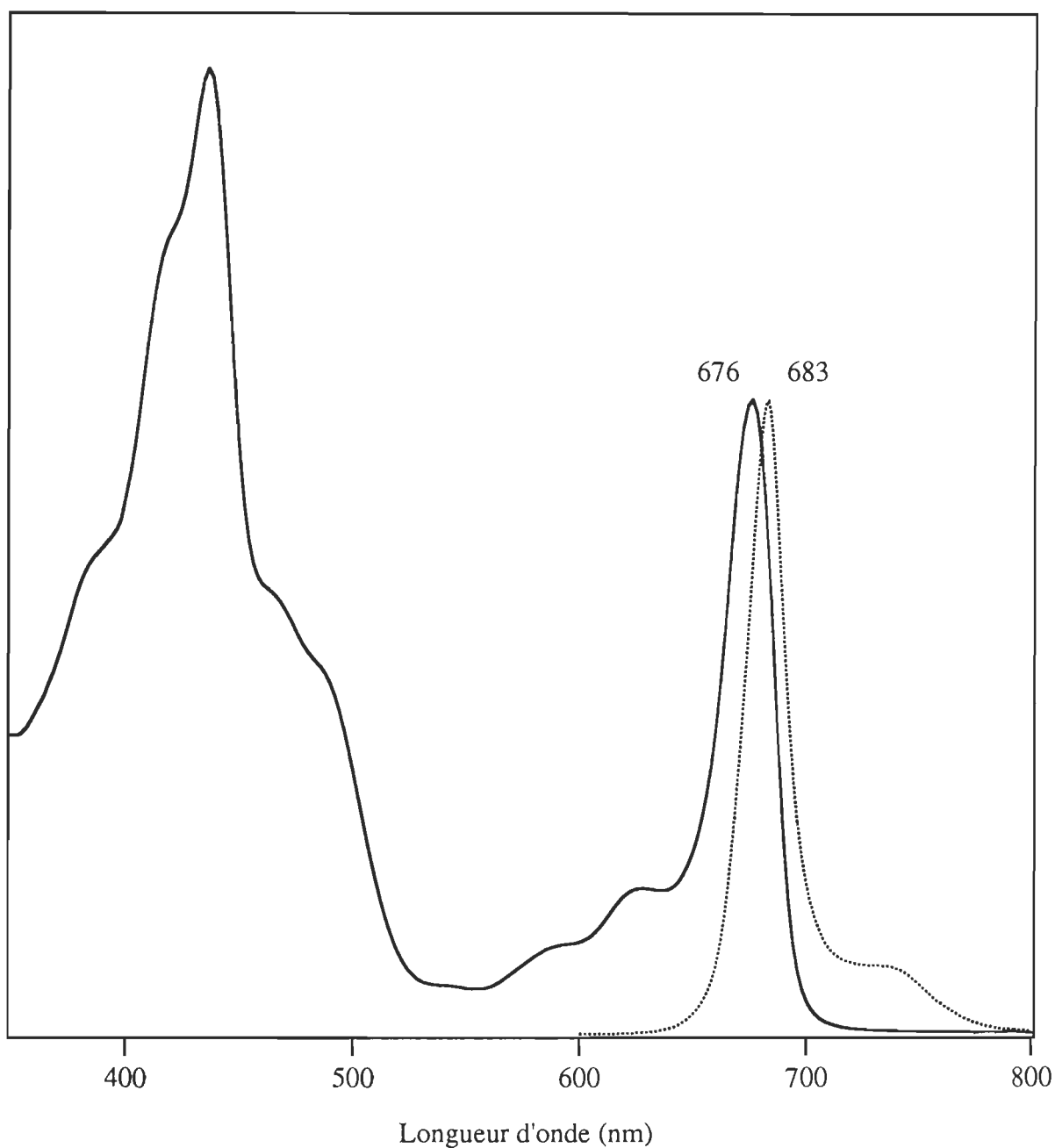


Figure 1.7 Spectres d'absorption et de fluorescence du PS II CC en solution. Tampon: 20 mM Bis(2-hydroxyéthyl)imino-tris(hydroxyméthyl)méthane, pH 6,5; 20 mM MgCl₂; 5mM CaCl₂; 400 mM sucrose et 0.03% dodécyl-β-D-maltoside. Concentration en chlorophyll = 0,17 μM.

Q, souvent nommée la bande rouge, est sensible à l'intégrité du complexe (Montoya *et al.*, 1994; Williams et Gounaris, 1992; Booth *et al.*, 1990; Braun *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1989; Crystall *et al.*, 1989; Seibert *et al.*, 1988). Nos propres mesures faites avec le PS II CC corroborent ces observations. Il s'agit donc d'un paramètre spectroscopique important permettant d'évaluer l'intégrité du PS II CC. En effet, ces auteurs ont démontré que cette bande à 676 nm subit un déplacement vers le bleu pouvant aller jusqu'à 670 nm lorsque le complexe est endommagé. Ce critère sera donc utilisé pour évaluer l'état du PS II CC *in situ* à l'interface air-eau (voir Chapitre 2).

1.4.2 Fluorescence

L'énergie absorbée par les différents pigments qui composent le PS II est, dans des conditions physiologiques normales, acheminée au centre réactionnel où cette énergie est essentiellement convertie en énergie chimique par une série d'étapes photochimiques. Cependant, même dans les meilleures conditions d'emmagasinage d'énergie, quelques centres réactionnels peuvent relaxer à l'état fondamental en dissipant de l'énergie sous forme de chaleur ou de fluorescence. La perte et l'emmagasinage d'énergie sont donc des processus compétitifs. *In vivo*, l'émission de fluorescence peut donc indiquer l'état du PS II.

L'utilisation de la fluorescence de la chl *a* dans l'étude de l'efficacité du travail photochimique du PS II CC est facilitée par deux caractéristiques de l'appareil photosynthétique. Comme indiqué ci-haut, les caractéristiques spectrales des différents pigments qui composent l'appareil photosynthétique permettent aux pigments de transférer efficacement l'énergie qu'ils absorbent aux molécules de chl *a*. Ainsi, la presque totalité de la fluorescence générée par l'appareil photosynthétique provient de la chl *a* (Joshi et

Mohanty, 1995). Deuxièmement, l'émission de la chl *a* est modulée par sa conformation moléculaire et la dynamique de son environnement. C'est ainsi que les différents processus, de la séparation de charges jusqu'à l'activation de différentes enzymes de la phase obscure, peuvent être évalués par l'étude de la fluorescence de la chl *a*.

La fluorescence de la chl *a* a l'avantage d'être une mesure sensible et spécifique. C'est d'ailleurs sa propriété spectroscopique la plus étudiée (pour d'excellentes revues, consulter Govindjee, 1995; Holzwarth, 1995; Dau, 1994 a et b; van Grondelle *et al.*, 1994). Les spectres de fluorescence de la chl *a* varient en fonction des conditions expérimentales mais, de façon générale, on observe une bande principale autour de 680 nm. Il s'agit de l'émission produite par le retour d'un électron du niveau excité inférieur π^*_1 (Q) vers l'état fondamental. Les autres états excités (Soret) subissent une désactivation non radiative jusqu'à ce niveau π^*_1 et n'émettent donc pas de fluorescence. Un spectre de fluorescence caractéristique du PS II CC en solution apparaît à la Figure 1.7 et montre un maximum situé à 683 nm.

Tout comme la bande rouge en absorption, plusieurs auteurs ont démontré que la bande de fluorescence à 680 nm de la chl *a* du RC est aussi sensible à l'intégrité de ce complexe (Montoya *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1989; Crystall *et al.*, 1989). Ils ont établi qu'en cours de dénaturation, cette bande subit également, tout comme l'absorption, un déplacement vers le bleu. Il s'agit donc d'un second critère d'évaluation de l'intégrité du complexe. La spectroscopie de fluorescence sera donc utilisée pour évaluer l'état du PS II CC *in situ* à l'interface air-eau (voir Chapitre 2).

1.4.3 Infrarouge

Les pigments ne représentent qu'une partie des constituants du PS II CC. Une seconde constituante essentielle à son intégrité et sa fonction est son squelette polypeptidique. Comme décrit au Tableau 1.1, le PS II CC est formé plusieurs polypeptides dont les caractéristiques spectroscopiques peuvent également être étudiées. L'une des façons les plus facilement accessibles, et qui donne d'importants renseignements sur la structure secondaire des polypeptides, est la spectroscopie infrarouge (IR) (Siebert, 1995). En effet, les diverses structures secondaires telles que les hélices- α , les feuillets- β (parallèles et antiparallèles) ainsi que les pelotes statistiques se distinguent par la fréquence de leurs bandes de vibrations amide I respectives. Le Tableau 1.2 présente ces fréquences de vibration pour quelques unes des principales structures polypeptidiques rencontrées (Jackson et Mantsch, 1995).

Tableau 1.2 Fréquences de vibration amide I de différentes structures secondaires des protéines.

Structure	Fréquence (cm ⁻¹)
Feuillet- β antiparallèle	1675-1695
Hélice- α	1648-1660
Pelote statistique	1640-1648
Feuillet- β	1625-1640

Ainsi, on peut supposer que le spectre infrarouge du PS II CC présentera une importante bande autour de 1648-1660 cm⁻¹ puisqu'il contient plusieurs polypeptides

possédant des hélices- α transmembranaires (voir Tableau 1.1). C'est d'ailleurs ce qu'ont constaté les chercheurs qui ont mesuré le spectre infrarouge de membranes enrichies en PS II (Chapados *et al.*, 1991 et 1990) ou de RC du PS II (He *et al.*, 1991).

La spectroscopie IR est maintenant régulièrement utilisée dans la détermination de la structure secondaire des protéines. Lorsque la structure secondaire d'une protéine est altérée, son spectre IR est modifié principalement dans la région des bandes de vibrations amide I. Ce type de spectroscopie permet donc de détecter les changements structuraux et fonctionnels des protéines. Il s'agit donc d'un outil, comme l'absorption et la fluorescence, qui sera utilisé pour fournir des indications sur la structure et l'intégrité du PS II CC après son étalement à l'interface air-eau (voir Chapitre 3).

Le but ultime de ce travail étant de cristalliser le PS II CC en deux dimensions, la prochaine section présentera les approches pouvant être éventuellement envisagées pour atteindre ce but.

1.5 Cristallisation bidimensionnelle du PS II CC

La structure tridimensionnelle exacte du PS II CC est, à ce jour, encore inconnue. Plusieurs équipes tentent depuis bientôt dix ans de produire des cristaux de ce complexe afin de déterminer sa structure (Morris *et al.*, 1997; Holzenberg *et al.*, 1996; Marr *et al.*, 1996; Nakazato *et al.*, 1996; Tsiotis *et al.*, 1996; Fotinou *et al.*, 1993; Bassi *et al.*, 1989). Cependant, la résolution d'environ 20 Å obtenue jusqu'à maintenant n'est pas suffisante pour déterminer sa structure à l'échelle atomique. La grande majorité des cristaux de PS II CC qui ont été produits sont de cristaux bidimensionnels. En effet, les études par microscopie électronique (par analyse d'image de particules de PS II CC) démontrent que

ce complexe possède, du côté luménal, une protubérance importante qui pourrait très bien inhiber la cristallisation tridimensionnelle du complexe (Boekema *et al.*, 1995). Toutes les avenues disponibles pour la cristallisation bidimensionnelle du PS II CC doivent donc être explorées.

L'une d'elles est certainement l'utilisation de la méthode des monocouches. En effet, depuis maintenant près de 15 ans, pas moins d'une soixantaine de publications sont apparues, décrivant l'utilisation de cette technique en vue de cristalliser diverses protéines en deux dimensions (voir, par exemple, Chiu *et al.*, 1997; Darst *et al.*, 1991; Uzgiris et Kornberg, 1983).

1.6 Méthode des monocouches et cristallisation bidimensionnelle de protéines

Les monocouches ont longtemps été considérées exclusivement comme étant des systèmes moléculaires biomimétiques permettant d'acquérir de l'information sur l'organisation, la structure et le fonctionnement de dispositifs biologiques complexes. Cette méthode a d'ailleurs permis l'étude de plusieurs systèmes biologiques naturels dont les protéines. La plupart des travaux en films de Langmuir privilégient cependant l'étude des protéines solubles ou membranaires adsorbées à une monocouche lipidique. Ainsi, au milieu des années 80, l'équipe allemande du groupe de Möhwald s'est tout particulièrement intéressée aux interactions entre des complexes photosynthétiques et des lipides (Riegler *et al.*, 1985; Heckl *et al.*, 1985a et b).

Une seconde approche dans l'étude des polypeptides à l'interface air-eau consiste à bâtir un système macromoléculaire organisé en utilisant des lipides fonctionnalisés auxquels se lient des protéines. Diverses équipes dans le monde s'intéressent activement à

cette avenue de recherche (Lebeau *et al.*, 1995; Brisson *et al.*, 1994; Célia *et al.*, 1994; Darst *et al.*, 1991; Ahlers *et al.*, 1990). Ces études ouvrent la voie à des systèmes spécialisés dans la reconnaissance moléculaire mais surtout à la cristallisation bidimensionnelle de protéines, études qui sont également applicables aux protéines photosynthétiques (Hara *et al.*, 1996).

Une troisième approche consiste à étaler, directement à l'interface air-eau, des fractions membranaires enrichies en polypeptide d'intérêt. Ce type d'étude implique non pas l'utilisation de molécules individuelles, mais plutôt de domaines préalablement formés (Erokhin et Feigin, 1991; Salesse *et al.*, 1990). Enfin, une dernière approche consiste à l'étude de films de Langmuir composés de protéines membranaires isolées (Erokhin et Feigin, 1991; Uphaus *et al.*, 1997). Ces systèmes protéiques sont tout particulièrement appropriés aux études à l'interface air-eau. Cependant, la préparation de monocouches protéiques stables est une opération délicate puisque la tension superficielle de l'eau est très élevée et peu facilement provoquer la dénaturation des protéines, et tout spécialement dans le cas des protéines membranaires lorsqu'elles sont étalées sur une sous-phase aqueuse (Yasuda *et al.*, 1992). Par contre, l'avantage d'étudier ces protéines est qu'elles possèdent une portion hydrophobe très importante et quelques parties hydrophiles. En effet, cette structure particulière devrait permettre une orientation spécifique de ces protéines à l'interface air-eau, de façon à ce que les boucles hydrophiles reliant les hélices- α interagissent avec l'eau alors que les hélices- α hydrophobes interagissent entre elles. De plus, les domaines hydrophobes retiennent les protéines à l'interface, les empêchant ainsi de pénétrer dans la sous-phase et pourraient éventuellement permettre la formation d'interactions protéines-protéines, favorisant ainsi la cristallisation bidimensionnelle. Aussi, ces domaines hydrophobes permettent d'atteindre des pressions de surface élevées, soit d'environ 50 à 60 mN/m. Dans plusieurs cas, les aires moléculaires limites obtenues

sont en accord avec le diamètre de la protéine tel que déterminé par des mesures cristallographiques (Erokhin et Feigin, 1991). Cependant, malgré les avantages que peuvent offrir les monocouches en cristallisation bidimensionnelle, jusqu'à ce jour, aucune protéine photosynthétique n'a été cristallisée par cette méthode. Néanmoins, plusieurs équipes s'intéressent aux études en monocouche de ce type de protéine.

Les protéines photosynthétiques qui ont été étudiées par la méthode des monocouches sont principalement les RC des bactéries photosynthétiques bien que quelques études portent également sur le RC du PS II. L'étude des arrangements monomoléculaires de ces protéines n'est pas sans intérêt. En effet, les films de RC pourraient être utilisés comme biosenseurs ou comme biophotoélectrodes (Katz, 1994). Étant donné que nous avons utilisé la méthode des monocouches comme approche pouvant permettre de cristalliser le PS II CC en deux dimensions, nous ferons maintenant une revue de l'état des connaissances dans le domaine des monocouches des protéines photosynthétiques, incluant le rôle du détergent, la solubilité de ces protéines dans la sous-phase, la dénaturation des protéines suite à leur étalement à l'interface air-eau, l'épaisseur et la rugosité des films et, finalement, leur orientation en monocouche.

1.7 Monocouches de protéines photosynthétiques

Plusieurs équipes se sont intéressées aux monocouches de RC bactériens et, plus récemment, aux films de RC du PS II. Voici une description des découvertes de chaque équipe en identifiant également les aspects qui seront abordés dans nos propres recherches.

1.7.1 Rôle du détergent dans les propriétés de surface

Selon Zaitsev *et al.* (1992), les isothermes de pression de surface des RC de trois bactéries photosynthétiques (*C. aurantiacus*, *Rb. sphaeroides*, *Rps. viridis*) possèdent deux régions montrant des caractéristiques différentes. À basse pression de surface et jusqu'à environ 31 mN/m, la monocouche de RC est dans un état liquide-expansé (Andelman *et al.*, 1994; Knobler, 1990). Lorsque la compression est poursuivie au-delà de 31 mN/m, un changement de pente dans les isothermes de pression de surface indique que le détergent est complètement expulsé de la monocouche et que les complexes protéiques développent de nouvelles interactions les uns avec les autres, ce qui conduit à un état condensé. Le détergent joue donc un rôle plus important dans les caractéristiques des monocouches de RC aux pressions de surface inférieures à 30 mN/m.

De même, dans le cas des monocouches du RC du PS II, Uphaus *et al.* (1997) ont également observé une telle dissolution du détergent dans la sous-phase. En considérant que l'établissement de fortes interactions entre les protéines en monocouche est nécessaire pour qu'il y ait cristallisation, l'élimination du détergent de la monocouche est un facteur primordial. Dans l'étude de Uphaus, le détergent est éliminé par la compression-décompression-recompression successive de la monocouche. Cependant, cette approche a provoqué la dénaturation de la protéine étalée à l'interface comme démontré par l'augmentation de son aire moléculaire lors de la seconde compression (Uphaus *et al.*, 1997).

1.7.2 Solubilité des protéines photosynthétiques dans la sous-phase

Zaitsev et ses collaborateurs (Zaitsev *et al.*, 1992 et 1991) ont observé que lorsqu'ils

utilisent des monocouches de RC de *Rb. sphaeroides* (sous-unités **M**¹, **L** et **H**) et de *Rps. viridis* (sous-unités **M**, **L**, **H** et **C**), les aires moléculaires dépendent largement de la concentration en sel dans la sous-phase alors qu'il n'y a aucune dépendance dans le cas des RC de *C. aurantiacus* (sous-unités **M** et **L**). En fait, à faible force ionique (tampon phosphate 1 mM), les RC de *Rb. sphaeroides* (sous-unités **M**, **L** et **H**) et *Rps. viridis* (sous-unités **M**, **L**, **H** et **C**) qui possèdent donc respectivement une et deux des sous-unités hydrophiles (**H** et **C**), sont solubilisés dans la sous-phase lors de la compression, ce qui diminue l'aire moléculaire observée. Par contre, le RC de *C. aurantiacus*, qui ne comporte que les polypeptides hydrophobes **M** et **L**, demeure à l'interface quelle que soit la force ionique de la sous-phase. En fait, une force ionique élevée (tampon phosphate 1M) est nécessaire pour maintenir les RC de *Rb. sphaeroides* et *Rps. viridis* à l'interface air-eau suite à leur étalement. Ces études démontrent donc l'importance de la concentration ionique de la sous-phase qui joue un rôle déterminant dans le maintien des complexes protéiques à l'interface, surtout lorsque ces complexes possèdent des sous-unités hydrophiles.

Une équipe japonaise a étudié l'unité photoréactive (PRU) ainsi que le RC de la bactérie *Rps. viridis* en monocouche. Dans l'une des études sur le PRU (Hara *et al.*, 1991), dont la masse moléculaire est de 368 kDa, l'extrait membranaire est solubilisé dans le détergent CHAPS. LE PRU étant un complexe transmembranaire, il possède aussi deux surfaces hydrophiles de part et d'autre du complexe. Les auteurs ont constaté que le PRU est soluble dans une sous-phase à faible force ionique mais devient insoluble à force ionique élevée, ce qui permet d'étaler le complexe protéique à l'interface. Cette équipe s'est aussi intéressée aux films de RC bactériens (Yasuda *et al.*, 1991). Ils ont traité les membranes de *Rps. viridis*, qui sont riches en PRU, avec le détergent LDAO, ce qui leur a

¹ Ces lettres ont été mises en gras afin de les distinguer des polypeptides du PS II CC.

permis d'éliminer les polypeptides du complexe collecteur de lumière. Le complexe obtenu est donc plus petit que le PRU initial, soit un RC dont la masse moléculaire est de 137 kDa. L'étalement et le maintien à l'interface de ce RC sur une sous-phase de faible force ionique (BaCl_2 2 mM) a été effectué avec succès. Cette étude contredit donc les résultats de Zaitsev (Zaitsev *et al.*, 1992 et 1991) cités ci-haut.

Uphaus *et al.* (1997) se sont également intéressés à l'évaluation de la stabilité des films de RC du PS II en monocouche à 25 et 35 mN/m. Ils ont observé que pour obtenir une pression de surface stable en utilisant une faible force ionique (1 mM Tris-HCl pH 7.2; 0.03% dodecyl- β -D-maltoside), il était nécessaire de comprimer le film pendant les 15 premières minutes après avoir atteint une pression de surface de 25 ou 35 mN/m. Ils ont attribué la réduction de l'aire moléculaire correspondante à l'élimination de l'excès de détergent de la monocouche par sa solubilisation dans la sous-phase. Ils en ont donc conclu que les protéines du RC demeuraient à l'interface air-eau après leur étalement et ce, malgré la faible force ionique de la sous-phase utilisée. Cette conclusion est soutenue par le fait que la stabilité de la pression de surface est finalement atteinte après 15 minutes, d'où l'arrêt de la solubilisation du matériel dans la sous-phase. Cependant, il est clair que cette interprétation devrait être appuyée par des données spectroscopiques pour être vraiment convaincante (voir Chapitre 3). Par ailleurs, ils ont mentionné que la pression de surface reste toujours instable lorsqu'elle est maintenue à une faible valeur. Par contre, dans ce cas-ci, ils ont interprété ce résultat par la solubilisation des RC dans la sous-phase, les protéines du film ne pouvant interagir suffisamment fortement les unes avec les autres aux faibles pressions de surface.

1.7.3 Dénaturation des protéines photosynthétiques à l'interface air-eau

L'équipe de Miyake a étudié l'effet de la densité initiale d'étalement sur la dénaturation des RC bactériens à l'interface air-eau (Yasuda *et al.*, 1992). Ils ont observé qu'à haute densité d'étalement ($45 \text{ nm}^2/\text{RC}$), les isothermes de pression de surface montrent une transition de phase distincte et un changement de pente important. À cette densité, ils obtiennent une aire moléculaire extrapolée de $25 \text{ nm}^2/\text{RC}$ ce qui est en accord avec les valeurs obtenues par diffraction des rayons-X du cristal de RC. Une diminution de la densité d'étalement initiale produit un affaissement de l'isotherme caractéristique qu'ils interprètent comme une expansion de la structure des protéines à l'interface. La détermination de conditions expérimentales adéquates qui préservent la structure secondaire des protéines membranaires, lorsqu'elles sont étalées à l'interface air-eau, est donc essentielle à toute étude visant la cristallisation bidimensionnelle.

Un second facteur s'est avéré essentiel à la préservation de la structure du RC du PS II lors des études en monocouche. Il s'agit de la vitesse de compression. En effet, Chumanov *et al.* (1993) ont démontré que la bande maximum de fluorescence de la chl *a* de films LB de RC se déplace de 681 à 671 nm lorsque la vitesse de compression passe de 40 à $7.5 \text{ cm}^2/\text{min}$. Ces auteurs démontrent que ce déplacement spectral vers le bleu est caractéristique de la dénaturation des RC en solution. À vitesse de compression intermédiaire, les auteurs ont constaté que le spectre de fluorescence montrait un maximum à 681 nm accompagné d'un large épaulement à 671 nm, ce qui indique une dénaturation partielle. Il est important de mentionner que pour conclure à la dénaturation de ces complexes protéiques, il est essentiel de déterminer, en plus de l'état des pigments par spectroscopie électronique, l'état du squelette polypeptidique suite à leur étalement en monocouche à l'interface air-eau par des mesures en infrarouge (voir Chapitre 3).

1.7.4 Épaisseur et rugosité des films de protéines photosynthétiques et dimensions de ces complexes

Plus récemment, l'équipe de Zaitsev s'est intéressée à la caractérisation, par la réflectivité des rayons-X, de films Langmuir-Blodgett (LB) de RC provenant de différentes bactéries photosynthétiques (Zaitsev et Lvov, 1995). En étalant huit monocouches de RC sur substrat solide, à 40 mN/m, ils ont déterminé l'épaisseur totale et la rugosité des films. Dans les cas des RC de *Rb. sphaeroides* et *Rps. viridis*, l'épaisseur totale des huit monocouches a été évaluée à 30.5 nm et 34.0 nm, respectivement, alors que, dans les deux cas, la rugosité était inférieure à 1.5 nm. Ces valeurs correspondent donc à l'épaisseur d'une seule monocouche de RC de 38.1 Å et 42.5 Å (Zaitsev et Lvov, 1995), et aux dimensions transmembranaires des RC. Les réflexions de Bragg observées dans ces films de RC permettaient de conclure que les films montraient des couches distinctes avec des frontières bien définies. Par contre, dans le cas des RC de *C. aurantiacus*, les films sont désorganisés.

Le groupe d'Erokhin s'est également penché sur la caractérisation des dimensions du RC de *Rb. sphaeroides* par la diffraction des rayons-x à angle rasant (Erokhin et Feigin, 1991; Erokhin *et al.*, 1987). Ils ont observé qu'en solution, les RC ont une forme approximativement cylindrique avec un diamètre de 30 ± 5 Å et une épaisseur de 75 ± 5 Å. Le centre du cylindre est entouré d'une ceinture de détergent qui augmente le diamètre externe du complexe protéine-détergent jusqu'à 45 ± 5 Å. Cette ceinture a une hauteur de 45 ± 5 Å. Elle couvre donc les 2/3 de l'épaisseur totale du RC, ce qui représente probablement les parties hydrophobes du complexe protéique. Cependant, d'après l'isotherme de pression de surface, les RC ont une aire moléculaire de $2\,500$ Å² (soit un rayon de 28 Å). Les auteurs attribuent la différence observée entre ces deux mesures à la

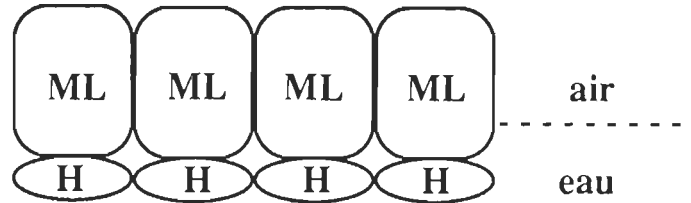
solubilisation partielle des RC dans la sous-phase. Cependant, ces auteurs ne considèrent pas la possibilité que l'excès de détergent pourrait être éliminé dans la sous-phase, favorisant ainsi les interactions hydrophobes entre les protéines. Dans ce cas, le diamètre observé en solution, sans tenir compte de la ceinture de détergent, soit $30 \pm 5 \text{ \AA}$, est tout à fait similaire à l'aire obtenue en monocouche. Selon ces auteurs, l'épaisseur de la monocouche en film LB est de 86 \AA . Cette valeur est deux fois plus grande que celle rapportée par Zaitsev et Lvov (1995). Il est donc possible qu'il s'agisse plutôt, dans ce cas-ci, d'une bicouche de RC bactériens.

1.7.5 Orientation des protéines photosynthétiques à l'interface air-eau

L'équipe de Zaitsev et ses collaborateurs s'est aussi intéressée aux films de Langmuir orientés constitués de RC bactériens (Zaitsev *et al.*, 1992 et 1991). Ils ont observé que l'asymétrie polypeptidique du RC de *Rb. sphaeroides* permet d'orienter spontanément (à 80%) le RC de façon à ce que la sous-unité **H**, polypeptide ancré à l'une des faces hydrophiles du complexe central (**ML**), soit dirigée vers la sous-phase (Figure 1.8A). Dans le cas du RC de *Rps. viridis* (Figure 1.8B), la présence du cytochrome (**C**) additionnel, plus hydrophile que la sous-unité **H**, qui est ancré à la face hydrophile opposée du complexe central (**ML**), permet d'orienter préférentiellement le cytochrome vers la sous-phase.

Les études de Erokhin et Feigin (1991) démontrent également que les RC de *Rb. sphaeroides* s'orientent spontanément par rapport à l'interface air-eau. Cependant, ces auteurs n'observent qu'une orientation préférentielle du RC de 12% (56% vs 44%).

A - *Rb. sphaeroides*



B - *Rps. viridis*

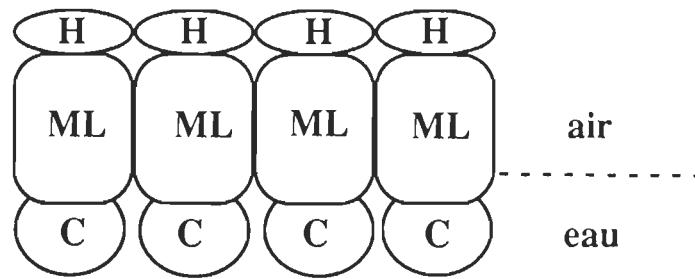


Figure 1.8 Orientation des centres réactionnels bactériens en fonction de l'espèce bactérienne et des polypeptides qui les composent. **M** et **L**: polypeptides hydrophobes; **H**: polypeptide hydrophile; **C**: cytochrome hydrophile (voir la liste des abréviations et le texte pour une définition plus élaborée de ces sous-unités) (Zaitsev *et al.*, 1992).

1.8 Objectifs spécifiques de ce travail de recherche

À la lumière des études discutées ci-dessus, nous avons élaboré une problématique de recherche en ciblant les questions sur lesquelles nous désirions nous pencher. Dans le but ultime de cristalliser le PS II CC en monocouche, nous avons décidé de privilégier les mesures *in situ* à l'interface air-eau aux dépositions conventionnelles sur substrats solides. Auparavant, les chercheurs n'avaient pas accès à des appareils leur permettant d'observer d'infimes changements optiques directement à l'interface air-eau. L'étude de la structure et de l'intégrité de protéines membranaires étalées sur une surface aqueuse par la détermination de leurs caractéristiques spectroscopiques était donc très problématique. Cependant, notre équipe de recherche ainsi que divers collaborateurs ont mis au point différents instruments spécialement construits pour effectuer des mesures directement à l'interface air-eau, ouvrant ainsi une nouvelle sphère de recherche.

Lors de mesures préliminaires qui ne seront pas discutées dans le présent travail, nous avons observé que l'étalement de l'échantillon de PS II CC directement à l'interface air-eau à l'aide d'une seringue faisait plonger la goutte profondément dans la sous-phase. Il en résultait une perte de matériel et un manque de reproductibilité des isothermes. Tous les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus en utilisant la méthode d'étalement de Trurnit (1960), où la solution contenant l'échantillon descend le long d'une tige de verre qui repose dans le fond du bain de monocouche mais dont l'extrémité arrondie est humectée et émerge de la sous-phase.

Nous avons donc, dans un premier temps, étudié les isothermes de pression et de potentiel de surface du PS II CC dans deux conditions expérimentales différentes. En effet, les études de Yasuda *et al.* (1992), portant sur les films LB de RC de *Rps. viridis*,

démontrent que la densité d'étalement était l'un des facteurs importants permettant d'obtenir des films monomoléculaires de protéines intactes. Nous avons donc vérifié l'effet d'un étalement à une pression de surface initiale d'environ 5 mN/m immédiatement suivi de la compression. Nous avons ensuite cherché des conditions expérimentales qui, incontestablement, peuvent mener à la dénaturation du PS II CC. Ainsi, les mesures ont été répétées en étalant le PS II CC à l'interface air-eau à une pression de surface initiale presque nulle (0.6 mN/m). Le film est ensuite incubé à cette pression de surface durant 30 minutes avant la compression du film.

Un second facteur pouvant influencer l'état du PS II CC à l'interface air-eau est la vitesse de compression, comme démontré par Chumanov *et al.* (1993) pour le RC du PS II. Nous avons donc choisi d'étudier l'effet de trois vitesses de compression différentes et ce, dans chacune des deux conditions initiales d'étalement. Ainsi, les isothermes de pression et de potentiel de surface ont été mesurés à des vitesses de 10, 40 et 80 nm²/molécule·min. Nous nous sommes cependant assurés, dans un premier temps, de la reproductibilité de ces isothermes. Par la suite, nous avons vérifié l'effet du détergent employé lors de l'extraction du PS II CC sur les propriétés de surface du complexe. Une caractérisation systématique des isothermes de pression et de potentiel de surface du détergent seul a donc été effectuée et les isothermes obtenues comparées à celles des extraits photosynthétiques. Afin de respecter les conditions expérimentales, le détergent est solubilisé dans la même solution que le PS II CC et un volume égal à celui du PS II CC a été étalé à l'interface air-eau. Les mêmes conditions expérimentales de pression de surface initiale ainsi que de vitesse de compression furent étudiées.

