

N° d'ordre : 2507

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

et

**L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

par **Hugo Lavoie**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : **Chimie Physique**

---

**PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DE PROTÉINES MEMBRANAIRES À  
L'INTERFACE AIR-EAU : UNE ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE PM-IRRAS ET  
RAYONS X**

---

Soutenue le : 17 mai 2002

Après avis de :

**Mme** Anne Renault

Chargé de recherches, C.N.R.S., GMCM, Rennes, France.

**M.** Michel Pézolet

Professeur, Département de chimie, Université Laval, Québec, Canada.

**Rapporteurs**

Devant la commission d'examen formée de :

**M.** Pierre Tancrède

Professeur, Département de chimie-biologie, UQTR, Canada. **Président**

**Mme** Anne Renault

Chargé de recherches, C.N.R.S., GMCM, Rennes, France.

**M.** Michel Pézolet

Professeur, Département de chimie, Université Laval, Québec, Canada.

**M.** Daniel Blaudez

Maître de conférence, CPMOH, Université Bordeaux I, France.

**M.** Christian Salesse

Professeur, Département de chimie-biologie, UQTR, Canada.

**M.** Bernard Desbat

Directeur de recherches, C.N.R.S., LPCM, Université Bordeaux I, France.



À Julie

À mes parents et amis

*“On n'arrête pas le progrès, on ne peut que le ralentir et le dévier de sa course. Si on le confond suffisamment on peut même lui faire croire qu'il avance alors qu'en fait, il recule! De toute façon, la direction pure de l'évolution est toujours différente dépendant de la façon dont on la regarde et ainsi, on peut même arriver à la faire changer de direction sans même la faire dévier de sa trajectoire.”*

© Steve Levesque



## AVANT PROPOS

Ce travail est le fruit d'une collaboration et d'une cotutelle de thèse France-Québec entre l'université de Bordeaux I et l'université du Québec à Trois-Rivières. Je tiens tout d'abord à remercier les personnes qui de près ou de loin ont contribué à sa mise en place et à sa réalisation.

Plus particulièrement, je désire remercier mon directeur de thèse Québécois, Dr. Christian Salesse, pour l'apport scientifique et financier qu'il a pu m'accorder. Merci Christian pour ta patience et ton soutien. Merci également de m'avoir donné la chance d'effectuer de nombreux stages de recherche à l'extérieur du pays.

Mes remerciements vont aussi au Dr. Bernart Desbat, mon directeur de thèse en France, pour son implication et son dévouement à la science. Merci pour tout Bernard.

Je tiens à remercier Mme Anne Renault, MM. Michel Pézolet, Daniel Blaudez et Pierre Tancrède d'avoir porté un oeil critique sur ce travail en acceptant d'être examinateurs de cette thèse.

J'aimerais remercier mes collègues et amis français (Daniel, Emmanuel, Gwenaëlle, Laurent, Michel, Sabine et Thierry) pour leur accueil et leur soutien tout au long de mes séjours à l'université de Bordeaux.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de l'UQTR (Judith, Mario, Michèle, Michel, Philippe B. et Sonia) qui ont fait de ce laboratoire un endroit de travail agréable et stimulant.

Je désire remercier Alain Tessier, Daniel Ducharme et M. François Boucher pour leur disponibilité ainsi que pour leurs explications et discussions scientifiques auxquelles j'ai pu bénéficier durant toutes ces années. Enfin, je ne pourrais terminer sans remercier les deux mousquetaires du labo d'à côté, Michel et Normand. Merci pour tout!



## **CONTRIBUTION DES COAUTEURS DES ARTICLES DE CETTE THÈSE**

Une thèse est souvent le fruit de l'apport de plusieurs personnes. Dans le cas d'une thèse sous forme d'articles, il est de mise de décrire la contribution de chacun des coauteurs des manuscrits.

### **Chapitre 2**

J'ai exécuté 90% des mesures expérimentales qui sont présentées dans cet article. J'ai interprété les résultats et écrit la première version de ce manuscrit qui a ensuite été corrigée par les coauteurs. Chaque coauteur de cet article a participé au travail de la façon suivante: D. Blaudez est responsable d'une figure de cet article; D. Vaknin a supervisé les mesures en rayons X; B. Desbat est codirecteur de cette thèse et B. Ocko nous a donné accès à son temps de synchrotron au Brookhaven National Laboratory.

### **Chapitre 3**

J'ai exécuté toutes les mesures expérimentales qui sont présentées dans ce manuscrit. J'ai aussi interprété les résultats et écrit la première version de ce manuscrit qui a ensuite été corrigée par les coauteurs. Chaque coauteur de cet article a participé au travail de la façon suivante: D. Vaknin a supervisé les mesures en rayons X et B. Desbat est codirecteur de cette thèse.

### **Chapitre 4**

J'ai exécuté 60% des mesures expérimentales qui sont présentées dans cet article. C'est un article de revue qui a été écrit par mon directeur, C. Salesse, pour comparer les résultats obtenus en PM-IRRAS avec la rhodopsine, le PSII CC et la bR. J'ai aussi préparé toutes les figures pour cet article. Chaque coauteur de cet article a participé au travail de la façon suivante: M. Grandbois et D. Blaudez ont fait les mesures avec la bR; J. Gallant avec le PSII CC; B. Desbat est codirecteur de cette thèse et F. Boucher a fourni la bR.





## AUTRES CONTRIBUTIONS DE L'AUTEUR À LA LITTÉRATURE SCIENTIFIQUE

### *Manuscrits publiés*

Tsukanova, V., H. Lavoie, A. Harata, T. Ogawa and C. Salesse (2002) Microscopic Organization of Long-Chain Rhodamine Molecules in Monolayers at the Air/Water Interface J. Phys. Chem. B 106, 4203-4213

Vranken, N., H. Lavoie, M. Van der Auweraer, C. Salesse and FC. De Schryver (2001) The formation of Highly Oriented Domains of Thiocarbocyanine Dye in a Monolayer at the Air-Water Interface Langmuir 18, 1641-1648

Vranken, N., H. Lavoie, P. Bélanger, M. Van der Auweraer, C. Salesse and FC. De Schryver (2000) Influence of molecular structure on the aggregating properties of thiocarbocynine dyes adsorbed to Langmuir films at the air-water interface Langmuir 16 , 9518-9526.

Gallant, J., H. Lavoie, A. Tessier, G. Munger, R.M. Leblanc et C. Salesse (1998) Surface and spectroscopic properties of photosystem II core complex at the nitrogen/water interface Langmuir 14, 3954-3963.

Dutta, A., H. Lavoie, K. Ohta and C. Salesse (1997) Surface pressure dependent fluorescence resonance energy transfer in mixed monolayers of amphiphilic coumarin and texas red at the air-water interface Langmuir 13, 801-807

### *Manuscrits en préparation*

Lavoie, H., P. Bélanger, J. Dufourcq and C. Salesse (2002) PLA<sub>2</sub>-mellitin synergism revealed by energy transfert fluorescence spectroscopy. (in preparation)

Lavoie, H., B. Desbat and C. Salesse (2002) Solvent history of VGA at the air-water interface: a PM-IRRAS study (in preparation)



## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	v
AVANT PROPOS.....	vii
CONTRIBUTION DES COAUTEURS DES ARTICLES DE CETTE THÈSE.....	ix
AUTRES CONTRIBUTIONS DE L'AUTEUR À LA LITHÉRAURE SCIENTIFIQUE.....	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	1
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	13
CHAPITRE 1.....	14
INTRODUCTION.....	15
1.1 Les nanotechnologies.....	15
1.1.1 L'électronique moléculaire.....	16
1.1.1.1 Les « biopuces ».....	16
1.1.1.2 Les « biodétecteurs » moléculaires.....	18
1.1.1.3 Les commutateurs moléculaires.....	18
1.1.2 La problématique de fabrication en électronique moléculaire.....	19
1.2 Les films monomoléculaires.....	19
1.3 Les nanotechnologies et les protéines.....	21
1.4 Les propriétés structurales des protéines.....	22
1.4.1 La structure des protéines.....	22
1.4.1.1 La structure primaire des protéines.....	23
1.4.1.2 La structure secondaire des protéines.....	23
1.4.1.2.1 Les hélices.....	24
1.4.1.2.2 Les feuillets $\beta$ .....	26
1.4.1.2.3 Les coudes.....	29
1.4.1.2.4 Les structures désordonnées.....	29
1.4.1.3 La structure tertiaire des protéines.....	30
1.4.1.4 La structure quaternaire des protéines.....	30

1.4.2	Les familles de protéines .....	30
1.5	Détermination de la structure secondaire des protéines par spectroscopie infrarouge .....	31
1.5.1	La spectroscopie infrarouge.....	32
1.5.1.1	Régions spectrales spécifiques aux protéines.....	32
1.5.1.2	Les modes vibrationnels de la chaîne polypeptidique.....	33
1.5.1.3	Détermination de la conformation de la chaîne polypeptidique .....	34
1.6	La gramicidine .....	37
1.6.1	L'origine et les fonctions de la gramicidine .....	37
1.6.1.1	Synthèse biologique de la gramicidine .....	37
1.6.1.2	Fonction de la gramicidine dans <i>Bacillus brevis</i> .....	38
1.6.1.3	Fonction antibiotique de la gramicidine.....	38
1.6.2	La structure secondaire de la gramicidine .....	39
1.6.3	Études antérieures sur l'organisation de la gramicidine dans les membranes et en monocouche .....	40
1.7	La rhodopsine.....	41
1.7.1	La structure de l'œil .....	42
1.7.2	La structure de la rhodopsine .....	43
1.7.2.1	La structure primaire de la rhodopsine .....	44
1.7.2.2	La structure secondaire de la rhodopsine.....	45
1.7.2.3	La structure tertiaire de la rhodopsine .....	48
1.7.3	L'activation de la rhodopsine .....	48
1.7.4	Le mécanisme de transduction visuelle .....	50
1.7.5	Études antérieures sur la rhodopsine en monocouche.....	52
1.8	Objectifs du travail de recherche de cette thèse.....	53
1.8.1	La gramicidine à l'interface air-eau .....	54
1.8.2	La rhodopsine à l'interface air-eau.....	55
1.9	Références.....	57
CHAPITRE 2.....		91
SPECTROSCOPIC AND STRUCTURAL PROPERTIES OF VALINE GRAMICIDIN A IN MONOLAYERS AT THE AIR-WATER INTERFACE .....		93
2.1	Abstract .....	94
2.2	Introduction.....	95

2.3	Materials and methods .....	97
2.3.1	Surface pressure isotherms .....	97
2.3.2	X-ray reflectivity and X-ray GID measurements .....	97
2.3.3	PM-IRRAS measurements .....	98
2.4	Results and Discussion .....	99
2.4.1	X-ray Reflectivity, Thickness and Surface Pressure Measurements .....	99
2.4.2	X-ray GID measurements .....	101
2.4.3	PM-IRRAS measurements on pure H <sub>2</sub> O .....	102
2.4.4	PM-IRRAS measurements on pure D <sub>2</sub> O .....	103
2.4.5	Simulation of the PM-IRRAS spectra and estimation of the water contribution .....	104
2.5	Conclusions .....	107
2.6	Acknowledgements .....	109
2.7	References .....	110
CHAPITRE 3 .....		127
STRUCTURE OF RHODOPSIN IN MONOLAYERS AT THE AIR-WATER INTERFACE: A PM-IRRAS AND X-RAY REFLECTIVITY STUDY .....		129
3.1	Abstract .....	130
3.2	Introduction .....	131
3.3	Experimental methods .....	133
3.3.1	Purification of rod outer segment disk membranes and rhodopsin .....	133
3.3.2	Film formation .....	133
3.3.3	PM-IRRAS measurements .....	134
3.3.4	X-ray reflectivity .....	134
3.3.5	Surface roughness .....	135
3.4	Results and Discussion .....	137
3.4.1	Effect of different parameters on the molecular area of rhodopsin .....	137
3.4.1.1	Effect of spreading surface pressure, temperature and incubation time .....	137
3.4.1.2	Effect of temperature, immediate compression after spreading and compression speed .....	138
3.4.1.3	Molecular area of rhodopsin and estimation of ROS disk membrane lateral pressure .....	139

3.4.2	Infrared spectrum of native rhodopsin in ROS disk membranes.....	139
3.4.3	Effect of different parameters on the structure of rhodopsin in monolayers .....	140
3.4.3.1	Effect of incubation time on the structure of rhodopsin in monolayers.....	140
3.4.3.2	Effect of immediate compression after spreading on the structure of rhodopsin in monolayers .....	142
3.4.3.3	Effect of the decrease in surface pressure during compression on the structure of rhodopsin in monolayers.....	143
3.4.4	Effect of temperature on the structure of rhodopsin in monolayers.....	144
3.4.5	Effect of surface pressure on the secondary structure of rhodopsin .....	145
3.4.6	Stability of rhodopsin structure in monolayers as a function of time .....	145
3.4.7	Comparison between the films of rhodopsin in different experimental conditions.....	146
3.4.8	PM-IRRAS spectra of monolayers of ROS disk membranes .....	146
3.5	Conclusion.....	148
3.6	Acknowledgements .....	150
3.7	References .....	151
CHAPITRE 4.....		171
THE BEHAVIOR OF MEMBRANE PROTEINS IN MONOLAYERS AT THE GAS-WATER INTERFACE: COMPARISON BETWEEN PHOTOSYSTEM II, RHODOPSIN AND BACTERIORHODOPSIN.....		173
4.1	Abstract .....	174
4.2	Introduction.....	175
4.3	Materials and Methods .....	177
4.3.1	Purification of Photosystem II Core Complex.....	177
4.3.2	Purification of Rhodopsin .....	177
4.3.3	Purification of Purple Membranes.....	177
4.3.4	Film Formation.....	178
4.3.5	PM-IRRAS Measurements.....	178
4.4	Results and Discussion .....	180
4.4.1	Effect of Spreading of PS II CC and Rho at a Surface Pressure of 5 mNm <sup>-1</sup> on their Structure.....	180

4.4.2	Effect of Increasing Surface Pressure on the Structure of PS II CC and Rho .....	181
4.4.3	Effect of Low Surface Pressure Incubation on the Structure of PS II CC and Rho .....	182
4.4.4	Effect of Low Temperature on the Structure of Rho.....	182
4.4.5	Effect of Spreading Purple Membranes on the Structure of bR in Monolayers .....	183
4.4.6	Comparison Between the Intensity of the Amide I Band of PS II CC, Rho and bR.....	184
4.4.7	Comparison Between the Behavior of PS II CC, Rho and bR in Monolayers .....	185
4.5	Acknowledgments .....	187
4.6	Références .....	188
CHAPITRE 5.....		199
CONCLUSION .....		199
5.1	Récapitulation des résultats .....	199
5.1.1	La gramicidine A à l'interface air-eau.....	199
5.1.1.1	La structure secondaire de la VGA.....	199
5.1.1.2	Orientation de la VGA à l'interface air-eau .....	200
5.1.1.3	Organisation de la VGA à l'interface air-eau.....	201
5.1.1.4	Structuration de l'eau .....	201
5.1.1.4.1	Simulations des spectres PM-IRRAS sur l'eau .....	202
5.1.1.5	Comparaison entre la valine gramicidine et l'isoleucine gramicidine.....	203
5.1.1.6	Effet du solvant d'étalement sur la structure de la gramicidine.....	205
5.1.2	La rhodopsine à l'interface air-eau.....	207
5.1.2.1	Effet de différentes conditions expérimentales sur la structure de la rhodopsine.....	207
5.1.2.1.1	Effet de la vitesse de compression.....	208
5.1.2.1.2	Effet de la pression de surface initiale.....	208
5.1.2.1.3	Effet de la période d'incubation.....	209
5.1.2.1.4	L'effet de la température .....	209
5.1.2.2	Stabilité du film de rhodopsine en fonction du temps.....	210

5.1.2.3	Épaisseur du film de rhodopsine.....	211
5.1.2.4	Effet de la lumière.....	212
5.1.2.5	Les conditions idéales pour maintenir l'intégrité de la rhodopsine.....	213
5.2	Perspectives de recherche.....	214
5.2.1	Les avenues de recherche pour la gramicidine .....	214
5.2.2	Les avenues de recherche pour la rhodopsine.....	214
5.2.2.1	Tentatives de cristallisation.....	214
5.2.2.2	Modèle simplifié d'interactions moléculaires.....	216
5.3	Références.....	217



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Modèles d'hélices vues de côté et du dessus.....	25
Figure 1.2: Représentation du macrodipôle formé dans l'hélice $\alpha$ résultant de l'addition de tous les microdipôles présents dans chaque acide aminé .....	26
Figure 1.3: Structure schématisée des feuillets $\beta$ parallèles et antiparallèles .....	27
Figure 1.4: Structure en feuillet $\beta$ provenant de la structure tridimensionnelle de la thioredoxine.....	28
Figure 1.5: Schéma représentant les déplacements atomiques impliqués dans les modes vibrationnels des bandes amide.....	34
Figure 1.6: Structure secondaire proposée pour la gramicidine dans une membrane lipidique.....	40
Figure 1.7: Structure de l'oeil des vertébrés (haut) et photo des photorécepteurs de la rétine .....	43
Figure 1.8: Modèle d'organisation de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine dans la bicouche lipidique et structure primaire de la rhodopsine.....	45
Figure 1.9: Structure tertiaire de la rhodopsine .....	47
Figure 1.10: Séquence des photointermédiaires de la rhodopsine .....	49
Figure 1.11: Schéma de l'activation de la phototransduction.....	51
Figure 2.1: X-ray reflectivity of VGA at 20°C normalized to the reflectivity of pure water subphase.....	117