L'étape suivante est de s'assurer de l'intégrité du PS II CC lors de l'étalement à l'interface. Pour ce faire, nous avons préalablement étudié les propriétés spectroscopiques

natives du PS II CC en solution pour ensuite les comparer, à titre de référence, aux mesures subséquemment obtenues à l'interface air-eau. L'effet de la densité initiale d'étalement du PS II CC ainsi que de la vitesse de compression sur les spectres d'absorption et de fluorescence fût ensuite mesurée afin de trouver les conditions expérimentales minimisant les dommages au complexe protéique étalé à l'interface air-eau.

L'étude de la microscopie de fluorescence du PS II CC en monocouche nous a permis de vérifier, entre autres, l'état d'agrégation du complexe à l'interface air-eau. En effet, dans le but de cristalliser le PS II CC, nous devons nous assurer que ce complexe est distribué de façon uniforme à l'interface air-eau.

Les mesures des propriétés de surface, telles que le potentiel ou la pression de surface peuvent nous informer, de façon empirique, sur l'état général du PS II CC en monocouche. Cependant, elles ne permettent pas de spécifier la nature exacte des phénomènes qui produisent soit une augmentation de l'aire moléculaire ou soit une transition de phase dans les isothermes. De même, la mesure des propriétés spectroscopiques électroniques (absorption et fluorescence), bien que riche en information sur l'état du PS II CC à l'interface, ne permet pas de discuter en profondeur de l'état du squelette polypeptidique du PS II CC lorsqu'il est soumis à différentes conditions expérimentales. Nous avons donc eu recours à la spectroscopie PM-IRRAS ("polarization modulated infrared reflection absorption spectroscopy") pour étudier directement l'effet des deux densités initiales d'étalement ainsi que des trois vitesses de compression sur la structure secondaire du PS II CC à l'interface air-eau. La détermination des fréquences de vibration de la bande amide I a donc permis de vérifier l'état de la structure secondaire du PS II CC étalé à l'interface air-eau. Cette méthode est également sensible à l'orientation des éléments vibrationnels. Elle permet donc l'élimination des bandes vibrationnelles isotropes de l'eau. Sont détectés.

seulement les éléments de vibration qui sont sélectivement orientés et non pas les structures désorganisées dont l'orientation est isotrope. Aussi, cette méthode *in situ* permet de calculer l'angle moyen que font les hélices- α avec la normale à l'interface.

Par ailleurs, compte tenu que la structure du PS II CC obtenue lors de sa purification selon la méthode de Haag *et al.* (1990), implique que les surfaces stromales du PS II CC sont en contact (voir Figure 1.5), nous avons vérifié s'il est possible de construire un arrangement monomoléculaire de PS II CC à l'interface air-eau. En effet, d'après les images obtenues par Boekema *et al.* (1995), il est évident, qu'en solution, ce complexe se présente sous une forme empilée qui n'est pas sans rappeler l'empilement granulaire des membranes thylacoïdiennes. Cependant, les forces présentes à l'interface air-eau pourraient bien être suffisantes, surtout en présence de cations monovalents, pour provoquer la séparation stromale des PS II CC. La mesure de l'épaisseur de la monocouche par la réflectivité des rayons-X a permis de clarifier cette question.

De plus, en supposant qu'un film monomoléculaire de PS II CC puisse être obtenu, nous voulions examiner l'orientation des PS II CC à l'interface air-eau. En effet, l'asymétrie de structure causée par la présence du polypeptide de 33 kDa du côté luménal (voir Figure 1.5) pourrait orienter préférentiellement le PS II CC et ce, de façon analogue à la présence du polypeptide **H** face aux monocouches de RC de *Rb. sphaeroides*, comme mentionné ci-dessus (Figure 1.8) (Zaitsev *et al.*, 1992). L'analyse des données obtenues en réflectivité des rayons-X du PS II CC en monocouche nous a permis d'évaluer cette hypothèse.

1.9 Références

- Ahlers, M., Müller, W., Reichert, A., Ringsdorf, H. et Venzmer, J. Specific interactions of proteins with functional lipid monolayers. Ways of simulating biomembrane processes. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1990, 20, 1269-1285.
- Andelman, D., Brochard, F., Knobler, C. et Rondelez, F. Structures and phase transitions in Langmuir monolayers. In W. M. Gelbart, A. Ben-Shaul & D. Rioux (Éds.), Micelles, membranes, microemulsions, and monolayers. New York: Springer-Verlag, 1994, pp. 559-602.
- Barbato, R., Race, H. L., Frisco, G. et Barber, J. Chlorophyll levels in the pigment-binding proteins of photosystem II. A study based on the chlorophyll to cytochrome ratio in different photosystem II preparations. FEBS Lett., 1991, 286, 86-90.
- Bassi, R., Magaldi, A. G., Tognon, G., Giacometti, G. M. et Miller, K. R. Two-dimensional crystals of the photosystem II reaction center complex from higher plants. Eur. J. Cell Biol., 1989, 50, 84-93.
- Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J. et Rögner, M. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 175-179.
- Booth, P. J., Crystall, B., Giorgi, L. B., Barber, J., Klug, D. R. et Porter, G. Thermodynamic properties of D1/D2/cytochrome *b*-559 reaction centres investigated by time-resolved fluorescence measurements. Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1016,

141-152.

Braun, P., Greenberg, B. M. et Scherz, A. D1-D2-cytochrome *b559* complex from the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*: correlation between complex integrity, spectroscopic properties, photochemical activity, and pigment composition. Biochemistry, 1990, 29, 10376-10387.

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. Biology of the Cell, 1994, 80, 221-228.

Célia, H., Hoermann, L., Schultz, P., Lebeau, L., Mallouh, V., Wigley, D. B., Wang, J. C., Mioskowski, C. et Oudet, P. Three-dimensional model of Escherichia coli gyrase B subunit crystallized in two-dimension on novobiocin-linked phospholipid films. J. Mol. Biol., 1994, 236, 618-628.

Chapados, C., Lemieux, S. et Carpentier, R. Infrared study of a photosystem II submembrane preparation. In M. Baltscheffsky (Éd.), Current research in photosynthesis. Dordrecht: Kluwer, 1990, pp. I.1.343-346.

Chapados, C., Lemieux, S. et Carpentier, R. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. Biophys. Chem., 1991, 39, 225-239.

Chapman, D. J., Gounaris, K et Barber, J. The D1/D2/cytochrome *b559* photosystem two reaction centre from *Pisum sativum* L.: isolation, characterization and damage by light. Photosynthetica, 1989, 23, 411-426.

- Chiu, W., Avila-Sakar, A. J. et Schmid, M. F. Electron crystallography of macromolecular periodic arrays on phospholipid monolayers. Adv. Biophys., 1997, 34, 161-172.
- Chumanov, G., Picorel, R., Toon, S., Seibert, M. et Cotton, T. M. Structural and functional integrity of the photosystem II reaction center on silver electrodes: fluorescence and redox probes. Photochem. Photobiol., 1993, 58, 757-760.
- Crystall, B., Booth, P. J., Klug, D. R., Barber, J. et Porter, G. Resolution of a long lived fluorescence component from D1/D2/cytochrome *b*-559 reaction centres. FEBS Lett., 1989, 249, 75-78.
- Darst, S. A., Ahlers, M., Meller, P. H., Kubalek, E. W., Blankenburg, R., Ribí, H. O., Ringsdorf, H. et Kornberg, R. D. Two-dimensional crystals of streptavidin on biotinylated lipid layers and their interactions with biotinylated macromolecules. Biophys. J., 1991, 59, 387-396.
- Dau, H. Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. Photochem. Photobiol., 1994a, 60, 1-23.
- Dau, H. Short-term adaptation of plant to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission. J. Photochem. Photobiol., 1994b, 26, 3-27.
- Erokhin, V. V. et Feigin, L. A. Deposition and investigation of protein Langmuir-Blodgett films. Prog. Colloid Polym. Sci., 1991, 85, 47-51.

- Erokhin, V. V., Feigin, L. A., Kayushina, R. L., Lvov, Y. M., Kononenko, A. A, Knox, P. P. et Zakharova, N. I. Langmuir films of photosynthetic reaction centers from purple bacteria. Studia Biophys., 1987, 122, 231-236.
- Fleischman, D. Photosynthesis. In N. Sperelakis (Éd.), Cell physiology: source book. New York: Academic Press, 1995, pp. 682-696.
- Fotinou, C., Kokkinidis, M., Fritsch, G., Haase, W., Michel, H. et Ghanotakis, D. F. Characterization of a photosystem II core ant its three-dimensional crystals. Photosynth. Res., 1993, 37, 41-48.
- Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. Aust. J. Plant Physiol., 1995, 22, 131-160.
- Haag, E., Irrgang, K.-D., Boekema, E. J. et Renger, G. Functional and strucural analysis of photosystem II core complex from spinach with high oxygen evolution capacity. Eur. J. Biochem., 1990, 189, 47-53.
- Hankamer, B., Barber, J. et Boekema, E. J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1997, 48, 641-671.
- Hansson, O. et Wydrzynski, T. Current perceptions of photosystem II. Photosynth. Res., 1990, 23, 131-162.

- Hara, M., Majima, T., Ajiki, S.-I., Sugino, H., Toyotama, H., Ueno, T., Asada, Y. et Miyake, J. Multilayer preparation of bacterial photosynthetic membrane with a certain orientation immobilized on the solid surface by avidin-biotin interaction. Bioelectrochem. Bioenerg., 1996, 41, 127-129.
- Hara, M., Yasuda, Y. et Miyake, J. Interfacial films of the membrane protein: Photoreaction unit. Abstract booklet of the fifth international conference on Langmuir-Blodgett films, 1991, p. IP6. (Résumé)
- He, W.-Z., Newell, W. R., Haris, P. I., Chapman, D. et Barber, J. Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction center and conformational changes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochemistry, 1991, 30, 4552-4559.
- Heckl, W. M., Lösche, M. et Möhwald, H. Langmuir-Blodgett films containing proteins of the photosynthetic process. Thin Solid Films, 1985a, 133, 73-81.
- Heckl, W. M., Lösche, M., Sheer, H. et Möhwald, H. Protein/lipid interactions in phospholipid monolayers containing the bacterial antenna protein B800-850. Biochim. Biophys. Acta, 1985b, 810, 73-83.
- Holzenberg, A., Flint, T. B., Shepherd, F. H. and Ford, R. C. Photosystem II: mapping the locations of the oxygen evolution-enhancing subunits by electron microscopy. Micron, 1996, 27, 121-127.
- Holzwarth, A. R. Time-resolved fluorescence spectroscopy. Methods in Enzymology,

1995, 246, 334-362.

Jackson, M. et Mantsch, H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1995, 30, 95-120.

Joshi, M. K. et Mohanty, P. Probing photosynthetic performance by chlorophyll *a* fluorescence: analysis and interpretation of fluorescence parameters. J. Sci. Ind. Res., 1995, 54, 155-174.

Katz, E. Application of bifunctional reagent for immobilization of proteins on a carbon electrode surface: oriented immobilization of photosynthetic reaction centers. J. Electroanal. Chem., 1994, 365, 157-164.

Knobler, C. M. Recent developments in the study of monolayers at the air-water interface. Adv. Chem. Phys., 1990, 77, 397-449.

Kühlbrandt, W., Wang, D. N. et Fujiyoshi, Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. Nature, 1994, 367, 614-621.

Lebeau, L., Shultz, P., Célia, H., Mésini, P., Nuss, S., Klinger, C., Olland, S., Oudet, P. et Mioskowski, C. Specifically designed lipid assemblies as tools for two-dimensional crystallization of soluble biological macromolecules. In Y. Barenholz & D. D. Lasic (Éds.), Handbook of nonmedical applications of liposomes. Models for biological phenomena (Vol. II). Boca Raton: CRC Press, 1995, pp. 153-186.

Marr, K. M., Mastrorarde, D. N. et Lyon, M. K. Two-dimensional crystals of photosystem

II: biochemical characterization, cryoelectron microscopy and localization of the D1 and cytochrome b559 polypeptides. J. Cell Biol., 1996, 132, 823-833.

Montoya, G., Cases, R., Rodriguez, R., Aured, M. et Picorel, R. Detergent-induced reversible denaturation of the photosystem II reaction center: implications for pigment-protein interactions. Biochemistry, 1994, 33, 11798-11804.

Morris, E. P., Hankamer, B., Zheleva, D., Friso, G. et Barber, J. The three-dimensional structure of a photosystem II core complex determined by electron crystallography. Structure, 1997, 5, 837-849.

Nakazato, K., Toyoshima, C., Enami, I. et Inoue, Y. Two-dimensional crystallization and cryo-electron microscopy of photosystem II. J. Mol. Biol., 1996, 257, 225-232.

Riegler, J., Heckl, W. M., Peschke, J., Lösche, M. et Möhwald, H. Protein/lipid interaction of reaction center and antenna proteins. In M. E. Michel-Beyerle (Éd.), Antennas and reaction centers of photosynthetic bacteria: structure, interactions and dynamics. Berlin: Springer-Verlag, 1985, pp 207-215.

Salesse, C., Ducharme, D., Leblanc, R. M. et Boucher, F. Estimation of disk membrane lateral pressure and molecular area of rhodopsin by the measurement of its orientation at the nitrogen-water interface from an ellipsometric study. Biochemistry, 1990, 29, 4567-4575.

Seibert, M., Picorel, R., Rubin, A. B. et Connolly, J. S. Spectral, photophysical, and stability properties of isolated photosystem II reaction center. Plant Physiol., 1988,

87, 303-306.

Seidler, A. The extrinsic polypeptides of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1277, 35-60.

Siebert, F. Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems. Methods in Enzymology, 1995, 246, 501-526.

Thornber, J. P., Morishige, D. T., Anandan, S. et Peter, G. F. Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids. In H. Sheer, (Éd.), Chlorophylls. Boca Raton: CRC Press, 1991, pp 549-585.

Trumit, H. J. A theory and method for the spreading of protein monolayers. J. Colloid Sci., 1960, 15, 1-13.

Tsiotis, G., Walz, T., Spyridaki, A., Lustig, A., Engel, A. et Ghanotakis, D. Tubular crystals of a photosystem II core complex. J. Mol. Biol., 1996, 259, 241-248.

Uphaus, R. A., Fang, J. Y., Picorel, R., Chumalov, G., Wang, J. Y., Cotton, T. M. et Seibert, M. Langmuir-Blodgett and x-ray diffraction studies of isolated photosystem II reaction centers in monolayers and multilayers: physical dimensions of the complex. Photochem. Photobiol., 1997, 65, 673-679.

Uzgiris, E. E. et Kornberg, R. D. Two-dimensional crystallization technique for imaging macromolecules, with application to antigen-antibody-complement complexes. Nature, 1983, 301, 125-129.

- van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T. and Sundstrom, V. Energy transfer and trapping in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 1994, 1187, 1-65.
- van Leeuwen, P. J., Nieveen, M. C., van de Meent, E. J., Dekker, J. P. et van Gorkom, H. J. Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction particles from spinach. Photosynth. Res., 1991, 28, 149-153.
- Vermaas, W. F. J. Molecular-biological approaches to analyse photosystem II structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1993, 44, 457-481.
- Vermaas, W. F. J. et Ikeuchi, M. Photosystem II. In L. Bogorad & I. K. Vasil (Éds), Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego: Academic Press, 1991, pp 25-111.
- Whitmarsh, J. et Pakrasi, H. B. Form and function of cytochrome b₅₅₉. In D. R. Ort & C. F. Yocum (Éds.), Oxygenic photosynthesis: the light reactions. Dordrecht: Kluwer, 1996, pp 249-264.
- Williams, W. P. et Gounaris, K. Stabilisation of PS-II-mediated electron transport in oxygen-evolving PS II core preparations by the addition of compatible co-solutes. Biochim. Biophys. Acta, 1992, 1100, 92-97.
- Xu, Q. et Bricker, T. M. Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II. J. Biol. Chem., 1992, 267, 25 816-25 821.

- Yachandrā, V. K., DeRose, V. J., Latimer, M. J., Mukerji, I., Sauer, K. et Klein, M. P. Where plants make oxygen: a structural model for the photosynthetic oxygen evolving manganese cluster. Science, 1993, 260, 675-679.
- Yasuda, Y., Hirata, Y., Sugino, H., Kumei, M., Hara, M., Miyake, J. et Fujihira, M. Langmuir-Blodgett films of reaction centers of *Rhodospseudomonas viridis*: photoelectric characteristics. Thin Solid Films, 1992, 210/211, 733-735.
- Yasuda, Y., Sugino, H., Kumei, M., Hirata, Y., Miyake, J. et Fujihira, M. Preparation of Langmuir-Blodgett films of the photosynthetic proteins. Abstract booklet of the fifth international conference on Langmuir-Blodgett films, 1991, p. IP7. (Résumé)
- Zaitsev, S. Y., Kalabina, N. A. et Likashev, E. P. Design and properties of Langmuir films of photosensitive proteins. Abstract booklet of the fifth international conference on Langmuir-Blodgett films, 1991, p. IP3. (Résumé)
- Zaitsev, S. Y., Kalabina, N. A., Zubov, V. P., Lukashov, E. P., Kononenko, A. A. et Uphaus, R. A. Monolayer of photosynthetic reaction centers of green and purple bacteria. Thin Solid Films, 1992, 210/211, 723-725.
- Zaitsev, S. Y. et Lvov, Y. M. X-ray reflectivity of Langmuir-Blodgett films of reaction center proteins from photosynthetic bacteria. Thin Solid Films, 1995, 254, 257-262.

CHAPITRE 2

SURFACE AND SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF PHOTOSYSTEM II CORE
COMPLEX AT THE NITROGEN/WATER INTERFACE

soumis à la revue

Langmuir

**Surface and Spectroscopic Properties of Photosystem II Core Complex at the
Nitrogen/Water Interface**

**Judith Gallant, Hugo Lavoie, Alain Tessier, Gaétan Munger, Roger M. Leblanc* and
Christian Salesse****

GREIB, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières,
3351 Boulevard des Forges, C. P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

*Present address: Department of Chemistry, University of Miami, Coral Gables, FL 33124-
0431, USA

**Telephone number: (819) 376-5077

Fax number: (819) 376-5057

e-mail: christian_salesse@uqtr.quebec.ca

2.1 Abstract

We have studied surface and spectroscopic properties of Photosystem II core complex (PS II CC) for the first time in monolayers at the nitrogen/water interface. A new instrument was thus specially built to perform absorption and fluorescence spectroscopic measurements directly at the nitrogen/water interface. We present surface pressure and surface potential isotherms as well as *in situ* absorption and fluorescence spectra of PS II CC monolayers. We also used fluorescence microscopy to observe the characteristics of the film at the interface. Results shown here were used to establish proper experimental conditions needed to form monomolecular films of structurally intact protein complexes at the interface. The effect of initial surface density, incubation time and compression speed have been studied. We show that even though a slower speed of compression produced more homogeneous films, the speed should be fast enough to prevent surface denaturation of the protein at the interface whereas fast compression speed induced large heterogeneities. We also conclude that spreading at low surface pressure is inadequate since PS II CC is denaturated under that condition.

2.2 Introduction

Photosystem II (PS II) is a membrane pigment-protein complex responsible for the visible light driven cleavage of water molecules which produces molecular oxygen. It is present in higher plants and algae. PS II is made of several polypeptides, two of which are inner (core) antennae (CP47 and CP43, named after their apparent molecular masses). These membrane proteins contain 15 to 20 chlorophylls (chl) *a*.^{1,2} CP47 and CP43 are believed to have six transmembrane α -helices that span the membrane.³ These antennae collect and funnel excitation energy to chlorophylls located in the reaction center (RC) of the complex, where photochemical charge separation takes place. The RC is composed of five α -helices containing membrane polypeptides, namely D1 (34 kDa), D2 (32 kDa), the α (9 kDa) and β (4.5 kDa) subunits of cytochrome (cyt) *b*₅₅₉ and the small *psbI* gene product (4 kDa).⁴ The RC also comprises the following reaction species: the photooxidable special chl *a* (P680) whose nature, monomeric vs dimeric, is still under intense debate, two intermediate pheophytins *a*, two to four accessory chl *a* and two plastoquinone electron acceptors (*Q_A* and *Q_B*) and other ionic cofactors. In thylakoid membranes, PS II is also associated with an outer antenna, the light harvesting complex (LHC), and to an undetermined number of other intermediate antennas (CP29, CP26 and CP24) all binding chl *a*, chl *b* and various carotenoids. PS II is also associated with three extrinsic polypeptides which stabilize the tetra-nuclear manganese cluster facing the luminal side of thylakoid membranes and which is responsible for the binding of water molecules and production of molecular oxygen. Those PS II-associated water soluble polypeptides protecting the oxygen evolving complex (OEC) respectively weight 33, 23 and 17 kDa.

Although tremendous efforts have been made to crystallize PS II,⁵ to this day, its exact three-dimensional structure is still unknown. The putative model of PS II RC is

based on our knowledge of the bacterial RC structure which has close homology to the higher plants RC,⁶ and whose atomic structure has been solved at a resolution of 2.3 Å using well ordered three-dimensional crystals.⁷ This intense research on bacterial RC structure has stimulated considerable interest in the study of its mono- and multilayer organization.⁸⁻¹¹ This interest towards protein monolayers was not limited to bacterial RC. In recent years, many studies have been undertaken to characterize protein monolayers.¹² Membrane proteins are especially interesting to study in monomolecular assemblies since their structure contains hydrophilic area that can interact with the subphase as well as hydrophobic domains which can interact either with each other or with detergent and lipids. Working with such proteins directly at the air-water interface could become a valuable approach for their two-dimensional crystallization.¹³ Indeed, membrane proteins form mainly two-dimensional crystals.¹⁴ Up to now, only two-dimensional crystals of PS II CC have been produced.⁵ Since monolayers offer a two-dimensional organization of proteins at the interface, the monolayer methodology could be used to induce crystallization of PS II CC if excess detergent can be removed to optimize protein-protein interactions. Also, the recent development of *in situ* X-ray diffraction of protein crystal at the air/water interface¹⁵ may open the way to new research avenues that were previously unexplored.

In the present work, we have used the smallest complex able to evolve molecular oxygen called PS II core complex (PS II CC). It contains CP47, CP43, D1, D2, α and β subunits of *cyt b₅₅₉*, *psbI* gene product, and the extrinsic 33 kDa, as well as all functional cofactors located in those polypeptides which are essential to photosynthesis. However, since protein properties can be drastically altered when spread at the interface¹⁶, especially labile proteins such as PS II CC, finding the appropriate set of experimental conditions to maintain the native properties of this complex is of major importance. As an example, one must find a way to elude the effect of water surface tension which can denature protein

structure upon spreading. We investigated the effect of two different spreading conditions and three compression speeds on the physical, microscopic and spectroscopic characteristics of PS II CC monolayers. These are crucial factors influencing the homogeneity and intactness of proteins at the interface. We used surface pressure-area (π -A) and surface potential-area (ΔV -A) isotherms to study the complex behavior at the nitrogen/water interface. We also developed a new *in situ* analytical instrument to further demonstrate under which conditions the protein-pigment complex spread at the interface retains its native absorption and fluorescence characteristics. Indeed, the study of these spectroscopic properties of chl *a* bound to PS II CC allows the characterization of the complex integrity. In order to investigate the homogeneity of the film, we also observed the microscopic distribution of chl *a* fluorescence in PS II CC at the interface using *in situ* fluorescence microscopy.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Photosystem II Core Complex Isolation and Purification. PS II CC was extracted and purified from fresh spinach leaves using a previously published method.¹⁷ All manipulations were performed in darkness or under dim green light and samples were always kept on ice. The method of van Leeuwen et al.¹⁷ was modified as following: filtration of the crude extract was done with ten layers of cheese cloth and isolation of PS II CC from LHC by FPLC was performed at 4 °C with a HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance column (Pharmacia Biotech Inc.). The column was previously equilibrated with BTS400 (20 mM of Bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methane (Bis-Tris, Sigma Chemical Co.) at pH 6.5, 20 mM MgCl₂ (Fisher Scientific Co.), 5 mM CaCl₂ (Omega Chemical Company Inc.), 10 mM MgSO₄ (Sigma Chemical Co.), 400 mM sucrose (ACP Chemicals Inc.) and 0,03% (w/v) *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DM, Calbiochem). Approximately 20 ml of the extract containing PS II CC and LHC were loaded onto the ion exchange column. This volume corresponds to a total of 35 mg of chl. The column gel was then entirely green and the maximum absorption of the eluate at 280 nm (A_{280}) reached 0.9 AU. LHC was eluted from the column until the eluate became nearly colorless and the A_{280} was lower than 0.02 AU, which took 30 minutes at a flow rate of 3 ml/min. After complete elution of LHC, PS II CC was still anchored as a deep green band on the first few centimeters of the gel. Its elution was performed by increasing the MgSO₄ concentration to 75 mM. Total procedure, from leaves to pure PS II CC fractions took approximately 6 hours. Samples were then aliquoted, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use.

2.3.2 Photosystem II Core Complex Characterization. Chl concentration of PS II CC was measured with a double beam UV-VIS spectrophotometer (Model 553, Perkin-

Elmer Ltd) using a buffered 80% aqueous acetone pigment extraction as described by Porra *et al.*¹⁸

Functional integrity of PS II CC was checked by oxygen evolution measurements. A Clark-type electrode cell (Hansatech Ltd) contained PS II CC at a chl concentration of 5 μM and 1 mM of 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone (Pfaltz & Bauer, Inc.) as electron acceptor. The solution was kept at 20 °C during measurements. We used a saturating red light centered at 660 nm to induce oxygen evolution.

In order to evaluate the molar concentration of PS II CC, we have determined its cytochrome (cyt) b_{559} content. Most authors now agree that there is only one cyt b_{559} (divided into two subunits) per PS II CC.¹⁹ We used the method of De Las Rivas *et al.*²⁰ which consists in measuring the difference spectrum between the reduced (dithionite) and oxidized (ferricyanide) form of cyt b_{559} using an extinction coefficient of 17.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. The sample was diluted with BTS400 (without detergent) to a chl concentration of 0.1 mM. Difference spectra were recorded on a Hewlett Packard single beam diode array spectrophotometer (Model 8452A).

The analysis of the polypeptide composition was carried out on a Bio-Rad Mini-protean II electrophoresis cell, with experimental conditions as published by Haag *et al.*²¹ Gels were Coomassie stained and polypeptide identification was performed using low range molecular weight standards (Bio-Rad Laboratories). PS II CC were diluted five times into sample buffer and a volume of 10 μL was deposited on top of the stacking gel. Gels were run at 200 V for 50 minutes.

UV-visible absorption spectra of PS II CC were recorded with a Hewlett Packard

single beam diode array spectrophotometer (Model 8452A). In order to obtain optical densities lower than 1 AU, samples were diluted with BTS400 to obtain a PS II CC concentration of $0.17 \mu\text{M}$.

Fluorescence emission spectra were measured using a SPEX Fluorolog II spectrometer. Excitation was set at 440 nm. Excitation and emission slits were fixed at 0.5 mm. PS II CC concentration was adjusted to $0.17 \mu\text{M}$ by dilution with BTS400. All measurements were recorded at room temperature.

2.3.3 Isotherm Measurements of Photosystem II Core Complex. The Langmuir trough, built in our laboratory, is made of aluminum covered with a sheet of adhesive precoated Teflon (Johnston Industrial Plastics). The width of the trough is 121 mm and the monolayer can be compressed from a length of 767.0 mm down to 19.9 mm which gives a compression factor of 38.5. This is particularly important to measure the entire isotherm of PS II CC. The trough's depth is 6 mm. Surface pressure (π) was detected with a Wilhelmy plate system using a filter paper.²² Surface potential (ΔV) was measured with an ^{241}Am radioactive electrode (Nuclear Radiation Development) coupled with a platinum reference electrode immersed into the subphase.²³ All trough operations were controlled by computer. Monolayers were always kept under nitrogen to prevent hazardous contact of molecular oxygen with our sample.

We used the same subphase conditions for PS II CC as those reported for monolayers of bacterial RC.⁹ Hence, the subphase contained 2 mM ascorbic acid (Fisher Scientific Co.) and 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer (Tris, Boehringer Mannheim) at pH 8. However, our conditions were different from this publication with regards to the nature of the salt and its concentration. Indeed, preliminary results (not shown) indicated

that using a salt concentration as low as 2 mM CdCl₂ led to dissolution of PS II CC into the subphase. Other reports showed a similar behavior for bacterial RC from *Rb. sphaeroides* and *Rps. viridis*.^{11c} It was shown that using a dense salt solution could minimize leakage of protein material into the subphase.²⁴ However, potentially hazardous effects of CdCl₂ on PS II CC²⁵ compelled us to use a less damaging salt. We therefore measured our isotherms with 500 mM NaCl (Ultrapure, J. T. Baker Inc.). This salt concentration does not solubilize the extrinsic 33 kDa polypeptide since a 1.5 M NaCl wash does not.²⁶ Tris and NaCl were purified with chloroform (Megasolv-HPLC 99.98%, Omega Chemical Company Inc.).²³ Ultrapure water was obtained from a four cartridge demineralizing system (NANOpure, SYBRON|Barnstead). Its specific resistivity and surface tension were greater than $18 \times 10^6 \Omega \cdot \text{cm}$ and 70 mN/m, respectively. The TruNit method was used to spread PS II CC at the nitrogen/water interface.²⁷ In order to study the influence of protein surface density on the integrity of PS II CC at the interface, two initial surface pressures of 0.6 ± 0.1 and 5.7 ± 0.2 mN/m were investigated by spreading 20 and 40 μl of a 12.7 ± 0.3 μM PS II CC solution, respectively. Also, we were interested to follow the effect of compression speed on the integrity and packing of the protein complex. Therefore, three compression speeds, 10, 40 and 80 nm²/molecule-min, were investigated. When PS II CC was spread at 0.6 mN/m, the monolayer was incubated for 30 minutes prior to compression. A molecular mass of 240 kDa was used for PS II CC.²⁸

2.3.4 Design of the Instrument for *in situ* Spectroscopic Measurements at the Air-Water Interface. We collected all monolayer spectra on a new instrument specially built for *in situ* measurements at the air/water interface. Its design, which is shown in Figure 2.1, allows to measure absorption and fluorescence spectra as well as π -A isotherms of monolayers of PS II CC. All components of the instrument (trough, spectrofluorometer and spectrophotometer) are computer controlled. The home made Langmuir trough is

made of aluminum covered with adhesive precoated Teflon and equipped with a Langmuir film balance having a typical precision of ± 0.5 mN/m. Translation of the monolayer permits consecutive measurements of absorption or fluorescence spectra with the same sample. A slow flow of nitrogen can be distributed at the air-water interface with a pierced tube fixed on the side of the trough. The left part of Figure 2.1 shows the spectrofluorometer which is assembled from parts of a Spex Fluorolog II (Spex Industries Inc.). Optics are fixed on two positions permitting excitation from below (dashed line) or from above (solid line) the trough. In fact, the excitation path is selected by the position of the plane mirror (pm2). In the present work, excitation was done from above the monolayer only. The excitation light comes from a 150 W Xenon lamp. The beam passes through a monochromator (M1) and is then focussed at the air-water interface by an elliptical mirror (em1 or em3). A shutter (s1) is placed in the light path to protect the sample from photobleaching. The fluorescence is collected with a Photometrics extented UV CCD camera (model CH 250, Optikon Corp. Ltd) *via* a second monochromator (M2) whose optics were modified to select an appropriate 200 nm detection range. The sensitivity of the instrument is high enough to measure the spectrum of a chl *a*/phospholipid (1:100) monolayer with a signal to noise ratio of 20 for one second acquisition time. The acquisition time can be varied between several msec to minutes. The right part of Figure 2.1 shows the spectrophotometer, a UV-visible dual beam instrument designed for the measurement of low absorbance values. In order to increase the signal stability, all optical components, except the two detectors, were placed under the trough to minimize vapor condensation. Deuterium and tungsten lamps are used as light sources for UV and visible regions, respectively. They can be used either simultaneously or independently. The two light beams are combined with a Polka beam splitter (model 38105, Oriel Corp.) and this radiation is directed towards the monochromator M3. Subsequently, approximately 4 % of the beam is redirected to a reference photodiode (ph3)

to adjust the light intensity at all wavelengths by a feedback loop. The light reaches a chopper which is made from mirrors especially cut so that all light is directed either to the monolayer or to the reference trough. When no sample is spread at the air-water interface, a shutter (s2) can block the signal to photodiode 1 (ph1). The reference signal reaching the reference photodiode 2 (ph2), I_0' , is then recorded as a function of wavelength. The shutter is then opened and a baseline is recorded in absence of monolayer at the air-water interface. As both light paths are identical, the signal obtained when the two detectors ph1 and ph2 are used is almost a flat line and is amplified by a lock-in (model SR830 DSP, Stanford Research Systems). Spreading of material at the interface decreases the signal to ph1 thus increasing the combined signal producing a square wave $I_0 - I$ which is sent to the lock-in. Absorption is calculated when this square wave signal is divided by the recorded reference signal I_0' using Equation 1:

$$A = -\log \left[1 - \left(\frac{I_0 - I}{I_0'} \right) \right] \quad (1)$$

The baseline is calculated in the same way and is then subtracted to give the true absorbance. Compared to conventional instruments, this design has a superior precision for low values of absorbance. The output to the lock-in being the square wave $I_0 - I$ (or when the sample beam is blocked, I_0'), 0.5% noise on both measurements introduce, for a 1×10^{-3} AU full scale absorption measurement, an uncertainty of 1×10^{-5} AU. In conventional designs, when I_0 and I are measured using $A = -\log I/I_0$ with a precision of 0.5%, the uncertainty of the same measurement becomes 5×10^{-3} AU.

2.3.5 Fluorescence Microscopy. Epifluorescence microscopy (Nikon, model UM-2) was used to further investigate the state of PS II CC monolayers. For that purpose, the

trough (see "Isotherm measurements of PS II CC") was installed directly under the objective lens of the microscope. Excitation light was produced with a mercury short arc lamp (HBÖ 100 W/2, Osram). The light beam was sent through a neutral density as well as a blue filter (430-490 nm). The filter set used to correctly observe chl *a* fluorescence was a combination of a blue excitation filter (Nikon, M420-490, B-3A filter combination), a dichroic mirror (Nikon, DM580, G-2A Filter Combination) and a barrier filter (Nikon, M590, G-2A filter combination). A 20 X objective (Nikon, MPlan 20) was used to focus the light beam on the monolayer interface. Emission light was collected with a low light level video camera (Hamamatsu, C2400-09), recorded with a videocassette recorder (Sony, VO-9800) and printed using a video graphic printer (Sony, UP-850).

2.4 Results and Discussion

2.4.1 Characterization of photosystem II core complex in solution

Based on cyt *b*₅₅₉ measurements, we estimated the PS II CC concentration of the samples used in this work to be $12.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$. Similar values were always consistently obtained with our PS II CC preparations. The chl *a* / chl *b* ratio of PS II CC samples was 11 which is comparable to other published data.²⁹ Samples showing a chl *a* / chl *b* ratio lower than 6 were discarded since the presence of higher amounts of chl *b* is known to indicate that one of the minor outer antenna is contaminating the samples.²¹ This was confirmed by electrophoretic analysis which showed the presence of CP29 in those samples. Gel electrophoresis of our PS II CC preparations indicated the presence of CP47, CP43, D1, D2, cyt *b*₅₅₉ and the extrinsic 33 kDa. There was no trace of PS I nor LHC. We calculated that the samples used in this work contained 42 ± 2 chls per PS II RC which is similar to other published results.^{5b,19c} Oxygen evolution was $1030 \pm 90 \mu\text{mole O}_2/\text{mg chl}\cdot\text{h}$ which is comparable to published values for similar complexes^{17,19b} although we regularly obtained average values of up to $1300 \mu\text{mole O}_2/\text{mg chl}\cdot\text{h}$. All preparations exhibiting oxygen evolution rates lower than $1000 \mu\text{mole O}_2/\text{mg chl}\cdot\text{h}$ were discarded.

We measured the absorption spectrum of PS II CC in solution. The position of the two main maxima located at 437 and 676 nm which depend on different pigments present in the complex, is in agreement with published data.^{19a,21} It is generally agreed that denaturation of PS II has strong effects on its spectroscopic characteristics. The following examples from different authors³⁰ illustrate this tendency. They observed that the Q_y red absorption band, located at 676 nm in intact PS II RC suffered a blue shift down to 670 nm under progressively harsher conditions. In fact, based on fluorescence lifetime

measurements, Booth *et al.*^{30a} qualified as *inactive* any sample showing a red absorption maximum at wavelengths lower than 673 nm. Seibert *et al.*^{30f} stated that this red band is mainly due to chl absorption. This shift was therefore due to changes in the chl/protein matrix. In our experiments, we observed that PS II CC also showed blue shifts of the red absorption band of up to 7 nm in denaturing conditions. Therefore, this parameter was used to characterize the structural integrity of PS II CC in monolayers. The fluorescence spectrum of PS II CC was also measured in solution. We observed the typical reported bands at 683 and 735 nm.³¹ PS II RC fluorescence also shows a blue shift with denaturation.^{30b-e} Hence, the results obtained in solution were used as basis of comparison for spectra measured at the nitrogen/water interface.

2.4.2 Conditions that maintain native characteristics of PS II CC in monolayers

2.4.2.1 Effect of compression speed on surface pressure isotherms of PS II CC

π -A and ΔV -A isotherms of PS II CC were measured at two initial surface pressures of spreading (or surface densities) and three different compression speeds. We wanted first to verify the effect of the spreading density on the integrity of PS II CC when spread in monolayers at the air-water interface and, second, to choose the appropriate speed of compression in regards to equilibrium *versus* denaturation. Figure 2.2A shows π -A isotherms of PS II CC measured at three different compression speeds (curves a, b and c). In those experiments, PS II CC was spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m which corresponded to a surface density of 300 nm²/molecule and compression was started immediately after spreading. We observed an increase in surface pressure with compression speed between approximately 300 and 30 nm²/molecule. This indicates that more material is being compressed at the interface when the speed is greater. Indeed, at the

two lowest compression speeds (curves b and c, Figure 2.2A), the compression time needed to reach any molecular area is two and eight times longer (respectively) than at the fastest compression speed (curve a, Figure 2.2A). Therefore, at lower compression speeds, the water soluble DM (dodecyl maltoside) molecules, which are in large excess at the interface, have more time to leave the interface, thus lowering the measured surface pressure. All three curves merge at 33 mN/m (30 nm²/molecule), which is presumed to correspond to the surface pressure where excess detergent molecules have been ejected into the subphase.

2.4.2.2 Effect of compression speed on surface pressure isotherms of DM

To verify to which extent the presence of DM could influence the shape of PS II CC π -A isotherms, we spread at the interface 40 μ l of the DM containing buffer that is used to solubilize PS II CC. Results are shown in Figure 2.2A (curves d, e and f). For comparison purposes, all parameters were set as if it actually was PS II CC being compressed at the interface. Therefore, molecular area, compression speeds, and so on, all refer to PS II CC. It can be seen that no matter the compression speed, an isotherm of DM was measured only at molecular areas lower than 50 nm²/molecule. Hence, we believe that most of the features present in isotherms a, b and c (Figure 2.2A) are attributable to PS II CC although modulated by its interaction with detergent molecules. Contrary to what is expected for a lipid, the compression speed had a drastic effect on DM isotherms. Indeed, isotherms of DM show that at any given molecular area, higher compression speeds give higher surface pressures. As mentioned above, this phenomenon is most likely due to the solubility of DM. Lower compression speeds probably gave more time to the detergent to form micelles that were solubilized into the subphase thus lowering the surface pressure at all molecular areas (curve f, Figure 2.2A). Therefore, the compression speed dependence of DM π -A isotherms (curves d, e and f) followed what was observed with PS II CC (curves a,

b and c). This hypothesis is also supported by the fact that incubating the DM monolayer at zero surface pressure for 30 minutes before compression (as performed in Figure 2.5) did not allow to measure π -A isotherms of DM, the surface pressure being constantly at 0 mN/m (at all compression speeds).

Other authors discussed the influence of lauryldimethylamineoxide (LDAO) on isotherms of bacterial RC.^{11c} When they spread bacterial RC at the interface, they observed a slope change at a surface pressure of 31-32 mN/m which was attributed to two different states of RC at the interface. They reported that at low surface pressure the detergent played a major role in the monolayer structure by covering the hydrophobic surface of protein subunits. This state was designated as a liquid-expanded state (state II). At surface pressures above the transition of 31-32 mN/m, detergent molecules were believed to be ejected from the monolayer and RC could then form a more strongly interacting lattice which they identified as a condensed state I. Our results favor this global interpretation.

2.4.2.3 Effect of compression speed on PS II CC surface potential isotherms

Figure 2.2B shows ΔV -A isotherms of PS II CC. At a compression speed of 80 nm²/molecule·min (curve a), intense unreproducible fluctuations were observed in the isotherms that are probably attributable to patches of aggregated PS II CC being randomly detected by the radioactive electrode. Additional evidences from absorption spectroscopy and fluorescence microscopy (Figures 2.3A and 2.4, respectively) also indicate the presence of aggregates of intact PS II CC when the film is compressed at this highest compression speed (see discussion below). Such fluctuations largely decreased at 40 nm²/molecule·min (curve b) and are almost undetectable at 10 nm²/molecule·min (curve c)

thus revealing a homogeneous film leading to reproducible ΔV -A isotherms especially in the last part of the isotherm at molecular areas lower than $200 \text{ nm}^2/\text{molecule}$.

2.4.2.4 Spectroscopic characteristics of intact PS II CC at the interface

In situ absorption and fluorescence spectral characteristics of PS II CC spread in monolayers at the nitrogen/water interface are presented in Table 2.1. As mentioned above, the absorption and fluorescence maxima are important indicators of the state of PS II CC at the interface. A typical *in situ* absorption spectrum whose characteristics are close to those measured in solution is shown in Figure 2.3A. In this case, PS II CC was spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m followed by an immediate compression of the film at a speed of $80 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$. Similar results were obtained at $40 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$ (see Table 2.1). In both cases, the red absorption band position was located at 676 nm which is identical to what was obtained for intact PS II CC in solution (see above). These results thus suggest that those experimental conditions lead to the formation of PS II CC films that are not denatured. A large increase in absorption values can be seen when PS II CC is compressed to 30 mN/m at a speed of $80 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$ (curve c, Figure 2.3A and Table 2.1). The intensity of this sudden rise was highly variable. This observation is an additional indication for the presence of aggregates of intact PS II CC at the interface which were randomly detected by absorption as observed in surface potential. This is further supported by the experiments in fluorescence microscopy (see below). When the film was compressed at $10 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, the red maximum was blue shifted to 673.5 nm which indicates that the complex suffered some denaturation (see Table 2.1).

Figure 2.3B shows typical *in situ* fluorescence spectra of PS II CC at the nitrogen/water interface in the same experimental conditions as in Figure 2.3A. It is well

known that the emission observed from PS II CC comes from antenna chl *a* molecules.^{31a} In intact PS II CC, all other photoactive molecules such as carotenoids and chl *b* transfer their excitation energy to a neighbouring chl *a*.^{31c} Although steady state measurements are not the most powerful fluorescence technique to study PS II CC, we detected interesting features which can be used as indicators of PS II CC integrity at the interface. Figure 2.3B shows fluorescence characteristics of PS II CC which was spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m followed by an immediate compression at a speed of 80 nm²/molecule·min. Comparable results were obtained at 40 nm²/molecule·min. In those two cases, the fluorescence maximum measured at 10 mN/m is centered at 682 nm and increasing surface pressure shifts this value to the red up to 683-684 nm (see Table 2.1). Comparing these values to the ones obtained with PS II CC in solution which showed a maximum located at 683 nm, these values indicate that PS II CC is intact in these films, even at lower surface pressure. At 25 mN/m, the emission intensity reached 56 811 counts for a compression speed of 40 nm²/molecule. Such a strong fluorescence suggests that the pigments in PS II CC are not damaged. Spreading PS II CC at an initial surface pressure of 5.7 mN/m and compressing the film at a speed of 10 nm²/molecule·min also gives similar fluorescence characteristics although with a much lower fluorescence intensity (Table 2.1). Indeed, maximum fluorescence emission is red shifted from 682.9 (10 mN/m) to 684.2 nm (30 mN/m) and its intensity reaches 11 065 counts (Table 2.1). However, we noticed the presence of a small shoulder at 765 nm, which was observed in denaturing conditions (see Figure 2.6B). Hence, even though PS II CC was spread at 5.7 mN/m, it may not all be in its native state when using such a low compression speed of 10 nm²/molecule·min. Indeed, the emission maximum was blue shifted to 680.2 nm at the early stages of compression (at pressures lower than 10 mN/m, results not shown). We have demonstrated by polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) that the secondary structure of the polypeptide backbone of PS II CC is not denatured in these

conditions.³² Therefore, only protein-pigment interactions can be affected by use of such compression speeds. In fact, chl *a* may be disrupted from PS II CC and thus more susceptible to damage. However, if damage does not occur, the red shift observed at higher surface pressures (see Table 2.1) may be explained by the reduction of the distance between individual chl molecules. Indeed, knowing that diluted chl *a* molecules in lipid monolayers have a maximum fluorescence band located at 678 nm and that a red shift is detected in chromophores whenever the distance between them is reduced to a point at which energy transfer becomes possible, one could think that compression leads to such changes in spectra where chl *a* molecules are detached from PS II CC. Increasing the surface pressure could thus shift the spectral bands due to the reduction of intermolecular spacing as chl *a* molecules get closer together. In conclusion, both absorption and fluorescence spectra of PS II CC demonstrated that compression at 10 nm²/molecule·min is inadequate to preserve the native characteristics of PS II whereas compression at 80 nm²/molecule·min leads to the formation of an inhomogeneous film. Finally, the best spectral characteristics were obtained when PS II CC was compressed at 40 nm²/molecule·min.

2.4.2.5 Fluorescence microscopy of intact PS II CC monolayers

Figure 2.4 shows micrographs of PS II CC films using *in situ* fluorescence microscopy. During the first few minutes after spreading, whatever the compression speed, rapid movements in the film made the collection of images so difficult that compression had to be stopped in order to acquire images. This phenomenon was observed until the film reached a surface pressure of 10 mN/m. Whenever PS II CC was spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m followed by an immediate compression, the film had an inhomogeneous texture as shown in Figure 2.4A. The darker areas in Figure 2.4A are probably made of excess detergent domains which were gradually eliminated at higher

surface pressures. Indeed, when the surface pressure reached 25 mN/m, the film became very homogeneous as shown in Figure 2.4B. These images showed an intensely bright film that was bleached in a matter of seconds. However, all films showed areas of tremendous heterogeneity, their occurrence being proportional to the compression speed. Examples of those remarkable features are shown in Figures 2.4C and 2.4D. These structures were always oriented perpendicular to the direction of compression. Although those kinds of heterogeneities were observed most frequently at pressures higher than 30 mN/m, they were occasionally observed at lower surface pressures, but especially with the high compression speed of 80 nm²/molecule·min. Those structures are most likely formed by aggregated domains of intact PS II CC being stacked together by the movement of the mobile barrier. These microscopic observations thus support our previous explanation for the measurement of intense unreproducible fluctuations in ΔV -A isotherms (curve a, Figure 2.2B) and the large increase in absorption values at 30 mN/m (curve c, Figure 2.3A and Table 2.1) observed at this high compression speed. Nevertheless, the most frequently observed type of heterogeneity noticed at low surface pressure can be viewed in Figure 2.4E. Those small and rapidly moving features were so intensely fluorescent that in order to record adequate images, sensitivity had to be substantially reduced. Therefore, the dark background in Figure 2.4E is highly fluorescent.

2.4.2.6 Molecular area of PS II CC in monolayers

Molecular area of PS II CC at the nitrogen/water interface was calculated using isotherms obtained when PS II CC was spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m followed by an immediate compression (Figure 2.2A). Since the isotherms shown in Figure 2.2A all merge at 33 mN/m, where excess detergent molecules should have left the interface (see curves d, e and f, Figure 2.2A), we used the corresponding value of molecular

area of $31 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ as a basis of comparison with published data. Our calculations supposed that all PS II CC remained at the interface. Although some proteins can be solubilized into the subphase upon spreading at the interface, several indications strongly suggest that this loss was insignificant. Indeed *in situ* absorption and fluorescence measurements after suction of PS II CC monolayer from the interface have shown that there was no detectable spectroscopic signal emerging from possibly solubilized PS II CC, even after the spreading and removal of three consecutive monolayers. Moreover, the very high reproducibility of the isotherms shown in Figure 2.2A also strongly suggests that the loss of proteins into the subphase was minimal. Our calculation of the molecular area of PS II CC also supposed that PS II CC formed a monomolecular array which was confirmed by X-ray reflectivity measurements.³² Our value of $31 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ for the molecular area of PS II CC can be compared with literature data obtained by electron microscopy. Hence, Boekema *et al.*²⁸ estimated the top view of PS II CC dimer to measure $17.2 \text{ nm} \times 9.7 \text{ nm}$. Considering that PS II CC have an ellipsoidal shape, we calculated from these measurements that a single PS II CC would occupy approximately 65 nm^2 . Santini *et al.*³³ calculated the volume of PS II CC to be 640 nm^3 . Dividing this value by their estimated thickness of 13.5 nm which is large compared to other published values²⁸, we obtained a molecular area of 47 nm^2 . These values are 1.5 to 2 times larger than our value of $31 \text{ nm}^2/\text{molecule}$. Since the lateral pressure in membranes is still unknown, although there is a large consensus for values ranging between 25 and 35 mN/m ,³⁴ the molecular area of PS II CC was also calculated using values obtained at 25 mN/m . In that case, the molecular area of PS II CC varies from 54 to 67 nm^2 , depending on the compression speed (see Figure 2.2A). These values are in good agreement with the previously published data mentioned above.^{28, 33}

2.4.3 Conditions that alter PS II CC structure in monolayers

2.4.3.1 Effect of compression speed on surface pressure and surface potential isotherms of PS II CC

In order to evaluate the effect of low surface density on PS II CC monolayers, a second set of experimental conditions was studied where PS II CC was spread at an initial surface pressure of 0.6 mN/m and incubated for 30 minutes prior to compression. The compression speeds used were the same as described above. Figure 2.5A shows π -A isotherms obtained under these conditions. PS II CC was spread at an initial surface pressure of 0.6 ± 0.1 mN/m which rose to 1.3 ± 0.6 mN/m at constant molecular area after the 30 min incubation time, thus suggesting that PS II CC spreads out and unfolds at the interface. This interpretation is supported by our PM-IRRAS measurements showing that a large proportion of the α -helices of PS II CC is transformed to β -sheets in these conditions.³² Transitions in the π -A isotherms can be seen at all compression speeds, the most obvious one being observed at approximately 37 mN/m at a compression speed of 80 nm²/molecule·min (curve a). In all isotherms, no matter the compression speed, these transitions were observed at surface pressures between 30 and 40 mN/m. Figure 2.5B shows ΔV -A isotherms that also displayed corresponding transitions as a plateau where the most striking one is observed at 80 nm²/molecule·min (curve a). These transitions observed in both surface pressure and surface potential isotherms indicate that a physical process is taking place at the interface which affects the structure of PS II CC. Indeed, PM-IRRAS measurements have shown that the secondary structure of PS II CC undergoes important structural changes during those transitions, from unfolded β -sheets to the formation of new α -helices.³² Also, at molecular areas lower than 50 nm²/molecule all isotherms indicated the presence of more compact films characterized by the rapid increase

in surface pressure upon further compression. Furthermore, when PS II CC was spread and incubated at a low initial surface pressure, we observed that the compression resulted, at all compression speeds, in the formation of a rigid film which could be lifted from the interface with a syringe. This phenomenon was observed by other groups and was explained by non specific interactions between denatured side chains of the protein.³⁵ Under these conditions, no randomly occurring fluctuations in surface potential were observed in the ΔV -A isotherms that could be attributable to aggregates of intact PS II CC in contrast to isotherms obtained when spreading is performed at 5.7 mN/m (compare Figures 2.5B and 2.2B). The incubation at low surface pressure could have allowed the destruction of all intact protein particles which were further transformed as incubation proceeded into superaggregates of interacting unfolded polypeptide chains at the interface. This hypothesis is also supported by absorption spectroscopy (Figure 2.6A, see below) and PM-IRRAS measurements.³²

2.4.3.2 Spectroscopic characteristics of PS II CC at the interface

When PS II CC was given time to relax at a surface pressure of 0.6 mN/m during 30 minutes prior to compression, the red absorption band at 10 mN/m was blue shifted as low as 672 to 669 nm at all compression speeds (see Figure 2.6A and Table 2.1). We also noted a large drift in the baseline that was stronger in the UV region when samples were incubated at low surface pressures as illustrated in Figure 2.6A in contrast to spreading at 5 mN/m (Figure 2.3A). This effect was more pronounced at lower compression speeds. This observation was interpreted by the presence of superaggregates which scatter light. Further compression allows to observe these superaggregates by naked eye as intense green strips that can be removed from the interface as dark green threads. Finally, an important decrease in the absorption intensities was observed in all spectra taken after the 30 minutes

incubation time (see Table 2.1). This phenomenon may partly be due to the lower surface density of PS II CC at the interface in these conditions. Indeed, under these conditions, molecular areas between 230 and 270 nm²/molecule were obtained at 20 mN/m depending on the compression speed (see Figure 2.5A), whereas molecular areas between 70 and 110 nm²/molecule were obtained at the same surface pressure when PS II CC was spread at 5.7 mN/m (see Figure 2.2A). However, since the position of the red absorption band clearly shows denaturation, which is supported by our PM-IRRAS measurements in the same conditions,³² the release of individual pigments from PS II CC which are randomly floating at the interface may also be responsible for this observation.

In these experimental conditions, the intensity of fluorescence is reduced by 2 to 10 fold (compare Figures 2.3B and 2.6B and see Table 2.1). This is interpreted as an indication of denaturation which is also supported by our PM-IRRAS data.³² As an example, in the case of monolayers compressed at 80 nm²/molecule·min, the fluorescence maximum was shifted from 680.5 to 683.9 nm with increasing pressure but the fluorescence intensity is not restored to values obtained with samples which were not incubated at low surface pressure (compare Figures 2.3B and 2.6B and see Table 2.1). In order to differentiate between the effect of spreading at low surface pressure *versus* incubation time on PS II CC integrity, the fluorescence of PS II CC was immediately measured after spreading at low surface pressure. Evidences of denaturation could be observed even though the spectrum was taken within less than one minute after spreading (see 0 mN/m spectrum in Table 2.1). Indeed, the fluorescence maximum was blue shifted to 681.5 nm and the intensity of fluorescence was already as low as 2 712 counts. Increasing the surface pressure by compression did not significantly change the fluorescence intensity, although a red shift to 683.5 nm was observed. In fact, we think that after the incubation at low surface pressure, PS II CC is completely denatured, leaving chl *a*

molecules floating randomly at the interface surrounded by a loose protein matrix. As explained before, reduction of the surface area induced by compression could bring chl *a* molecules closer together. A red shift in the fluorescence emission would consequently be observed. This shift would increase as the distance between chls get smaller thus permitting stronger dipole-dipole interactions. This would also explain the low fluorescence intensity which is observed. If chl *a* aggregates were formed, quantum yield of fluorescence will decrease according to the intermediate strength exciton coupling model. Therefore, we do not think that the red shift observed in those cases indicate a renaturation of the complex at the interface, since neither the intensity of fluorescence nor the absorption characteristics are restored. We also observed a relative increase in the 735 nm band which may also be an additional indication of denaturation. Indeed, it is well known that chl-water interaction in hydrated chl *a* aggregates will lead to bands in the region between 725 and 735 nm.³⁶ These results thus further support our interpretation that chls are released from PS II CC in these conditions. Figure 2.6B also shows new features in its red most region, where chl *a* fluorescence vibrational satellites bands are located, particularly at approximately 715 and 765 nm. Since those bands are not present in intact PS II CC fluorescence spectrum in solution nor in conditions where PS II CC is believed to be intact (Figure 2.3B), we conclude that they result from denaturation of PS II CC which leads to the formation of hydrated chl *a* oligomers.³⁶

Since PS II CC contains more chls than PS II RC, we believe that the protein environment of CP47 and CP43 as well as that of the RC are greatly affected by the incubation at low surface pressure. There may be a partial or complete disruption of pigments from PS II CC, thus indicating that its structure is drastically altered as shown for the polypeptide backbone of PS II CC by our PM-IRRAS measurements.³² This disruption could either be reversible or irreversible, depending on the experimental conditions. This

damage could affect only outer chls which may not need to be located in an exact position for the complex to be functional. In that case, the damage could be reversed by an increase in surface pressure. In contrast, the damage could involve specific pigments whose exact location are essential to the function of PS II CC. Damage involving displacement of those pigments could be irreversible.

2.4.3.3 Fluorescence microscopy of PS II CC at the interface

When PS II CC was spread at 0.6 mN/m and incubated for 30 minutes, images showed very homogeneous monolayers, as shown in Figure 2.7A. We noticed that the intensity of fluorescence was greatly reduced compared to what was observed when PS II CC was spread at 5.7 mN/m (see Figure 2.4B) although the intensity was still proportional to the surface pressure. The occurrence of heterogeneities was also greatly reduced. In fact, at surface pressures lower than 30 mN/m, intense fluorescent aggregates as shown in Figure 2.7B were almost never observed. Indeed, mainly small fluorescent domains could seldom be observed (Figure 2.7C). We noted that the faster the compression speed, the greater was the probability of observing those heterogeneities.

2.5 Conclusion

From the measurement of both surface and *in situ* spectroscopic properties of PS II CC in monolayers, we have identified experimental conditions that should be avoided to prepare monolayers of intact PS II CC. Indeed, whenever PS II CC was spread and incubated at low surface pressure, both the absorption and fluorescence characteristics showed signs of degradation which is consistent with our PM-IRRAS data.³² Indeed, the red absorption band of PS II CC suffered an irreversible blue shift that is correlated to a significant denaturation. Also, the fluorescence studies have illustrated that at the very beginning of the 30 min incubation time, i.e. immediately after spreading, the low surface pressure was already affecting the spectral properties of PS II CC, since the fluorescence maximum was blue shifted to 681.5 nm. The π -A and ΔV -A isotherms measured in these same experimental conditions showed transitions which indicated that PS II CC underwent physical changes during compression. This suggested that the protein may be unfolded at lower surface pressures and that its secondary structure was changing as surface pressure increased as clearly demonstrated by our PM-IRRAS data.³² Fluorescence microscopy revealed that PS II CC films that had been subject to low surface pressure incubation were very homogeneous but showed low intensity, thus indicating that the complex is denatured. Heterogeneities were observed at surface pressures higher than 30 mN/m and were correlated with the transition noted in the π -A and ΔV -A isotherms.

Our results also showed that when PS II CC was spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m and immediately compressed, the compression speed is an important parameter affecting its integrity. When PS II CC was compressed at 10 nm²/molecule·min, the absorption spectra showed a slight indication of degradation that seemed reversible. In fact, the red absorption band measured at 10 mN/m was blue shifted down to 673.5 nm, but

this value returned to 676.0 nm with compression. This observation was also detected by fluorescence, although less evidently. However, π -A and ΔV -A isotherms, absorption spectra and fluorescence microscopy indicated that when the film was compressed too rapidly, at 80 nm²/molecule·min, PS IICC formed superaggregates at the interface. Considering our ultimate aim to prepare ordered two-dimensional crystals of PS II CC, the formation of such aggregates must be avoided. Therefore, we can conclude that the best experimental condition allowing to maintain the native PS II CC spectral characteristics and where reduced aggregation was obtained is by spreading PS II CC at an initial surface pressure of 5.7 mN/m followed by an immediate compression at 40 nm²/molecule·min.

2.6 References

- (1) Alfõnso, M.; Montoya, G.; Cases, R.; Rodriguez, R.; Picorel, R. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10494.
- (2) Chang, H.-C.; Jankowiak, R.; Yocum, C. F.; Picorel, R.; Alfonso, M.; Seibert, M.; Small, G. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7717.
- (3) Bricker, T. M. *Photosynth. Res.* **1990**, *24*, 1.
- (4) Putnam-Evans, C.; Burnap, R.; Wu, J.; Whitmarsh, J.; Bricker, T. M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4046.
- (5) (a) Bassi, R.; Ghiretti Magaldi, A.; Tognon, G.; Giacometti, G. M.; Miller, K. R. *Eur. J. Cell Biol.* **1989**, *50*, 84. (b) Fotinou, C.; Kokkinidis, M.; Fritsch, G.; Haase, W.; Michel, H.; Ghanotakis, D. F. *Photosynth. Res.* **1993**, *37*, 41. (c) Holzenburg, A.; Flint, T. D.; Shepherd, F. H.; Ford, R. C. *Micron* **1996**, *27*, 121. (d) Marr, K. M.; Mastronarde, D. N.; Lyon, M. K. *J. Cell Biol.* **1996**, *132*, 823. (e) Nakazato, K.; Toyoshima, C.; Enami, I.; Inoue, Y. *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 225. (f) Tsiotis, G.; Walz, T.; Spyridaki, A.; Lustig, A.; Engel, A.; Ghanotakis, D. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 241.
- (6) Barber, J. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 981.
- (7) (a) Allen, J. P.; Feher, G.; Yeates, T. O.; Komiyama, H.; Rees, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5730. (b) Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. *Nature* **1985**, *318*, 618. (c) Deisenhofer, J.; Epp, O.; Sinning, I.; Michel, H. *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 429.
- (8) (a) Pepe, I. M.; Nicolini, C. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, *33*, 191. (b) Yasuda, Y.; Sugino, H.; Toyotama, H.; Hirata, Y.; Hara, M.; Miyake, J. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1994**, *34*, 135.
- (9) (a) Alegria, G.; Dutton, P. L. *Biochim. Biophys. Acta* **1991a**, *1057*, 239. (b) Alegria,

- G.; Dutton, P. L. *Biochim. Biophys. Acta* **1991b**, 1057, 258.
- (10) Riegler, J. Heckl, W. M.; Peschke, J.; Lösche, M.; Möhwald, H. In *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria: Structure, Interactions, and Dynamics*; Michel-Beyerle, M. E., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1985; p 207.
- (11) (a) Antolini, F.; Trotta, M.; Nicolini, C. *Thin Solid Films* **1995**, 254, 252. (b) Hirata, Y.; Miyake, J. *Thin Solid Films* **1994**, 244, 865. (c) Zaitsev, S. Yu.; Kalabina, N. A.; Zubov, V. P.; Lukashev, E. P.; Kononenko, A. A.; Uphaus, R. A. *Thin Solid Films* **1992**, 210/211, 723. (d) Zaitsev, S. Yu.; Lvov, Y. M. *Thin Solid Films* **1995**, 254, 257.
- (12) (a) Brash, J. L.; Horbett, T. A. *Proteins at Interfaces: Physicochemical and Biochemical Studies*, American Chemical Society: Washington, 1987. (b) Horbett, T. A.; Brash, J. L. *Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications*; American Chemical Society: Washington, 1995.
- (13) Uzgiris, E. E.; Kornberg, R. D. *Nature* **1983**, 301, 125.
- (14) Kühlbrandt, W.; Wang, D. N.; Fujiyoshi, Y. *Nature* **1994**, 367, 614.
- (15) Haas, H.; Brezesinski, G.; Möhwald, H. *Biophys. J.* **1995**, 68, 312.
- (16) MacRitchie, F. *Anal. Chim. Acta* **1991**, 249, 241.
- (17) van Leeuwen, P. J.; Nieveen, M. C.; van de Meent, E. J.; Dekker, J. P.; van Gorkom, H. J. *Photosynth. Res.* **1991**, 28, 149.
- (18) Porra, R. J.; Thompson, W. A.; Kriedemann, P. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 975, 384.
- (19) (a) Bumann, D.; Oesterhelt, D. *Biochemistry* **1994**, 33, 10 906. (b) MacDonald, G. M.; Boerner, R. J.; Everly, R. M.; Cramer, W. A.; Debus, R. J.; Barry, B. A. *Biochemistry* **1994**, 33, 4393. (c) Rögner, M.; Boekema, E. J.; Barber, J. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 44.
- (20) De Las Rivas, J.; Klein, J.; Barber, J. *Photosynth. Res.* **1995**, 46, 193.