Figure 2.2: (A) Surface pressure isotherm of VGA at 20°C on pure water. (B) Thickness of VGA on pure water versus the molecular area as determined by X-ray reflectivity .....	118
Figure 2.3: X-ray grazing incidence diffraction of VGA <i>in situ</i> at the air/water interface at a surface pressure of 25 mNm <sup>-1</sup> .....	119
Figure 2.4: PM-IRRAS spectra of VGA <i>in situ</i> at the air/water interface on pure H <sub>2</sub> O at different surface pressures .....	120
Figure 2.5: PM-IRRAS spectra of VGA <i>in situ</i> at the air/water interface on pure D <sub>2</sub> O at different surface pressures .....	121
Figure 2.6: (A) Peak position of the amide I' band as a function of the molecular area. (B) Intensity of the amide I' band normalized to the in-plane density as a function of the surface pressure .....	122
Figure 2.7: PM-IRRAS spectra simulation of six different gramicidin secondary structures .....	123
Figure 2.8: Comparison between the simulated and the experimental spectra of gramicidin.....	124
Figure 2.9: Comparison between the simulated and the experimental spectra at 40 mNm <sup>-1</sup> on H <sub>2</sub> O using the same parameters as those used on D <sub>2</sub> O.....	125
Figure 2.10: Schematic representation of VGA in monolayers at the air-water interface .....	126
Figure 3.1: Surface pressure isotherms of pure rhodopsin at the air water interface .....	160
Figure 3.2: FTIR spectrum of the rod outer segment disk membranes in solution..	161

- Figure 3.3: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. (A and B) Spreading at  $0 \text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time. (C and D) Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time ..... 162
- Figure 3.4: X-ray reflectivity (normalized to the Fresnel reflectivity  $R_F$  of ideally flat subphase) versus momentum transfer  $Q_v$  of a rhodopsin monolayer at  $11.7 \text{ mNm}^{-1}$  ..... 163
- Figure 3.5: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. (A) Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (B) Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ..... 164
- Figure 3.6: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. Spreading at  $10 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  ..... 165
- Figure 3.7: X-ray reflectivity (normalized to the Fresnel reflectivity  $R_F$ ) versus momentum transfer  $Q_z$  of a rhodopsin monolayer at  $21 \text{ mNm}^{-1}$  ..... 166
- Figure 3.8: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  on a subphase at  $4^\circ\text{C}$ .... 167
- Figure 3.9: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin measured as a function of time. Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  on a subphase at  $4^\circ\text{C}$  until a surface pressure of  $20 \text{ mNm}^{-1}$  is reached ..... 168
- Figure 3.10: Normalized PM-IRRAS spectra of rhodopsin at  $20 \text{ mNm}^{-1}$  using the amide I band. Spectrum a is the spectrum at 120 min in Fig. 3.9 whereas spectra b and c are the spectra at  $20 \text{ mNm}^{-1}$  in Figs. 3.6 and 3.8, respectively ..... 169

Figure 3.11: PM-IRRAS spectra of ROS disk membranes at different surface pressures. Compression speed is $10 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ .....	170
Figure 4.1: PM-IRRAS spectra of PS II CC and Rho monolayers at the nitrogen-water interface.....	192
Figure 4.2: Comparison of normalized PM-IRRAS spectra of <b>(A)</b> PS II CC and <b>(B)</b> Rho monolayers at the nitrogen-water interface spread at an initial surface pressure of $5.7$ and $5.0 \text{ mNm}^{-1}$ , respectively. ....	193
Figure 4.3: PM-IRRAS spectra of PS II CC and Rho monolayers at low surface pressure at the nitrogen-water interface. <b>(A)</b> PS II CC - Initial surface pressure was set at $0.6 \text{ mNm}^{-1}$ . <b>(B)</b> Rho - Initial surface pressure was set at $0 \text{ mNm}^{-1}$ .....	194
Figure 4.4: PM-IRRAS spectra of Rho monolayer at the nitrogen/water interface at $4^\circ\text{C}$ .....	195
Figure 4.5: PM-IRRAS spectra of bacteriorhodopsin monolayers at the nitrogen-water interface.....	196
Figure 4.6: Calculated PM-IRRAS spectra in the amide I and amide II region of pure $\alpha$ -helices versus the tilt angle between the helices' axis and the normal to the interface.....	197
Figure 5.1: Simulation de la VGA sur l'eau avec l'ajout d'une couche d'eau anisotrope de $10 \text{ \AA}$ .....	202
Figure 5.2: Spectre (A) de la valine gramicidine A et (B) de l'isoleucine gramicidine A à différentes pressions de surface.....	204
Figure 5.3: Comparaison entre les spectres de la VGA et l'IGA à $40 \text{ mNm}^{-1}$ .....	205
Figure 5.4: Spectres de l'isoleucine gramicidine A à différentes pressions de surface étalée avec différents solvants .....	206

Figure 5.5: Comparaison entre les spectres de l'isoleucine gramicidine A à une pression de surface de $40 \text{ mNm}^{-1}$ suite à leur étalement avec différents solvants .....	207
Figure 5.6: Spectre d'un film de rhodopsine maintenu à $20 \text{ mNm}^{-1}$ en fonction du temps sur une sous-phase à (A) $21^\circ\text{C}$ et (B) $4^\circ\text{C}$ .....	211
Figure 5.7: Spectre de rhodopsine à $25 \text{ mNm}^{-1}$ avant et après illumination.....	213
Figure 5.8: Images en microscopie électronique d'un film de rhodopsine.....	215

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1.1: Position et contribution de chacune des vibrations amide dans la région entre 1000 et 1800 $\text{cm}^{-1}$ .....	35
Tableau 1.2: Fréquences moyennes observées pour le mode amide I en fonction de la structure secondaire .....	36
Tableau 2.1: Structural parameter of the two-box model for VGA on water as determined from X-ray reflectivity measurements .....	116
Tableau 5.1: Résumé des mesures en réflectivité des rayons X .....	212

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

$\pi$ .....	Pression de surface
$\pi_i$ .....	Pression de surface initiale
$\rho$ .....	Densité électronique
$\sigma$ .....	Rugosité
A .....	Aire moléculaire
AI/All .....	Ratio amide I/Amide II
ALO.....	Amonyx LO
ATR.....	Attenuated total reflection
bR .....	Bactérorhodopsine
cGMP .....	Guanosine-3: 5'-monophosphate cyclique
Chl .....	Chlorophyle
D1 et D2.....	Polypeptides du centre réactionel du PSII
$d_{TOT}$ .....	Épaisseur totale de films à l'interface air-eau
FTIR.....	Fourier transform infrared ou infrarouge à transformé de fourier
$G_{\alpha\beta\gamma_t}$ .....	Transducine
$G_{\alpha_t}$ .....	Sous-unité $\alpha$ de la transducine
GA.....	Gramicidine A
GDP .....	Guanosine diphosphate
GTP .....	Guanosine triphosphate
IGA.....	isoleucine gramicidine A

IRRAS .....	Infrared reflection absorption spectroscopy
LB .....	Langmuir-Blodgett
MI .....	Métarhodopsine I
MII .....	Métarhodopsine II
PDE .....	Phosphodiesterase
PM-IRRAS .....	Polarisation modulation IRRAS ou spectroscopie de réflectivité infrarouge différentielle par modulation de polarisation
PS II .....	Photosystème II
$Q_z$ .....	Moment de transfert
$R/R_F$ .....	Réfectivité des rayons X normalisée
Rho .....	Rhodopsine
RMN .....	Résonance magnétique nucléaire
SEB .....	Segment externe du bâtonnet
VGA .....	Valine gramicidine A
XGID .....	X-ray grating incidence diffraction ou diffraction des rayons X à angle rasant



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 *Les nanotechnologies*

L'électronique a fait des pas de géant depuis les vingt dernières années. Les appareils électroniques utilisés dans notre vie de tous les jours sont de plus en plus rapides et petits. Par exemple, la microtechnologie permet aux calculatrices d'aujourd'hui d'avoir une puissance de calcul plusieurs fois plus grande que celle des meilleurs ordinateurs datant de 40 ans (Groves, 1995). Les besoins sans cesse grandissants de l'industrie et de la société pour des composantes toujours plus petites et plus rapides poussent la microélectronique moderne à ses limites pragmatiques.

Un scientifique tel que Forrest L. Carter a eu l'idée de passer de la microélectronique à l'électronique à l'échelle moléculaire (Carter, 1987; Hong, 1994). Cette théorie est appelée « nanoélectronique ». Les possibilités de ce concept semblent illimitées.

La nanotechnologie est maintenant à nos portes. Cette technologie passe par l'implantation de systèmes utilisant des molécules organiques ou biologiques. Avec toutes les connaissances acquises en chimie et en biochimie, il est possible d'obtenir en abondance des structures moléculaires permettant le traitement de signaux électriques. Ceci signifie, du moins en théorie, que ces possibilités structurales et fonctionnelles peuvent être employées pour réaliser les fonctions nécessaires aux circuits intégrés à un niveau moléculaire.

Récemment, la fabrication de fils moléculaires (molecular electronic wire) a été démontrée, de diodes électroniques moléculaires, de jonctions moléculaires et de commutateurs électriques moléculaires faits d'une seule molécule (Andres *et al.*, 1996; Bumm *et al.*, 1996; Dekker *et al.*, 1997; Dhirani *et al.*, 1997; Metzger *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1997 et 1998; Tans *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997a et b; Reinerth *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999a, b et 2000; Reed, 1999; Tans et Dekker, 2000; Donhauser *et al.*, 2001; Tour *et al.*, 2001). Ces développements prometteurs dans le

domaine de la nanotechnologie suggèrent la possibilité de produire des composantes électroniques plus complexes à l'aide de ces éléments de base.

### 1.1.1 *L'électronique moléculaire*

L'électronique au niveau moléculaire offre plusieurs avantages. Premièrement, la taille des dispositifs nanoélectroniques serait plusieurs centaines de fois inférieure à celle des plus petits circuits de silicium actuels (Groves, 1995). Deuxièmement, si l'espace physique attribué à un circuit basé sur le silicium était attribué à un circuit moléculaire, les processus informatiques seraient beaucoup plus rapides et plus puissants. Troisièmement, l'utilisation de l'électronique moléculaire pourrait diminuer les coûts de fabrication des composantes électroniques de façon considérable (Albrecht, 1989).

Le concept mis en place semble assez simple mais en pratique c'est une toute autre histoire. Le problème principal est de synthétiser et d'organiser les molécules de façon stable et efficace afin de produire ces dispositifs électroniques. Actuellement, la technologie n'est pas encore disponible pour accomplir de tels agencements microscopiques (Mahler *et al.*, 1996).

Il est permis de croire que des molécules peuvent être insérées dans le corps humain et servir de petites « puces » qui pourront contrôler les fonctions du corps, stocker de l'information ou des signaux de processus biologiques. La réalisation d'une telle puce serait une étape très importante, car elle permettrait à des dispositifs synthétiques de mesurer des signaux provenant des systèmes biologiques sans l'exigence de fils attachés au corps humain (Nicolini, 1996).

Plusieurs types de dispositifs utilisant l'électronique moléculaire ont été étudiés tels que les micropuces à base biologique ou « biopuces », les biodétecteurs et les commutateurs composés de molécules biologiques. Ces dispositifs seront décrits dans les prochaines sections.

#### 1.1.1.1 *Les « biopuces »*

L'intérêt pour les « biopuces » est apparu dans les années 1980, lorsque l'idée de construire des composantes électroniques fabriquées à partir de molécules

organiques ou de protéines germa de l'imagination de plusieurs scientifiques (Birge, 1990, 1992 et 1995; Chen *et al.*, 1995; Nicolini, 1996). Les chercheurs ont prouvé que ces biopuces pourraient être fabriquées à l'échelle moléculaire (Luscombe et Frensley, 1990; Luscombe, 1993; Mujica *et al.*, 1994a et b; Joachin et Vinuesa, 1996). Cette possibilité contribuerait à diminuer l'échelle d'intégration des circuits intégrés de plusieurs ordres de grandeur (Kaminima, 1991). De plus, les lois de la mécanique quantique ainsi que les limitations des techniques de fabrication démontrent que l'électronique d'aujourd'hui arrive à ses limites. En effet, les chercheurs prévoient qu'une miniaturisation des transistors à semi-conducteur au-delà de 0.1  $\mu\text{m}$  affectera leur bon fonctionnement (Frazier, 1988; Keyes, 1988; 1992 et 1993; Stix, 1995). De là, les efforts ont été concentrés sur la compréhension de l'écoulement d'électrons entre les molécules.

Les molécules biologiques et les protéines telles que la chlorophylle, les enzymes, la bactériorhodopsine (bR), la rhodopsine, le photosystème II (PS II) et bien d'autres protéines fonctionnelles sont des candidats intéressants pour l'élaboration de composantes bioélectroniques. Ces composantes auront la capacité de transformer et de transférer de l'information moléculaire, photonique et électrique (Hong, 1989).

Les développements récents en biologie moléculaire ont permis à l'électronique moléculaire d'imaginer des dispositifs pouvant détecter des maladies au niveau moléculaire et génétique. Une application de ce type de dispositifs moléculaires est l'utilisation du commutateur d'ADN. Les commutateurs d'ADN sont des dispositifs moléculaires qui possèdent la capacité de découvrir des mutations. L'utilisation la plus commune de cette puce d'ADN pourrait être la recherche de mutations ponctuelles. Cependant, le système peut être modifié pour examiner tous les types de mutations (suppression, inversion, translocation et insertion). Ce système d'identification génétique peut être employé pour balayer la séquence d'ADN pour la recherche des défauts génétiques connus aussi bien que pour déterminer le génotype dans le but d'analyse relationnelle ou d'identification légale et judiciaire (Sabanayagam, 1999).

Le gène « p53 » est responsable de mutations sur les protéines de 60% des cellules cancéreuses. Les études ont démontré que chez les femmes atteintes du cancer du sein, celles ayant une tumeur porteuse du gène « p53 » muté sont plus sujettes à développer des métastases que celles dont la tumeur ne possède pas ce gène. Des

chercheurs ont mis au point des puces pouvant détecter le gène « p53 ». Par conséquent, des nanorobots capables de détecter cette mutation seraient très utiles pour les médecins quand viendrait le temps de déterminer la thérapie que devrait recevoir la personne atteinte du cancer (Stipp, 1997). Le champ d'étude ouvert par l'application de ce type de dispositif moléculaire à la médecine se nomme « nanomédecine ».

#### 1.1.1.2 Les « biodétecteurs » moléculaires

L'une des caractéristiques les plus intéressantes des molécules biologiques est leur capacité à déterminer les molécules avec lesquelles elles peuvent s'associer. Par exemple, les enzymes possèdent la capacité d'identifier et de localiser leur substrat. Il en est de même pour les hormones et leurs récepteurs. Les dispositifs moléculaires qui tirent profit de ces caractéristiques s'appellent les détecteurs bioélectriques ou biodétecteurs. Les premiers travaux notables dans le domaine des biodétecteurs ont été effectués dans les années 1960. Les premiers biodétecteurs produits sont des capteurs d'oxygène (Kaminima, 1991).

Les systèmes moléculaires organiques sont maintenant à l'étude pour produire des structures et des architectures supramoléculaires en utilisant des matériaux synthétiques et biologiques qui serviront à construire des biodétecteurs. Parmi les applications biologiques, les biodétecteurs sont utilisés afin de reproduire les fonctions sensorielles ainsi que des capteurs capables de mesurer des forces de contact et de fournir de l'information sur les propriétés mécaniques et la nature d'un objet sont à l'étude (Rossi *et al.*, 1994).

Les problèmes rencontrés lors du développement des biodétecteurs concernent la dégradation des molécules en dehors de leur environnement normal et la complexité de l'interface entre le corps humain et le biodétecteur (Rossi *et al.*, 1994).

#### 1.1.1.3 Les commutateurs moléculaires

Un autre type de dispositif électronique est le commutateur. La définition d'un commutateur moléculaire est décrite par la capacité d'une molécule d'exister sous deux états différents, soit un état « ON » ou en fonction et un état « OFF » ou hors

fonction (Nespurek et Sworakowski, 1994). Quatre types de commutateurs moléculaires existent soit: 1- par processus de torsion où une torsion de la molécule autour d'un lien simple s'effectue pour réaliser le changement d'un état à un autre (par exemple: Buffeteau *et al.*, 1998 et 2001; Buffeteau et Pézolet, 1998; Labarthe *et al.*, 1998; Natansohn *et al.*, 1998; Pézolet *et al.*, 1998); 2- par saturation ou insaturation, soit par la transformation d'un lien double en une liaison simple et vice versa. Ceci est accompli par une réduction ou une réorganisation moléculaire. Les différents états sont obtenus par protonation ou déprotonation des bandes de valence; 3- l'interface quantique qui est basée sur des effets électroniques utilisant la nature oscillatoire des électrons; 4- un commutateur à effet tunnel, ces commutateurs peuvent être arrêtés en changeant la taille de barrière ou la profondeur du puits de potentiel (Launday et Coudret, 1998).

Les commutateurs sont indispensables dans tous les types de circuits où l'écoulement de charges est nécessaire. Ils peuvent également être utilisés pour des registres de données tels que les mémoires pour ordinateur, les disques durs ou tous dispositifs demandant le stockage d'information.

### *1.1.2 La problématique de fabrication en électronique moléculaire*

Cependant, la fabrication de nanocomposantes électroniques impliquera nécessairement que les molécules devront posséder une organisation ou une orientation bien définies pour le bon fonctionnement du dispositif. Le prochain défi pour la production des dispositifs moléculaires est de trouver une méthode efficace d'agencer les molécules biologiques ou les protéines où elles pourront agir l'une sur l'autre et effectuer leurs fonctions destinées. Ce besoin peut être satisfait par des techniques telles que l'orientation des molécules dans un champ magnétique, le « spin coating » et les films monomoléculaires ou Langmuir-Blodgett.

### *1.2 Les films monomoléculaires*

L'électronique moléculaire requiert le développement systématique de matériaux agissant en tant que composantes actives. De façon plus précise, l'électronique moléculaire implique l'emploi de matériaux pour traiter des signaux ou pour exécuter

des fonctions de transformation d'énergie. Dans plusieurs secteurs, tels que les polymères conducteurs et les affichages à cristaux liquides, les effets physiques désirés n'exigent pas d'autres modifications des matériaux. L'agencement moléculaire s'effectue donc spontanément. Par contre, l'utilisation de certains matériaux peut nécessiter que ceux-ci soient agencés en laboratoire. Cet agencement moléculaire s'effectue généralement par des méthodes conventionnelles, mais il est possible qu'il faille recourir à des techniques spéciales.