- (21) Haag, E.; Irrgang, K.-D.; Boekema, E.J.; Renger, G. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *189*, 47.
- (22) Albrecht, O. *Thin Solid Films* **1983**, *99*, 227.
- (23) Lamãrche, F. *Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophyll-protéine à l'interface air-eau*; Thesis, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada, 1988.
- (24) (a) Erokhin, V.; Feigin, L. A. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **1991**, *85*, 47. (b) Verger, R.; Pattus, F. *Chem. Phys. Lipids* **1982**, *30*, 189. (c) Davies, R. J.; Goodwin, G. C.; Lyle, I. G.; Jones, M. N. *Colloids and Surfaces* **1983**, *8*, 29.
- (25) (a) Atal, N.; Saradhi, P. P.; Mohanty, P. *Plant Cell Physiol.* **1991**, *32*, 943. (b) Maksymiec, W.; Baszynski, T. *Acta Soc. Bot. Pol.* **1988**, *57*, 465.
- (26) Enami, I.; Kamino, K.; Shen, J.-R.; Satoh, K.; Katoh, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *977*, 33.
- (27) Trumit, H.J. *J. Colloid Sci.* **1960**, *15*, 1.
- (28) Boekema, E. J.; Hankamer, B.; Bald, D.; Kruip, J.; Nield, J.; Boonstra, A. F.; Barber, J.; Rögner, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 175.
- (29) Tyystjärvi, E.; Kettunen, R.; Aro, E.-M. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1186*, 177.
- (30) (a) Booth, P. J.; Crystall, B.; Giorgi, L. B.; Barber, J.; Klug, D. R.; Porter, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1016*, 141. (b) Braun, P.; Greenberg, B. M.; Scherz, A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10 376. (c) Chapman, D. J.; Gounaris, K.; Barber, J.; *Photosynthetica* **1989**, *23*, 411. (d) Crystall, B.; Booth, P. J.; Klug, D. R.; Barber, J.; Porter, G. *FEBS Lett.* **1989**, *249*, 75. (e) Montoya, G.; Cases, R.; Rodriguez, R.; Aured, M.; Picorel, R. *Biochemistry* **1994**, *33*, 11 798. (f) Seibert, M.; Picorel, R.; Rubin, A. B.; Connolly, J. S. *Plant Physiol.* **1988**, *87*, 303. (g) Williams, W. P.; Gounaris, K. *Biochem. Biophys. Acta* **1992**, *1100*, 92.
- (31) (a) Govindjee. *Aust. J. Plant Physiol.* **1995**, *22*, 131. (b) Jennings, R. C.; Garlaschi, F. M.; Bassi, R.; Zucchelli, G.; Vianelli, A.; Dainese, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**,

- 1183; 194. (c) Joshi, M. K.; Mohanty, P. *J. Sci. Ind. Res.* **1995**, *54*, 155.
- (32) Gallant, J.; Desbat, B.; Vaknin, D.; Salesse, C. *Biophys. J.* **1997**, submitted.
- (33) Santini, C.; Tidu, V.; Tognon, G.; Ghiretti Magaldi, A.; Bassi, R. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 307.
- (34) (a) Seelig, A. *Cell Biol. Int. Rep.* **1990**, *14*, 369. (b) Salesse, C.; Ducharme, D.; Leblanc, R. M.; Boucher, F. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4567. (c) Blume, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *557*, 32; (d) Demel, R.A.; Geurts Van Kessel, W.S.M.; Zwaal, R.F.A.; Roelefsen, B.; Van Deenen, L.L.M. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *406*, 97.
- (35) Myers, D. *Surfaces, Interfaces, and Colloids. Principles and Applications*; VCH Publishers, Inc.: New York, 1991; Chapter 8.
- (36) Frackowiak, D.; Zelent, B.; Helluy, A.; Niedbalska, M.; Goc, J.; Leblanc, R. M. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1992**, *69*, 213.

Table 2.1 *In situ* absorption and fluorescence characteristics of PS II CC monolayers. π_i is the initial spreading surface pressure, λ_A and λ_F are respectively the absorption red band and fluorescence maxima whereas I_A and I_F are the corresponding intensities of those maxima.

π_i mN/m	Compression speed nm ² /molecule·min	π mN/m	λ_A ± 0.2 nm	I_A AU	λ_F ± 0.5 nm	I_F arb. u.
5.7	10	10	673.5	0.0026	682.9	4 053
		20	674.5	0.0078	684.2	14 888
		30	676.0	0.0144	684.2	11 065
5.7	40	10	676.0	0.0057	682.5	5 842
		20	676.0	0.0147	683.9	25 056
		25	-----	-----	684.2	56 811
5.7	80	10	676.0	0.0005	682.2	6 543
		20	676.0	0.0037	683.2	12 688
		30	676.0	0.0270	-----	-----
0.6	10	0	675.0	0.0009	681.5	2 712
		10	669.0	0.0015	681.8	1 962
		20	670.5	0.0020	681.8	1 690
		30	671.0	0.0030	683.5	2 583
0.6	40	10	672.0	0.0013	678.8	1 217
		20	672.0	0.0019	682.9	1 746
		30	672.0	0.0042	683.9	2 928
0.6	80	10	672.0	0.0010	680.5	2 007
		20	672.5	0.0015	682.9	2 161
		30	672.5	0.0023	683.9	5 218

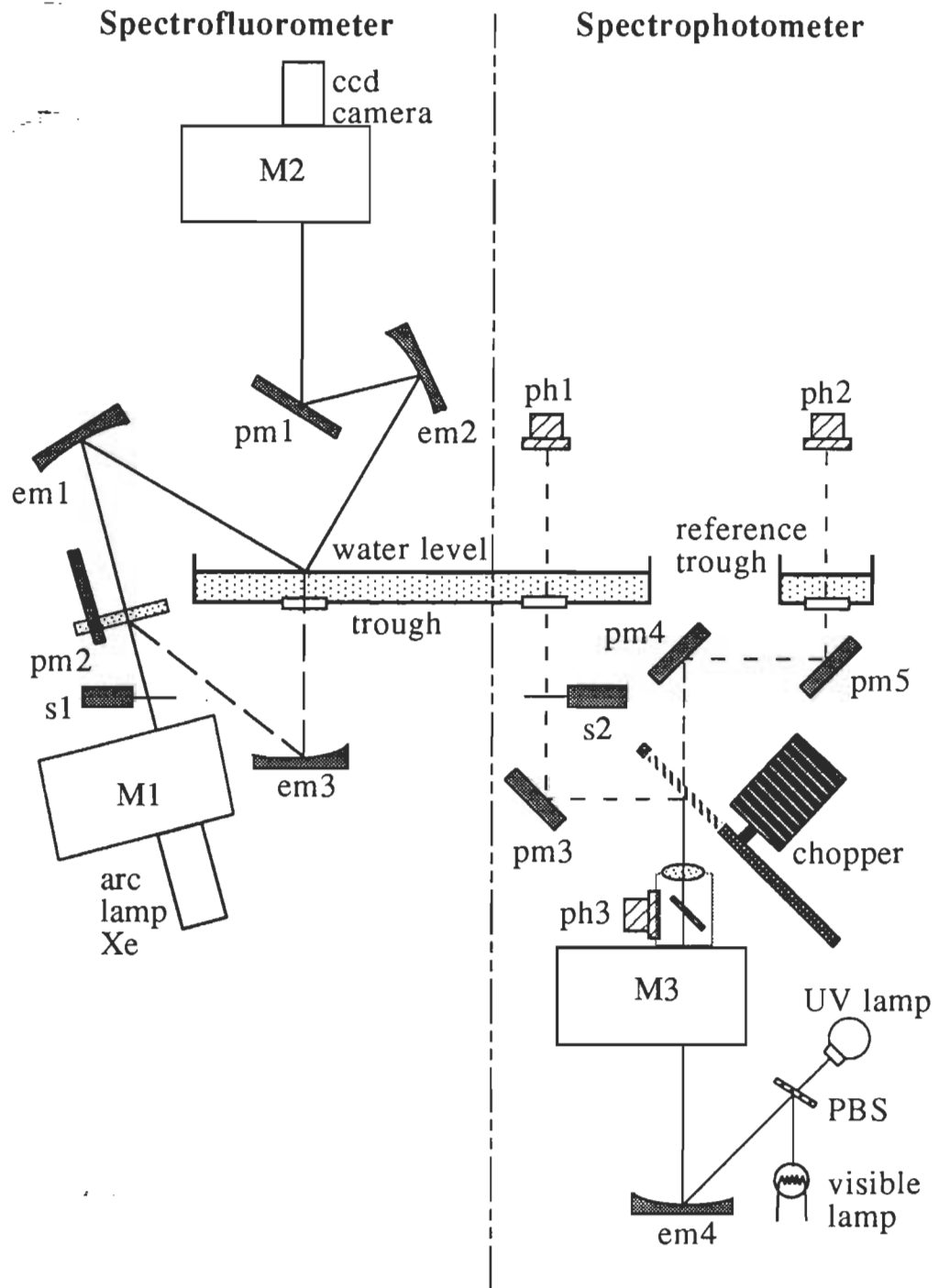


Figure 2.1 Schematic representation of the spectrofluorometer-spectrophotometer designed for *in situ* measurements at the air/water interface. ph: photodiodes; pm: plan mirror; em: ellipsoidal mirror; M: monochromator; PBS: Polka beam splitter.

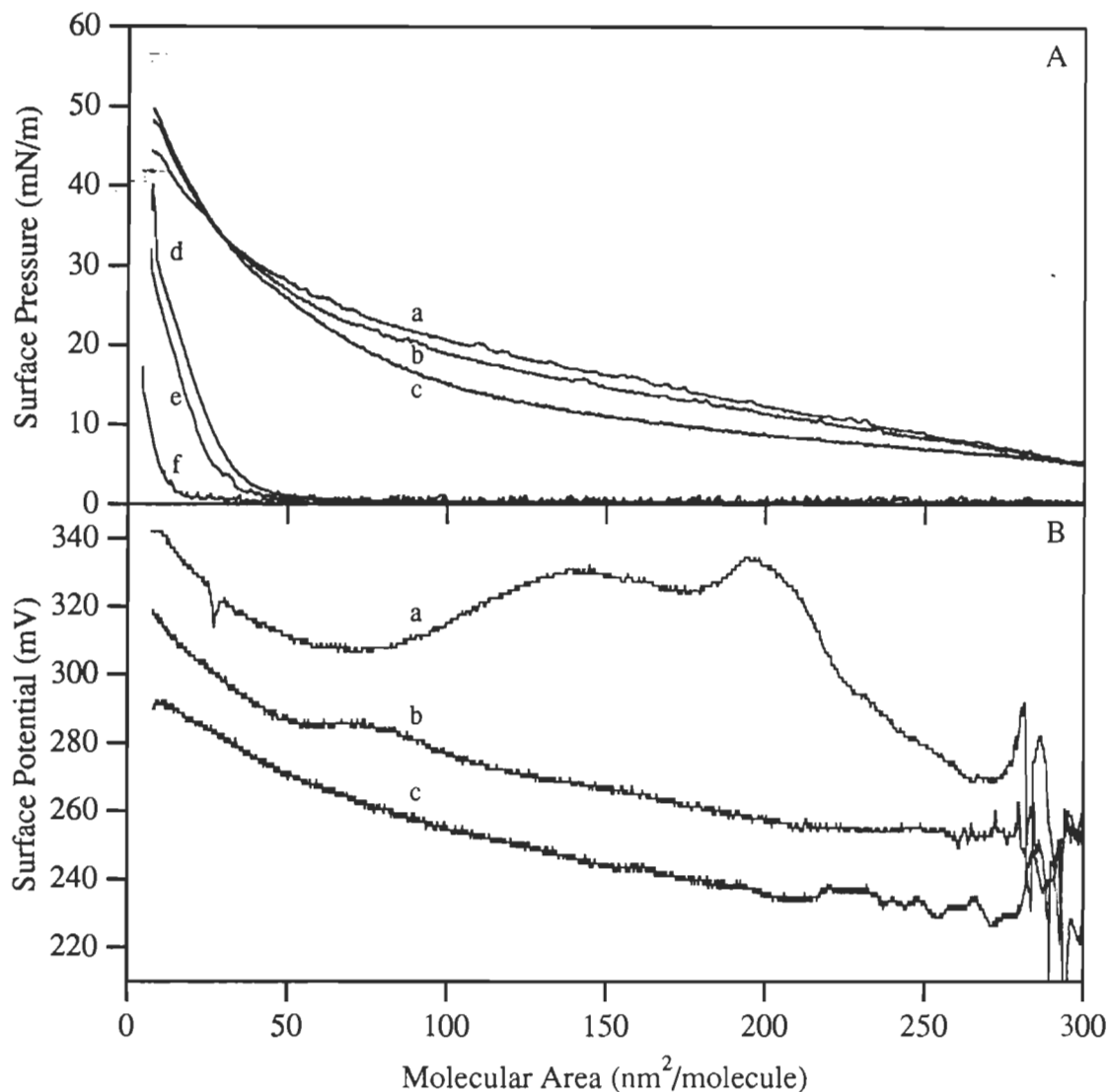


Figure 2.2 Effect of different compression speeds on π -A (A) and ΔV -A (B) isotherms of PS II CC (curves a-c) and of DM (curves d-f) spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m. Curves a and d: 80 nm²/molecule·min; Curves b and e: 40 nm²/molecule·min and Curves c and f: 10 nm²/molecule·min. All compressions were started immediately after spreading. Subphase buffer contained 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer at pH 8, 2 mM ascorbic acid and 500 mM NaCl.

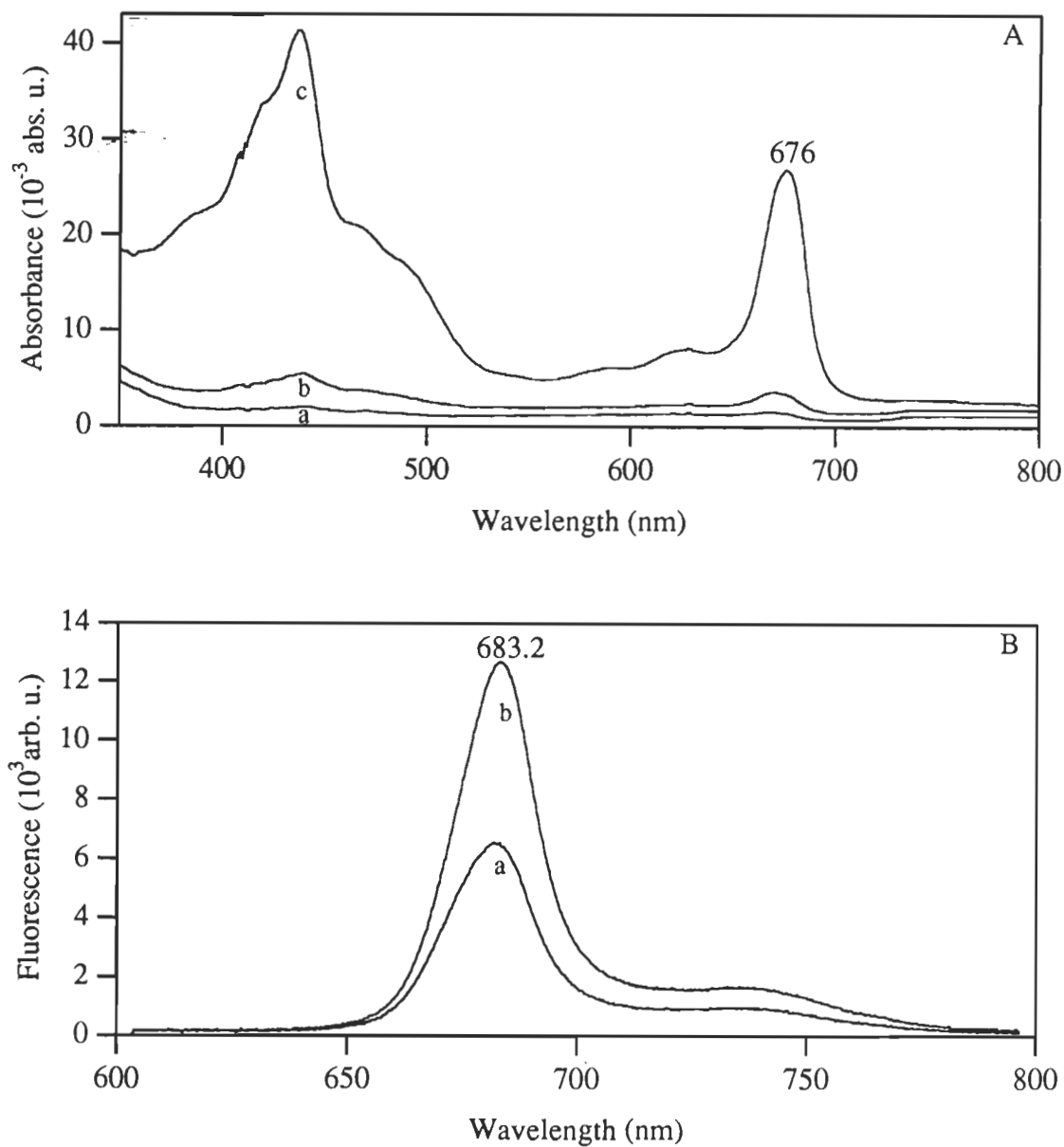
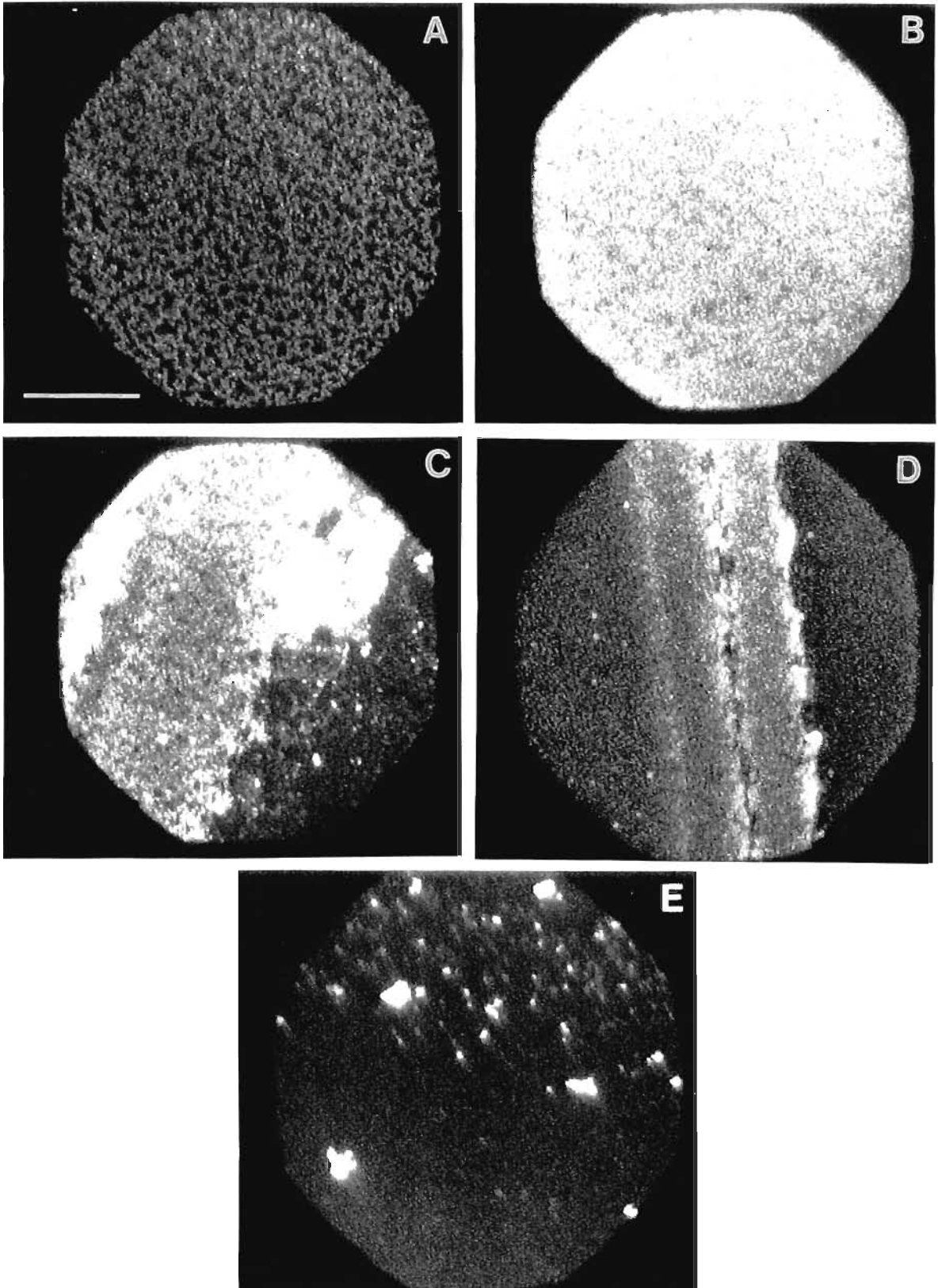


Figure 2.3 *In situ* absorption (A) and fluorescence (B) spectra at the nitrogen/water interface of PS II CC spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m and compressed immediately at 80 nm²/molecule·min. *In situ* fluorescence measurements, $\lambda_{exc} = 440$ nm. Curves a: 10 mN/m; Curves b: 20 mN/m; Curve c: 30 mN/m.

Figure 2.4 *In situ* fluorescence microscopy of PS II CC at the nitrogen/water interface. **A - C**: Initial surface pressure of spreading (π_i) = 5.7 mN/m, immediate compression, speed = 80 nm²/molecule·min, **A**: π = 5.9 mN/m ; **B**: π = 25.0 mN/m; **C**: π = 30.0 mN/m; **D - E**: π_i = 5.7 mN/m, immediate compression, speed = 10 nm²/molecule·min, **D**: π = 30.0 mN/m; **E**: π = 7.7 mN/m. Scale bar on micrograph **A** = 100 μ m.



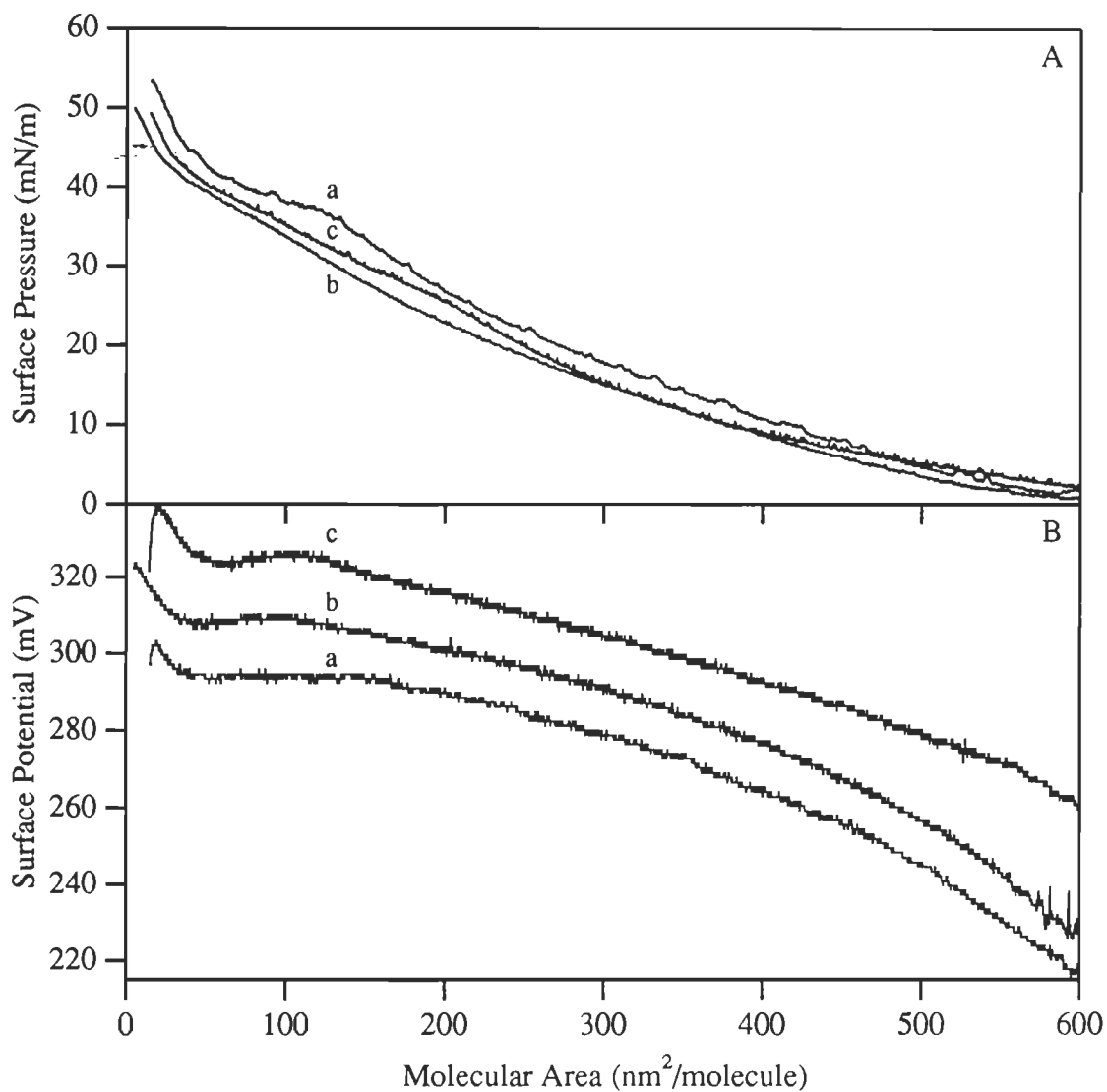


Figure 2.5 Effect of different compression speeds on π -A (A) and ΔV -A (B) isotherms of PS II CC spread at initial surface pressure of 0.6 mN/m. Curves **a**: 80 nm²/molecule·min; Curves **b**: 40 nm²/molecule·min; Curves **c**: 10 nm²/molecule·min. All compressions started after a 30 minutes incubation time.

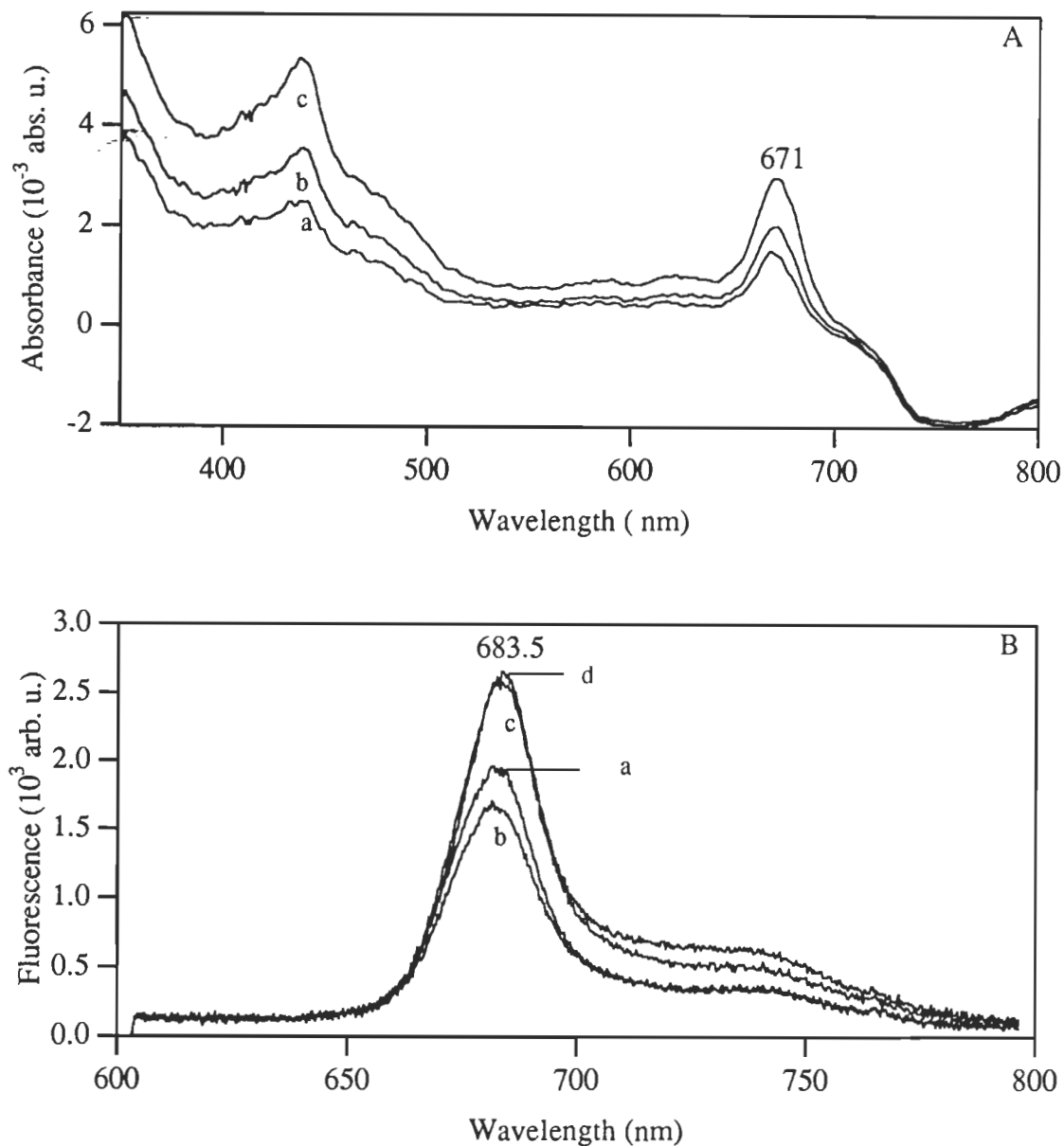
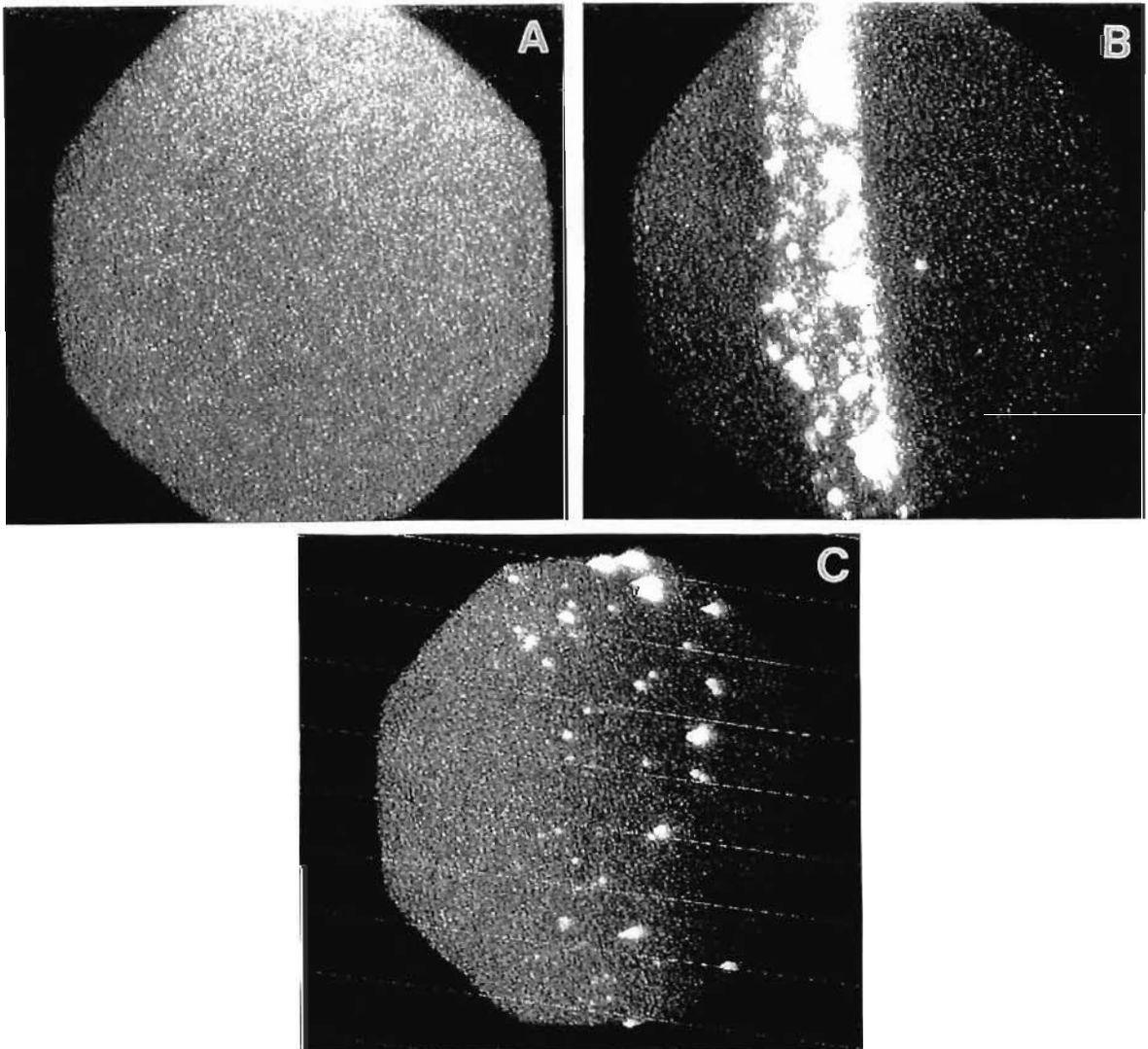


Figure 2.6 *In situ* absorption (A) and fluorescence (B) spectra at the nitrogen/water interface of PS II CC spread at an initial surface pressure of 0.6 mN/m followed by a 30 minutes incubation time prior to compression at 10 nm²/molecule·min. *In situ* fluorescence measurements, $\lambda_{exc} = 440$ nm. Curves a: 10 mN/m; Curves b: 20 mN/m; Curves c: 30 mN/m; Curve d: 40 mN/m.

Figure 2.7 *In situ* fluorescence microscopy of PS II CC spread at the nitrogen/water interface, incubation time = 30 minutes, $\pi_i = 0.6$ mN/m, **A**: compression speed = $80 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, $\pi = 5.0$ mN/m; **B**: compression speed = $40 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, $\pi = 41.0$ mN/m; **C**: compression speed = $10 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, $\pi = 11.0$ mN/m. See Figure 2.4 for scale bar.



CHAPITRE 3

POLARIZATION MODULATED INFRARED SPECTROSCOPY AND X-RAY
REFLECTIVITY OF PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEX AT THE GAS-WATER
INTERFACE

soumis à la revue

Biophysical Journal

**Polarization Modulated Infrared Spectroscopy and X-Ray Reflectivity of Photosystem
II Core Complex at the Gas-Water Interface**

Judith Gallant[†], Bernard Desbat[§], David Vaknin[‡] and Christian Salessé^{*†}

[†]GREIB, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières,
3351 Boulevard des Forges, C. P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

[§]Laboratoire de Spectroscopie Moléculaire et Cristalline, Université de Bordeaux I, 33405
Talence, France

[‡]Ames Laboratory, Physics Department, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA

*Telephone number: (819) 376-5077

Fax number: (819) 376-5057

e-mail: christian_salesse@uqtr.quebec.ca

Running title: **PS II CC monolayers**

Keywords: PM-IRRAS; X-ray reflectivity; Photosystem II; protein secondary structure;
monolayers; film thickness

3.1 ABSTRACT

The state of photosystem II core complex (PS II CC) in monolayer at the air-water interface was investigated using *in situ* polarization modulated infrared reflection absorption spectroscopy and X-ray reflectivity techniques. Two approaches for preparing and manipulating the monolayers were examined and compared. In the first, PS II CC was compressed immediately after spreading at an initial surface pressure of 5.7 mN/m whereas in the second, the monolayer was incubated for 30 minutes at an initial surface pressure of 0.6 mN/m prior to compression. In the first approach, the complex maintained its native α -helical conformation upon compression and the secondary structure of PS II CC was found to be stable for two hours. The second approach resulted in films showing stable surface pressure below 30 mN/m and where the presence of large amounts of β -sheets was detected indicating denaturation of PS II CC. Above 30 mN/m, those films suffered surface pressure instability, which had to be compensated by continuous compression. This instability was correlated with the formation of new α -helices in the film. When the temperature was lowered to 4 °C, denaturing conditions were found to be considerably less efficient in transforming the native α -helices into β -sheets. The X-ray reflectivity studies indicate that the spread film consists of a single layer of protein at the air-water interface, with film thickness that agrees with typical dimensions of the protein.

3.2 INTRODUCTION

Photosystem II core complex (PS II CC) is a pigment-protein complex located in higher plant thylakoid membranes which is essential to all animal life on earth. It is involved in the electron transport of the photosynthetic process (for reviews see Hanson and Wydrzynski, 1990; Nugent, 1996; Hankamer et al., 1997). PS II CC is the protein complex responsible for the photoinduced water oxidation which produces molecular oxygen as a byproduct. PS II CC consists of several hydrophobic and integral membrane polypeptides whose transmembrane spanning domains are believed to be mainly composed of α -helices (Vermaas et al., 1993). Integral polypeptides of PS II CC, shown in Fig. 3.1, include the 32 and 34 kDa reaction center (RC) proteins known as D1 and D2, the RC cytochrome b_{559} , containing two subunits of 9 and 4 kDa (Shuvalov, 1994), the chlorophyll-binding internal antenna proteins CP47 and CP43 (approximately 47 and 43 kDa, respectively), and a number of smaller proteins whose sequence is known but whose function is still obscure. PS II CC also contains a 33 kDa extrinsic polypeptide that protects the binding site of water molecules involved in the oxidation process (Seidler, 1996). This water binding site is a tetranuclear manganese cluster. The 33 kDa extrinsic polypeptide is necessary for stable oxygen evolution rates and is located exclusively on the luminal side of the thylakoid membrane. PS II CC also binds different cofactors and pigments, among which chlorophylls (chls), pheophytins and carotenoids. These pigments are involved in the collection and funneling of the light energy which ultimately reaches the RC where the initial charge separation occurs. This charge separation among pigments in the RC induces the photosynthetic water oxidation activity of PS II as well as the reduction of plastoquinones (Q_B) to plastoquinols. In thylakoid membranes PS II CC is also associated with the light-harvesting complex (LHC). This complex is a mobile antenna that controls the light energy distribution between PS II and the following electron pump of the

photosynthetic process, namely photosystem I.

Protein crystallization is of prime importance to the three dimensional determination of their structures. Since membrane proteins, such as the proteins of the photosynthetic apparatus, are known to crystallize preferentially in two-dimensional (2D) arrays (Kühlbrandt et al., 1994), one possible means to attain this critical organization is through the use of Langmuir films (Uzgiris and Kornberg, 1983). Indeed, two-dimensional monomolecular films provide a unique organization that facilitates contacts between oriented molecules which are necessary to induce crystallization by reducing the degrees of freedom of molecules to two dimensions. Furthermore, the two-dimensional protein concentration can be modified using lateral compression and subphase components that can be easily adjusted to optimize the film quality. Even though enormous efforts were devoted to the 2D crystallization of PS II in the last decade (Seibert et al., 1987; Bassi et al., 1989; Fotinou et al., 1993; Holzenburg et al., 1996; Marr et al., 1996; Nakazato et al., 1996; Tsiotis et al. 1996; Morris et al., 1997; and references therein), the three-dimensional structure of PS II CC is still unknown. Also, the resolution reached with these 2D crystals was limited to 20 Å. Our monolayer crystallization approach could improve this resolution. With the recent development of *in situ* x-ray grazing incidence diffraction using 2D protein crystals formed at the air-water interface (Haas et al., 1995), it is now possible to investigate 2D protein crystals *in situ* and without the use of heavy atoms staining. However, before reaching the ultimate phase of 2D crystal formation, one must carefully characterize and especially control protein structural organization and find the proper conditions to prepare monolayers where proteins remain native.

In the present work, we demonstrate with the help of polarization modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS), the effect of different experimental

conditions on PS II CC secondary structure *in situ* at the gas-buffer interface. PM-IRRAS is known to improve the infrared signal sensitivity of spread molecules at the interface, using a polarization modulation which reduces the strong anisotropic water interference in the amide I and II region of the infrared spectra (Blaudez et al., 1996). This technique provides invaluable information regarding the conformation and orientation of proteins at the interface. The intensity and position of PS II CC amide I and II bands were used to get insight into α -helix and β -sheet content as well as to characterize the angle of α -helices relative to the normal of the interface. We also investigated the state of PS II CC monolayers using X-ray reflectivity measurements directly at the air-water interface. This technique gives the electron number density across the interface from which average thickness and molecular densities can be obtained. Comparing the thickness parameter with published dimensions of PS II CC obtained by electron microscopy enabled us to discriminate between mono-, bi- or multilayer organization at the interface.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Purification and Characterization of Photosystem II Core Complex

PS II CC was extracted and purified from fresh spinach leaves using the method of van Leeuwen et al. (1991) with slight modifications. Isolation of PS II CC from LHC was performed at 4 °C by FPLC using a HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance column (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden). Approximately 20 ml of the extract containing both PS II CC and LHC corresponding to a total of 35 mg of chls, was loaded onto the ion exchange column. LHC was eluted from the column until the eluate became nearly colorless, which took 30 minutes at a flow rate of 3 ml/min. After complete elution of LHC, PS II CC was eluted by increasing the concentration of MgSO₄ as described by van Leeuwen et al. (1991). The sample buffer used to prepare PS II CC contained 20 mM of 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 Company Inc., Quebec, 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 (Calbiochem, San Diego, CA). Total procedure, from leaves to pure PS II CC fractions took approximately 6 hours. Samples were aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use.

Several methods were used to characterize PS II CC to evaluate its integrity. Chl concentration was measured by absorption spectroscopic as described by Porra et al. (1989). Functional intactness was verified by measuring light-saturated rates of oxygen evolution with a Clark-type electrode at 20 °C (Hansatech Ltd, Norfolk, England). During measurements, total chl concentration was 5 μM and 1 mM of 2,5-dichloro-*p*-benzoquinone

was used as electron acceptor (Pfaltz & Bauer, Inc., Waterbury, CT). Assuming that there is one cyt b_{559} per PS II CC (MacDonald et al., 1994; Rögner et al., 1996), the concentration of PS II CC samples was determined by measuring its cyt b_{559} content, as described by De Las Rivas et al. (1995). This method consists in measuring the difference spectrum between the reduced (dithionite) and oxidized (ferricyanide) form of cyt b_{559} using an extinction coefficient of $17.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at a chl concentration of 0.1 mM. The determination of polypeptide composition of PS II CC was carried out by electrophoresis using published experimental conditions (Haag et al., 1990). Gels were run at 200 V for 50 minutes and were Coomassie stained. Polypeptides were identified using SDS-PAGE low range molecular weight standards (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). PS II CC was diluted five times into the SDS-PAGE sample buffer and a volume of 10 μL was deposited on top of the stacking gel.

3.3.2 Film Formation

In all reported experiments, the subphase used contained 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer (Tris, Boehringer Mannheim, Laval, QC) at pH 8, 500 mM NaCl (Ultrapure, J. T. Baker Inc., Toronto, ON) and 2 mM ascorbic acid (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ). Tris and NaCl were purified with chloroform extraction (Megasolv-HPLC 99.98%, Omega Chemical Company Inc., Quebec, QC) (Lamarche, 1988). The specific resistivity of ultrapure water was $18 \times 10^6 \text{ W}\cdot\text{cm}$ (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA). The method of Trurnit (1960) was used to spread drops of PS II CC at the air-water interface. All experiments were performed under dim green light. In all calculations, we used a PS II CC molecular mass of 240 kDa (Boekema et al., 1995).

3.3.3 ATR Infrared Spectroscopy

FTIR spectra of PS II CC and its buffer were measured from 4000 to 650 cm^{-1} with a Nicolet Magna-IR 850 spectrophotometer (Madison, WI) equipped with a liquid nitrogen cooled MTEC detector and a Ge coated KBr beam splitter. PS II CC was deposited on a Ge 45° parallelogram ATR crystal (50 mm X 20 mm X 2 mm). Excess water was evaporated under a gentle nitrogen stream before the crystal was placed in the analysis compartment. For each spectrum, 200 scans were collected with a 2 cm^{-1} resolution.

3.3.4 PM-IRRAS Measurements

The home-made Langmuir trough used in the PM-IRRAS set up was made of aluminum and covered with a sheet of adhesive precoated Teflon (Johnston Industrial Plastics, Lachine, QC). Its width and length were 121 and 767 mm, respectively. The use of such a large trough was necessary to get a compression factor of 38.5 which allowed to measure the complete isotherm of PS II CC. The trough's depth was 6 mm. Surface pressure (π) was detected with a Nima Wilhelmy plate system (Coventry, U.K.) using a Whatman chromatographic filter paper (Maidstone, U.K.) (Albrecht, 1983). The PS II CC sample concentration used in PM-IRRAS measurements was $12.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$. Two initial surface pressures of 0.6 ± 0.1 and $5.7 \pm 0.2 \text{ mN/m}$ were obtained by spreading 20 or 40 μl , respectively, as well as three compression rates of 10, 40 and 80 $\text{nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$ were investigated. When PS II CC was spread at 0.6 mN/m , the monolayer was incubated for 30 min before compression. Monolayers were always kept under nitrogen to prevent hazardous contact of molecular oxygen with our sample and temperature was maintained at $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, unless otherwise stated.

The complete optical set up and equations for PM-IRRAS measurements were described previously (Blaudez et al., 1996). Briefly, FTIR spectra were measured using a Nicolet 740 spectrometer (Madison, WI). A polarizer was used to polarize the incident infrared beam and the polarization was alternatively modulated between p- and s-linear states (parallel and perpendicular to the interface normal) with a ZnSe photoelastic modulator (Hinds type III, Portland, OR). The polarization modulation frequency was set at 2500 cm^{-1} in order to adequately investigate the infrared domain from 2000 to 1000 cm^{-1} . The reflected beam was finally focused on a liquid nitrogen cooled HgCdTe detector (SAT, Poitiers, FR). Unless otherwise stated, 300 scans were collected for each spectrum at 4 cm^{-1} resolution.

3.3.5 X-ray Reflectivity Measurements

X-ray reflectivity measurements of the spread films were carried out *in situ*, on a liquid-surface X-ray reflectometer at the Ames Laboratory. The apparatus is similar to the one developed by Als-Nielsen and Pershan (1983) with the additional capability to apply second order corrections to the θ and the 2θ angles of the monochromator to ensure operation with a constant wavelength at all scattering angles. An X-ray beam of wavelength $\lambda=1.5404\text{ \AA}$ was selected by Bragg reflection from the (111) planes of a single crystal Ge monochromator. The incident beam divergence was regulated by two adjustable slits in front of the sample, and the intensity of the incident beam was continuously monitored to account for possible fluctuations of the X-ray generator. In order to reduce surface waves during measurements, a glass plate was positioned in the trough under the X-ray beam footprint. The subphase depth above the glass plate was kept at approximately $300\text{ }\mu\text{m}$. A dynamic vibration isolation system (JRS MOD-2, Affoltern, Switzerland) was used to remove mechanical vibrations. The Langmuir trough was contained in an air-tight

aluminum receptacle with Kapton windows, and its temperature was constantly maintained at 18 °C. The sealed container was flushed with helium for an hour before the beginning of the X-ray measurements, to reduce background due to air scattering, and to protect the spread proteins from oxidation. Gas flow was allowed during compression of the monolayer to the required surface pressure, and it was stopped during X-ray data collection. To evaluate the film characteristics, 10 μL of a $8.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ PS II CC solution was spread onto the subphase. In order to reduce the risks of protein unfolding, the compression was started immediately after spreading.

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1 Infrared spectroscopy

Since spreading of PS II CC in monolayers at the air-water interface could lead to protein denaturation, ATR-FTIR spectra of PS II CC were measured to get spectra of the native complex. Fig. 3.2 shows the ATR-FTIR spectrum of PS II CC. The water bands were subtracted using the buffer spectra with the algorithm published by Dousseau et al. (1989). ATR spectrum below 1500 cm^{-1} is not shown because of intense bands appearing in that spectral domain which were attributed to the detergent. We observed the typical ester C=O carbonyl band at 1737 cm^{-1} which is due to the presence of chlorophylls and lipids in the sample (Katz et al., 1966; Chapados et al., 1991). The amide I band is centered at 1658 cm^{-1} . Correlations have been made in the literature between the position of the amide I band and the protein secondary structure (Jackson and Mantsch, 1995). It has been shown that α -helices are commonly observed between 1648 and 1660 cm^{-1} . The position of our amide I band at 1658 cm^{-1} thus confirmed the expected α -helical structure of PS II CC. To our knowledge, no other infrared spectrum of PS II CC can be found in the literature to compare with this data. The width and shape of this band indicate the presence of small amounts of β -sheets. However, since PS II CC should be, at least, partially oriented with respect to the Ge ATR crystal, no attempt was made to deconvolute this amide I band to estimate the accurate secondary structure of the complex. Indeed, an optically anisotropic sample modifies the observed infrared intensities since the transition moments of the structural elements oriented parallel to the crystal surface have different intensities than those oriented perpendicular to the crystal. Shape and intensity of the band also depend on the angle of incident beam with respect to the crystal. Therefore, our result does not allow us to further discuss the relative content in α -helices and β -sheets of PS II

CC. However, it clearly appears that the major vibrational contribution to the amide I band are α -helices.

3.4.2 PM-IRRAS

3.4.2.1 Compression speed has no effect on the structure of intact PS II CC

We investigated possible effects of different compression speeds on the structure of intact PS II CC. To maintain the integrity of PS II CC in monolayer, we spread the protein complex at an initial surface pressure of 5.7 mN/m and compressed the film immediately. Fig. 3.3 A-C shows PM-IRRAS spectra of PS II CC obtained at three different compression speeds. These PM-IRRAS spectra are similar to published FTIR spectra of PS II RC which contained 67% α -helices (He et al., 1991) as well as to infrared spectra of native PS II membrane particles (Chapados et al., 1990; Chapados et al., 1991). It can be seen that the compression speed has very little influence on the overall shape of the spectra. At all compression speeds, PM-IRRAS signal increased with surface pressure. All spectra show the ester C=O band due to chlorophylls and lipids at 1737 cm^{-1} as seen in the ATR spectrum (Fig. 3.2). Also, all spectra show an amide I band centered at 1655 cm^{-1} , indicating that the structure of PS II CC mainly contains α -helices. Compared to the ATR spectra (Fig. 3.2), PM-IRRAS spectra show a 3 cm^{-1} shift to lower frequencies in both amide I and II bands. These differences may be explained by different band sensitivity inherent to the measurement method, different orientation of the protein complex in the two measuring systems, different water-amide group interactions, etc. A shoulder at approximately 1630 cm^{-1} can be seen in all spectra which indicates the presence of β -sheets. We believe that this shoulder may be due, at least partly, to the presence of the extrinsic 33 kDa polypeptide, thus suggesting that this extrinsic protein is still anchored to

the complex after spreading at the interface. Indeed, the extrinsic 33 kDa polypeptide is known to contain between 36 to 50 % of β -sheets (Xu et al., 1994; Ahmed et al., 1995; Zhang et al., 1996). The fact that it is better observed by PM-IRRAS compared to ATR spectra may be due to difference in orientation of PS II CC with respect to the measuring beam that slightly favors its observation in the PM-IRRAS spectra.

3.4.2.2 Determination of the α -helix angle relative to the interface normal

It was previously shown that PM-IRRAS spectra are sensitive to the orientation of α -helices. More precisely, the α -helix orientation affects the amide I to amide II ratio. Based on calculated spectra of pure α -helices (Cornut et al., 1996) and using results shown in Fig. 3.3, we estimated that α -helices of PS II CC are tilted with an angle of 40° with respect to the interface normal. This angle is an average of all angles made by each individual α -helix in the complex. Up to now, reported models of PS II CC structure, show that several polypeptides, among which D1 and D2 (Svensson et al., 1990; Svensson et al., 1996; Xiong et al., 1996) contain some α -helices that are oriented approximately parallel to the membrane surface (perpendicular to the interface normal). Therefore, this angle of 40° is probably overestimated by the contribution of those surface-lying α -helices. In addition, the intensity of the amide I band is much higher than what is normally expected for a single monolayer of pure α -helices oriented perpendicular to the interface (Cornut et al., 1996). Indeed, calculations showed that the orientation of α -helices not only changes the amide I to amide II ratio, but also drastically changes the amide I intensity. For example, a change of 15° in the tilt angle of α -helices with respect to the interface normal, from 30° to 45° , produces a 100 % increase of the amide I signal intensity. Therefore, the presence of surface-lying helices may explain the high amide I signal observed for PS II CC monolayers.

3.4.2.3 Evidence for the elimination of the excess detergent into the subphase

In-att spectra of intact PS II CC taken at 10 mN/m (spectrum a in Fig. 3.3 A-C), we noticed the presence of numerous bands in the 1150 to 1000 cm^{-1} region which had a relative intensity of approximately half that of the amide I band. The relative intensity of these bands compared to the amide I band decreased with compression as can be seen in Fig. 3.4 which shows normalized PM-IRRAS spectra at 10 and 30 mN/m (spectra a and b, respectively). The most intense C-C stretching bands of the detergent, *n*-dodecyl- β -D-maltoside, are located in that frequency domain (Annexe). We thus believe that the decreased intensity of these bands with surface pressure is due to the detergent solubilization into the subphase. The removal of this excess detergent is a great advantage for further crystallization studies. Indeed, 2D crystals of membrane proteins are usually formed by preparing lipid vesicles containing high concentrations of these proteins in which excess detergent is removed by dialysis.

3.4.2.4 Surface pressure has no effect on the structure of intact PS II CC

We examined the possibility that the structure and orientation of PS II CC change upon compression to higher surface pressures. To visualize those changes, if any, we compared normalized spectra of PS II CC monolayers, at 10 and 30 mN/m, when spread under similar conditions. One example of this comparison is shown in Fig. 3.4. It can be seen that the amide I and II bands were comparable in both spectra. The higher noise level in the 10 mN/m spectrum (spectrum a) is due to the reduced protein interfacial concentration at this surface pressure. Nevertheless, it was clear from these spectra that compression to higher surface pressures affected neither the α -helix content nor their orientation with respect to the interface normal.

3.4.2.5 Stability of the α -helix secondary structure

With the aim of preparing PS II CC two-dimensional crystals, we needed to investigate the stability of PS II CC monolayers at room temperature as a function of time. Therefore, we measured PM-IRRAS spectra of PS II CC at a surface pressure of 20 mN/m every 15 min for a period of two hours (Fig. 3.5). During the first 30 min (spectra a and b), it was necessary to compress the film to compensate for the reduction in surface pressure. After 30 min, the surface pressure of the film was stabilized. This decrease in surface pressure was interpreted in terms of solubilization of some material into the subphase, presumably the detergent, as shown in Fig. 3.4 (see above). The first spectrum (spectrum a) shows a lower amide I intensity compared to the other spectra in this figure. This observation also supports our detergent solubilization hypothesis. In fact, when the detergent is leaving the interface, the PS II CC concentration in the film is rising thus increasing the amide I intensity. When the surface pressure is stabilized, there is no more increase in the amide I intensity. The most important observation from Fig. 3.5 is that all amide I bands were centered at 1655 cm^{-1} . This indicated that PS II CC maintained its α -helix structure during the two hours incubation time at the interface at 20 mN/m. No time dependent denaturation is observed.

3.4.2.6 Effect of low surface pressure incubation on PS II CC structure

Many publications discussed the probable effect of incubation at low surface pressure on either bacterial RC or PS II RC (Tiede, 1985; Alegria and Dutton, 1991; Yasuda et al., 1992; Uphaus et al., 1997). However, none of those studies described the structures formed by these polypeptides when proteins are unfolding at the interface. Therefore, we further investigated the effect of incubation at low surface pressure and of different compression

speeds on PM-IRRAS spectra of PS II CC as shown in Fig. 3.6.

3.4.2.6.1 Formation of β -sheets

We observed that PS II CC secondary structure was drastically altered by the low surface pressure treatment (see spectra a to d, Fig. 3.6 A-C). Indeed, unfolding of PS II CC at the gas-water interface destroyed the native α -helical structure of the protein and produced β -sheets. This interpretation is confirmed by the amide I band position, located at 1629 cm^{-1} , which is characteristic of β -sheets (Jackson and Mantsch, 1995).

3.4.2.6.2 No effect of surface pressure and of compression speed on β -sheets under 30 mN/m

The general shape of PM-IRRAS spectra of denatured PS II CC did not change upon compression as long as the film was maintained at pressures lower than 30 mN/m . This means that compression did not alter the β -sheet content below this surface pressure. As an example, it can be seen that spectra a to d in Fig. 3.6 A showed no major difference upon compression. The same phenomenon was observed at other compression speeds (spectra a to d, Fig. 3.6 B and C). As expected, the intensity of the amide I band increased with the surface pressure. This is due to the increase in surface concentration of the unfolded polypeptides as molecular area was decreased.

There was not significant effect of compression speed on the film structure. All spectra at surface pressures equal of lower than 30 mN/m shown in Fig. 3.6 A-C (spectra a to d) have similar shapes. In fact, approximately the same ratio can be seen between the bands attributed to β -sheets (1629 cm^{-1}) and to α -helices (1655 cm^{-1}). The intensity of the

amide I band corresponding to β -sheets is lower than what was previously observed for α -helices (compare Fig. 3.3 and 3.6). We attributed this reduction to the fact that unfolded β -sheets occupy a larger area at the interface than α -helices. The PM-IRRAS signal is thus lowered since the number of amino acid residues per surface area is greatly reduced. Finally, we also noticed that the film was extremely stable at surface pressures lower than 30 mN/m. Indeed, no compression was needed to maintain the film at the desired surface pressure during PM-IRRAS measurements in contrast to what was observed in Fig. 3.5 (see above). This behavior is due to the fact that the excess detergent is lost during the 30 min incubation time rather than during the compression.

3.4.2.6.3 Formation of new α -helices at surface pressures higher than 30 mN/m

Whenever denatured films of PS II CC were compressed at pressures higher than 30 mN/m, we noticed a striking and reproducible phenomenon. Indeed, no matter what compression speed was investigated, the surface pressure of denatured films became unstable. It systematically needed to be compensated continuously by compression during measurements indicating that some type of reorganization of the film was taking place at the interface. In fact, PM-IRRAS spectra indicated that the protein secondary structure was considerably altered when the pressure reached 40 mN/m compared to 30 mN/m (see Fig. 3.6 A-C).

Compression to 40 mN/m resulted in different protein conformations, depending on the speed of compression (compare spectra e, Fig. 3.6 A-C). When PS II CC was compressed at a speed of 10 nm²/molecule·min (spectrum e, Fig. 3.6 C), the amide I maximum remained centered at 1629 cm⁻¹. This indicated that this film maintained its β -sheet structure upon further compression. However, when this spectrum is compared to

the one measured at 30 mN/m (spectrum d, Fig. 3.6 C), we noticed that a stronger band appeared at 1648 cm^{-1} . This indicated that the protein film underwent a minor secondary structure change, with a slight reduction of the β -sheet content allowing the formation of some random coil or some new α -helices. Nevertheless, at this low speed of compression, the film maintained a large β -sheet content. In contrast, when the film was compressed at high speed ($80\text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$), as shown by spectrum e in Fig. 3.6 A, a very clear and reproducible change in the secondary structure of denatured PS II CC occurred from 30 to 40 mN/m. The amide I maximum shifted from 1629 cm^{-1} (spectrum d) to 1655 cm^{-1} (spectrum e), which was interpreted as the formation of new α -helices, although the shoulder at 1632 cm^{-1} indicated that the film still contained an important portion of β -sheets. Another striking feature was observed at 40 mN/m compared to 30 mN/m, where a strong increase in the amide I intensity is observed (compare spectra d and e, Fig. 3.6 A). Although it did not quite reach intensities found in intact films of PS II CC (see Fig. 3.3), this spectacular increase strongly suggest that large amounts of new α -helices were formed. It also indicated that these helices oriented themselves at the interface. This is, to our knowledge, the first evidence of a surface pressure-induced and compression speed-controlled reversible secondary structure change of proteins at the interface.

The spectrum e of Fig. 3.6 B, shows one of the spectra obtained when unfolded PS II CC films were compressed at a compression speed of $40\text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$. At that particular speed, the compression to a pressure of 40 mN/m gave various unreproducible spectra. In fact, under this experimental condition, we obtained spectra as those shown in Fig. 3.6 A as well as in Fig. 3.6 C (spectrum e). The one illustrated in Fig. 3.6 B was a frequently observed behavior. We found no explanation as for why the content of α -helices and β -sheets varied from one experiment to another in this specific experimental condition.

The molecular processes affecting the structure of PS II CC films at low surface pressure may be compression speed dependent. In the case of the low compression speed ($10 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, Fig. 3.6 C), the system was probably in a near equilibrium state. Since the time needed to reach the surface pressure of 40 mN/m was four to eight times longer, the unfolded protein could behave differently compared to when it was rapidly compressed at 40 or $80 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$ (Fig. 3.6 B and C, respectively). When compressed at $10 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, the β -sheets could have adapted to the slowly rising pressure by changing either their relative packing or orientation up to the point where the pressure finally reached 40 mN/m without any significant change in the secondary structure of the protein. However, when the film was compressed at $80 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$, the fast compression could have triggered conformational changes of the unfolded protein which responded to this abrupt pressure rise by an immediate formation α -helices which corresponds to a more compact structure.

3.4.2.6.4 State of PS II CC immediately after spreading

In order to probe the process of denaturation when PS II CC was spread at low surface pressure and incubated for 30 min, we measured the PM-IRRAS spectrum of PS II CC immediately after spreading and compared it to the one obtained after the 30 minutes incubation at a surface pressure of 0.6 mN/m . These spectra are illustrated in Fig. 3.7. To obtain a band position that would really represent the initial state of PS II CC right after spreading, we reduced the number of scans to 20, which were measured within one minute. The spectrum obtained (spectrum a, Fig. 3.7), although noisy, shows a distinct amide I band maximum at approximately 1654 cm^{-1} , indicating that one minute after spreading, the protein complex still retained its α -helical structure. However after 30 minutes of incubation at 0.6 mN/m (spectrum b), the maximum was shifted to 1631 cm^{-1} , the

characteristic band position of β -sheets. This indicates that the incubation time at low surface pressures is also a critical factor in the denaturation of proteins at the interface as is the value of the initial spreading surface pressure.

3.4.2.7 Effect of low temperature on PS II CC

We also investigated the effect of low temperature on the denaturation process of PS II CC in monolayers at the interface. We therefore reduced the temperature of the subphase to 4 °C. After 43 minutes of incubation of PS II CC at 0.6 mN/m, we measured a first spectrum and then started the compression at a speed of 40 nm²/molecule·min. Fig. 3.8 shows the results of those experiments. It can be seen that the amide I bands are centered at 1655 cm⁻¹. Therefore, it can be stated that under these conditions, which were previously shown to induce a clear denaturation of PS II CC at room temperature (see Fig. 3.6 B), the protein complex conserved most of its α -helices. However, it is also important to notice that the two shoulders in those spectra, which are located at 1632 and 1695 cm⁻¹, indicate that there is a distinct fraction of PS II CC that is found in antiparallel β -sheet structure. It is still unclear to us if those two bands indicate a partial denaturation process. They may also be attributed at least partly to anti-parallel β -sheets naturally present in the complex, as found in the extrinsic 33 kDa polypeptide (Ahmed et al., 1995). Regardless of these bands, it was obvious that lower temperature greatly reduced the denaturation of PS II CC at the interface.

3.4.3 X-RAY REFLECTIVITY

Figure 3.9 shows an X-ray reflectivity curve normalized to the reflectivity of an ideally flat subphase (R/R_F) versus the momentum transfer (Q_Z) of a PS II CC monolayer

maintained at 30 ± 1 mN/m. The solid line is the best fit calculated reflectivity from the electron density model structure shown in the inset as a solid line. The reflectivity was calculated by assuming a *two box model* (Als-Nielsen and Kjaer, 1989). A recursive formalism (Parratt, 1954) was used to calculate the reflectivity from ideally flat interfaces, $R_0(Q_z)$. To account for surface roughness, σ , under the assumption of Gaussian smeared interfaces, a Debye-Waller factor was applied as follows,

$$R(Q_z) = R_0(Q_z)e^{-(Q_z\sigma)^2} \quad (1)$$

The dotted line in the inset corresponds to the *box model* in the absence of the effect of surface roughness. The thickness values of the two boxes extracted from the reflectivity are 22 ± 2 and 14 ± 2 Å with electron number densities of 0.37 ± 0.02 and 0.42 ± 0.02 e/Å³ respectively, and a surface roughness, $\sigma = 5.9 \pm 0.5$ Å. The two *box model* suggests that PS II CC may be composed of two distinct electron density zones. We hypothesize that the detergent trapped in the PS II CC monolayer, surrounding and stabilizing the complex, and/or any anisotropically distributed cofactors inside the complex may contribute to the apparent separate electron densities.