Une de ces méthodes est la technique des films Langmuir-Blodgett (LB) (Gaines, 1966). Irving Langmuir et son assistante Katharine Burr Blodgett ont développé cette technique dans les années 1930 (Blodgett, 1934; Blodgett et Langmuir, 1937). Cette méthode est utilisée lorsqu'une substance nécessite un degré élevé d'anisotropie moléculaire dans une couche mince d'épaisseur uniforme. Cette technique est importante pour l'électronique moléculaire car, dans certains systèmes de traitement de signal, les molécules en conjonction les unes avec les autres produisent une densité fonctionnelle élevée. La technique des films LB est une méthode relativement simple pour produire un raccordement électrique entre deux molécules adjacentes (Peterson, 1992).

Parmi les technologies disponibles, les films LB semblent être des plus prometteurs en raison de leur capacité à former des systèmes ayant un degré élevé d'organisation moléculaire (Roberts, 1990; Ulman, 1991; Zasadzinski *et al.*, 1994). De plus, la technologie des films LB permet l'assemblage de matériaux organiques ou biologiques dans un système 2D, nécessaire au développement de composantes bioélectroniques (Ulman, 1991). D'ailleurs, cette technique permet l'agencement en structures 2D de protéines et montre une amélioration de certaines propriétés physico-chimiques ou une induction de nouvelles propriétés (Nicolini *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1993; Pepe et Nicolini, 1996). Ces propriétés incluent la stabilité physico-chimique, la stabilité fonctionnelle et la stabilité à la dégradation structurale à long terme.

Par conséquent, les chercheurs ont montré un intérêt considérable et grandissant pour l'adoption de la technique Langmuir-Blodgett afin de produire des biopuces utilisant, à titre de composant actif, une protéine telle que la bactériorhodopsine. En effet, la capacité que possède la bR à former des films LB et ses excellentes propriétés optiques font de cette protéine une candidate exceptionnelle pour les

composantes optiquement couplées (Birge, 1990 et 1992; Miyasaka et Koyama, 1991 et 1992; Miyasaka *et al.*, 1992; Méthot, 1996).

Depuis plusieurs années, l'étude des propriétés physico-chimiques et structurales de films monomoléculaires de protéines à l'interface air-eau est un champ d'étude de pointe (Devaux, 1903; Gonzalez et MacRitchie, 1970; Demel *et al.*, 1973; Phillips *et al.*, 1975; Korenbrot et Pramik, 1977; MacRitchie, 1978 et 1986; Pattus *et al.*, 1981; Ulrich et Vogel, 1999; Lenne *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2000; Lebeau *et al.*, 2001; Meinders *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001; Knebel *et al.*, 2002). L'intérêt sans cesse grandissant pour l'étude de ce type de films provient du fait que plusieurs protéines membranaires ont été ciblées pour être utilisées pour certaines nanotechnologies.

### 1.3 Les nanotechnologies et les protéines

Depuis plus de deux décennies, les connaissances sur la structure et la fonction des protéines ont augmenté considérablement. Parmi ces protéines, l'étude de la bactériorhodopsine et l'élucidation de sa fonction comme pompe à proton représente un des plus beaux exemples connus à ce jour (Birge, 1990; Oesterhelt *et al.*, 1991; Wang et El-Sayed, 2001; Hatcher *et al.*, 2002). La bR est une protéine transmembranaire se retrouvant dans les membranes pourpres de la bactérie *Halobacterium Halobium*. Elle permet de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique par le transfert d'un proton du côté extracellulaire au côté intracellulaire de la membrane. Cette propriété permet de croire que la bR pourrait être utilisée dans certaines composantes bioélectroniques, ou encore comme substituant au silicium dans les microcontrôleurs et les microprocesseurs (Birge, 1992). Les propriétés photoniques et photovoltaïques remarquables de la bR ont par surcroît été démontrées sur quelques constructions à l'échelle moléculaire. Des prototypes expérimentaux ont été développés, dont des filtres, des cellules photosensibles, des photorécepteurs artificiels et des mémoires optiques (Birge, 1990; Miyasaka *et al.*, 1992; Fukuzawa, 1994; Chen *et al.*, 1995; Fukuzawa *et al.*, 1996; Maccioni *et al.*, 1996; Storrs *et al.*, 1996). Ce type de protéine pourrait donc conduire au développement et à la production de nanocomposantes (Hampp, 1993; Cornell *et al.*, 1997 et 1999).

Un problème majeur demeure toutefois avec l'utilisation de molécules complexes en nanotechnologie et en films monomoléculaires tels que les polypeptides et les protéines. Il est d'une importance cruciale que la structure native et fonctionnelle des protéines soit maintenue tout au long du processus de formation des films LB. Un des objectifs de cette thèse est de démontrer la possibilité d'obtenir des films structurellement intacts de protéines membranaires. Pour réaliser cet objectif, la structure secondaire des protéines étudiées dans ce travail a été déterminée en film monomoléculaire.

#### *1.4 Les propriétés structurales des protéines*

Les protéines sont des polymères naturels d'acides aminés possédant une structure et une fonction bien définies. La fonction biologique des protéines est étroitement liée à la conformation qu'elles adoptent. En effet, leur fonction est liée à la disposition spatiale des groupements fonctionnels les uns par rapport aux autres. La détermination de la structure tridimensionnelle de ces polymères naturels permet une meilleure compréhension de leur fonction et de leur activité.

##### *1.4.1 La structure des protéines*

La structure tridimensionnelle des protéines peut être décrite par quatre niveaux d'organisation structurale: primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. La classification de l'organisation structurale des protéines a été proposée bien avant les mesures effectuées par John C. Kendrew et ses collègues. En effet, ils ont été les premiers à déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine, la myoglobine, avec une résolution de 6 Å (Kendrew, 1958).

Dans les années 1930, W.T. Astbury, de l'université de Leeds en Angleterre, a démontré que les cheveux humains donnent des diagrammes de diffraction caractéristiques et que ceux-ci changent drastiquement en étirant les cheveux (Crennell, 1999). Son interprétation des diagrammes de diffraction lui a permis de les décrire comme deux formes distinctes, soit la forme « alpha » et la forme « bêta ». L'analyse du diagramme de diffraction des cheveux étirés l'a mené à proposer un modèle pour la forme « bêta » correspondant aux chaînes presque entièrement



étendues d'un polypeptide antiparallèle avec des liens hydrogène entre les chaînes adjacentes.

Dans les années 1950, un chercheur danois nommé K. Linderstrøm-Lang eut la brillante idée qu'il devrait y avoir au moins quatre niveaux d'organisation structurale dans la hiérarchie de la structure des protéines (Linderstrøm-Lang, 1952; Linderstrøm-Lang et Shellman, 1959). Dans cette hiérarchie, tous les niveaux ont été caractérisés par un type particulier de force d'organisation où un niveau d'organisation plus élevé se compose d'éléments décrits par le niveau précédent. Il est maintenant convenu que cette organisation est simpliste, mais qu'au niveau structural, elle est encore utile du point de vue pédagogique.

#### *1.4.1.1 La structure primaire des protéines*

Les protéines sont des hétéropolymères constitués d'un enchaînement polymérisé de monomères d'acides aminés. Le lien peptidique est formé par la condensation du groupement carbonyle en  $\alpha$  d'un acide aminé et du groupement amine du prochain acide aminé. Cette séquence d'acides aminés est appelée structure primaire et elle est unique en nombre et en agencement pour chaque protéine. Il existe 20 acides aminés différents possédant des chaînes latérales passant du simple méthyle (alanine) au cycle indole (tryptophane). Tous les acides aminés, sauf la glycine, sont chiraux et peuvent prendre la configuration D ou L. Toutefois, très peu de protéines naturelles possèdent dans leur structure primaire des acides aminés d'énantiomère D.

#### *1.4.1.2 La structure secondaire des protéines*

La structure secondaire d'une protéine se décrit par l'organisation structurale de la chaîne principale du polypeptide (squelette polypeptidique) sans se soucier de la conformation des chaînes latérales. Cette structure secondaire est imposée par les propriétés physico-chimiques de chacun des acides aminés de la structure primaire (voir Richardson et Richardson, 1989). Ces propriétés comprennent à la fois les caractéristiques de la chaîne principale et des chaînes latérales des acides aminés.

De plus, les différentes structures secondaires sont stabilisées à l'aide de liaisons hydrogène spécifiques aux types de structure.

#### 1.4.1.2.1 Les hélices

L'hélice est une des structures régulières les plus répandues dans la nature. Elle se distingue par le fait que toutes les chaînes latérales des acides aminés pointent vers l'extérieur de la structure formée par le squelette polypeptidique (voir Figure 1.1). Historiquement, le type d'hélice était indiqué par le nombre de résidus par tour hélicoïdal et par le nombre d'atomes de la chaîne principale entre les atomes constituant le pont hydrogène (Bragg *et al.*, 1950). Ainsi, les hélices ont été nommées  $3.6_{13}$ ,  $3.0_{10}$  et  $4.4_{16}$  pour l'hélice  $\alpha$ , l'hélice  $3_{10}$  et l'hélice  $\pi$ , respectivement. Cette nomenclature persiste seulement pour l'hélice  $3_{10}$  car elle est très ambiguë pour les autres types d'hélices; par exemple, les hélices  $3.6_{13}$  et  $3.7_{13}$  sont deux types d'hélices  $\alpha$ .

Parmi toutes les formes géométriques hélicoïdales possibles, l'hélice  $\alpha$  est la plus répandue. C'est la conformation la plus abondante dans la famille des protéines globulaires où elle compte de 32 à 38% de tous les types de structures secondaires (Kabsch et Sander, 1983; Creighton, 1993). Selon la même base de données structurales, la longueur moyenne d'une hélice  $\alpha$  est de 10 résidus, soit 2,77 tours. Le pas idéal d'une hélice  $\alpha$  est de 3,6 résidus par tour, ce qui lui confère une distance de 5,4 Å entre chacun des tours. Toutefois, de courts segments d'hélices  $3_{10}$  ou d'hélices  $\pi$  peuvent se retrouver aux extrémités des hélices  $\alpha$  (Schulz et Schirmer, 1979).

L'hélice  $\alpha$  est une structure secondaire qui se distingue par un motif de base formé par des liaisons hydrogène intramoléculaires répétées entre tous les groupements carbonyle (C=O) du résidu  $n$  et des groupements amine (N-H) du résidu  $n+4$  (Schulz et Schirmer, 1979; Branden et Tooze, 1991). Les hélices  $\alpha$  les plus observées sont les hélices droites, mais il est possible que certaines séquences primaires forment des hélices gauches. Les liaisons hydrogène intramoléculaires formées dans une hélice  $\alpha$  droite sont presque parallèles à l'axe de l'hélice (voir Figure 1.1) (Schulz et Schirmer, 1979; Branden et Tooze, 1991).

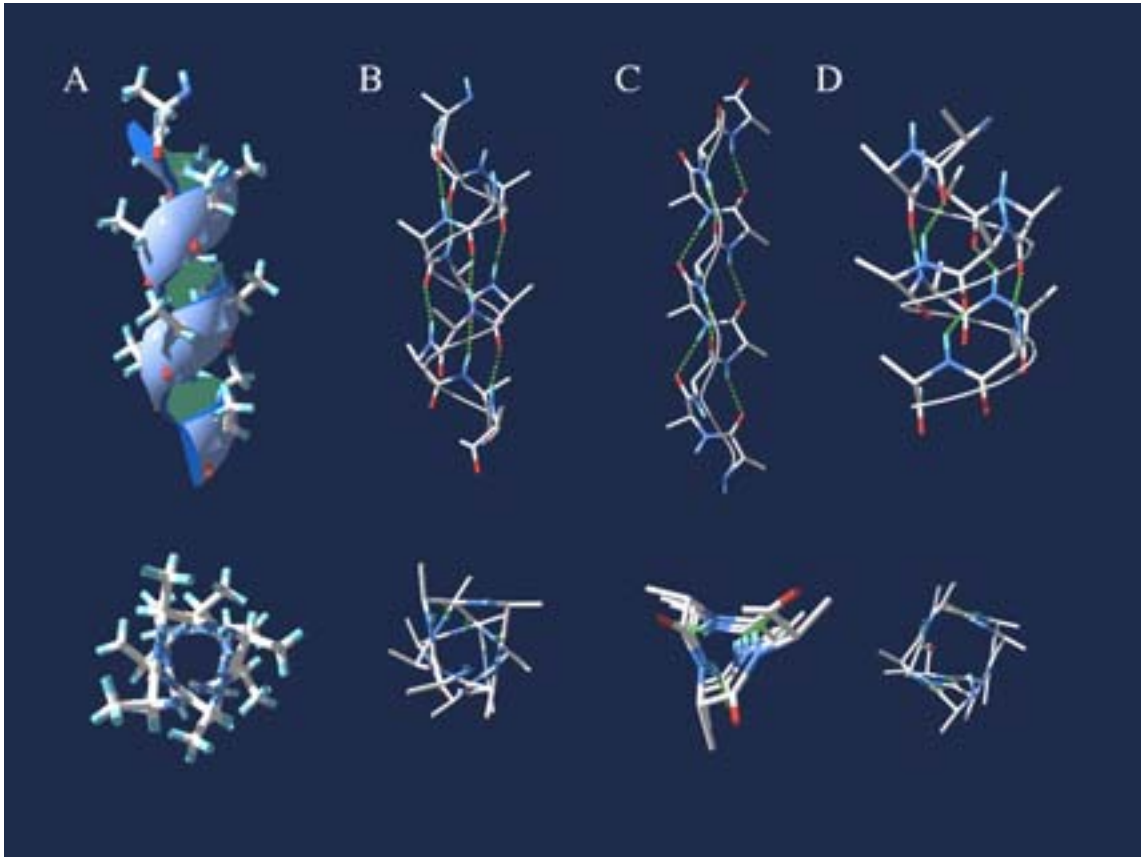


Figure 1.1: Modèles d'hélices vues de côté et du dessus: hélices  $\alpha$  (A et B), hélice  $3_{10}$  (C) et hélice  $\pi$  (D). Les liens hydrogène pour chacune des structures (B, C et D) sont indiqués en vert. Chacune des structures a été générée à partir de leur fichier PDB respectif.

De plus, toutes les unités peptidiques d'une hélice  $\alpha$  sont dirigées dans la même direction, soit strictement parallèle à l'axe hélicoïdal. Cette propriété structurale montre un effet cumulatif ayant pour résultat un macrodipôle parallèle à l'axe de l'hélice (Hol *et al.*, 1978) (voir Figure 1.2). L'effet net de ce macrodipôle est la présence d'une charge approximative de +0,5 unité du côté N-terminal et de -0,5 unité du côté C-terminal. Par exemple, ce dipôle pourrait avoir une grande importance dans l'organisation et l'orientation des hélices aux abords d'un site actif d'une enzyme.

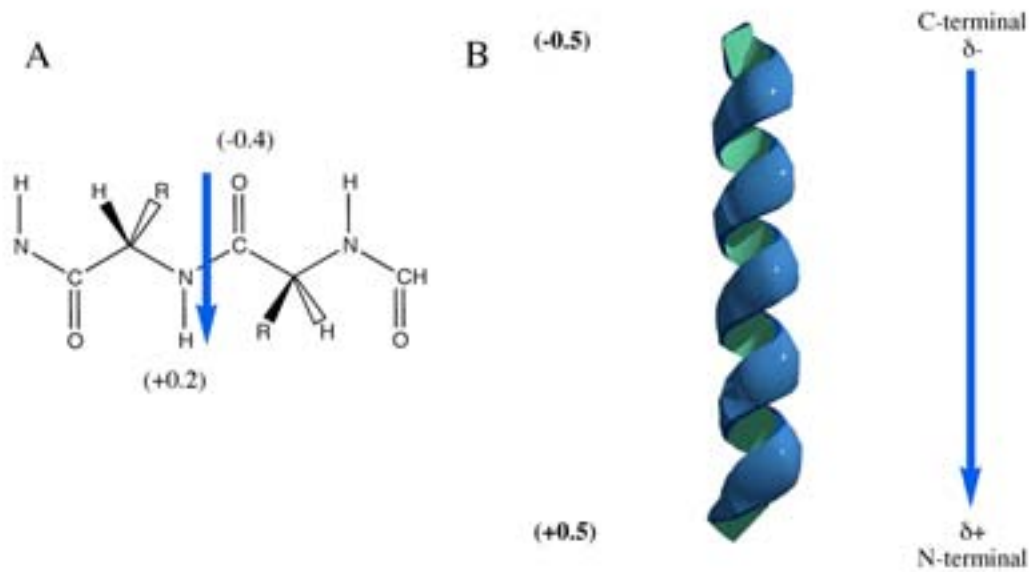


Figure 1.2: Représentation du macrodipôle (B) formé dans l'hélice  $\alpha$  résultant de l'addition de tous les microdipôles (A) présents dans chaque acide aminé (adapté de Branden et Tooze, 1991).

L'hélice  $3_{10}$  présente dans certaines protéines n'est pas un élément structural commun. Seulement 3,4% des résidus sont impliqués dans l'hélice  $3_{10}$  (Schulz et Schirmer, 1979; Kabsch et Sander, 1983). Parfois, un tour simple d'hélice  $3_{10}$  peut se retrouver au début et/ou à la fin d'une hélice  $\alpha$ . Les liens hydrogène d'une hélice  $3_{10}$  se distinguent par un motif formé par tous les groupements carbonyle (C=O) du résidu  $n$  et des groupements amine (N-H) du résidu  $n+3$  (Schulz et Schirmer, 1979).

#### 1.4.1.2.2 Les feuillets $\beta$

Le feuillet  $\beta$  constitue un autre élément structural répandu dans les protéines globulaires. Il comporte entre 20 et 28% de tous les résidus (Kabsch et Sander, 1983; Creighton, 1993). L'unité de base d'un feuillet  $\beta$  est un brin polypeptidique. La conformation étendue des brins polypeptidiques composant un feuillet  $\beta$  a été proposée dans les années 1930 grâce à des données de diffraction des rayons X sur des cheveux et de la soie. Les chercheurs ont dû attendre jusqu'à ce que la structure cristalline du lysozyme ait été résolue avant de voir le même type de structure pour une protéine (Crennell, 1999).