3.4.3.1 Monolayer *versus* bilayer

By examining the overall profile of the electron density (Fig. 3.9) and comparing it to known dimensions of PS II CC, we suggest that the film at the interface consists of a single protein layer. The stromal face to face aggregation, which is typically observed in solution as well as in thylakoid membranes, is most likely not occurring at the interface. This aggregation would have given a film thickness of approximately 120 Å. The relatively high NaCl concentration of the subphase (500 mM) is probably responsible for the

prevention of aggregation of PS II CC. It is indeed known that the presence of large amounts of monovalent cations tend to induce the destacking of thylakoid membranes (Barber, 1980). It should be emphasized that although our results are inconsistent with the formation of a homogeneous bilayer we cannot exclude the presence of local inhomogeneous aggregation.

3.4.3.2 Surface roughness

The surface roughness of a pure liquid-vapor interface is dominated by thermally excited capillary waves, σ_{CW} , that depend on surface tension, γ , ($\sigma_{CW}^2 \propto k_B T / \gamma$). In addition, the effective surface roughness, σ , depends on the intrinsic roughness, σ_I , due to the size, shape and organization of the molecules at the interface. Therefore, the measured effective roughness from the reflectivity is given by (Ocko et al., 1994),

$$\sigma^2 = \sigma_{CW}^2 + \sigma_I^2 \quad (2)$$

For pure liquids, in particular for water, the intrinsic part is comparable or smaller than the capillary waves term. Under the vibration damping conditions described above (glass plate and dynamic anti-vibration system), the effective surface roughness from pure water (or subphase) is approximately 2.4 – 2.8 Å depending on the resolution of the spectrometer and the attenuation of waves at the interface. For typical Langmuir monolayers (i.e., fatty acids, lipids, etc) there is a small increase in the surface roughness which is usually associated with the increase of surface pressure (or equivalently the decrease in surface tension) as discussed above (Als-Nielsen and Kjær, 1989). The effective surface roughness for these monolayers at moderate pressures (20 – 35 mN/m) is in the range 2.8 – 4 Å. In the present case, the roughness is too large to be accounted for by

capillary waves only, and we argue that the roughness is dominated by the intrinsic part which using Eq. 2 is estimated at, $\sigma_l = 4.5 - 5.5 \text{ \AA}$. This larger intrinsic roughness can be associated with the irregularity inherent to the morphology of proteins. One reason for the increased surface roughness may be related to the hydrophilic loops that links together the transmembrane α -helices of PS II CC. These large luminal loops contain residues which play crucial roles in the interaction between transmembrane polypeptides and extrinsic oxygen evolving complex proteins and cofactors. On the other hand, the loops on the stromal side, which are shorter than those found on the luminal side, might interact with another PS II CC, producing either the aggregated structure observed in solution which is similar to the stacking of PS II in thylakoid membranes *in vivo*. Since these loops are not as well organized as α -helices and vary considerable in sizes, from 18 to 190 residues for CP47 alone, they probably are responsible for the external shape on the surface of the complex. Therefore, the surface roughness value is most probably affected by the presence of these loops.

3.4.3.3 Film Thickness

The total *homogeneous* thickness of the film as extracted from the *box model* in the absence of surface roughness is $36 \pm 4 \text{ \AA}$, which is too small to account for the real size of the complex. This discrepancy is intimately related to the increase in surface roughness as discussed above. The *homogeneous* thickness of the film can be associated with the hydrophobic part of PS II CC which is made of α -helices. Indeed, the hydrophobic domain of other membrane proteins such as the bacterial RC (Rees et al., 1994) and bacteriorhodopsin (BR) (Popot et al., 1994) is $30 - 40 \text{ \AA}$ and $35 - 40 \text{ \AA}$, respectively, which is in accordance with the present value extracted from the reflectivity. Also, knowing that a single turn of an α -helix is made of 3.6 amino acids which corresponds to a step of 5.4 \AA of

the α -helix total length (Lehninger, 1982), we calculated that this 36 Å thickness corresponds to α -helices made of 24 amino acids. Based on published models of PS II CC (Cramer et al., 1986; Bricker, 1990; Svensson et al., 1990; Vermaas and Ikeuchi, 1991; Xiong et al., 1996), we calculated the average number of amino acids in its transmembrane α -helices (in D1, D2, CP47, CP43 and cyt b_{559} polypeptides) to be 24 residues (varying from 20 to 28 residues). This value is in agreement with observed number of residues found for membrane-spanning α -helices of other proteins such as BR (20-25 residues per α -helix) and the bacterial RC (20-30 residues per α -helix).

The larger roughness that we extracted for the film indicates that the protein protrudes into both the air-protein interface as well as the protein-water interface. Lateral inhomogeneity on the molecular length scale could have been included partially in the model had the molecular form factor of the protein in the film been known. We argue that the thickness (d_{TOT}) of individual proteins in the film is better approximated as a sum of the *homogeneous* part (determined from the *box model*), and a cut-off length that depends on the intrinsic roughness, σ_I . Assuming a cut off that is twice the surface roughness at each interface (air-protein and protein-water interfaces) yields,

$$d_{TOT} \approx d_{box} + 4\sigma_I = 58 \pm 8 \text{ \AA} \quad (3)$$

This result compares with previously published data for PS II CC obtained by electron microscopy (Boekema et al., 1995) of 60 Å edge to edge thickness. However, this thickness does not account for the presence of the extrinsic 33 kDa polypeptide which is present in the spreading solution. We give two plausible reasons to the fact that 33 kDa polypeptide is not detected with the reflectivity measurements: a) the polypeptide is not anchored anymore to PS II and is solubilized into the subphase or b) the polypeptide is

inhomogeneously distributed in the film and/or incorporates a large amount of water molecules that basically wash out the contrast of the electron density of water so that it is beyond the sensitivity of our instrument. Diffuse X-ray scattering and X-ray reflectivity studies of these membranes at a synchrotron may shed some light on this problem. A recently proposed model for the extrinsic oxygen evolution complex of PS II implies a central water cavity connecting the aqueous phase to the water binding site on the luminal side of the complex (Holzenburg et al., 1996). This cavity would offer an intramolecular stable microenvironment acting as a diffusion barrier. Although this model contains all three of the extrinsic polypeptides, this implies that each of those polypeptides, and especially 33 kDa, which is essential to high oxygen evolution rates, would have a high degree of hydration. This could explain the apparent absence of electron density for the 33 kDa polypeptide. Furthermore, given the dimensions of PS II CC and the fact that this extrinsic polypeptide does not cover the whole luminal face of PS II CC, the plane in which the 33 kDa polypeptide is lying comprises at least three times more bulk water than polypeptide (Fig. 3.1). Our PM-IRRAS measurements of intact PS II CC showed that small amounts of β -sheets could be attributed to the extrinsic 33 kDa polypeptide (see Fig. 3.3). Amorphous films of PS II CC, made from PS II CC drops directly deposited and dried on the Ge ATR crystal, which certainly contained the extrinsic polypeptide also showed similar amounts of β -sheets (see Fig. 3.2). The hypothesis of the release of this extrinsic 33 kDa polypeptide is therefore unlikely. Hence, it is more probable that the X-ray reflectivity is not sensitive to the presence of small but inhomogeneous amounts of this hydrated extrinsic polypeptide. Our conclusion would imply that the 33 kDa polypeptide, which is exclusively located on the exterior luminal side of PS II CC (Fig. 3.1) would preferentially orient PS II CC with this extrinsic protein facing the subphase. Evidences have proven that such preferential orientation can be observed for membrane proteins that link peripheral hydrophilic polypeptides. Indeed, Zaitsez et al. (1992) determined the

orientation of several related types of bacterial RC in monolayers, based on their photoinduced electrical response. These authors have shown that *Rb. sphaeroides* RC, which contains the two transmembrane subunits **L** and **M** as well as the **H** subunit which is in contact with the hydrophilic surface of the membrane, orients itself at the interface with the **H** subunit (258 residues) facing the subphase with a ratio of 80%. The presence of this hydrophilic polypeptide on one side of the complex is thus sufficient to induce the orientation of this RC at the interface. The same study has shown that the *Rps. viridis* RC, which contains the same subunits as *Rb. sphaeroides* plus a cyt subunit (336 residues), anchored on the opposite hydrophilic side of the RC, orients itself in the reverse direction, with its cytochrome subunit (**C**) facing the subphase and the **H** subunit facing air. A difference of 78 residues, favoring the cyt side of the bacterial RC, has reversed its orientation. It is therefore conceivable that the extrinsic 33 kDa polypeptide (248 residues) of PS II CC induces the same kind of orientation to PS II CC.

3.5 CONCLUSION

The investigation of PS II CC in monolayers have given invaluable information about the structure of this protein complex at the air-liquid interface. We have demonstrated that the spreading conditions are of particular importance to maintain the α -helical secondary structure of PS II CC. We also showed that conditions can be found to form stable monolayers, which could eventually allow crystallization of two-dimensional PS II CC. As long as PS II CC is spread at an initial surface pressure of 5.7 mN/m and immediately compressed, the α -helix content of this complex is maintained. Although we also found experimental conditions, usually used to spread lipids, leading to the denaturation of PS II CC, the study of the molecular processes involved in protein denaturation is also of primary significance. Indeed, the fact that the protein conformation changed upon compression from 30 to 40 mN/m to form α -helices from β -sheets regardless of the compression rate, is an interesting observation that implies some control on protein folding at the air-water interface. Further studies of this phenomenon could lead to a better understanding of protein folding in natural membranes.

The drastic decrease in protein denaturation upon reduction of temperature is definitely a promising new research avenue. As two-dimensional crystallization may be favored by the reduction of temperature, owing to slower movements of spread molecules at the interface, as well as water molecules, our results have shown that an additional advantage is the observation of lower rates of denaturation.

X-ray reflectivity measurements have proven to be a successful technique to obtain critical information about the microscopic dimension of the film. The thickness we measured indicates, without any doubt, that the film is composed of a single layer of

protein homogeneously distributed at the interface. Further studies at synchrotron radiation sources will enable a more detailed reflectivity study and, in addition, will provide information on the lateral organization in particular of films crystallized films.

Finally, this paper shows the first clear evidence that conditions can be found where the native secondary structure of membrane proteins can be maintained upon spreading in monolayers at the gas-water interface.

3.6 REFERENCES

- Ahmed, A., H.-A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier. 1995. A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy. *FEBS Lett.* 363:65-68.
- Albrecht, O. 1983. The construction of a microprocessor-controlled film balance for precision measurement of isotherms and isobars. *Thin Solid Films.* 99:227-234.
- Alegria, G., and P. L. Dutton. 1991. I. Langmuir-Blodgett monolayer films of bacterial photosynthetic membranes and isolated reaction centers: Preparation, spectrophotometric and electrochemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1057:239-257.
- Als-Nielsen, J., and P. S. Pershan. 1983. Synchrotron x-ray diffraction study of liquid surfaces. *Nucl. Instrum. Methods.* 208:545-548.
- Als-Nielsen, J., and K. Kjaer. 1989. X-ray reflectivity and diffraction studies of liquid surfaces and surfactant monolayers. *In* Phase transitions in soft condensed matter. T. Riste and D. Sherrington, editors. Plenum Press, New York. 113-138.
- Barber, J. 1980. Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 594:253-308.
- Bassi, R., A. G. Magaldi, G. Tognon, G. M. Giacometti, and K. R. Miller. 1989. Two-dimensional crystal of the photosystem II reaction center complex from higher plants. *Eur. J. Cell Biol.* 50:84-93.
- Blaudez, D., J.-M. Turlet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. 1996. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92: 525-530.
- Boekema, E. J., B. Hankamer, D. Bald, J. Kruip, J. Nield, A. F. Boonstra, J. Barber, and M. Rögner. 1995. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green

- plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:175-179.
- Bricker, T. M. 1990. The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynth. Res.* 24:1-13.
- Chapados, C., S. Lemieux, and R. Carpentier. 1990. Infrared study of a photosystem II submembrane preparation. *In Current Research in Photosynthesis.* M. Baltscheffsky, editor. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. I.2.343-346.
- Chapados, C., S. Lemieux, and R. Carpentier. 1991. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. *Biophys. Chem.* 39:225-239.
- Cornut, I., B. Desbat, J. M. Turlet, and J. Dufourcq. 1996. In situ study by polarization modulated Fourier transform infrared spectroscopy of the structure and orientation of lipids and amphipathic peptides at the air-water interface. *Biophys. J.* 70:305-312.
- Cramer, W. A., S. M. Theg, and W. R. Widger. 1986. On the structure and function of cytochrome b-559. *Photosynth. Res.* 10:393-403.
- De Las Rivas, J., J. Klein, and J. Barber. 1995. pH sensitivity of the redox state of cytochrome b559 may regulate its function as a protectant against donor and acceptor side photoinhibition. *Photosynth. Res.* 46:193-202.
- Dousseau, F., M. Therrien and M. Pézolet. 1989. On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. *Appl. Spectrosc.* 43:538-542.
- Fotinou, C., M. Kokkinidis, G. Fritsch, W. Haase, H. Michel and D. F. Ghanotakis. 1993. Characterization of a photosystem II core and its three-dimensional crystals. *Photosynth. Res.* 37:41-48.
- Haag, E., K.-D. Irrgang, E. J. Boekema, and G. Renger. 1990. Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity. *Eur. J. Biochem.* 189:47-53.
- Haas, H., G. Brezesinski and H. Möhwald. 1995. X-ray diffraction of a protein crystal anchored at the air/water interface. *Biophys. J.* 68:312-314.

- Hankamer, B., J. Barber, and E. Boekema. 1997. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:641-671.
- Hanson, Ö., T. Wydrzynski. 1990. Current perceptions of photosystem II. *Photosynth. Res.* 23:131-162.
- He, W.-Z., W. R. Newell, P. I. Haris, D. Chapman, and J. Barber. 1991. Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction center and conformational changes studies by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 30:4552-4559.
- Holzenburg, A., T. D. Flint, F. H. Shepherd, and R. C. Ford. 1996. Photosystem II: Mapping the locations of the oxygen evolution-enhancing subunits by electron microscopy. *Micron.* 27:121-127.
- Jackson, M., and H. H. Mantsch. 1995. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:95-120.
- Katz, J. J., R. C. Dougherty, and L. J. Boucher. 1966. Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll. In *The chlorophylls*. L. P. Vernon, and G. R. Seely, editors. Academic Press, New York. 185-251.
- Kühlbrandt, W., D. N. Wang, and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature.* 367:614-621.
- Lamarche, F. 1988. Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophyll-protéine à l'interface air-eau. Thesis, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières. Chapter 2.
- Lehninger, A. L. 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc., New York. Chapter 7.
- MacDonald, G. M., R. J. Boerner, R. M. Everly, W. A. Cramer, R. J. Debus, and B. A. Barry. 1994. Comparison of cytochrome b-559 content in photosystem II complexes from spinach and *Synechocystis* species PCC 6803. *Biochemistry.* 33:4393-4400.
- Marr, K. M., D. N. Mastrorade, and M. K. Lyon. 1996. Two-dimensional crystals of

- photosystem II: Biochemical characterization, cryoelectron microscopy and localization of the D1 and cytochrome b559 polypeptides. *J. Cell Biol.* 132:823-833.
- Morris, E. P., B. Hankamer, D. Zheleva, G. Friso, and J. Barber. 1997. The three-dimensional structure of a photosystem II core complex determined by electron crystallography. *Structure.* 5:837-849.
- Nakazato. K., C. Toyoshima, I. Enami, and Y. Inoue. 1996. Two-dimensional crystallization and cryo-electron microscopy of photosystem II. *J. Mol. Biol.* 257:225-232.
- Nugent, J. H. A. 1996. Oxygenic photosynthesis. Electron transfer in photosystem I and photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 237:519-531.
- Ocko, B.M., X. Z. Wu, E. B. Sirota, S. K. Sinha, and M. Deutsch. 1994. X-ray reflectivity study of thermal capillary waves on liquid surfaces. *Phys. Rev. Lett.* 72:242-245.
- Parratt, L.G. 1954. Surface studies of solids by total reflection of X-rays. *Phys. Rev.* 95:359-369.
- Popot, J.-L., C. De Vitry, and A. Atteia. 1994. Folding and assembly of integral membrane proteins: An introduction. *In Membrane Protein Structure: Experimental Approaches.* S. H. White, editor. Oxford University Press, New York. 41-96.
- Porra, R. J., W. A. Thompson, and P. E. Kriedemann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 975:384-394.
- Rees, D. C., A. J. Chirino, K.-H. Kim, and H. Komiya. 1994. Membrane protein structure and stability: Implications of the first crystallographic analyses. *In Membrane Protein Structure: Experimental Approaches.* S. H. White, editor. Oxford University Press, New York. 3-26.
- Rögner, M., E. J. Boekema, and J. Barber. 1996. How does photosystem 2 split water? The

- structural basis of efficient energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 21:44-49.
- Seibert, M., M. Dewitt, and L. A. Staehelin. 1987. Multimeric (tetrameric) particles on the luminal surface of freeze-etched photosynthetic membranes. *J. Cell Biol.* 105:2257-2265.
- Seidler, A. 1996. The extrinsic polypeptides of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1277:35-60.
- Shuvalov, V. A. 1994. Composition and function of cytochrome b559 in reaction centers of photosystem II of green plants. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26:619-626.
- Svensson, B., C. Etchebest, P. Tuffery, P. van Kan, J. Smith, and S. Styring. 1996. A model for the photosystem II reaction center core including the structure of the primary donor P₆₈₀. *Biochemistry* 35:14486-14502.
- Svensson, B., I. Vass, E. Cedergren, and S. Styring. 1990. Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modelling. *EMBO J.* 9:2051-2059.
- Tiede, D. M. 1985. Incorporation of membrane proteins into interfacial films: Model membranes for electrical and structural characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 811:357-379.
- Trurnit, H. J. 1960. A theory and method for the spreading of protein monolayers. *J. Coll. Sci.* 15:1-13.
- Tsiotis, G., T. Walz, A. Spyridaki, A. Lustig, A. Engel, and D. Ghanotakis. 1996. Tubular crystals of a photosystem core complex. *J. Mol. Biol.* 259:241-248.
- Uphaus, R. A., J. Y. Fang, R. Picorel, G. Chumanov, J. Y. Wang, T. M. Cotton and M. Seibert. 1997. Langmuir-Blodgett and x-ray diffraction studies of isolated photosystem II reaction centers in monolayers and multilayers: Physical dimensions of the complex. *Photochem. Photobiol.* 65:673-679.
- Uzgiris, E. E., and R. D. Kornberg. 1983. Two-dimensional crystallization technique for

- imaging macromolecules, with application to antigen-antibody-complement complexes. *Nature*. 301:125-129.
- van Leeuwen, P. J., M. C. Nieveen, E. J. van de Meent, J. P. Dekker, and H. J. van Gorkom. 1991. Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction center particules from spinach. *Photosynth. Res.* 28:149-153.
- Vermaas, W. F. J. and M. Ikeuchi. 1991. Photosystem II. *In The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation*. L. Bogorad, I. K. Vasil, editors. Academic Press, Inc., San Diego. 25-111.
- Vermaas, W. F. J., S. Styring, W. P. Schröder and B. Andersson. 1993. Photosynthetic water oxidation: The protein framework. *Photosynth. Res.* 38:249-263.
- Xiong, J., S. Subramaniam, and Govindjee. 1996. Modeling of the D1/D2 proteins and cofactors of the photosystem II reaction center: Implications for the herbicide and bicarbonate binding. *Prot. Sci.* 5:2054-2073.
- Xu, Q., J. Nelson and T. M. Bricker. 1994. Secondary structure of the 33 kDa, extrinsic protein of photosystem II: A far-UV circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta*. 1188:427-431.
- Yasuda, Y., Y. Hirata, H. Sugino, M. Kumei, M. Hara, J. Miyake, and M. Fujihara. 1992. Langmuir-Blodgett films of reaction centers of *Rhodospseudomonas viridis*: Photoelectric characteristics. *Thin Solid Films*. 210/211:733-735.
- Zaitsev, S. Y., N. A. Kalabina, V. P. Zubov, E. P. Lukashev, A. A. Kononenko, and R. A. Uphaus, 1992. Monolayers of the photosynthetic reaction centers of green and purple bacteria. *Thin Solid Films*. 210/211:723-725.
- Zhang, L.-X., H.-G. Liang, J. Wang, W.-R. Li and T.-Z. Yu. 1996. Fluorescence and Fourier-transform infrared spectroscopic studies on the role of disulfide bond in the calcium binding in the 33 kDa protein of photosystem II. *Photosynth. Res.* 48:379-384.

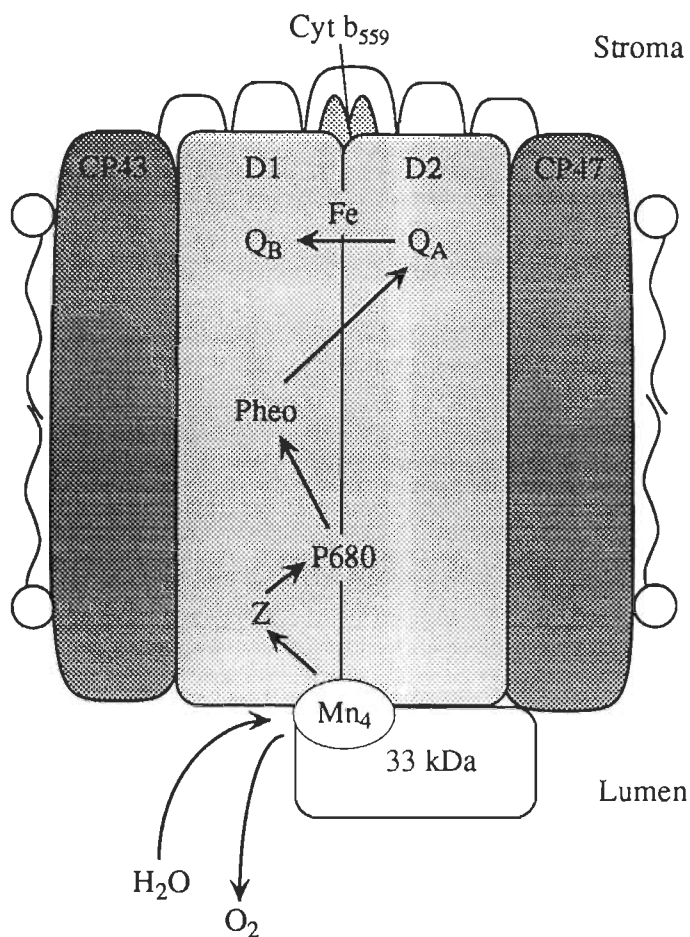


Figure 3.1 Schematic representation of Photosystem II core complex. The reaction center (RC) contains the polypeptides D1, D2 and the two subunits of cytochrome b₅₅₉. Those polypeptides bind the following co-factors: the redox-active tyrosine Z, the RC primary electron donor P680 (chlorophyll), pheophytin (Pheo), plastoquinones (Q_A and Q_B) and a nonheme iron. CP47 and CP43 are chlorophyll *a* binding proteins that act as intrinsic antenna. The extrinsic 33 kDa polypeptide, essential for high oxygen evolution rates, protects the tetramanganese cluster which is the water binding site. Hydrophobic part of PS II CC is approximately located at the same position as the detergent alkyl chains.

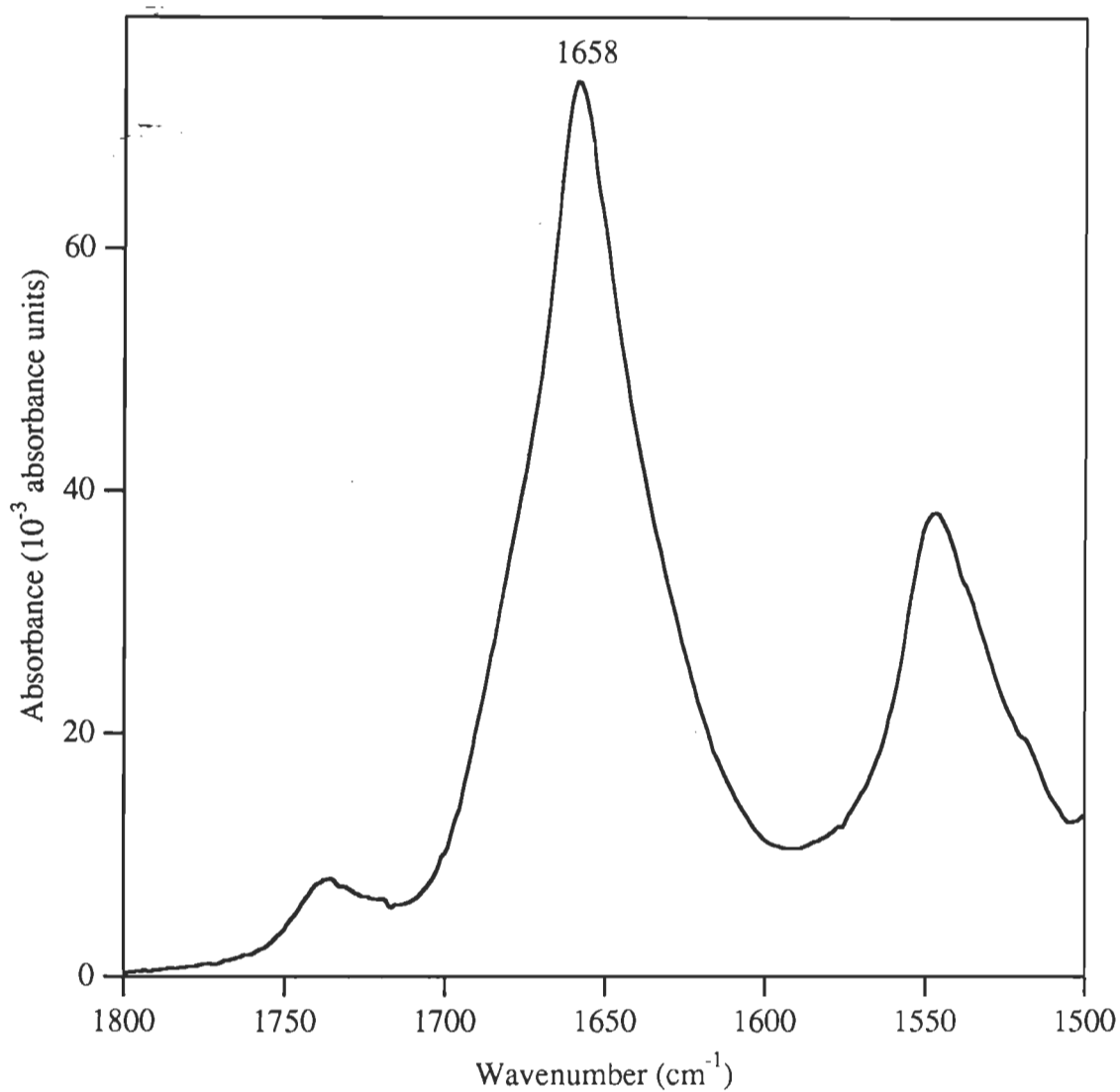
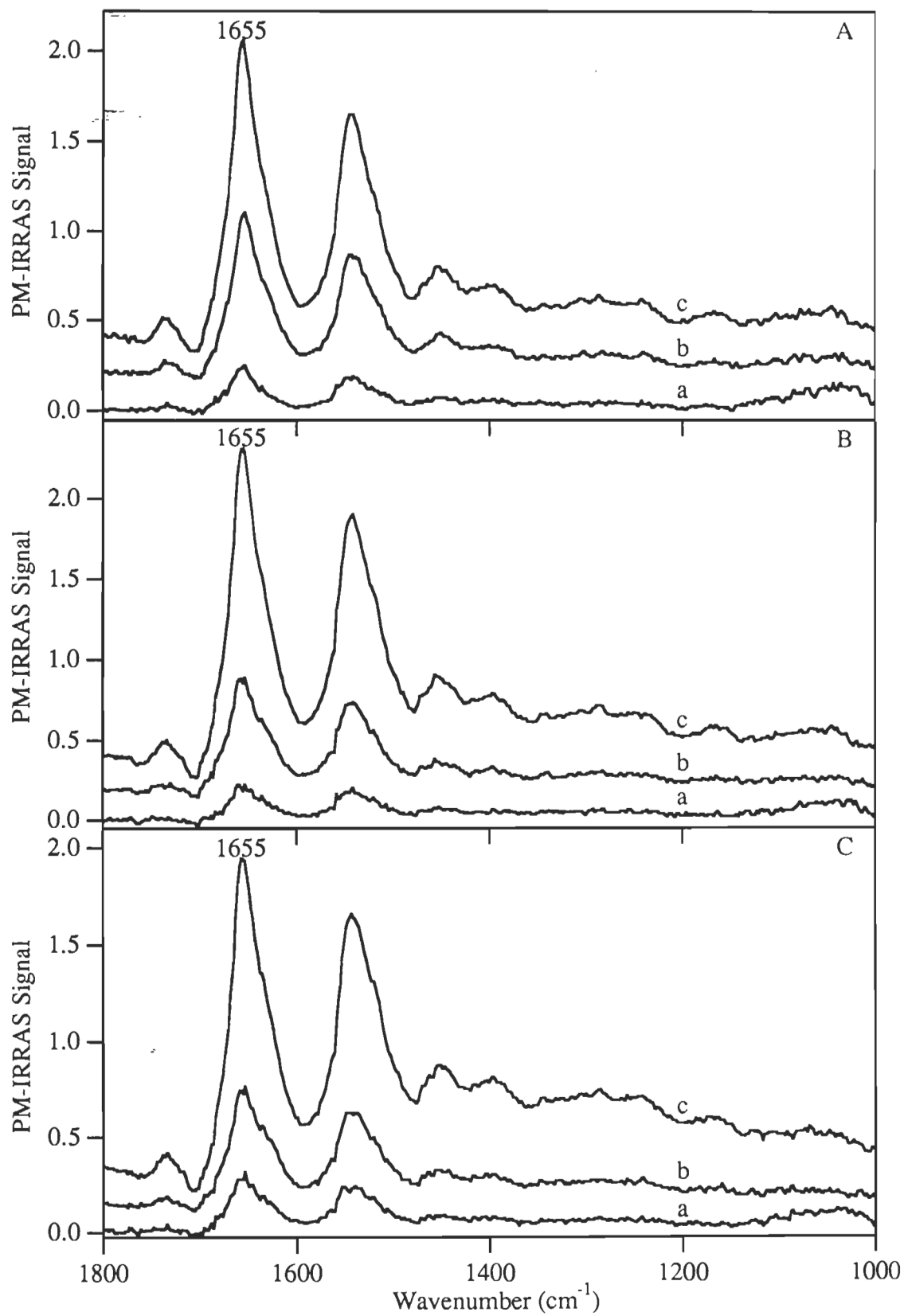


Figure 3.2 FTIR-ATR spectrum of PS II CC spread as a hydrated amorphous thin film on a Ge crystal.

Figure 3.3 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface. Initial surface pressure was set at 5.7 ± 0.2 mN/m. Compression at **A** - 80 nm²/molecule·min, **B** - 40 nm²/molecule·min and **C** - 10 nm²/molecule·min was started immediately after spreading of 40 μL of PS II CC. Spectra were measured at surface pressures of **a** - 10 mN/m, **b** - 20 mN/m and **c** - 30 mN/m.