Un simple brin d'un feuillet  $\beta$  peut être considéré comme une hélice à 2 résidus/tour, soit une structure secondaire répétitive (voir Figure 1.3). Cependant, puisqu'il n'y a aucun lien hydrogène intramoléculaire ni aucune interaction de Van der Waals entre les atomes des résidus voisins, cette conformation étendue est stable seulement en tant qu'élément d'un feuillet  $\beta$  car les liens hydrogène intermoléculaires et les interactions de Van der Waals entre les brins alignés exercent une influence stabilisante (voir Figures 1.3 et 1.4). Les chaînes latérales des résidus adjacents se retrouvent de chaque côté du brin. Conséquemment, les résidus n'agissent pas sur les mêmes brins (voir Figure 1.3).

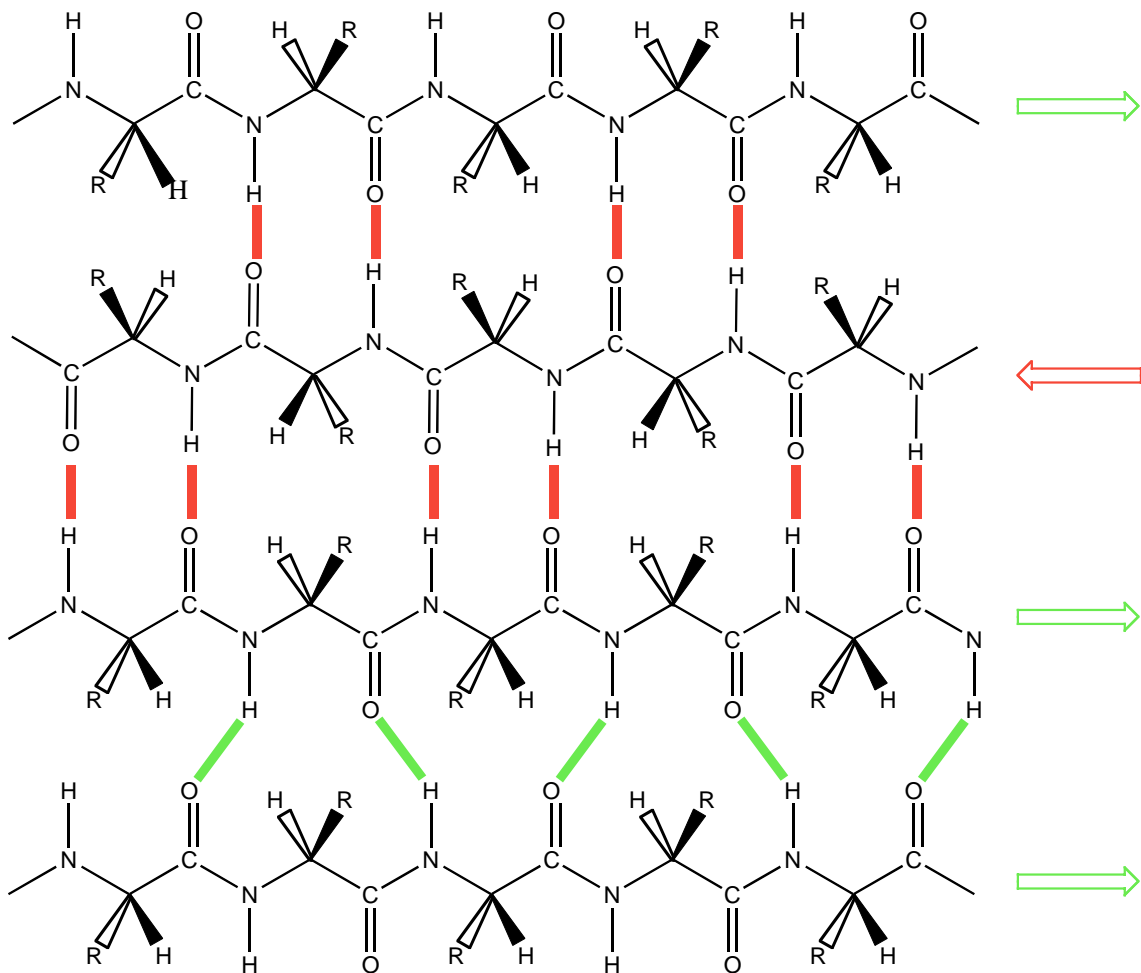


Figure 1.3: Structure schématisée des feuillets  $\beta$  parallèles (vert) et antiparallèles (rouge). Les liens hydrogène formés sont indiqués en utilisant les couleurs correspondant au type de feuillets  $\beta$  (adapté de Alberts *et al.*, 1989).

Les liens hydrogène des feuillets  $\beta$  sont en moyenne 0,1 Å plus courts que ceux trouvés dans les hélices (Baker et Hubbard, 1984). La longueur moyenne d'un feuillet  $\beta$  est d'environ 6 résidus et la plupart des feuillets comportent moins de 6 brins (Schulz et Schirmer, 1979; Branden et Tooze, 1991).

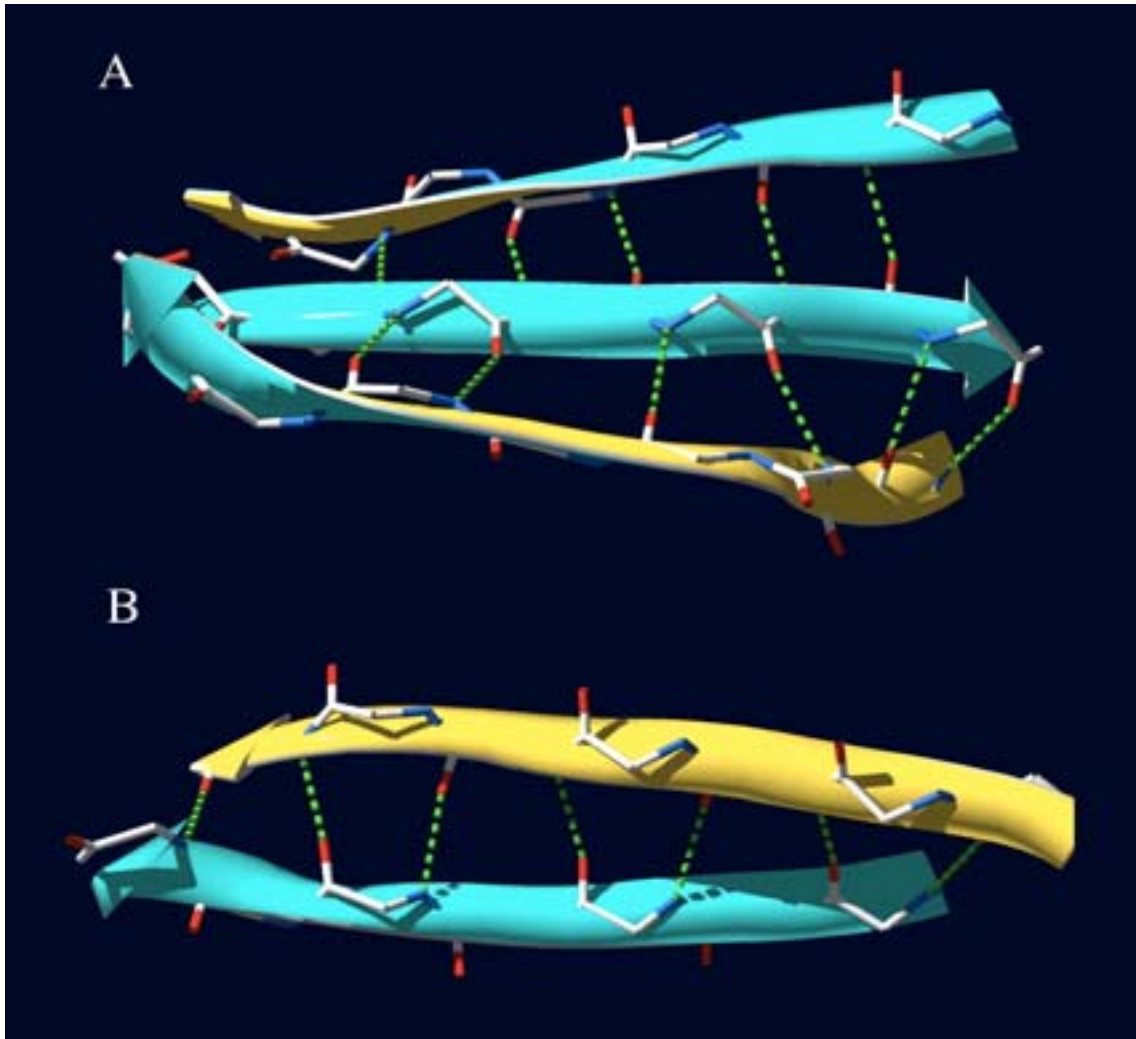


Figure 1.4: Structure en feuillet  $\beta$  provenant de la structure tridimensionnelle de la thioredoxine (PDB #2TRX, résolution de 2.8 Å). (A) feuillet  $\beta$  antiparallèle, (B) feuillet  $\beta$  parallèle. Les liaisons hydrogène sont indiquées en vert.

Contrairement aux hélices composées de résidus d'un segment polypeptidique continu, les feuillets  $\beta$  sont formés de brins qui sont très souvent des segments éloignés dans la séquence polypeptidique. Les feuillets  $\beta$  se retrouvent sous deux formes bien particulières: le feuillet « antiparallèle » et le feuillet « parallèle » (voir

Figures 1.3 et 1.4). Cette nomenclature est basée sur la direction relative des deux brins formant le feuillet (Schulz et Schirmer, 1979; Branden et Tooze, 1991).

À première vue, les feuillets  $\beta$  antiparallèles semblent intrinsèquement plus stables que les feuillets  $\beta$  parallèles car, sur papier, l'orientation des liens hydrogène intermoléculaires de ce type de feuillet est plus optimale (voir Figure 1.3). Cependant, une étude approfondie des liens hydrogène à l'intérieur des structures tridimensionnelles des protéines (Baker et Hubbard, 1984) montre qu'il n'y a aucune différence significative dans la linéarité des liens hydrogène des feuillets parallèles et antiparallèles. Les feuillets  $\beta$  qu'on croyait initialement planaires sont en fait tordus (de  $0^\circ$  à  $30^\circ$  par résidu) dans les protéines globulaires (voir Figures 1.3 et 1.4). De plus, les feuillets antiparallèles sont plus souvent tordus que les feuillets parallèles.

#### 1.4.1.2.3 *Les coudes*

Les coudes  $\beta$  ont été identifiés pour la première fois par Venkatachalam (1968). Ils comportent approximativement le tiers de tous les résidus des protéines globulaires. Les coudes sont souvent constitués d'acides aminés tels que la proline et la glycine. Ils sont contenus aux pourtours des hélices et des feuillets et servent à renverser la direction de la chaîne polypeptidique. Il existe quatre types de coudes: le coude gamma, contenant un lien hydrogène entre l'oxygène du carbonyle du résidu  $n$  et l'amine du résidu  $n+2$ , ainsi que les coudes de type I, II et III contenant un lien hydrogène entre l'oxygène du carbonyle du résidu  $n$  et l'amine du résidu  $n+3$  (voir section 1.5.1.3) (Krimm et Bandekar, 1986).

#### 1.4.1.2.4 *Les structures désordonnées*

Les structures désordonnées, appelées pelotes statistiques, sont des structures aléatoires ne possédant pas de conformation régulière comme l'hélice et le feuillet. Ce sont des segments polypeptidiques mobiles et sensibles aux changements.

### *1.4.1.3 La structure tertiaire des protéines*

La structure tertiaire se définit comme la structure tridimensionnelle d'une protéine. En d'autres mots, la structure tertiaire d'une chaîne polypeptidique est le prochain niveau structural après la structure secondaire. La structure tertiaire décrit l'interaction spatiale des structures secondaires entre elles. C'est aussi la description spatiale de tous les atomes du squelette polypeptidique et des chaînes latérales constituant la protéine. Tout comme la structure secondaire, la structure tertiaire d'une protéine est stabilisée la plupart du temps par des forces non-covalentes (telles que les liens hydrogène) bien qu'elle puisse également être stabilisée par des liens covalents (ponts disulfures).

### *1.4.1.4 La structure quaternaire des protéines*

La structure quaternaire d'une protéine est l'agencement de gros complexes polypeptidiques ou protéiques entre eux. Cette structure décrit l'organisation tridimensionnelle de ces complexes tels que les photosystèmes I et II qui contiennent un agencement particulier de plusieurs protéines.

## *1.4.2 Les familles de protéines*

Les protéines se divisent en 4 grandes classes distinctes: les protéines globulaires ou solubles telles que la carboxypeptidase, la  $\beta$ -lactoglobuline, l'anhydrase carbonique, la myoglobine et le lysozyme; les protéines fibreuses telles que le collagène, l'élastine, la kératine et la myosine; les protéines associées aux membranes telles que la transducine, la recoverine et les phospholipases; ainsi que les protéines membranaires telles que la rhodopsine, la bactériorhodopsine, la cytochrome C oxydase, la cyclooxygénase-2, la calcium ATPase, la maltoporine et les photosystèmes I et II.

Cette dernière famille est très importante car elle intervient très souvent lors de fonctions biologiques. La cellule comporte plusieurs unités fonctionnelles appelées organelles. La plupart de ces unités se trouvent limitées par une ou plusieurs membranes. Ainsi, pour exécuter ses fonctions, la membrane doit être spécialisée,



c'est-à-dire posséder des composantes protéiques et lipidiques spécifiques. Les membranes sont donc essentielles pour maintenir l'intégrité et la fonctionnalité de la cellule (Alberts *et al.*, 1989).

Dans cette thèse, on présente l'étude de l'organisation, de l'orientation et de la structure de protéines membranaires étalées à l'interface air-eau. Deux protéines modèles ont été retenues pour cette étude. Tout d'abord, un petit polypeptide, la gramicidine, et un modèle plus complexe, la rhodopsine. Les deux modèles seront décrits en détail dans les sections 1.6 et 1.7. La prochaine section décrit les principes permettant de déterminer la structure secondaire des protéines par spectroscopie infrarouge.

### *1.5 Détermination de la structure secondaire des protéines par spectroscopie infrarouge*

Dans la recherche des rapports entre la structure et la fonction des macromolécules biologiques, l'étude de leur conformation apporte des informations très importantes. Le problème pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une macromolécule est de taille et, malheureusement, aucune technique n'est complètement adéquate.

La structure tridimensionnelle à haute résolution d'une protéine peut être déterminée par cristallographie des rayons X. Toutefois, cette technique exige l'obtention d'un monocristal, ce qui n'est pas encore possible pour toutes les protéines. Une alternative à la cristallographie est la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) multidimensionnelle. La spectroscopie RMN, contrairement à la diffraction des rayons X, permet de déterminer la structure d'une protéine en solution. L'analyse des données obtenues par spectroscopie RMN est très complexe pour de grandes protéines. C'est pourquoi son application actuelle est limitée à des protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 50 kDa. De plus, cette méthode exige une concentration élevée de protéine, et donc une solubilité très importante, ce qui limite aussi son utilisation.

En considérant ces limitations, l'utilisation de méthodes alternatives peut fournir des informations structurales sur des protéines sans toutefois déterminer leur structure avec une résolution atomique. Ces méthodes incluent le dichroïsme circulaire et la

spectroscopie vibrationnelle (infrarouge et Raman) qui sont en mesure de donner de l'information sur la structure secondaire des protéines. Ces types de spectroscopie ont pour avantage d'être facilement accessibles car ils exigent relativement peu de matériel (~0.1 mg de protéine) et permettent d'étudier les protéines dans différents environnements.

### 1.5.1 La spectroscopie infrarouge

Au cours des dernières années, l'utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) pour déterminer la structure secondaire des macromolécules biologiques a beaucoup augmenté. Dans les années 1960, plusieurs travaux sur le sujet ont été effectués par Miyazawa (Miyazawa, 1958, 1960 et 1967). Depuis, la sensibilité de la spectroscopie infrarouge aux différentes structures secondaires telles que les hélices, les feuilletts et les coudes a été bien établie (Chirgadze et Nevskaya, 1976a et b; Bandekar, 1992; Goormaghtigh *et al.*, 1994a, b, c et 1999). Les études de Nevskaya et Chirgadze effectuées en 1976 démontrent bien, à l'aide de polypeptides de synthèse, la sensibilité de la spectroscopie infrarouge aux structures secondaires des protéines en solution. De plus, des spectres infrarouge de haute qualité peuvent être relativement faciles à obtenir sans les problèmes associés à la taille des protéines, à la fluorescence de fond et à la dispersion de la lumière. Enfin, l'absorption omniprésente de l'eau dans la région amide a constitué pendant longtemps un problème fort important, mais elle peut maintenant être mathématiquement soustraite des spectres infrarouge (Koenig et Tabb, 1980; Powell *et al.*, 1986; Dousseau *et al.*, 1989; Dousseau et Pézolet, 1990; Dousseau, 1991). Ces faits ont rendu les systèmes biologiques en solution aqueuse plus favorables aux études par spectroscopie FTIR.

#### 1.5.1.1 Régions spectrales spécifiques aux protéines

Le squelette peptidique, c'est-à-dire l'unité structurale répétitive des protéines, donne jusqu'à 9 bandes caractéristiques en infrarouge nommées bandes amide A, B, I, II, III, IV, V, VI et VII (Krimm et Bandekar, 1986). Les bandes amide A et B sont des bandes assez fortes situées entre 3000 et 3600  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes les plus sensibles à la structure secondaire du squelette peptidique sont les bandes amide I, II et III.

Elles sont situées dans la région entre 1200 à 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes amide IV à VII sont peu utiles dans la détermination de la structure secondaire des protéines.

#### 1.5.1.2 Les modes vibrationnels de la chaîne polypeptidique

Les bandes amide A ( $3500 \text{ cm}^{-1}$ ) et amide B ( $3100 \text{ cm}^{-1}$ ) sont deux bandes assez fortes qui proviennent d'une résonance de Fermi entre le premier harmonique de la vibration amide I et le fondamental de la vibration d'élongation N-H. La bande amide A ne dépend pas de la conformation du squelette polypeptidique, mais elle est très sensible à la force des liaisons hydrogène. Cette bande se situe entre 3225 et 3280  $\text{cm}^{-1}$  pour des liens hydrogène d'une longueur de 2,69 à 2,85 Å (Krimm et Bandekar, 1986).

Les bandes amide I et amide II sont principalement utilisées en spectroscopie infrarouge pour déterminer la structure secondaire des protéines (Miyazawa, 1967; Dousseau et Pézolet, 1990; Dousseau, 1991; Bandekar, 1992; Arrondo *et al.*, 1993; Surewicz *et al.*, 1993; Goormaghtigh *et al.*, 1994a, b et c). L'amide I est la bande d'absorption la plus intense du spectre protéique; elle est directement reliée à la conformation du squelette polypeptidique. Cette bande, située entre 1600 et 1700  $\text{cm}^{-1}$ , est principalement associée aux modes vibrationnels d'élongation C=O (70-85%) et d'élongation C-N (10-20%) (voir Figure 1.5 et Tableau 1.1). L'amide II, située entre 1510 et 1580  $\text{cm}^{-1}$ , résulte du couplage du mode de déformation dans le plan N-H (40-60%) et des modes de vibration d'élongation C-N (18-40%) et C-C (10%) (voir Figure 1.5). De plus, cette bande se révèle sensible à la conformation de la protéine. La bande amide III, située entre 1200 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ , est due au couplage du mode de vibration d'élongation C-N et du mode de déformation dans le plan N-H (Miyazawa, 1967; Castano, 1998) (voir Figure 1.5 et Tableau 1.1).

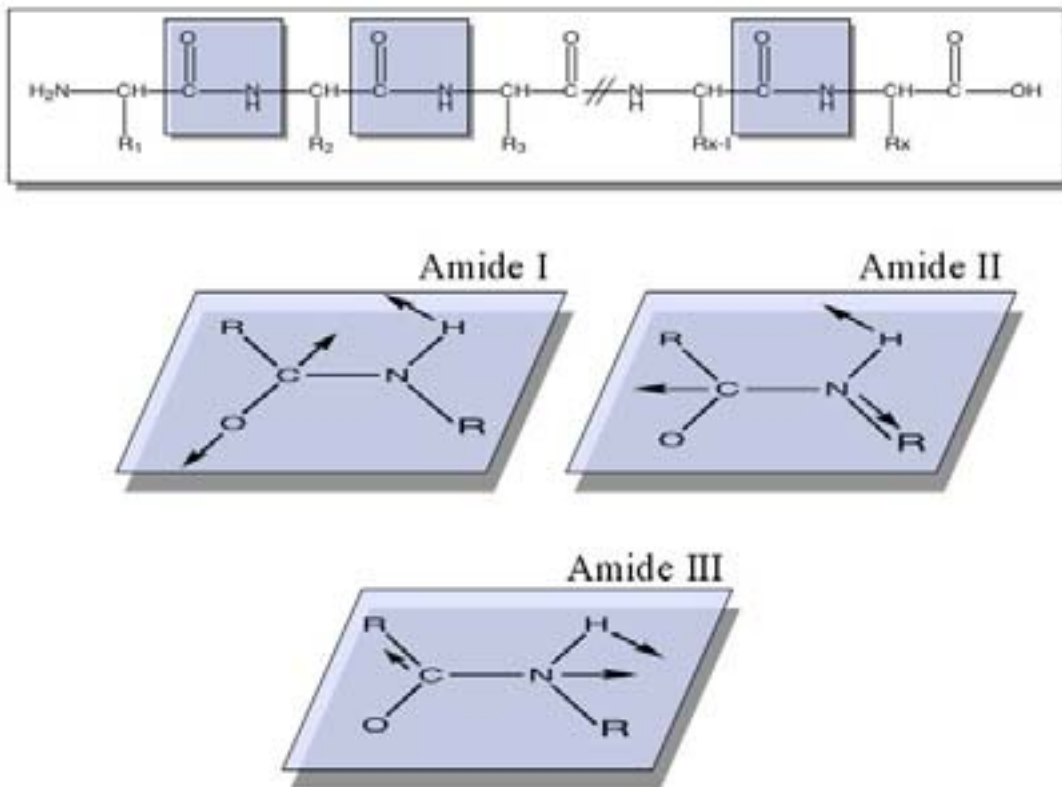


Figure 1.5: Schéma représentant les déplacements atomiques impliqués dans les modes vibrationnels des bandes amide (Tu, 1982; Dousseau, 1991).

### 1.5.1.3 Détermination de la conformation de la chaîne polypeptidique

En spectroscopie infrarouge, on utilise les bandes amide I et II pour déterminer la structure secondaire des protéines. Un grand nombre de polypeptides synthétiques, dont la structure secondaire est bien connue, ont été utilisés pour caractériser les spectres infrarouge des protéines. Par exemple, la polylysine peut adopter, selon les conditions expérimentales telles que la température et le pH de la solution, une structure en hélice  $\alpha$ , en feuillet  $\beta$  ou aléatoire. De nombreux travaux expérimentaux et théoriques effectués sur un grand nombre de polypeptides synthétiques ont fourni des informations sur la variabilité des fréquences adoptées pour chaque structure (Chirgadze et Nevskaya, 1976a et b; Byler et Susi, 1986; Krimm et Bandekar, 1986; Bandekar, 1992).

Tableau 1.1: Position et contribution de chacune des vibrations amide dans la région entre 1000 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Seules les contributions  $\geq 10\%$  sont indiquées (Krimm et Bandekar, 1986; Dousseau, 1991).

Type de bande	Mode vibrationnel	Contribution (%)
Amide I (entre 1600 et 1700 $\text{cm}^{-1}$ )	Élongation C=O	83
	Élongation C-N	15
	Déformation	11
Amide II (entre 1510 et 1580 $\text{cm}^{-1}$ )	Balancement N-H	49
	Élongation C-N	33
	Balancement C-O	12
	Élongation C-C	10
Amide III (entre 1200 et 1400 $\text{cm}^{-1}$ )	Balancement N-H	52
	Élongation C-C	18
	Élongation N-H	14
	Balancement C-O	11

Une étape critique dans l'interprétation des spectres infrarouge des protéines est l'attribution des bandes composant l'amide I. Les bandes situées entre 1650-1658  $\text{cm}^{-1}$  sont généralement caractéristiques des hélices  $\alpha$  (voir Tableau 1.2). La fréquence moyenne caractéristique d'une hélice  $\alpha$  est de 1652  $\text{cm}^{-1}$  pour l'amide I et de 1548  $\text{cm}^{-1}$  pour l'amide II (Nevskaya et Chirgadze, 1976). La largeur à mi-hauteur de la bande amide I dépend de la stabilité de l'hélice. Pour les structures les plus stables, une largeur d'environ 15  $\text{cm}^{-1}$  correspond à une hélice possédant une énergie libre de transition de plus de 300 cal/mol. D'autres hélices affichent des largeurs à mi-hauteur de 38  $\text{cm}^{-1}$  et possèdent des énergies libres de transition d'environ 90 cal/mol. La structure désordonnée et les coudes comportent également des bandes dans cette région, ce qui complique les analyses.

Tableau 1.2: Fréquences moyennes observées pour le mode amide I en fonction de la structure secondaire (Miyazawa, 1967; Arrondo *et al.*, 1993; Surewicz *et al.*, 1993; Goormaghtigh *et al.*, 1994a, b et c).

Structure secondaire	Fréquence
Hélice $\alpha$	1650-1665 $\text{cm}^{-1}$
Feuillet $\beta$ (parallèle)	1620-1640 $\text{cm}^{-1}$
(antiparallèle)	1620-1640 et 1680-1695 $\text{cm}^{-1}$
Coude	$\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$
Désordonné	1645-1650 $\text{cm}^{-1}$

Les feuillets  $\beta$  contribuent à la bande amide I dans les régions 1615-1640  $\text{cm}^{-1}$  et 1685-1700  $\text{cm}^{-1}$  (voir Tableau 1.2). Les feuillets  $\beta$  antiparallèles se distinguent des feuillets  $\beta$  parallèles par le dédoublement de la bande amide I, ceci étant dû aux interactions « inter-brins ». Les fréquences des bandes d'absorption principales des polypeptides synthétiques adoptant une structure en feuillet  $\beta$  ont été compilées par Chirgadze et Nevskaya, (1976a et b). La structure en feuillet  $\beta$  parallèle n'est pas fréquente chez les polypeptides synthétiques. Elle comporte une bande principale située près de 1640  $\text{cm}^{-1}$ . La structure en feuillet  $\beta$  antiparallèle, située entre 1615  $\text{cm}^{-1}$  et 1637  $\text{cm}^{-1}$ , possède une fréquence moyenne de la composante principale à 1629  $\text{cm}^{-1}$ . La valeur moyenne de la fréquence de la composante secondaire est de 1696  $\text{cm}^{-1}$  alors que la valeur la plus basse se situe à 1685  $\text{cm}^{-1}$ .

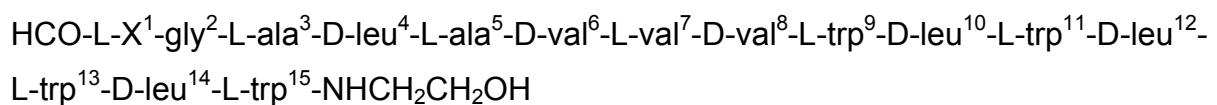
Les structures en coude impliquent généralement 4 résidus qui forment une boucle, de sorte que les deux segments s'y rattachant adoptent une orientation antiparallèle. Un certain nombre de structures en coude ont été identifiées comme faisant partie des protéines: le type I (42%, non-hélicoïdal), le type II (15%, non-hélicoïdal nécessitant une Gly en position 3) et le type III (18%, correspondant à un tour d'hélice  $3_{10}$ ) (Krimm et Bandekar, 1986). L'attribution spectrale des bandes associées aux coudes par l'analyse des modes vibratoires normaux dans l'insuline démontre une superposition de ces bandes avec l'absorption de la structure en hélice (Krimm et Bandekar, 1986).

## 1.6 La gramicidine

La gramicidine fut découverte par l'équipe du microbiologiste René Jules Dubos en 1940 (Hotchkiss et Dubos, 1940). En recherchant les propriétés de certaines bactéries contenues dans le sol, ils ont isolé une substance appelée la tyrothricine. Cette substance fut par la suite caractérisée comme un mélange de gramicidine et de tyrocidine. Ils ont démontré que la gramicidine avait des propriétés antibiotiques agissant contre les germes gram-positifs. Le nom de la gramicidine est issu de cette propriété. La gramicidine fut le premier antibiotique produit commercialement. Depuis la détermination de la structure primaire de 3 types de gramicidine (A, B et C) par Sarges et Witkop (1965a et b), une multitude d'études furent entreprises pour mieux caractériser la gramicidine autant pure qu'associée à des membranes modèles.

### 1.6.1 L'origine et les fonctions de la gramicidine

La gramicidine est produite par la bactérie aérobique *Bacillus brevis* (Katz et Demain, 1977). Elle est constituée de 15 acides aminés hydrophobes avec une alternance en énantiomères D et L (voir sa structure primaire ci-dessous). La gramicidine se termine par un groupement formyl à son extrémité N-terminal et par un groupement éthanolamine à son extrémité C-terminale (Sarges et Witkop, 1965a et b). La composition de la gramicidine naturelle est un mélange appelé gramicidine D. Ce mélange est constitué à 85% de gramicidine A dont la structure primaire se compose des acides aminés suivants:



X peut être une valine ou une isoleucine. De plus, le 11<sup>e</sup> acide aminé peut être un tryptophane, une phénylalanine ou une tyrosine et la gramicidine qui en résulte se nommera, respectivement, gramicidine A, B ou C (Sarges et Witkop, 1965a).

#### 1.6.1.1 Synthèse biologique de la gramicidine

Comme bien d'autres peptides à caractère antibiotique, la gramicidine est synthétisée par un complexe enzymatique non-ribosomal (Lipmann, 1971 et 1980;

Katz et Demain, 1977; Kurahashi, 1981). Le début de la synthèse se fait à partir de la valine de l'extrémité N-terminale et se termine par la liaison peptidique de l'éthanolamine de l'extrémité C-terminale (Lipmann, 1980; Kurahashi, 1981). La conversion des énantiomères L de la valine et de la leucine en leurs énantiomères D se produit durant cette biosynthèse (Akashi *et al.*, 1977; Akashi et Kurahashi, 1977). De plus, il est possible de produire de la gramicidine *in vitro* dans une cellule en présence du complexe enzymatique et de phosphatidyléthanolamine (Kubota, 1987).

#### 1.6.1.2 Fonction de la gramicidine dans *Bacillus brevis*

La gramicidine est produite lors de la sporulation de *Bacillus brevis* (Sarkar et Paulus, 1972; Katz et Demain, 1977; Demain et Piret, 1979; Young et Mandelstam, 1979) peu de temps après la production d'un autre polypeptide antibiotique: la tyrocidine (Ristow *et al.*, 1975b, c et 1979). Ces deux polypeptides sont reconnus pour jouer un rôle fonctionnel dans la régulation des gènes durant la transition de l'état végétatif à la sporulation de *Bacillus brevis* (Sarkar et Paulus, 1972; Katz et Demain, 1977).

Il semble que ces polypeptides ont des activités antagonistes (Ristow *et al.*, 1975a). Il a été découvert qu'*in vitro* la gramicidine interagit avec le complexe tyrocidine-ADN pour mettre fin à l'inhibition de la transduction induite par la tyrocidine sur l'ADN (Bohg et Ristow, 1986) et permettre la réactivation de la transcription de l'ARN (Ristow, 1977). Il a aussi été démontré que la gramicidine inhibe la transcription en se liant à l'ARN polymérase (Sarkar *et al.*, 1977 et 1979; Fisher et Blumenthal, 1982). Une autre activité antagoniste de la gramicidine et de la tyrocidine est que la gramicidine associée à la membrane inhibe l'activité de lyse de la tyrocidine en formant un complexe stœchiométrique 1 : 1 avec cette protéine.

#### 1.6.1.3 Fonction antibiotique de la gramicidine

La gramicidine est utilisée dans le traitement d'infections locales causées par des bactéries Gram-positives. Une bactérie sera classée Gram-positive selon le résultat du test du bactériologiste Christian Gram. Ces bactéries diffèrent de la classe négative seulement par la composition de leurs parois cellulaires. Puisque la



gramicidine est fortement toxique, elle ne peut être injectée par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Elle est donc utilisée pour le traitement des blessures extérieures infectées de l'œil ou du nez, pour le traitement des infections de la gorge, ou encore localement sur la peau en lotion ou en onguent.

### 1.6.2 La structure secondaire de la gramicidine

La gramicidine peut adopter une foule de conformations différentes (Figure 1.6). L'alternance d'énantiomères D et L dans sa structure primaire fait que la gramicidine adopte des structures en hélices de type « bêta » dont les liens hydrogène sont similaires à ceux retrouvés dans les feuilletts  $\beta$  (Urry, 1971 et 1972; Veatch *et al.*, 1974). Les acides aminés s'orientent vers l'extérieur des hélices  $\beta$  et le carbonyle du squelette peptidique s'oriente vers l'intérieur et parallèlement à l'axe principal de l'hélice en alternance vers le haut et vers le bas. Les hélices  $\beta$  qui en résultent peuvent être « droites » ou « gauches ». Ces conformations diffèrent par l'orientation des chaînes latérales, le nombre de résidus par tour d'hélice, leur longueur et leur diamètre (Urry, 1971; Urry *et al.*, 1971; Veatch *et al.*, 1974). Chaque peptide peut former une hélice simple stabilisée par des ponts hydrogène intramoléculaires et former un canal au travers de la membrane en s'associant à un autre monomère, par leur extrémité N-terminale ou C-terminale. Les liens hydrogène intermoléculaires leur confèrent une stabilisation additionnelle (voir Figure 1.6) (Urry *et al.*, 1971; Ramachandran et Chandrasekaran, 1972; Urry, 1972).

De plus, des hélices doubles entrelacées (intertwin  $\beta$ -helix) parallèles ou antiparallèles peuvent être observées (voir Figure 1.6). Ce dimère est stabilisé seulement par des ponts hydrogène intermoléculaires (Veatch *et al.*, 1974). Ces différentes structures confèrent à la gramicidine des propriétés différentes selon les paramètres structuraux (Wallace, 1990 et 1992).

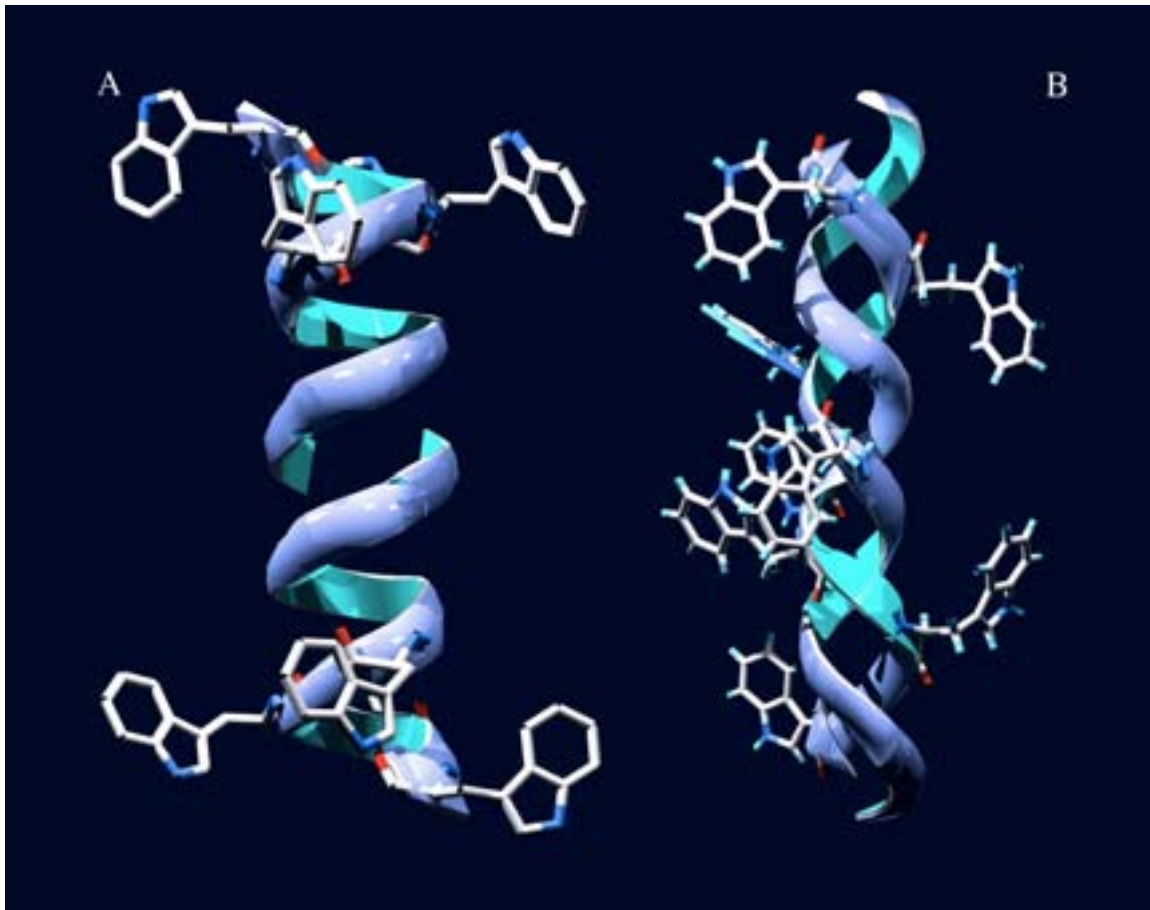


Figure 1.6: Structure secondaire proposée pour la gramicidine dans une membrane lipidique. Au total, six conformations ont été démontrées soit en monomère (2 monomères un par dessus l'autre pour traverser la membrane) soit en dimère entrelacé. (A) Un exemple de structure en monomère, la conformation  $\beta^{6.3}$ , et (B) un exemple de structure en dimère entrelacé, soit la conformation  $\beta^{5.6}$  antiparallèle.