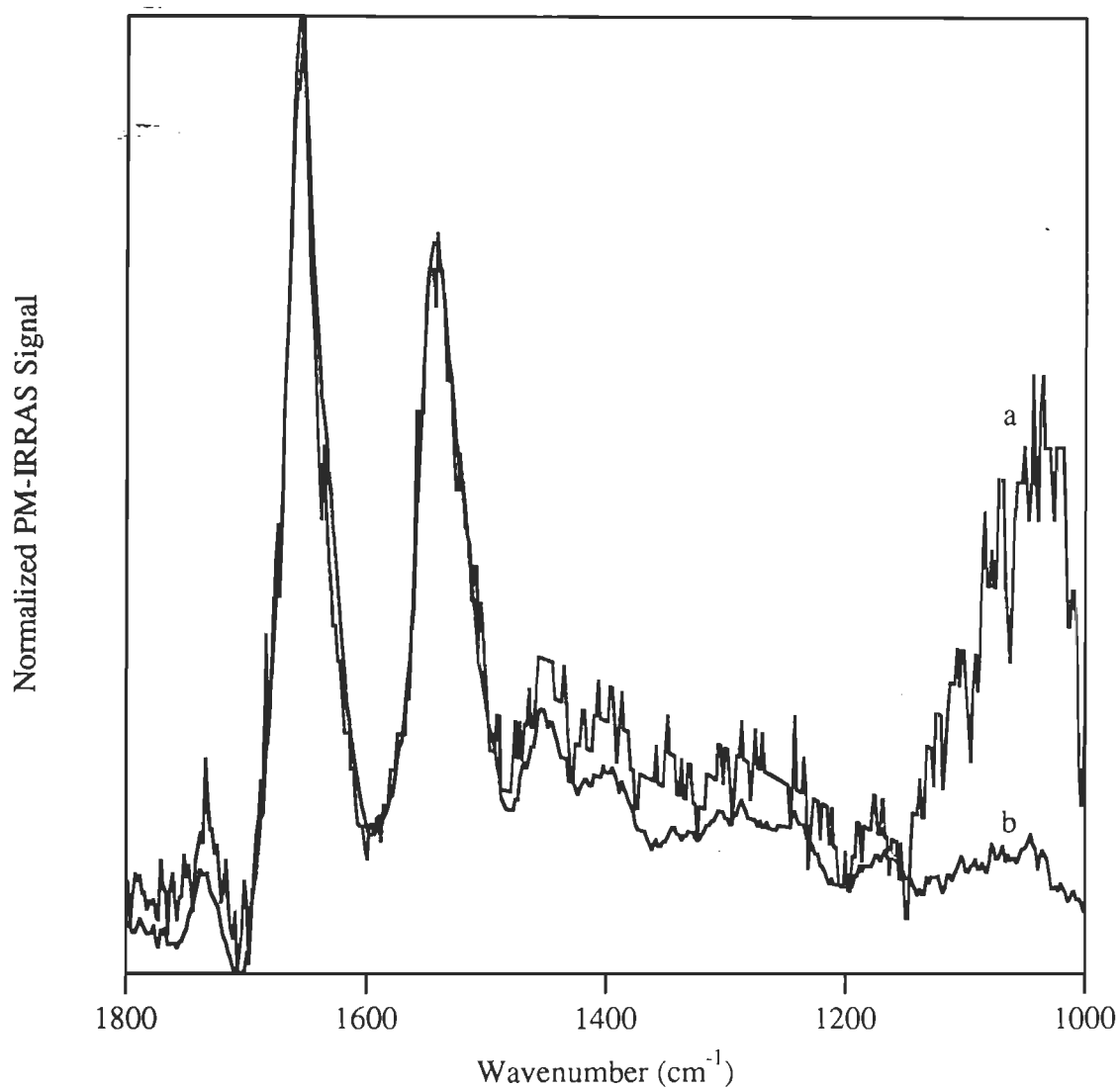


Figure 3.4 Comparison of normalized PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface spread at an initial surface pressure of 5.7 ± 0.2 mN/m. Compression at $80 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$ was started immediately after spreading of $40 \mu\text{L}$ of PS II CC. Spectra were measured at **a** - 10 mN/m, **b** - 30 mN/m.

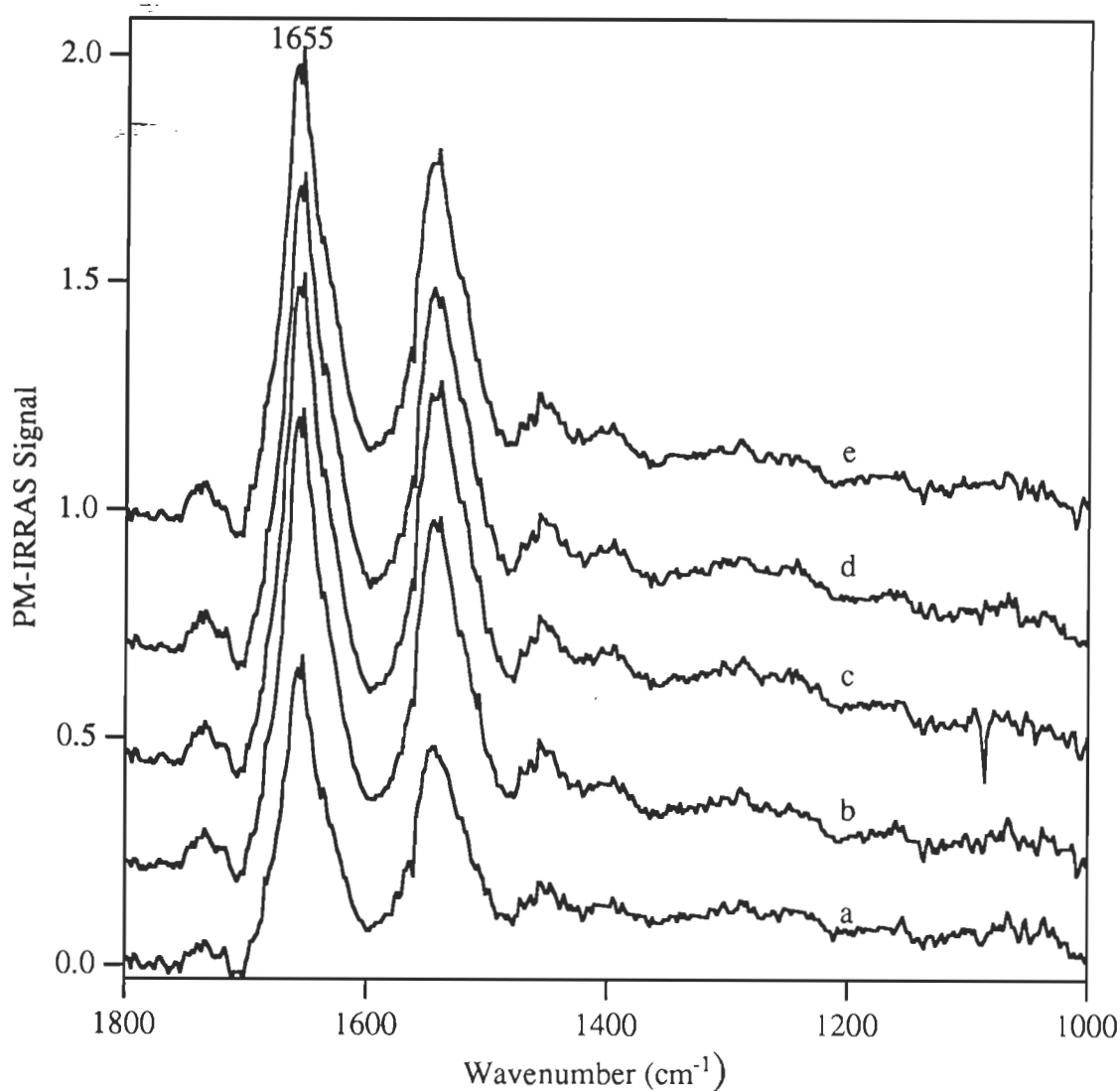
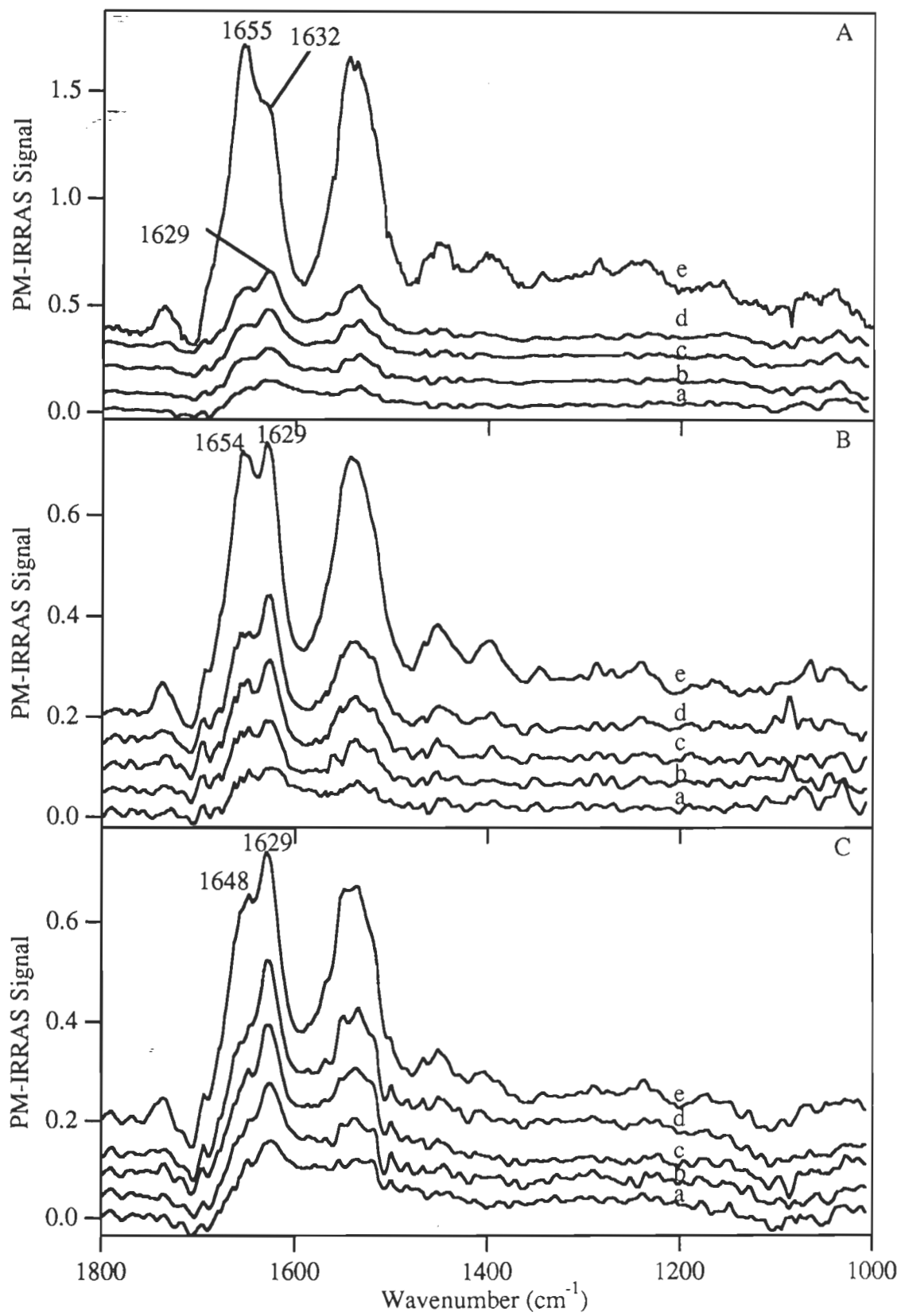


Figure 3.5 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen/buffer interface.

Initial surface pressure was set at 5.7 ± 0.2 mN/m. Compression at $80 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$ was started immediately after spreading of $40 \mu\text{L}$ of PS II CC. Surface pressure was maintained at 20 mN/m. Spectra were measured at: **a** - 15 min, **b** - 30 min, **c** - 45 min, **d** - 75 min, and **e** - 120 min after reaching 20 mN/m.

Figure 3.6 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen/buffer interface. Initial surface pressure was set at 0.6 ± 0.1 mN/m. Compression at **A** - 80 nm²/molecule·min, **B** - 40 nm²/molecule·min and **C** - 10 nm²/molecule·min was started 30 minutes after spreading of 20 μL of PS II CC. Spectra were measured at **a** - 0.6 mN/m, **b** - 10 mN/m, **c** - 20 mN/m, **d** - 30 mN/m and **e** - 40 mN/m.



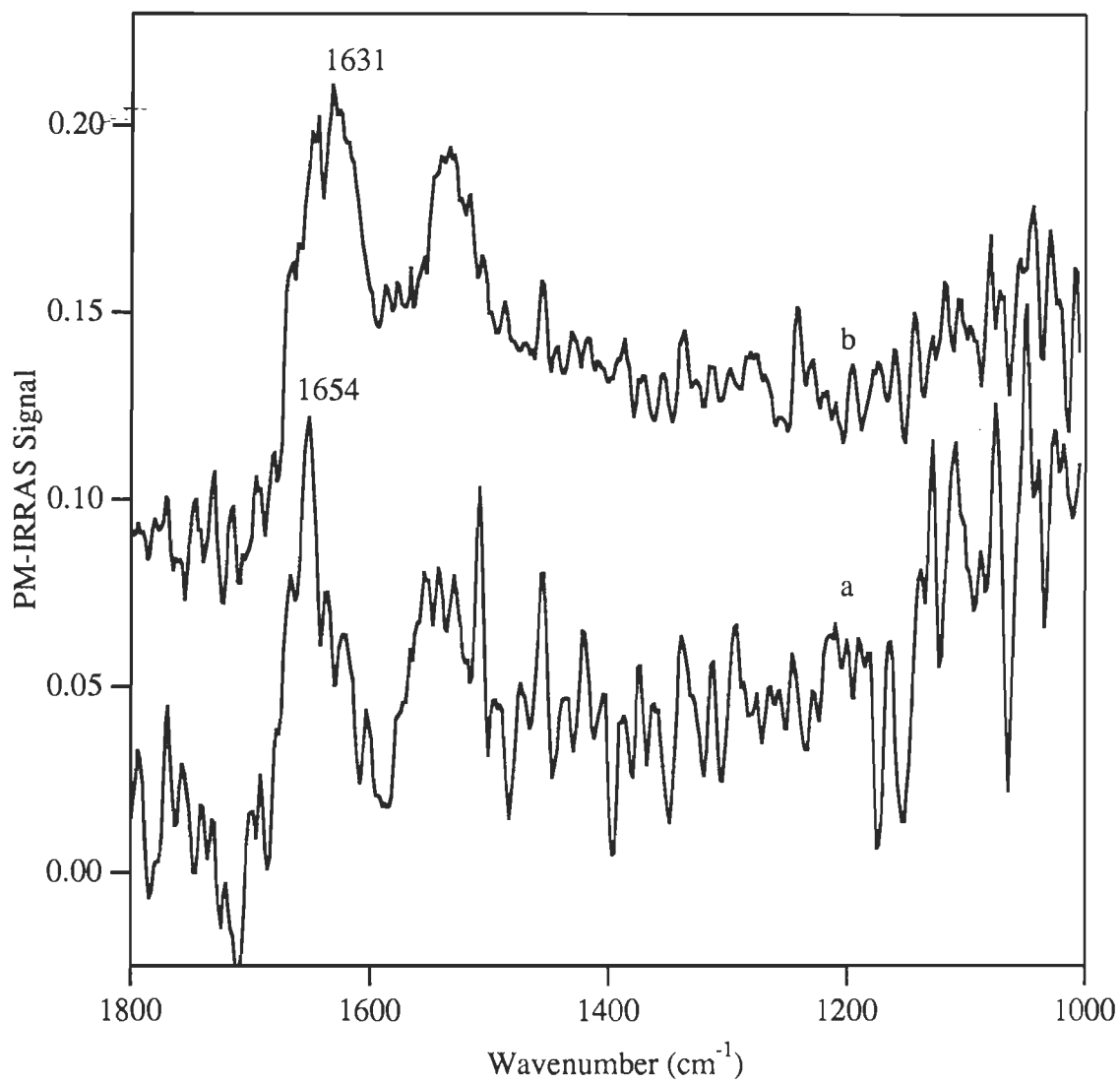


Figure 3.7 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface.

Surface pressure was set at 0.6 ± 0.1 mN/m and the film was not compressed. Spectra were recorded at: **a** - 0 min (20 scans), **b** - 30 min after spreading 20 mL of PS II CC.

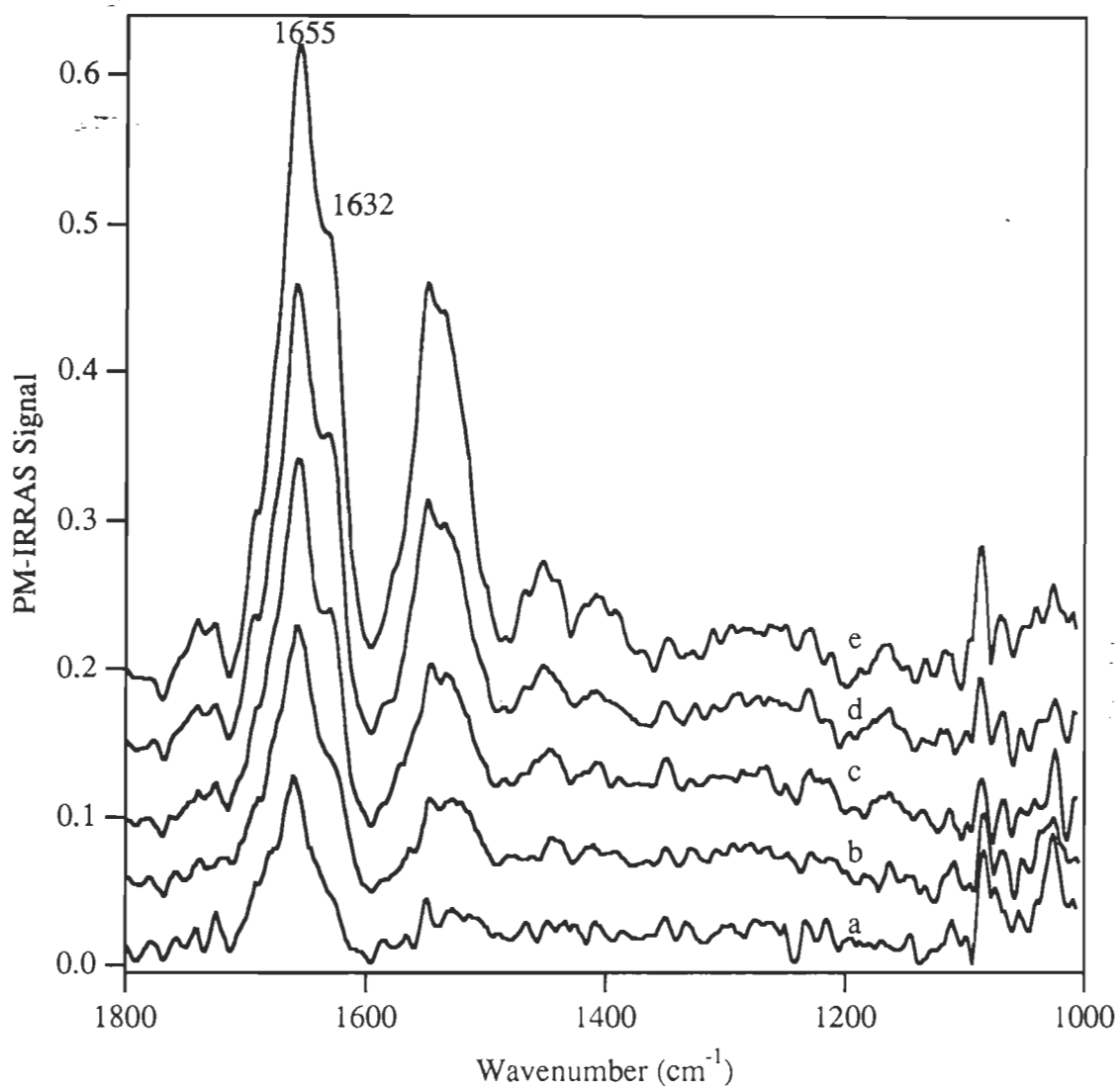


Figure 3.8 PM-IRRAS spectra of PS II CC monolayers at the nitrogen-water interface at 4 °C. Initial surface pressure was set at 0.6 ± 0.1 mN/m. Compression at $40 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$ was started 43 minutes after spreading of $20 \mu\text{L}$ of PS II CC. Spectra were measured at **a** - 0.6 mN/m, **b** - 10 mN/m, **c** - 20 mN/m, **d** - 30 mN/m and **e** - 40 mN/m.

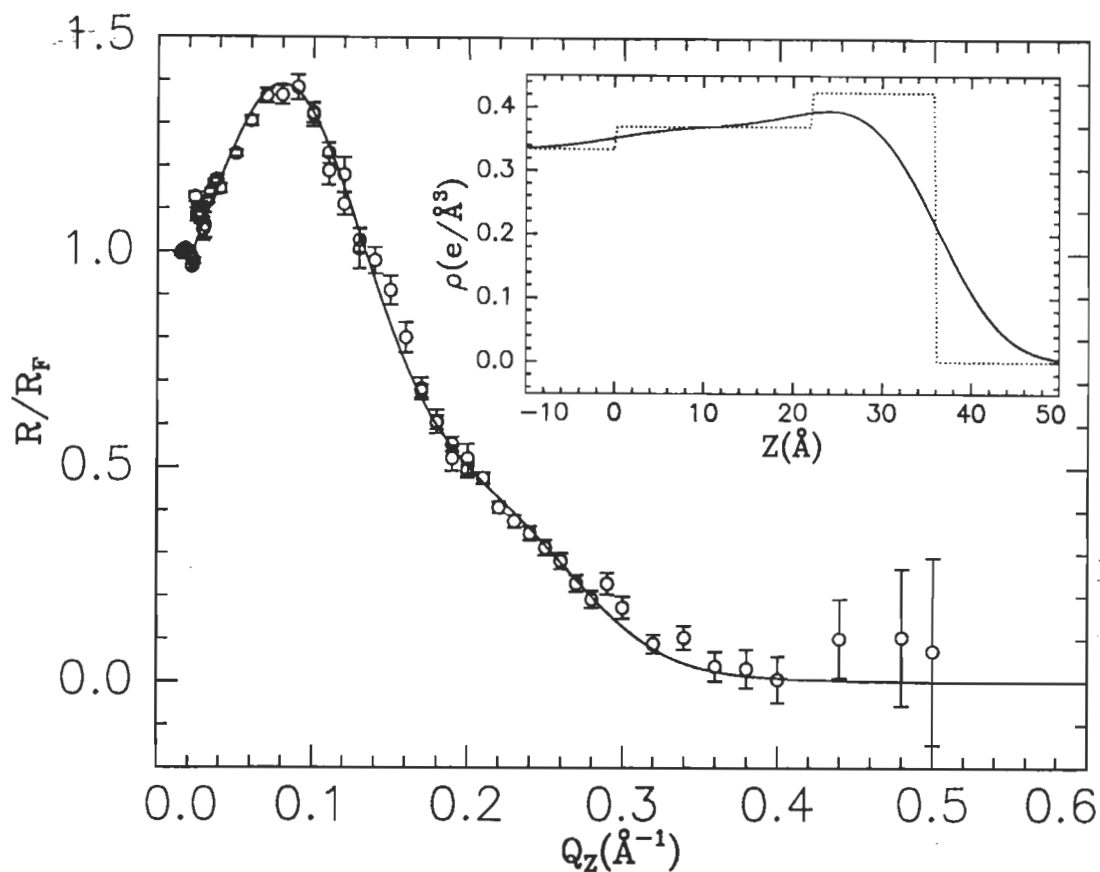


Figure 3.9 X-ray reflectivity (normalized to the Fresnel reflectivity R_F of ideally flat subphase) versus momentum transfer, Q_z , of a PS II CC monolayer. The solid curve is the calculated reflectivity obtained from the scattering length density profile shown in solid line in the inset. The dotted line in the inset corresponds to the *box model* that is smeared by a Gaussian to give the solid curve. Surface pressure was maintained at 30 mN/m during the measurement.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

Cette thèse présente une étude des propriétés de surface et spectroscopiques du PS II CC en monocouche. Les résultats qui ont été présentés aux chapitres 2 et 3 sous forme d'articles sont directement reliés entre eux. En effet, les mêmes échantillons ont été étudiés dans les mêmes conditions expérimentales avec des méthodes différentes. Dans ce dernier chapitre, l'ensemble des résultats sera intégré, ce qui permettra de tirer des conclusions sur l'ensemble du comportement du PS II CC en monocouche à l'interface air-eau.

Dans un premier temps, nous avons abordé le problème du PS II CC en monocouche par l'étude de deux conditions expérimentales différentes. La première consistait en l'étalement du complexe à une pression initiale supérieure à 5 mN/m suivi d'une compression immédiate. Nous souhaitons ainsi préserver la structure secondaire du complexe protéique en monocouche. Ceci est en effet une condition nécessaire à toute étude subséquente de cristallisation bidimensionnelle du PS II CC. La seconde condition expérimentale se voulait un contrôle négatif afin de connaître les caractéristiques de surface et spectroscopiques du PS II CC lorsqu'il est intentionnellement dénaturé. Pour y parvenir, nous avons donc étalé le PS II CC à une pression de surface initiale de moins de 1 mN/m, suivi d'une période d'incubation de 30 minutes à cette pression de surface avant la compression. Nous avons comprimé les films obtenus selon ces deux conditions

d'étalement à trois différentes vitesses de compression et ce, afin de vérifier laquelle convenait le mieux à la production de films homogènes de PS II CC intacts.

Les caractéristiques étudiées se divisent en trois classes. La première, comprenant les isothermes de pression et de potentiel de surface, la microscopie de fluorescence et la réflectivité des rayons-X qui donnent des renseignements sur le comportement et les caractéristiques globales du film. Il s'agit donc des propriétés de l'ensemble des molécules étalées à l'interface air-eau et des interactions qui se développent entre elles. La seconde classe se concentre sur les propriétés spectroscopiques des pigments. Il s'agit plus spécifiquement de la spectroscopie d'absorption et de fluorescence. Les pigments excités par la lumière réagissent de façon individuelle. Ce type de mesure fournit donc des caractéristiques moléculaires. La troisième classe de caractéristiques étudiées englobe les vibrations moléculaires du squelette polypeptidique. Il s'agit plus spécifiquement des mesures de PM-IRRAS. Les renseignements recueillis servent à déterminer l'état de la structure secondaire du PS II CC à l'interface air-eau.

Individuellement, chacune des mesures nous a informé sur l'état du PS II CC à l'interface air-eau. Par contre, la force de ce travail réside dans la cohérence des résultats entre eux. En effet, les hypothèses avancées par l'interprétation de certains résultats soutiennent celles avancées par les résultats d'autres mesures. Le présent chapitre mettra en évidence la relation entre les différents résultats.

Examinons donc les différentes observations expérimentales et les hypothèses qui ont été soulevées concernant chacun des objectifs de recherche en analysant globalement chacune des différentes conditions expérimentales.

4.1 Rôle du détergent

Plusieurs de nos mesures confirment que le détergent joue un rôle important dans l'organisation des films de PS II CC aux faibles pressions de surface mais qu'il se solubilise dans la sous-phase par l'action de la compression, comme le soutiennent Zaitsev *et al.* (1992) ainsi que Uphaus *et al.* (1997). L'une des évidences les plus éloquents est sans doute nos micrographies de fluorescence. En effet, l'image reproduite à la Figure 2.4A démontre bien qu'aux faibles pressions de surface (5.9 mN/m), il existe des régions dans le film où il n'y a pas de fluorescence. Puisque le microscope est sensible à la fluorescence de la chl, ces régions sont donc dépourvues de ce pigment et, par le fait même, de PS II CC intact. Il est donc raisonnable de supposer que ces régions correspondent à des domaines fortement enrichis en détergent qui se trouve en excès au début de la compression. La compression jusqu'à 25 mN/m (voir Figure 2.4B) diminue graduellement la dimension et la quantité de ces domaines. Le film devient de plus en plus fluorescent, indiquant ainsi une augmentation de la concentration de surface du PS II CC.

Notre interprétation de ce phénomène est soutenue par nos isothermes de pression de surface ainsi que par la spectroscopie PM-IRRAS de films de PS II CC. En effet, l'effet de la vitesse de compression sur les isothermes de pression de surface (Figure 2.2A), confirme que le détergent en excès est présent dans le film jusqu'à ce que la pression de surface atteigne 33 mN/m, pression à partir de laquelle les trois isothermes se recoupent. Les spectres PM-IRRAS ont également appuyé l'hypothèse de la solubilisation du détergent. En effet, la comparaison des spectres normalisés du PS II CC étalé à l'interface air-eau (Figure 3.4) démontre de façon évidente que le détergent voit ses bandes de vibration distinctives, autour de 1150 - 1000 cm^{-1} , disparaître du spectre lorsque la pression de surface passe de 10 à 30 mN/m. Puisque la cristallisation bidimensionnelle du PS II CC en

monocouche est intimement liée au développement d'interactions entre les complexes protéiques étalés à l'interface air-eau, la solubilisation du détergent est non seulement souhaitable mais essentielle. Nos résultats démontrent que la méthode des monocouches permet l'élimination du détergent. La mesure des spectres à pression de surface constante appuie aussi cette conclusion (voir Figure 3.5). En effet, on peut voir que l'intensité de la bande amide I a beaucoup augmenté après 30 min d'incubation à 20 mN/m alors que l'intensité des bandes de détergent a beaucoup diminué.

De plus, les spectres PM-IRRAS obtenus suite à l'incubation du PS II CC pendant 30 minutes à faible pression de surface ne montrent plus les bandes caractéristiques du détergent (voir Figure 3.6). Ces résultats suggèrent donc que le détergent est très soluble et qu'il est logique de croire que l'excès de détergent qui est trappé dans le film en compression immédiate peut être éliminé sous l'effet de l'augmentation de la pression de surface.

4.2 Conditions qui maintiennent l'intégrité du PS II CC

Cette section discute des résultats obtenus lorsque le PS II CC est étalé à l'interface air-eau à une pression de surface initiale de 5.7 mN/m (densité d'étalement: 300 nm²/molécule) et immédiatement comprimé à différentes vitesses de compression. On y retrouve également une synthèse des différentes interprétations et hypothèses soulevées par l'analyse des résultats.

4.2.1 Effet de la vitesse de compression et de la pression de surface

Nos mesures spectroscopiques (absorption, fluorescence et PM-IRRAS) nous ont

permis d'identifier les conditions expérimentales qui maintiennent l'intégrité du PS II CC à l'interface air-eau. La position des maxima, qui varient de 682.5 à 684.2 nm, ainsi que l'intensité de fluorescence du PS II CC (voir Tableau 2.1 et Figure 2.3) démontrent que quelque soit la vitesse de compression étudiée et la pression de surface atteinte, le PS II CC conserve les propriétés qu'il possède en solution ($\lambda_F = 683$ nm, voir Figure 1.7). Cependant, lorsqu'il est soumis à une faible vitesse de compression (10 nm²/molécule-min), l'apparition d'une bande à 765 nm indique que le PS II CC est légèrement endommagé.

Nos résultats en absorption confirment ce qui est déduit par les mesures de fluorescence. Ainsi, à faible vitesse de compression (10 nm²/molécule-min), la position des maxima d'absorption de la bande rouge ($\lambda_A = 673.5$ nm à 10 mN/m, voir Tableau 2.1) démontre que le PS II CC a subi une dénaturation. Par contre, les deux vitesses de compression plus rapides permettent de conserver les caractéristiques natives du PS II CC telles qu'observées en solution ($\lambda_A = 676$ nm, comparer les Figures 1.7 et 2.3).

Les spectres PM-IRRAS démontrent que la vitesse de compression et la pression de surface n'ont aucun effet sur la structure secondaire du PS II CC à l'interface air-eau dans cette condition expérimentale (voir Figure 3.3). En effet, la position de la bande amide I, qui est centrée à 1655 cm⁻¹, indique que le complexe est principalement constitué d'hélices- α . L'augmentation du signal en fonction de la pression de surface, marquant l'augmentation de la concentration interfaciale du PS II CC, n'affecte pas le rapport entre les bandes amide I et amide II. Il n'y a donc pas de redressement notable des hélices- α en fonction de la pression de surface. L'épaule à 1630 cm⁻¹ dénote la présence de feuillet- β , probablement dû à la présence du polypeptide extrinsèque de 33 kDa dont la structure secondaire est riche en ce type de structure.

L'analyse de ces différents éléments d'information spectroscopique sur l'état du PS II CC à l'interface air-eau nous permet de suggérer que les dommages encourus par le PS II CC aux faibles pressions de surface sont probablement dus à une modification des interactions pigment-protéine. En effet, puisque la structure secondaire n'est pas altérée, mais que les pigments subissent des dommages, il est logique de supposer qu'au moins une partie des pigments du PS II CC se détache de ce complexe, modifiant ainsi ses propriétés spectroscopiques (absorption et fluorescence) sans pour autant changer de façon notable les spectres PM-IRRAS.

4.2.2 Agrégation

Nous avons observé plusieurs phénomènes qui indiquent la formation d'agrégats de PS II CC lors de la compression à une vitesse de $80 \text{ nm}^2/\text{molécule}\cdot\text{min}$. L'une des plus notables est l'observation d'importantes variations non reproductibles dans les isothermes de potentiel de surface (voir Figure 2.2B). Nous avons interprété ce phénomène par la présence d'importants domaines de PS II CC agrégés. D'ailleurs, les spectres d'absorption ont également montré des indications appuyant cette interprétation. En effet, nous avons observé d'importantes variations d'intensité dans les spectres ne pouvant être expliquées que par la présence de tels agrégats (comparer les spectres b et c à la Figure 2.3A). La microscopie de fluorescence nous a également fourni des preuves très solides de la présence de ces agrégats. Ainsi, les micrographies apparaissant aux Figures 2.4C et D, enregistrées à 30 mN/m , montrent d'énormes agrégats mesurant de 100 à $200 \mu\text{m}$ de diamètre. Ces agrégats étaient plus fréquemment observés à grande vitesse de compression ($80 \text{ nm}^2/\text{molécule}\cdot\text{min}$) ainsi qu'aux pressions de surface supérieures à 30 mN/m . Nous croyons que le mouvement rapide de la barrière mobile lors de la compression à cette vitesse est l'un des facteurs dominants dans la formation de ces agrégats. En effet, les

micrographies nous indiquent que les agrégats sont orientés parallèlement à la barrière mobile. Le fait que ces images sont observées plus fréquemment aux pressions de surface supérieures et à grande vitesse de compression nous porte à croire que plus la surface du bain est réduite, plus les probabilités d'observation de ces agrégats sont grandes.