### 1.6.3 Études antérieures sur l'organisation de la gramicidine dans les membranes et en monocouche

Plusieurs études ont proposé des arrangements structuraux différents de la gramicidine pour la formation d'un canal au travers de la membrane (Urry, 1971 et 1972; Urry *et al.*, 1971, 1972 et 1983; Hladky et Haydon, 1972; Urban *et al.*, 1978; 1980; Langs, 1988; Salemme, 1988; Wallace, 1998). La Figure 1.6 présente les deux types d'organisation qui permettraient un transfert de cation à travers la membrane, soit la superposition de deux hélices l'une sur l'autre, ou soit une organisation en

double hélice entrelacée parallèle ou antiparallèle (Wallace, 1986, 1990, 1992 et 1998; Quist, 1998). Plusieurs études ont montré que la structure secondaire de la gramicidine est fonction des solvants de co-solubilisation et des ions monovalents présents dans la solution (Urry *et al.*, 1971 et 1972; Fossel *et al.*, 1974; Rothschild et Stanley, 1974; Iqbal et Weidekamm, 1980; Wallace, 1983; Hawkes *et al.*, 1987; Killian *et al.*, 1988a; LoGrasso *et al.*, 1988; Killian, 1992; Bouchard et Auger, 1993; Bouchard *et al.*, 2000).

Deux publications ont étudié l'organisation et l'orientation de la valine gramicidine A (VGA) en monocouche mais les résultats divergent (Dhathathreyan *et al.*, 1988; Ulrich et Vogel, 1999). Aussi, des études ont tenté d'expliquer le type de changement structural de la VGA prenant place dans le plateau de l'isotherme de pression de surface à  $\pi = 15-17 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Kemp et Wenner, 1976; Mau *et al.*, 1987; Tournois *et al.*, 1989; Ducharme *et al.*, 1996). Ce plateau peut être attribué à plusieurs phénomènes structuraux durant la compression tels que la formation de « cluster », une réorientation moléculaire, une transition de phase, une réorganisation de la monocouche ou de la molécule, un changement dans la structure moléculaire, ou encore une transition entre une conformation en monomère à une conformation en dimère (Kemp et Wenner, 1976; Tournois *et al.*, 1989).

### 1.7 La rhodopsine

La rhodopsine est la protéine responsable de la première étape du processus visuel. Elle est impliquée dans la vision nocturne par les segments externes des bâtonnets (SEB). On la retrouve dans les membranes discales des SEB où elle constitue 80% des protéines totales (Krebs et Kuhn, 1977; Nathans, 1992) et 95% des protéines membranaires (Heitzman, 1972; Robinson *et al.*, 1972; Amis *et al.*, 1981). La rhodopsine est un membre de la famille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires couplés aux protéines G tels que les récepteurs dopaminergiques, adrénérgiques et hormonaux (Peroutka, 1994). Elle constitue la base de la vision de certains invertébrés et des vertébrés vivant sur cette planète (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971). Elle fut extraite de la rétine pour la première fois en 1878 par W. Kuehne en utilisant des sels biliaires comme détergent (Kuehne, 1878).

### 1.7.1 *La structure de l'œil*

L'œil est un des organes sensoriels les plus complexes et sophistiqués du corps humain. Il est responsable de la vision et il est constitué d'instruments optiques très performants et de cellules photoréceptrices très sensibles. Soixante-dix pourcent des récepteurs sensoriels de l'organisme se retrouvent dans les yeux (Ali et Klyne, 1986; Dowling, 1987). L'œil est composé des tuniques fibreuse, vasculaire et interne (voir Figure 1.7) (Spence et Mason, 1983; Ali et Klyne, 1986).

L'enveloppe externe de l'œil est appelée tunique fibreuse et comprend une section antérieure, la cornée, et une section postérieure, la sclérotique. La cornée est une couche transparente et non vascularisée. La tunique vasculaire ou uvée comprend la choroïde, le corps ciliaire et l'iris. La choroïde, partie postérieure de la tunique vasculaire, est très vascularisée et tapisse une grande section de la sclérotique. Le corps ciliaire, situé dans la partie antérieure de la tunique vasculaire, est la région la plus épaisse de cette tunique (Tortora et Grabowski, 1994).

L'iris, partie colorée du globe oculaire, est composé de fibres musculaires qui permettent de régler l'intensité lumineuse dans la cavité postérieure du globe oculaire par la pupille. Finalement, c'est au niveau de la tunique interne aussi appelée rétine que se situent les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) (voir Figure 1.7) et où se déroule le mécanisme de phototransduction.

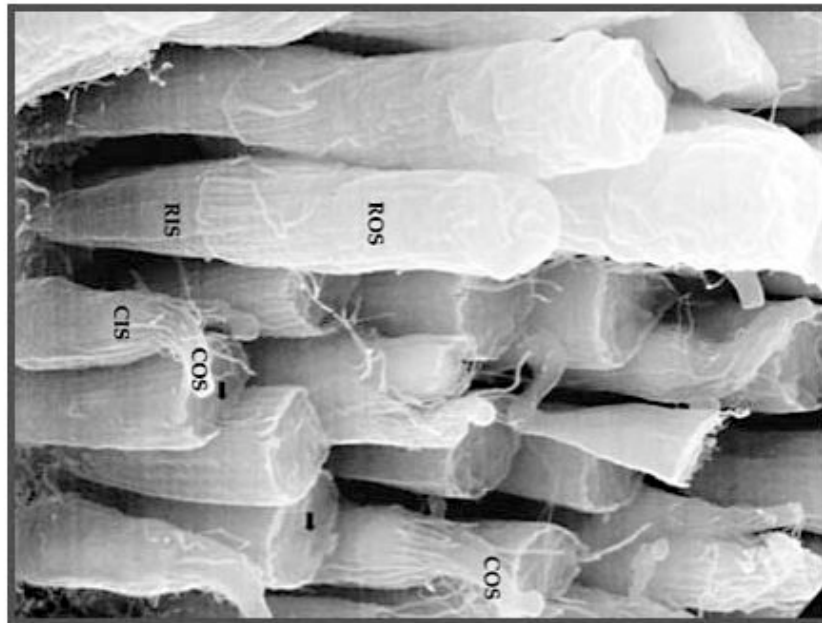
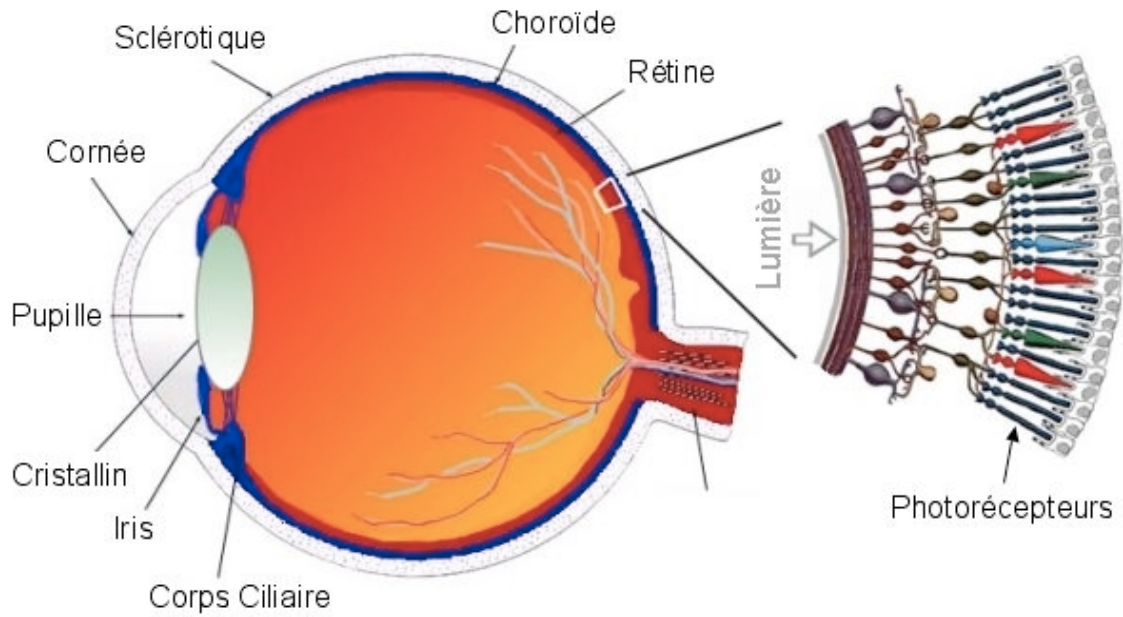


Figure 1.7: Structure de l'oeil des vertébrés (haut) et photo des photorécepteurs de la rétine (bas). COS: segments externes des cônes; CIS: segments internes des cônes; ROS: segments externes des bâtonnets; RIS: segments internes des bâtonnets.

### 1.7.2 La structure de la rhodopsine

La rhodopsine est une chromoglycoprotéine membranaire d'un poids moléculaire d'environ 41kDa (Papermaster et Dreyer, 1974; Hargrave, 1982; Hargrave et

McDowell, 1992a et b; Prasad *et al.*, 1992; Endo *et al.*, 1996). Elle est constituée de deux entités distinctes: une apoprotéine (opsine) de 348 acides aminés et un chromophore, le 11-cis rétinol (Shichi, 1983; Chen *et al.*, 1992; Thorgeirsson *et al.*, 1992). Près de 50% de sa structure primaire est contenue dans les lipides de la membrane discale des bâtonnets (voir Figure 1.8).

La rhodopsine humaine et bovine possède une homologie de séquence primaire de plus de 87%. La rhodopsine présente aussi 23% d'identité avec deux autres protéines membranaires de la famille des récepteurs transmembranaires à 7 hélices  $\alpha$  couplés aux protéines G: le récepteur  $\beta$ -adrénergique (Dixon *et al.*, 1986) et le récepteur muscarinique de l'acétylcholine (Kubo *et al.*, 1986).

#### 1.7.2.1 La structure primaire de la rhodopsine

La séquence primaire en acides aminés de la rhodopsine fut démontrée en 1982 par le groupe d'Ovchinnikov (Abdulaev *et al.*, 1982; Ovchinnikov, 1982) et corrigée en 1983 par le groupe de Hargrave (Hargrave *et al.*, 1983) (voir Figure 1.8). La rhodopsine a subi des modifications post-traductionnelles incluant: le pont disulfure entre les acides aminés cys<sub>110</sub> et cys<sub>187</sub>; la glycosylation par deux oligosaccharides sur les asparagines 2 et 15 de l'extrémité N-terminale (Fukuda *et al.*, 1979) et l'acylation des cystéines 322 et 323 avec des acides gras palmitoyl (Ovchinnikov *et al.*, 1988).

La structure primaire de la rhodopsine est donc enrichie de 9 molécules de mannose et de 12 molécules de N-acétylglycosamine du côté N-terminal (Irreverre *et al.*, 1969; Hargrave et Fong, 1977). Finalement, la rhodopsine possède 7 sites de phosphorylation localisés sur la chaîne du carbonyle terminal (Hargrave *et al.*, 1980; Karnik *et al.*, 1988).

Dès 1983, le groupe de Nathans publiait l'arrangement des 4 introns et des 5 exons de l'ADN génomique de la rhodopsine bovine (Nathans et Hogness, 1983). Le chromophore, le 11-cis rétinol, est lié au groupement  $\epsilon$ -aminé de la lysine 296 (voir Figure 1.8) de l'opsine via une base de Schiff protonée (Bownds, 1967) et il interagit de façon électrostatique avec l'hélice C de l'opsine (Teller *et al.*, 2001).

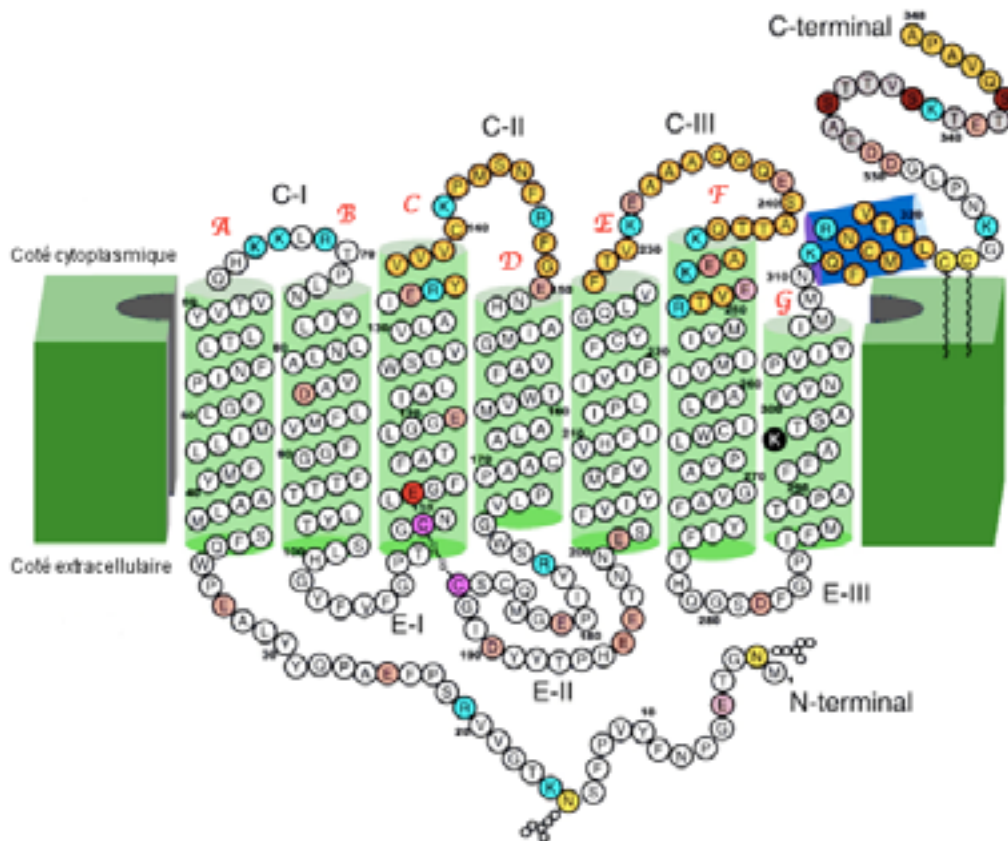


Figure 1.8: Modèle d'organisation de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine dans la bicouche lipidique et structure primaire de la rhodopsine (Teller et al., 2001) (adapté de Hargrave et al., 1983). Les hélices sont nommées de gauche à droite soit de A à G (en rouge). Les termes C-I, C-II, C-III, E-I, E-II et E-III représentent les boucles entre les hélices  $\alpha$ .

### 1.7.2.2 La structure secondaire de la rhodopsine

Avant que la structure de la rhodopsine à haute résolution soit connue (Palczewski et al., 2000), il a été possible de prédire sa structure secondaire. Il a été déterminé que la rhodopsine était constituée de portions hydrophiles et hydrophobes (Hargrave et Fong, 1977; Abdulaev et al., 1982; Ovchinnikov, 1982) et que les acides aminés hydrophobes sont concentrés au sein de la membrane (Baldwin, 1993; Farahbakhsh et al., 1995; Ridge et al., 1995; Kim et al., 1997; Pogozeva et al., 1997; Shieh et al., 1997; Herzyk et Hubbard, 1998). Des mesures en diffraction des rayons X (Schwartz et al., 1975; Sardet et al., 1976; Dratz et al., 1979), en diffraction des neutrons (Chabre et al., 1976; Saibil et al., 1976) ainsi qu'en cryomicroscopie électronique

(Chen et Hubbell, 1973; Krebs *et al.*, 1998; Schertler, 1998; 1999; Schertler et Hargrave, 2000) ont aussi démontré qu'une forte proportion de la rhodopsine est en hélice  $\alpha$  et enfouie dans la bicouche lipidique des membranes discales des segments externes des bâtonnets.

Déjà vers la fin des années 1970 et le début des années 1980, des mesures ont démontré que la rhodopsine est une protéine transmembranaire. Sa portion N-terminale est localisée dans l'espace intradiscal (Hargrave, 1977; Hargrave et Fong, 1977) et sa chaîne C-terminale dans l'espace extradiscal (Virmaux *et al.*, 1975; Hargrave et Fong, 1977; Sale *et al.*, 1978). De plus, la chaîne polypeptidique traverse 7 fois la membrane. Elle est reliée par 3 boucles intradiscales et 4 boucles cytoplasmiques dont la 4<sup>e</sup> boucle est formée entre l'hélice G et les 2 cystéines palmitoylées ancrées dans la membrane (voir Figure 1.8; Palczewski *et al.*, 2000).

La structure secondaire de la rhodopsine est connue depuis plusieurs années. Elle est constituée d'une portion membranaire en hélices  $\alpha$  (~50%) et d'une portion hydrophile principalement en structure désordonnée (~25% cytoplasmique et 25% intradiscale) (Rothschild et Stanley, 1975; Rothschild *et al.*, 1976, 1980a et b; Osborne, 1977; Litman, 1979; Schertler *et al.*, 1993; Schertler et Hargrave, 1995 et 2000; Unger et Schertler, 1995; Unger *et al.*, 1997; Schertler, 1998 et 1999; Palczewski *et al.*, 2000). Les hélices  $\alpha$  sont organisées en forme d'ellipse d'environ 75Å par 48Å et orientées perpendiculairement au plan de la membrane (voir Figure 1.9C; Schertler *et al.*, 1993; Schertler et Hargrave, 1995; Teller *et al.*, 2001). Dès la fin des années 1970, le groupe de Rothschild démontrait à l'aide de techniques spectroscopiques que la rhodopsine adopte une structure secondaire majoritairement en hélices  $\alpha$  (Rothschild *et al.*, 1976). Ces résultats ainsi que plusieurs autres expériences en dichroïsme circulaire (Rafferty, 1977; Rafferty *et al.*, 1977) et en Raman (Rothschild et Stanley, 1975; Rothschild *et al.*, 1976) ont confirmé cette conclusion. De plus, en 1980, le groupe de Rothschild concluait, à l'aide de mesures en polarisation infrarouge, que le cœur de la rhodopsine enfoui dans la membrane adopte une structure en hélices  $\alpha$  et que ces hélices possèdent une orientation globale inférieure à 40° par rapport à la normale du plan de la membrane (Rothschild *et al.*, 1980b). Cette conclusion est soutenue par l'existence du diamagnétisme dans les segments externes des bâtonnets (Chabre, 1978; Michel-Villaz *et al.*, 1979) et par des mesures de protéolyse chimique (Litman, 1979).



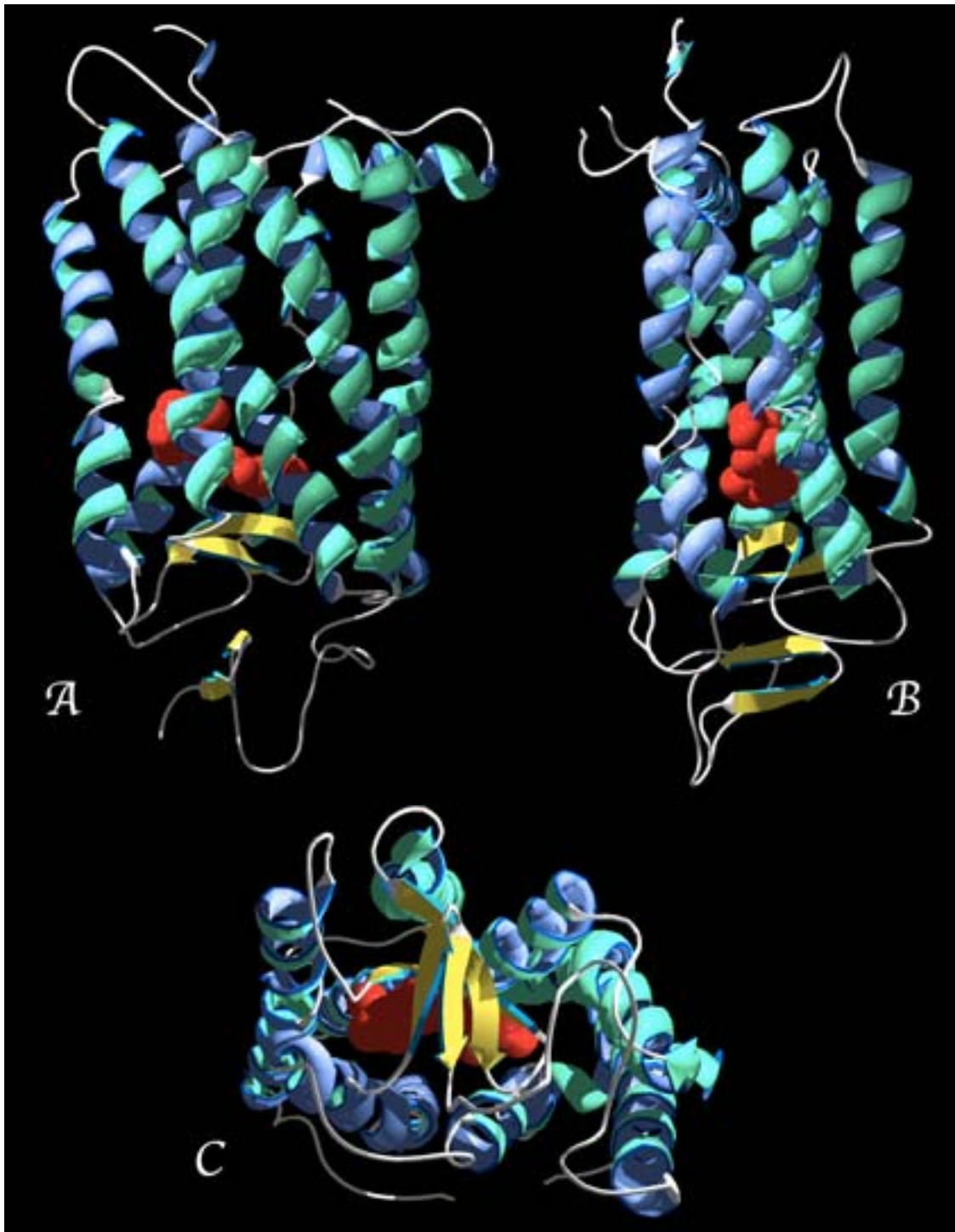


Figure 1.9: Structure tertiaire de la rhodopsine (PDB #1F88). Cette représentation tridimensionnelle montre clairement les 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires, les 2 feuillets  $\beta$  (en jaune) et le rétinale (en rouge). Vue de face (A), de côté (B) et du dessous (C).

### 1.7.2.3 La structure tertiaire de la rhodopsine

La structure tertiaire de la rhodopsine à haute résolution a été démontrée récemment (Palczewski *et al.*, 2000; Teller *et al.*, 2001). Cette démonstration a été faite à une résolution de 2.8 Å et a permis de confirmer les descriptions et interprétations faites à partir de diverses techniques chimiques, biochimiques et physiques (voir Figure 1.9).

La structure tertiaire obtenue en diffraction des rayons X confirme que la rhodopsine est composée de 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires organisées en ellipse et la liaison du rétinol à la lysine 296 (voir Figure 1.9).

La structure tertiaire apporte toutefois plusieurs nouveaux éléments structuraux tels que: la présence de deux feuillets  $\beta$  sur la face intradiscale de la rhodopsine (un premier sur la 2<sup>e</sup> boucle (E-II) et un autre sur la chaîne N-terminale) (en jaune sur la Figure 1.9); la présence d'une huitième hélice formée dans la quatrième boucle extradiscale, soit entre l'hélice G et les 2 cystéines palmitoylées; la présence d'une proline dans certaines hélices (A, D, F et G), qui crée une tension brisant momentanément ces hélices qui se plient alors vers l'intérieur. Pour plus de détails sur la structure tertiaire de la rhodopsine, voir Palczewski *et al.* (2000) et Teller *et al.* (2001).

### 1.7.3 L'activation de la rhodopsine

La vision débute par l'absorption d'un photon par le rétinol (aldéhyde de la vitamine A) qui est lié à la rhodopsine. Le rétinol subira ensuite une isomérisation de la forme 11-cis à tout trans en moins de 200 femtosecondes (Schoenlein *et al.*, 1991; Peteanu *et al.*, 1993; Teller *et al.*, 2001). Le rétinol passe alors d'un environnement spatial parfaitement adapté à sa forme 11-cis, à un environnement inadapté. Il s'en suit une série de changements structuraux mineurs de la rhodopsine et, par la suite, des changements plus globaux. La configuration interne des chaînes latérales des acides aminés et la structure tertiaire de la rhodopsine changeront jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint (Schoenlein *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1992; Farahbakhsh *et al.*, 1993; Peteanu *et al.*, 1993; Weitz et Nathans, 1993; Zvyaga *et al.*, 1993). Ces changements furent identifiés avec précision grâce à une série de

mesures prises en spectroscopie d'absorption. Ces changements structuraux de la rhodopsine se produisent dans des intervalles de temps allant des picosecondes aux millisecondes (voir Figure 1.10). Finalement, la rhodopsine ainsi activée devient incolore, de sorte que le processus entier de la perte de couleur s'appelle blanchiment ou « bleaching ».

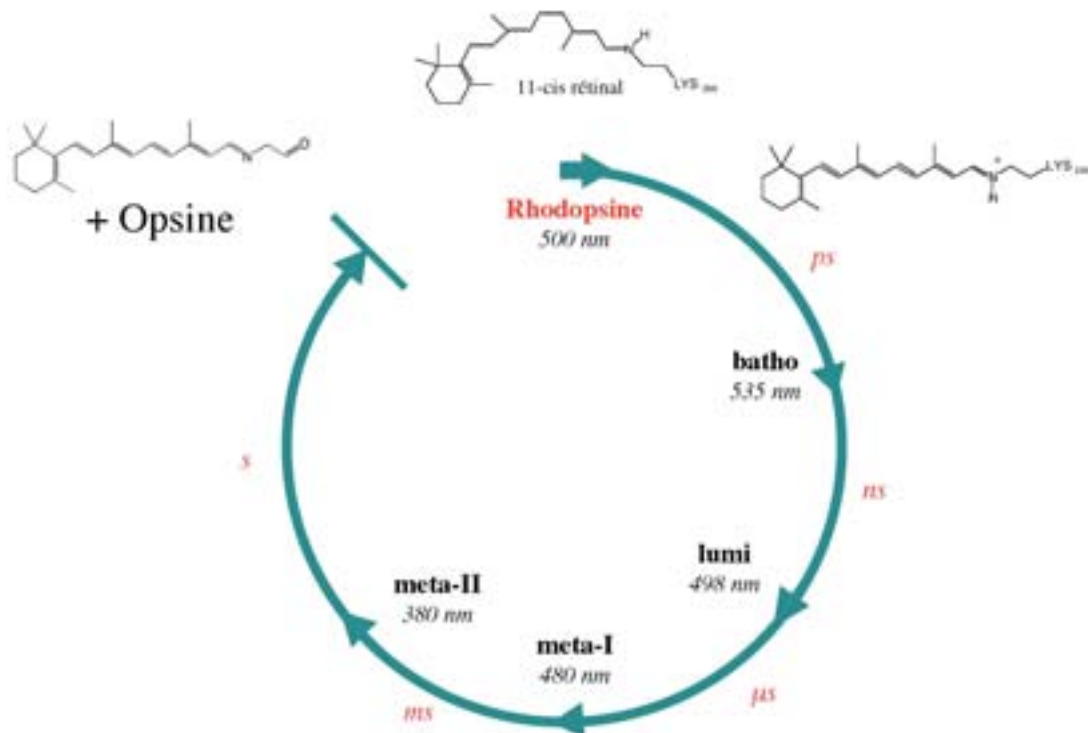


Figure 1.10: Séquence des photointermédiaires de la rhodopsine (adapté de Cowan et Drisko, 1976; Déry, 1991; Yoshizawa et Kuwata, 1995).

Les deux derniers photointermédiaires s'appellent métarhodopsine I (MI) et métarhodopsine II (MII). La conversion de MI en MII demande une grande augmentation d'entropie attribuable à un changement substantiel de la structure tertiaire. La conversion de MI en MII est l'étape critique dans le mécanisme d'activation de la rhodopsine. C'est l'étape où la rhodopsine passe d'un état totalement inactif à l'état de catalyseur pour l'activation de la transducine (Wessling-Resnick et Johnson, 1987; Yamazaki *et al.*, 1987; Hamm, 1991; Bruckert *et al.*, 1992; Fahmy et Sakmar, 1993). La fonction de l'intermédiaire MII est de catalyser, par un facteur  $10^7$ , l'échange du GDP pour le GTP dans le site actif de la transducine. Cette

catalse s'effectue jusqu'à l'inactivation de la rhodopsine par sa phosphorylation par la rhodopsine kinase et la liaison subséquente de l'arrestine (Baehr et al., 1979).

#### 1.7.4 Le mécanisme de transduction visuelle

Le phénomène de la vision débute à l'intérieur des segments externes des cellules photoréceptrices de la rétine tels que les bâtonnets (vision nocturne) et les cônes (vision des couleurs ou vision diurne) (voir Figure 1.7). Ces segments externes contiennent le pigment visuel, la rhodopsine, qui absorbe la lumière et qui initie le processus visuel (O'Brien, 1978; Shichi, 1983 et 1994; Liebman *et al.*, 1987; Doly et Meyniel, 1989; Hargrave et McDowell, 1992a et b; Hargrave, 1995).

La rhodopsine ainsi activée, activera la transducine ( $G_{\alpha\beta\gamma_t}$ ). La  $G_{\alpha\beta\gamma_t}$  est liée à la surface des membranes discales par ses sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  (Ohguro *et al.*, 1991; Perez-Sala *et al.*, 1991; Casey, 1992a et b; Iniguez-Lluhi *et al.*, 1992; Neubert *et al.*, 1992; Schafer et Rine, 1992; Kinsella et O'Mahony, 1994; Kisselev *et al.*, 1994). Lors de la formation de l'intermédiaire MII, la  $G_{\alpha\beta\gamma_t}$  et la rhodopsine interagissent spécifiquement et MII catalyse l'échange du GDP pour le GTP. Après la liaison du GTP et du  $Mg^{2+}$  au site actif de la  $G_{\alpha_t}$ , un changement conformationnel intervient de manière à libérer la sous-unité  $G_{\alpha_t}$  de la rhodopsine et de ses sous-unités  $G_{\beta\gamma_t}$  (Stryer et Bourne, 1986; Chabre et Deterre, 1989; Bruckert *et al.*, 1992; Faurobert *et al.*, 1993; Mazzoni et Hamm, 1993). Après cette libération, la rhodopsine conserve sa forme MII et demeure en mesure d'activer d'autres  $G_{\alpha\beta\gamma_t}$ . Ce processus d'activation de la  $G_{\alpha\beta\gamma_t}$  peut donc se poursuivre. L'étape d'activation de la  $G_{\alpha\beta\gamma_t}$  par la rhodopsine constitue le premier niveau d'amplification du processus visuel (voir Figure 1.11) (Kaupp et Koch, 1986; Lamb et Pugh, 1992; Chabre *et al.*, 1993; Pugh et Lamb, 1993).

La  $G_{\alpha_t}$  activera à son tour la phosphodiesterase (PDE), une enzyme qui a pour fonction primaire l'hydrolyse du GMP cyclique (cGMP) (Fung *et al.*, 1981; Rarick *et al.*, 1992; Artemyev *et al.*, 1993; Heck et Hofmann, 1993; Pfister *et al.*, 1993; Dumke *et al.*, 1994). L'activation de la PDE se produit lors de la dissociation des sous-unités  $PDE_{\gamma}$  du complexe  $PDE_{\alpha\beta\gamma}$  suite à la liaison entre la  $G_{\alpha_t}$  (GTP) et la  $PDE_{\gamma}$  (Yamazaki *et al.*, 1983 et 1990; Stryer, 1991). Par la suite, le complexe  $PDE_{\alpha\beta}$  hydrolyse le

cGMP, le messenger interne de la phototransduction, à un rythme aussi rapide que peut soutenir la diffusion du cGMP. À concentration élevée, la PDE peut hydrolyser jusqu'à plusieurs milliers de cGMP par seconde (Fung *et al.*, 1981; Kaupp et Koch, 1986; Stryer, 1986; Chabre et Deterre, 1989). Cette étape importante d'amplification enzymatique mène à la diminution rapide de la concentration en cGMP cytoplasmique et cause ainsi sa dissociation des canaux cationiques (Figure 1.11). La dissociation du cGMP cause alors la fermeture de ces canaux situés dans la membrane plasmique pour ainsi produire l'hyperpolarisation des cellules photoréceptrices et l'arrêt de la transmission synaptique (Shichi, 1983; Rayer *et al.*, 1990). L'hydrolyse du cGMP constitue le deuxième niveau d'amplification catalytique de la cascade visuelle (voir Figure 1.11). L'activation d'une seule rhodopsine mènera à l'hydrolyse de  $10^4$  à  $10^5$  molécules de cGMP (Kaupp et Koch, 1986; Chabre, 1992; Lamb et Pugh, 1992; Dizhoor *et al.*, 1993).

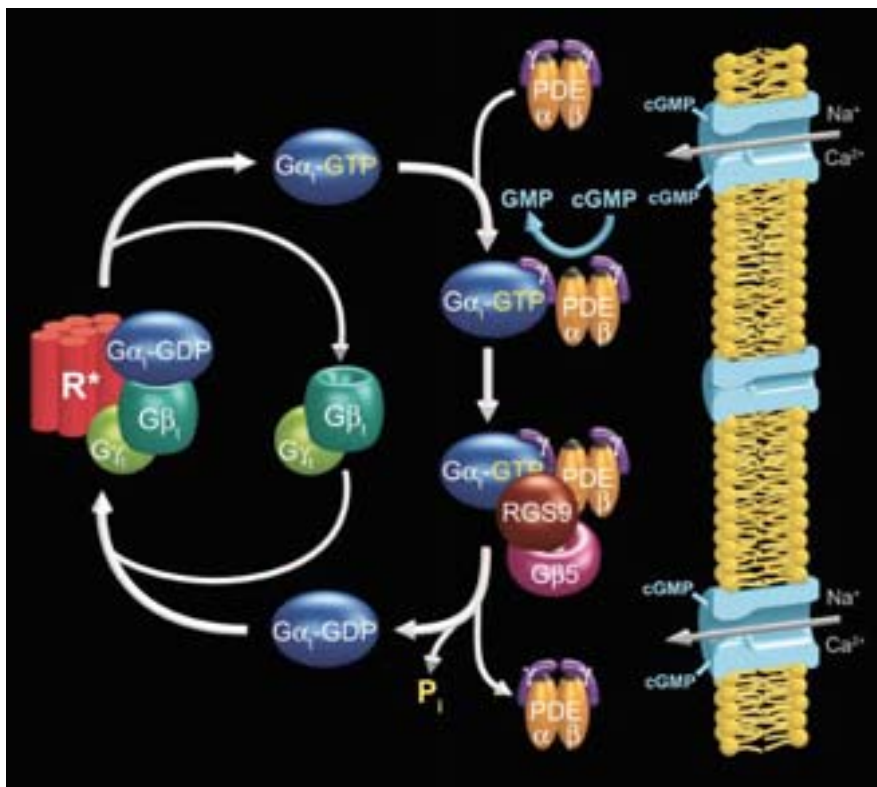


Figure 1.11: Schéma de l'activation de la phototransduction (Arshavsky *et al.*, 2002).