4.2.3 Stabilité du film versus solubilité du PS II CC

La stabilité du film, soit le maintien des protéines à l'interface, de même que la conservation de l'intégrité structurale du PS II CC, est un facteur important à maîtriser dans l'éventualité de la cristallisation bidimensionnelle de ce complexe à l'interface air-eau. Nous nous sommes donc assurés, dans un premier temps, de la stabilité de la structure secondaire du PS II CC à l'interface air-eau par la mesure des spectres PM-IRRAS en fonction du temps. Les résultats démontrent que la position de la bande amide I (1655 cm^{-1}) ne se déplace pas en fonction du temps (voir Figure 3.5). Les hélices- α sont donc conservées. De plus, la stabilisation de la pression de surface après les 30 premières minutes d'exposition du PS II CC à l'interface air-eau à 20 mN/m , indique qu'il n'y a pas ou peu de solubilisation de ce complexe dans la sous-phase en fonction du temps. D'ailleurs, la reproductibilité indéniable des isothermes de pression de surface appuie cette interprétation. De même, l'augmentation du signal de la bande amide I dans les spectres PM-IRRAS du PS II CC au cours de ces 30 premières minutes, témoigne de l'enrichissement progressif du film en PS II CC et de la solubilisation du détergent dans la sous-phase, ce qui diminue d'autant les possibilités de pertes du PS II CC dans la sous-phase (voir Figure 3.5). L'absence de bandes dans les spectres d'absorption et de fluorescence de la sous-phase, après l'étalement successif et la succion subséquente de trois monocouches de PS II CC suggèrent fortement que le PS II CC ne se solubilise pas dans la sous-phase.

4.2.4 Aire moléculaire

Les isothermes de pression de surface nous ont permis de calculer l'aire moléculaire du PS II CC lorsqu'il est étalé à l'interface air-eau. Nous avons tout d'abord pensé que la valeur d'aire moléculaire obtenue lorsque l'excès de détergent est éliminé de l'interface serait la valeur la plus réaliste. Cependant, la présence accrue de domaines d'agrégation à cette pression de surface, comme confirmé par la microscopie de fluorescence, pourrait provoquer une sous-estimation de l'aire moléculaire. Nous avons donc choisi d'extraire l'aire moléculaire à 25 mN/m (Voir Figure 2.2A). Nous avons donc obtenu une valeur de 54 à 67 nm² qui est en accord avec les valeurs publiées dans la littérature.

4.2.5 Orientation des hélices- α

La spectroscopie PM-IRRAS permet le calcul de l'angle moyen que font les hélices- α des protéines en monocouche avec la normale de l'interface et ce, par la comparaison des intensités des bandes amide I et amide II. Dans le cas du PS II CC, nous avons obtenu une valeur de 40°. L'angle calculé n'est pas modifié par l'augmentation de la pression de surface. Ceci confère donc au PS II CC une certaine rigidité dans sa structure secondaire. Cependant, cette valeur est très certainement surestimée par la présence d'hélices- α dans le PS II CC qui sont orientées parallèlement à l'interface. De plus, il faut être conscient que les hélices- α ne sont certainement pas parfaitement parallèles les unes par rapport aux autres comme dans le cas de protéines comme la rhodopsine ou la bactériorhodopsine (Schertler et Hargrave, 1995). Par conséquent, la valeur de l'angle obtenue devrait être considérée uniquement comme une estimation ou une valeur moyenne.

4.2.6 Épaisseur et rugosité du film, orientation du PS II CC et état monomoléculaire

La réflectivité des rayons-X nous a permis de déterminer trois facteurs structuraux importants des films de PS II CC. Dans un premier temps, l'épaisseur homogène, évaluée à 36 ± 4 Å représente, selon notre interprétation, la valeur de l'épaisseur de la portion hydrophobe du PS II CC soit, les hélices- α transmembranaires du complexe (voir Figure 3.1). Un second facteur, la rugosité, que nous avons établi à 5.8 ± 0.5 Å, est due aux formes externes du PS II CC, comme les boucles qui relient les hélices- α . Elle représente une valeur moyenne des reliefs existants à la surface de la monocouche. La présence du polypeptide extrinsèque du côté luménal du PS II CC qui provoque une protubérance de 31 Å devrait donc amener une rugosité d'environ 15 Å, soit la moitié de la hauteur totale du relief. Or, l'interface monocouche-air est plus sensible à la détermination de la rugosité que ne l'est l'interface monocouche-eau¹. La valeur de rugosité obtenue de 5.8 ± 0.5 Å pourrait donc indiquer que le polypeptide extrinsèque oriente le PS II CC de façon à ce que ce polypeptide hydrophile soit en contact avec la sous-phase.

L'état monomoléculaire du PS II CC à l'interface air-eau est confirmé par la détermination de l'épaisseur totale, qui nous donne un valeur de 58 ± 8 Å. En effet, cette valeur est en accord avec les dimensions transmembranaires publiées pour le PS II CC (60 Å, Boekema *et al.*, 1995). Cependant, elle ne tient pas compte de la présence du polypeptide extrinsèque de 33 kDa qui augmente de façon ponctuelle l'épaisseur du complexe de 60 Å à 91 Å (voir Figure 1.5 et Boekema *et al.*, 1995). Puisque les spectres PM-IRRAS montrent la présence de feuillets- β qui pourraient être attribuables à la présence de ce polypeptide à l'interface air-eau, nous avons posé l'hypothèse suivante. Si le polypeptide de 33 kDa fait face à la sous-phase, il pourrait être indétectable aux rayons-X

¹ Vaknin, D. Communication personnelle.

d'où la détermination d'une épaisseur de $58 \pm 8 \text{ \AA}$. En effet, puisque ce polypeptide ne couvre pas toute la surface luménale du PS II et si, par surcroît, son état d'hydratation diminuait sa densité électronique à une valeur proche de celle de l'eau, le polypeptide pourrait très bien devenir indétectable par cette méthode.

4.3 Conditions qui dénaturent le PS II CC

Cette section discute les résultats obtenus lorsque le PS II CC est étalé à l'interface air-eau à une pression de surface initiale de 0.6 mN/m (densité d'étalement: 600 nm²/molécule) et dont la compression, à différentes vitesses, est effectuée après une période d'incubation de 30 minutes. On y retrouve également une synthèse des différentes interprétations et hypothèses soulevées par l'analyse des résultats.

4.3.1 Dénaturation par l'incubation aux faibles pressions de surface

Nous avons tout d'abord noté que l'incubation du PS II CC en monocouche aux faibles pressions de surface ($\pi_i = 0.6 \text{ mN/m}$) produit une augmentation notable de la pression de surface jusqu'à 1.3 mN/m. Cette observation pourrait indiquer que le matériel polypeptidique étalé à l'interface s'est dénaturé pour occuper une aire moléculaire plus grande. Puisque nous avons vérifié que le détergent se solubilise spontanément dans la sous-phase au cours de ces 30 minutes d'incubation (par des mesures d'isothermes de pression de surface, voir section 2.4.2.2), nous croyons que le film est alors principalement constitué des pigments du PS II CC répartis de façon aléatoire dans une matrice polypeptidique dénaturée. Les micrographies de fluorescence montrent que quelle que soit la vitesse de compression et la pression de surface, du moment qu'elle soit au-dessous de 30 mN/m, le film est très homogène. Ceci nous indique que la distribution spatiale des chls *a* est très

uniforme. Aussi, nous avons constaté que suite à un arrêt de compression, la pression de surface reste très stable à condition qu'elle soit inférieure à 30 mN/m.

Afin de départager l'effet de la période d'incubation de celui de la pression de surface initiale, nous avons mesuré les propriétés spectrales des monocouches de PS II CC avant et après la période d'incubation de 30 minutes (voir Tableau 2.1). Nous avons constaté que seules les mesures de fluorescence démontrent que, moins d'une minute après l'étalement du PS II CC à l'interface air-eau, la position du maximum de fluorescence est déjà déplacée vers le bleu à 681.5 nm (voir Tableau 2.1), indiquant ainsi que le PS II CC commence à subir des dommages causés par la faible pression de surface à laquelle il est exposé. Par contre, les spectres d'absorption ($\lambda_A = 675$ nm, voir Tableau 2.1) et le spectre PM-IRRAS (bande à 1654 cm^{-1} , voir Figure 3.7) ne montrent aucune dégradation notable du PS II CC immédiatement après son étalement à l'interface air-eau. Ces résultats nous permettent de supposer que c'est la durée de l'exposition aux faibles pressions de surface qui représente le facteur le plus néfaste dans le processus de dénaturation du PS II CC.

Après les 30 minutes d'incubation aux faibles pressions de surface, les isothermes de pression et de potentiel de surface démontrent, respectivement, une transition et un plateau (voir Figure 2.5) qui se produisent systématiquement entre 30 et 40 mN/m à toutes les vitesses de compression étudiées. Ces observations indiquent qu'un processus physique affecte la structure des polypeptides à l'interface air-eau lorsque la pression de surface passe de 30 à 40 mN/m. Par contre, les transitions et plateaux les plus nets (voir les isothermes a dans les Figures 2.5A et 2.5B) sont ceux mesurés à 80 $\text{nm}^2/\text{molécule}\cdot\text{min}$. Il y a donc une accentuation des effets mesurés en augmentant la vitesse de compression.

Les différentes méthodes spectroscopiques utilisées pour la caractérisation du PS II

CC illustrent différentes facettes de la dénaturation du PS II CC à l'interface air-eau lorsqu'il est soumis aux faibles pressions de surface. Ainsi, le déplacement des bandes d'absorption de 669.0 à 672.5 nm (voir Tableau 2.1) est un signe évident de la dégradation de ce complexe. De même, l'importante diminution de l'intensité, ainsi que le déplacement des positions des maxima de fluorescence, de 678.8 à 681.8 nm (mesurés à 10 mN/m, voir Tableau 2.1) sont des signes additionnels de dénaturation. De plus, l'augmentation relative de la bande à 735 nm de même que l'apparition de nouvelles bandes à 715 et 765 nm dénotent la formation d'agrégats et d'oligomères de chl *a* hydratés. Il est donc indéniable que les pigments se détachent du squelette polypeptidique et subissent alors une hydratation due au contact direct entre les pigments et la sous-phase.

La spectroscopie PM-IRRAS démontre clairement que le PS II CC incubé durant 30 minutes à faible pression de surface subit une transformation qui modifie drastiquement sa structure secondaire qui, au départ, est riche en hélices- α (forme native) et devient alors principalement constituée de feuillets- β (voir Figure 3.6). Cette modification est confirmée par la diminution de la bande à 1655 cm^{-1} (hélices- α) qui est conjuguée à l'apparition de la bande à 1629 cm^{-1} (feuillets- β). Cette structure secondaire dénaturée est stable jusqu'à ce que la pression de surface atteigne 30 mN/m. Par contre, dépassé cette valeur limite, nous avons observé que la pression de surface devient instable, l'arrêt de la compression provoquant une baisse rapide de la pression de surface. Il y a donc une modification importante des caractéristiques du film qui s'amorce à 30 mN/m, comme suggéré par l'interprétation des isothermes de pression et de potentiel de surface (voir section 2.4.3.1). Les spectres PM-IRRAS démontrent d'ailleurs qu'à cette pression de surface débute une seconde transformation de la structure secondaire des polypeptides étalés à l'interface air-eau. L'ampleur de cette transformation est d'ailleurs grandement dépendante de la vitesse de compression. En effet, nous avons observé qu'à grande vitesse de compression (80

nm²/molécule·min), le passage d'une pression de surface de 30 à 40 mN/m provoquait la réapparition d'une bande importante à 1655 cm⁻¹, ce qui implique la formation de nouvelles hélices- α (voir Figure 3.6A). La quantité d'hélices produite est proportionnelle à la vitesse de compression (comparer les Figures 3.6A, B et C). La transformation est donc probablement déclenchée par l'action mécanique introduite dans le film par le mouvement rapide de la barrière mobile. Cette interprétation est aussi soutenue par la présence d'hétérogénéités dans les micrographies de fluorescence dont la fréquence d'observation est considérablement accrue aux pressions supérieures à 30 mN/m (voir Figure 2.7B). La disposition parallèle à la barrière mobile de ces hétérogénéités semble également confirmer le rôle du mouvement de la barrière mobile dans leur formation.

4.3.2 Agrégation

Les isothermes montrent une augmentation rapide de la pression et du potentiel de surface dès que la transition des feuilletts- β en hélices- α est terminée, soit aux aires moléculaires inférieures à 50 nm²/molécule et aux pressions de surface supérieures à 40 mN/m (voir Figure 2.5 et 3.5). La pente abrupte des isothermes démontre donc la formation d'un film compact. D'ailleurs, la compression entraîne la formation d'un film rigide, formé de bandes vertes visibles à l'oeil nu et qu'il est possible de retirer de l'interface à l'aide d'une aiguille, formant ainsi un mince fil vert. La dérive de la ligne de base, observée dans les spectres d'absorption (voir Figure 2.6A) confirme la formation d'une agrégation importante des PS II CC dénaturés à l'interface air-eau avant même la formation de ce film rigide.

4.3.3 Effet de la réduction de la température

Au cours de nos expériences en PM-IRRAS, une circonstance incontrôlable avait réduit la température du laboratoire à 18 °C. Nous avons alors noté une amélioration notable de la résistance du PS II CC à la dénaturation lors de l'incubation aux faibles pressions de surface. Nous avons donc refait l'expérience, en abaissant la température jusqu'à 4 °C (voir Figure 3.8). Malgré la présence de plus de feuillets- β que normalement observé dans des conditions non-dénaturantes, la majorité du PS II CC a conservé sa structure secondaire native en hélice- α . Cette condition expérimentale devrait être un atout indéniable dans l'optique de la cristallisation bidimensionnelle du PS II CC car elle pourrait permettre de stabiliser les interactions protéines-protéines en réduisant les mouvements des molécules tout en limitant les risques de dénaturation de ce complexe à l'interface air-eau.

4.4 Conditions expérimentales idéales

Suite à nos expérimentations, nous concluons que les meilleures conditions expérimentales qui pourraient éventuellement permettre de cristalliser le PS II CC en deux dimensions sont les suivantes: étalement à 300 nm²/molécule selon la méthode de Trurnit; $\pi_i = 5.7$ mN/m; compression immédiate à 40 nm²/molécule·min. En effet, les compressions trop lentes (10 nm²/molécule·min) endommagent le PS II CC alors que les compressions trop rapides (80 nm²/molécule·min) provoquent l'agrégation de PS II CC intacts, ce qui nuit à une organisation bidimensionnelle uniforme de ce complexe dans la monocouche. De plus, la réduction de la température, lors d'expériences de cristallisation pourrait non seulement améliorer les chances de succès mais réduirait d'autant les risques de dénaturation du PS II CC à l'interface air-eau.

Nous avons démontré que l'étalement aux faibles pressions de surface dénature le PS II CC en modifiant sa structure secondaire. Cependant, nos études se sont avérées riches en nouvelles observations concernant les facteurs modulant la structure secondaire des protéines aux interfaces.

4.5 Nouvelle avenue de recherche

Au cours des derniers mois, nous avons également exploré une seconde approche expérimentale ayant pour but la cristallisation bidimensionnelle du PS II CC à l'interface air-eau. Nous avons élaboré cette approche après avoir pris connaissance des travaux de Hirata et Miyake (1994) qui ont étudié la liaison du RC de *Rhodospseudomonas viridis* à un lipide portant une fonction quinonyl. Ils avaient synthétisé ce lipide dans le but de fixer la fonction quinone du lipide dans le site Q_B du RC. En étalant ce lipide à l'interface air-eau, ils ont étudié la liaison entre ces deux produits par des mesures de photoblanchiment du RC de films LB mixtes constitués de lipides quinonyl et de RCs.

Nous avons donc repris cette ingénieuse idée et la modifiant quelque peu. En effet, puisque les plastoquinones du site Q_B sont destinées, par leur activité de transporteur d'électron, à entrer et sortir du site, nous avons plutôt opté pour un lipide dont la tête polaire fonctionnalisée s'ancre de façon définitive au site Q_B. De cette façon, il serait possible de lier le PS II CC à une monocouche de ce lipide par le biais du site Q_B de façon quasi irréversible. Cette liaison permettrait d'orienter le PS II CC et pourrait ainsi induire la formation de cristaux bidimensionnels. Or, un herbicide communément utilisé, le DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée, Figure 4.1A), possède la propriété de se lier fortement au site Q_B du PS II CC (pour des revues, voir Oettmeier, 1992; Bowyer *et al.*, 1991). Nous avons donc entrepris, par des mesures de dégagement d'oxygène, l'évaluation

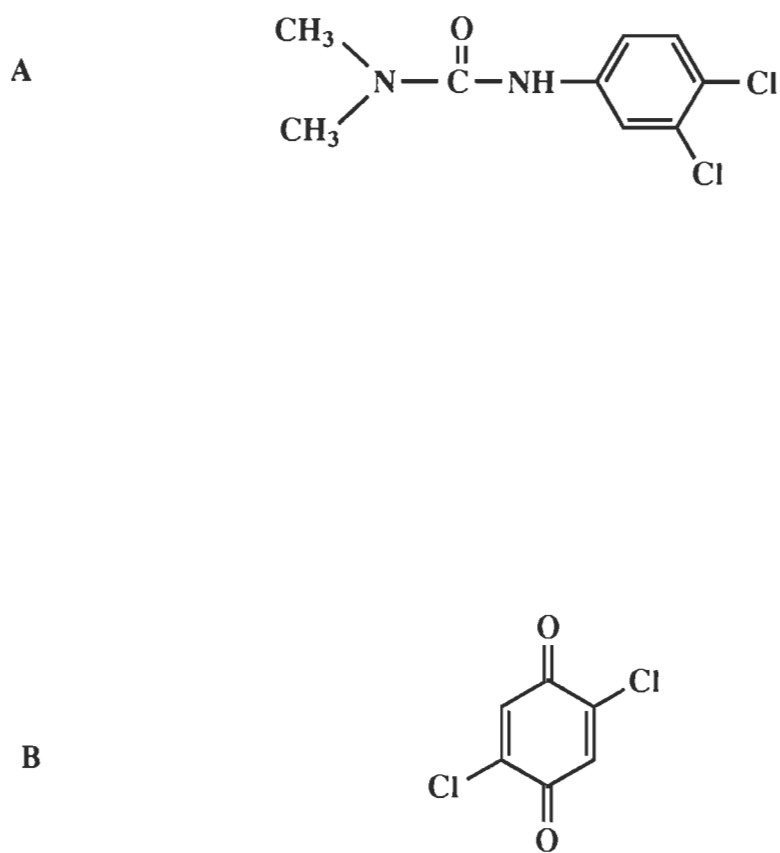


Figure 4.1 Structures de **A**- l'herbicide DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée) et **B**- l'accepteur d'électrons DCBQ (2,5-dichloro-*p*-benzoquinone).

de différents analogues du DCMU afin de choisir celui qui lie le mieux le PS II CC et qui sera ensuite utilisé dans la synthèse du lipide. La détermination de la force de liaison de l'analogue pour le site de Q_B a été évaluée par l'inhibition de la capacité de dégagement d'oxygène du PS II CC par la compétitivité entre l'analogue et le DCBQ (2,5-dichloro-*p*-benzoquinone, Figure 4.1B) qui est un accepteur d'électrons couramment utilisé lors de ces mesures. Les structures des différents analogues étudiés ainsi que les I_{50} mesurées (concentration nécessaire en analogue pour inhiber 50% du dégagement d'oxygène) sont illustrés à la Figure 4.2. Nous avons choisi l'analogue DCPU(Me)Bu pour la synthèse des lipides parce que c'est celui-là qui liait le plus efficacement le PS II CC. En effet, les mesures de compétitivité par le dégagement d'oxygène ont clairement démontré que c'est cet analogue qui avait le plus d'affinité pour le site de Q_B ($I_{50} = 9.0 \times 10^{-8}$ M). Les lipides dont les structures apparaissent à la Figure 4.3 seront prochainement utilisés afin de déterminer leur affinité de liaison avec le PS II CC.

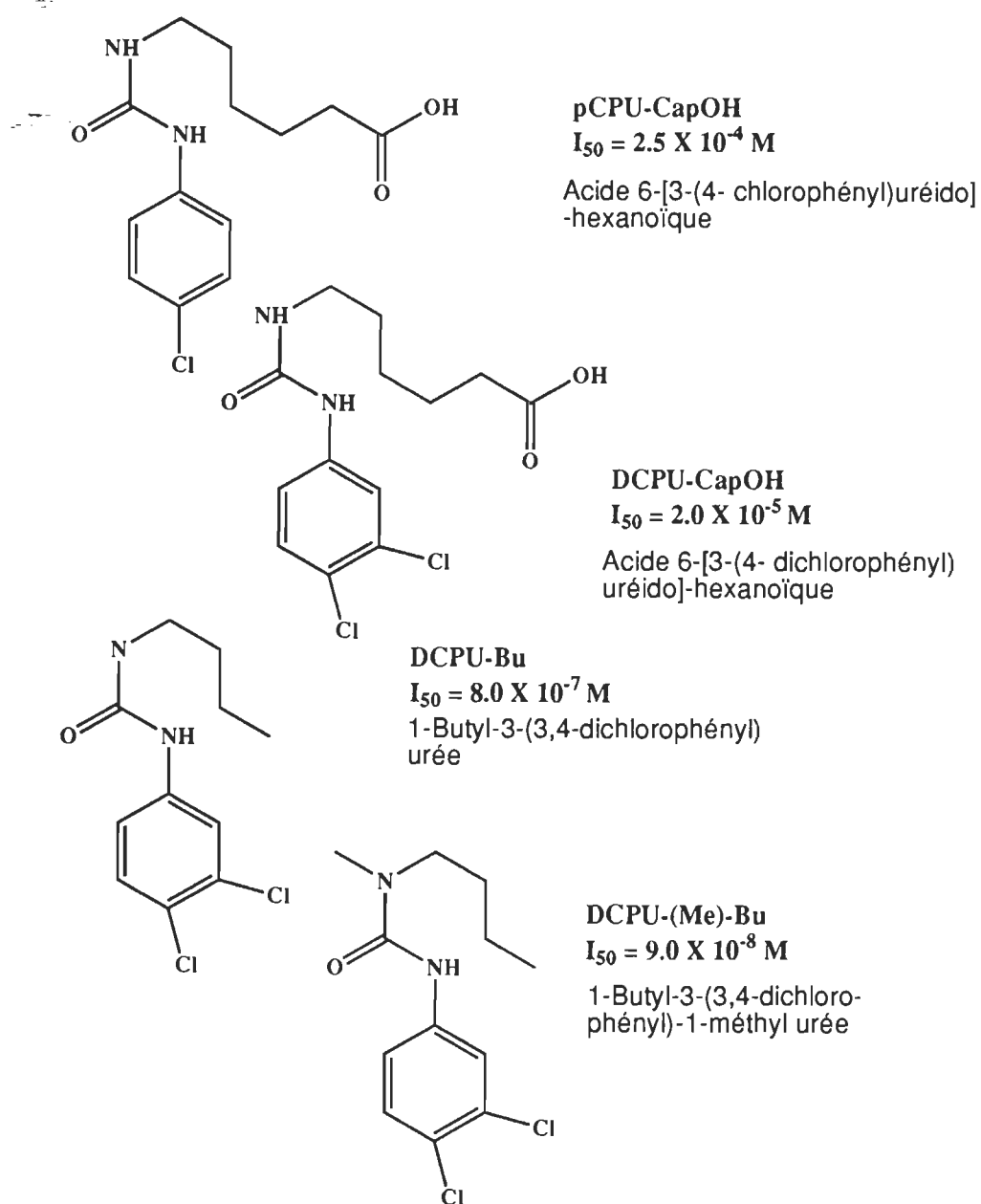


Figure 4.2 Structures des différents analogues du DCMU synthétisés par Stéphane Mons du groupe du Dr. Luc Lebeau (Université Louis Pasteur de Strasbourg). Les valeurs des I_{50} (concentration inhibant 50% du dégagement d'oxygène) obtenues sont aussi mentionnées.

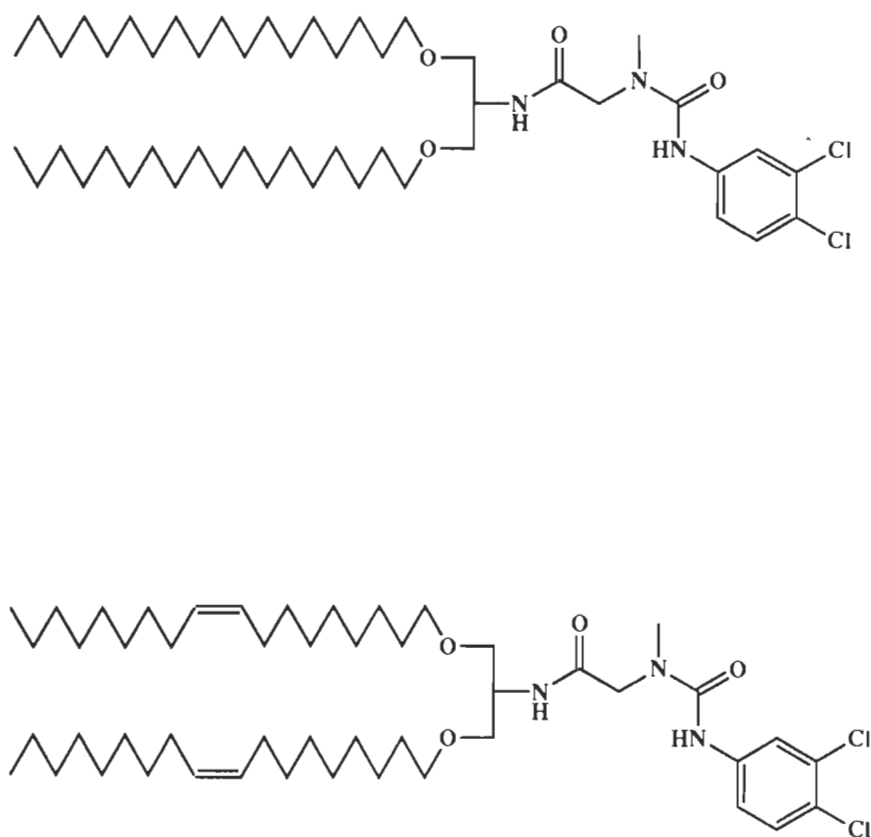


Figure 4.3 Structures des lipides synthétisés par le groupe de Strasbourg (voir Figure 4.2) dans le but d'induire la cristallisation bidimensionnelle du PS II CC en monocouche à l'interface air-eau.

4.6 Références

- Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J. et Rögner, M. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 175-179.
- Bowyer, J. R., Camilleri, P. et Vermaas, W. F. J. Photosystem II and its interaction with herbicides. In N. R. Baker & M. P. Percival (Éds.), Herbicides. Amsterdam, Elsevier, 1991, pp. 27-85.
- Hirata, Y et Miyake, J. Molecular construction of a photosynthetic reaction center at the interface by its affinity with quinonylphospholipid. Thin Solid Films, 1994, 244, 865-868.
- Oettmeier, W. Herbicides of photosystem II. In J. Barber (Éd.), The photosystems: structure, function and molecular biology. Amsterdam, Elsevier, 1992, pp. 349-408.
- Schertler, G. F. X. et Hargrave, P. A. Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 11578-11582.
- Uphaus, R. A., Fang, J. Y., Picorel, R., Chumalov, G., Wang, J. Y., Cotton, T. M. et Seibert, M. Langmuir-Blodgett and x-ray diffraction studies of isolated photosystem II reaction centers in monolayers and multilayers: physical dimensions of the complex. Photochem. Photobiol., 1997, 65, 673-679.
- Zaitsev, S. Y., Kalabina, N. A., Zubov, V. P., Lukashev, E. P., Kononenko, A. A. et

Uphaus, R. A. Monolayer of photosynthetic reaction centers of green and purple bacteria. Thin Solid Films, 1992, 210/211, 723-725.

ANNEXE

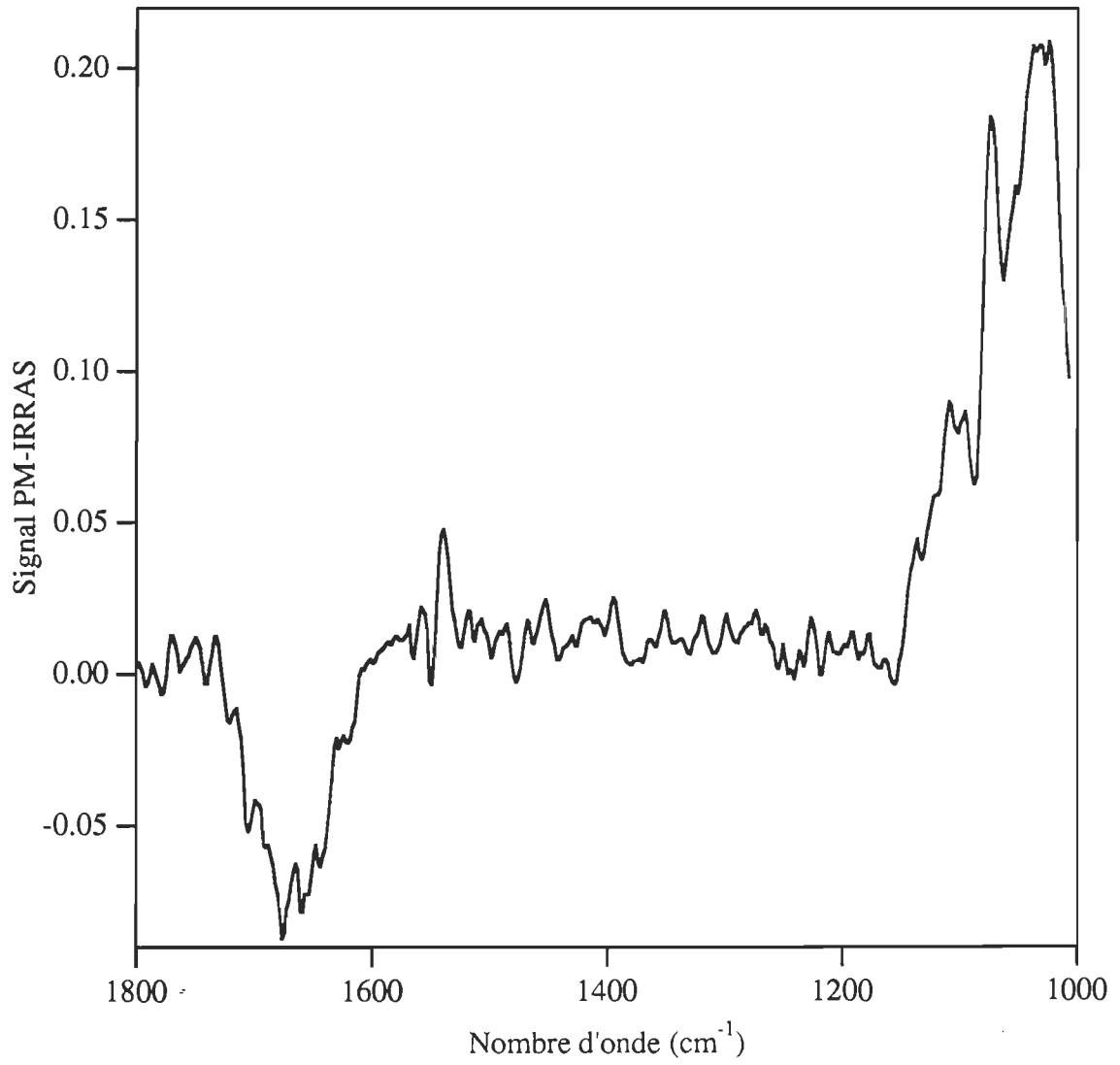


Figure A.1. Spectre PM-IRRAS du *n*-dodécyl- β -D-maltoside à l'interface air-eau.