R\*: Rhodopsin,  $G\alpha\beta\gamma t$ : Transducine,  $PDE_{\alpha\beta\gamma}$ : Phosphodiésterase et cGMP: guanosine-3: 5'-monophosphate cyclique.

### 1.7.5 Études antérieures sur la rhodopsine en monocouche

Depuis la première publication relatant des mesures de protéines étalées à l'interface air-eau (Devaux, 1903), plusieurs années se sont écoulées avant de voir les premières mesures relatives à la rhodopsine. Les premières mesures impliquant la rhodopsine à l'interface air-eau furent effectuées par Hyono *et al.*, (1962). Ces chercheurs rapportèrent une différence dans la forme de l'isotherme et dans la mesure de la pression de surface en fonction du temps entre deux types d'extraction de la rhodopsine. Leur conclusion s'appuyait sur des mesures d'isothermes de pression de surface et sur des courbes de force en fonction du temps avant et après un éclair lumineux.

En 1966, Azuma et Takagi démontrèrent l'effet de la composition de la sous-phase et de la force ionique sur les isothermes de pression de surface de fragments de membranes discales des segments externes des bâtonnets (Azuma et Takagi, 1966). Les changements observés ont aussi été démontrés à l'aide des premières mesures en spectroscopie électronique *in situ* à l'interface air-eau sur la rhodopsine. Contrairement à Hyono *et al.* (1962), Azuma et Takagi (1966) décrivèrent qu'il n'y avait aucune différence appréciable dans les isothermes de pression de surface entre une monocouche de rhodopsine native et une monocouche de rhodopsine photoblanchie.

Le groupe de Brody, après avoir étudié les propriétés de surface des fragments de membranes discales à la surface de l'eau, s'est penché sur la stabilité et la régénération des propriétés spectroscopiques de la rhodopsine (Karan *et al.*, 1978). Il a été ainsi démontré que les propriétés spectroscopiques de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau, lorsqu'elle est maintenue dans l'obscurité, demeuraient stables durant plus de 150 minutes. Les propriétés spectroscopiques de la rhodopsine après photoblanchiment ont également été étudiées. Il a été observé que, lorsqu'un film est maintenu à une forte pression de surface, il y a régénération des propriétés spectroscopiques de 57 à 100%, mais aucune régénération n'est observable si le film est maintenu à une faible pression de surface ou s'il est décomprimé après irradiation (Karan *et al.*, 1978).

Le groupe de Korenbrot a démontré par des mesures spectroscopiques que les films monomoléculaires de rhodopsine transférés sur substrat solide par la technique de

Langmuir-Blodgett demeurent fonctionnellement intacts (Korenbrot, 1977; Korenbrot et Pramik, 1977). Ils ont aussi démontré que la rhodopsine en film monomoléculaire garde sa capacité de régénération avec des caractéristiques similaires à celles retrouvées pour la rhodopsine dans les segments externes des bâtonnets (Korenbrot, 1977; Korenbrot et Pramik, 1977). De plus, Korenbrot et Jones, (1979) ont montré à l'aide du dichroïsme circulaire que le rétinol possédait une orientation de  $15^\circ \pm 4^\circ$  par rapport au plan de la membrane.

Les études de Salesse *et al.*, (1990) ont démontré à l'aide de mesures ellipsométriques et d'isothermes de pression de surface, que la pression de surface des membranes discales est d'environ  $38 \text{ mNm}^{-1}$  et que l'aire moléculaire de la rhodopsine contenue dans ces membranes est d'environ  $1.1 \text{ nm}^2$ . Par contre, ils ont démontré que la rhodopsine pure à l'interface air-eau avait une aire moléculaire de  $2.3 \text{ nm}^2$  (Salesse *et al.*, 1990). Ils ont aussi rapporté que la rhodopsine se réorientait lors de la compression du film. Cette conclusion était basée sur des mesures d'épaisseur du film en fonction de l'aire moléculaire de la rhodopsine.

Plus récemment, les chercheurs de l'équipe de Nicolini se sont intéressés à la caractérisation des propriétés thermiques des films Langmuir-Blodgett de rhodopsine (Maxia *et al.*, 1995; Pepe et Nicolini, 1996). Ils ont estimé, à l'aide de mesures nanogravimétriques, que l'aire moléculaire de la rhodopsine est d'environ  $1.1 \text{ nm}^2$ . Ils ont aussi déterminé par diffraction des rayons X que la périodicité entre chacune des monocouches transférées sur un substrat solide est de  $59 \text{ \AA}$  (Pepe *et al.*, 1996). De plus, ces chercheurs ont démontré par des mesures de dichroïsme circulaire que la rhodopsine, préparée à l'aide de transferts par la méthode de Langmuir-Schaefer à  $35 \text{ mNm}^{-1}$ , pouvait maintenir son intégrité structurale jusqu'à  $150^\circ\text{C}$  si elle était blanchie et jusqu'à  $200^\circ\text{C}$  si elle était préparée à l'obscurité. Enfin, ils ont montré que la rhodopsine garde sa propriété d'absorption à  $500 \text{ nm}$  jusqu'à  $90^\circ\text{C}$  (Pepe *et al.*, 1996).

### 1.8 Objectifs du travail de recherche de cette thèse

Depuis plus de 20 ans, les chercheurs supposent que l'étalement des protéines à l'interface air-eau provoque leur dénaturation. L'idée véhiculée derrière cette affirmation est que les protéines étalées à la surface de l'eau s'organisent de telle

sorte que les acides aminés hydrophiles s'orientent face à l'eau et les acides aminés hydrophobes face à l'air (MacRitchie, 1978 et 1986).

Il n'existe encore aucun résultat direct permettant de confirmer ou d'infirmer ce processus. Par contre, le récent développement de techniques telles que la spectroscopie différentielle infrarouge par modulation de polarisation, aussi nommée PM-IRRAS (Polarization Modulation InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy), ainsi que la réflectivité et la diffraction des rayons X apportent des informations directes sur la structure des protéines *in situ* à la surface de l'eau. De plus, la majorité des protéines membranaires forment des cristaux bidimensionnels qui ne s'analysent que par diffraction des électrons. Par contre, il a récemment été démontré qu'il était possible de procéder à des études structurales de protéines par diffraction des rayons X à angle rasant (XGID) (Haas *et al.*, 1995; Verclas *et al.*, 1999; Lenne *et al.*, 2000).

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre l'organisation structurale et les mécanismes de dénaturation des protéines membranaires à l'interface air-eau. Pour y parvenir, deux protéines sont étudiées: la gramicidine et la rhodopsine. Cette étude est effectuée à l'aide de la méthode des films monomoléculaires *in situ* à la surface de l'eau. Les objectifs seront présentés pour chacune des protéines étudiées.

### 1.8.1 La gramicidine à l'interface air-eau

Les mesures effectuées par Kemp et Wenner, (1976), Ries et Swift, (1987), Tournois *et al.* (1989) et Ducharme *et al.* (1996) ont démontré que l'isotherme de pression de surface de la gramicidine présentait un plateau dans la région située entre 15 et 17 mNm<sup>-1</sup>. Ils ont attribué ce plateau à plusieurs phénomènes tels qu'une formation de « cluster », une transition de phase, une réorientation moléculaire, une réorganisation du film, une transition de la forme monomère à la forme dimère, ou encore un changement de la structure secondaire ou tertiaire (Kemp et Wenner, 1976; Tournois *et al.*, 1989). Le chapitre 2 de cette thèse confirme certaines de ces hypothèses et clarifie la structure et l'organisation de la gramicidine en monocouche à l'interface air-eau.



Plusieurs chercheurs ont tenté de déterminer la structure de la gramicidine en solution et dans les membranes (Urry, 1971 et 1972; Urry *et al.*, 1971, 1972 et 1983; Glickson *et al.*, 1972; Fossel *et al.*, 1974; Veatch et Blout, 1974; Veatch *et al.*, 1974; Veatch, 1976; Veatch et Stryer, 1977; Heitz *et al.*, 1979; Weinstein *et al.*, 1979, 1980 et 1985; Wallace *et al.*, 1981; Wallace, 1983 et 1986; Lorenzi *et al.*, 1984; Naik et Krimm, 1984; Arseniev *et al.*, 1985; Hickok *et al.*, 1986; Cornell, 1987; Tournois *et al.*, 1987; Killian *et al.*, 1988a; b; Killian et Urry, 1988; LoGrasso *et al.*, 1988; Van Mau *et al.*, 1988; Killian, 1992; Cross *et al.*, 1999). Toutefois, ils se sont heurtés à une problématique importante: la gramicidine est sensible aux solvants et à son environnement lipidique. La technique des monocouches a permis de contourner ce problème.

À la lumière de ces résultats et dans le but de mieux caractériser les films monomoléculaires de gramicidine A, les objectifs suivants ont été définis:

- 1- Déterminer la structure secondaire de la VGA *in situ* à l'interface air-eau.
- 2- Déterminer le degré d'organisation et l'orientation de la VGA *in situ* à l'interface air-eau.
- 3- Déterminer les changements de phases ou structuraux prenant place lors du plateau de l'isotherme de pression de surface de la gramicidine A.
- 4- Tenter d'expliquer les changements d'intensité des spectres PM-IRRAS de gramicidine A sur D<sub>2</sub>O et H<sub>2</sub>O.
- 5- Déterminer l'effet de l'échange d'une valine par une isoleucine, dans la structure primaire de la gramicidine A, sur la structure secondaire de la gramicidine *in situ* à l'interface air-eau.
- 6- Déterminer la structure secondaire de la gramicidine en absence de solvants ou de lipides et l'effet du solvant d'étalement sur la structure secondaire de gramicidine.

### 1.8.2 La rhodopsine à l'interface air-eau

Au début de ce travail de recherche, la structure tertiaire de la rhodopsine n'était pas connue à l'échelle atomique. Ainsi, l'un des principaux objectifs consistait à préparer des cristaux bidimensionnels de rhodopsine. Toutefois, la cristallisation

bidimensionnelle de la rhodopsine en monocouche nécessitait l'obtention de conditions expérimentales permettant à la protéine de demeurer intacte à l'interface air-eau.

Nous avons donc déterminé les conditions expérimentales permettant de maintenir la structure native de la rhodopsine en monocouche à l'interface air-eau en tant que système modèle pour les protéines membranaires. Parmi ces conditions, la vitesse de compression, la pression de surface initiale et la température de la sous-phase ont été analysées. Ces conditions expérimentales sont discutées au chapitre 3 de cette thèse.

Dans le but de mieux caractériser les films monomoléculaires de rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau, et ainsi déterminer les paramètres permettant de maintenir son intégrité structurale, les objectifs suivant ont été définis:

- 1- Déterminer l'effet de la vitesse de compression sur la structure secondaire de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau.
- 2- Déterminer l'effet de la pression de surface initiale après étalement sur la structure secondaire de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau.
- 3- Déterminer l'effet d'une période d'incubation sur l'intégrité structurale de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau.
- 4- Déterminer l'effet de la température de la sous-phase sur l'intégrité structurale de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau.
- 5- Déterminer la stabilité des films de rhodopsine en fonction du temps *in situ* à l'interface air-eau.
- 6- Déterminer l'épaisseur des films de rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau à l'aide de la réflectivité des rayons X.
- 7- Déterminer les conditions expérimentales telles que la vitesse de compression, la température de la sous-phase, la pression initiale après étalement, le temps d'incubation et le type d'étalement, permettant de maintenir l'intégrité de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau.
- 8- Déterminer l'effet de la lumière sur la structure de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau.

## 1.9 Références

- Abdulaev, N. G., I. D. Artamonov, A. S. Bogachuk, M. Y. Feigina, M. B. Kostina, A. B. Kudelin, V. I. Martynov, A. I. Miroshnikov, A. S. Zolotarev and A. Ovchinnikov Yu. 1982. Structure of light-activated proteins: visual rhodopsin. Biochem Int 5:693-703.
- Akashi, K., K. Kubota and K. Kurahashi. 1977. Biosynthesis of enzyme-bound formylvaline and formylvalylglycine. A possible initiation complex for gramicidin A biosynthesis. J Biochem (Tokyo) 81:269-272.
- Akashi, K. and K. Kurahashi. 1977. Formylation of enzyme-bound valine and stepwise elongation of intermediate peptides of gramicidin A by a cell-free enzyme system. Biochem Biophys Res Commun 77:259-267.
- Alberts, B., B. D., J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson. 1989. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing Inc.
- Albrecht, O. 1989. Industrial Scale Production of LB Layers, from Molecular Electronics, Biosensors and Biocomputers. New York: Plenum Press.
- Ali, M. A. and M. A. Klyne. 1986. La vision chez les vertébrés. V. Mont-Royal, editor. Montréal, Qc.
- Amis, E. J., D. A. Davenport and H. Yu. 1981. Photopigment content of isolated bovine disk membrane vesicles. Anal Biochem 114:85-91.
- Andres, R. P., T. Bein, M. Dorogi, S. Feng, J. I. Henderson, C. P. Kubiak, W. Mahoney, R. G. Osifchin and R. Reifenberger. 1996. Coulomb Staircase at Room Temperature in a Self-Assembled Molecular Nanostructure. Science 272:1323-1324.

- Arrondo, J. L., A. Muga, J. Castresana and F. M. Goni. 1993. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. Prog Biophys Mol Biol 59:23-56.
- Arseniev, A. S., I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, A. L. Lomize and A. Ovchinnikov Yu. 1985. <sup>1</sup>H-NMR study of gramicidin A transmembrane ion channel. Head-to-head right-handed, single-stranded helices. FEBS Lett 186:168-174.
- Arshavsky, V. Y., T. D. Lamb and E. N. Pugh, Jr. 2002. G proteins and phototransduction. Annu Rev Physiol 64:153-187.
- Artemyev, N. O., J. S. Mills, K. R. Thornburg, D. R. Knapp, K. L. Schey and H. E. Hamm. 1993. A site on transducin alpha-subunit of interaction with the polycationic region of cGMP phosphodiesterase inhibitory subunit. J Biol Chem 268:23611-23615.
- Azuma, K. and M. Takagi. 1966. Rhodopsin Film at Air-Water Interface. Annual Report of Biological works. Osaka: Osaka University. p 1473-1481.
- Baehr W., M. J. Devlin, M. L. Applebury. 1979. Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments. J Biol Chem 254:11699-77.
- Baker, E. N. and R. E. Hubbard. 1984. Hydrogen Bonding in Globular Proteins. Prog Biophys Molec Biol 44:97-179.
- Baldwin, J. M. 1993. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. Embo J 12:1693-1703.
- Bandekar, J. 1992. Amide modes and protein conformation. Biochim Biophys Acta 1120:123-143.
- Birge, R. R. 1990. Photophysics and molecular electronic applications of the rhodopsins. Annu Rev Phys Chem 41:683-733.

- Birge, R. R. 1992. Protein-based optical computing and memories. IEEE Computer 25:56-67.
- Birge, R. R. 1995. Protein-based computers. Scientific American 272:90-95.
- Blodgett, K. B. 1934. Monomolecular films of fatty acids on glass. J Am Chem Soc 56: 495.
- Blodgett, K. B. and I. Langmuir. 1937. Built-up films of barium stearate and their optical properties. Physiol Rev 51:964.
- Bohg, A. and H. Ristow. 1986. DNA-supercoiling is affected in vitro by the peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin. Eur J Biochem 160:587-591.
- Bouchard, M. and M. Auger. 1993. Solvent history dependence of gramicidin-lipid interactions: a Raman and infrared spectroscopic study. Biophys J 65:2484-2492.
- Bouchard, M., D. R. Benjamin, P. Tito, C. V. Robinson and C. M. Dobson. 2000. Solvent effects on the conformation of the transmembrane peptide gramicidin A: insights from electrospray ionization mass spectrometry. Biophys J 78:1010-1017.
- Bownds, D. 1967. Site of attachment of retinal in rhodopsin. Nature 216:1178-1181.
- Bragg, W. L., J. C. Kendrew and M. F. Perutz. 1950. Polypeptide chain configuration in crystalline proteins. Proc Roy Soc A203:321-357.
- Branden, C. and J. Tooze. 1991. Introduction to Protein Structure. New York and London: Garland Publishing, Inc. 302 p.
- Bruckert, F., M. Chabre and M. T. Vuong. 1992. Kinetic analysis of the activation of transducin and photoexcited rhodopsin: Influence of the lateral diffusion of transducin and competition of guanosine diphosphate and guanosine triphosphate for the nucleotide site. Biophys J 63:616-629.

- Buffeteau, T., F. L. Labarthe, M. Pézolet and C. Sourisseau. 1998. Photoinduced Orientation of Azobenzene Chromophores in Amorphous Polymers As Studied by Real-Time Visible and FTIR Spectroscopies. Macromolecules 31:7312-7320.
- Buffeteau, T., F. L. Labarthe, M. Pézolet and C. Sourisseau. 2001. Dynamics of Photoinduced Orientation of Nonpolar Azobenzene Groups in Polymer Films. Characterization of the Cis Isomers by Visible and FTIR Spectroscopies. Macromolecules 34:7514-7521.
- Buffeteau, T. and M. Pézolet. 1998. Photoinduced Orientation in Azopolymers Studied by Infrared Spectroscopy: Cooperative and Biaxial Orientation in Semicrystalline Polymers. Macromolecules 31:2631-2635.
- Bumm, L. A., J. J. Arnold, M. T. Cygan, T. D. Dunbar, T. P. Burgin, L. Jones II, D. L. Allara, J. M. Tour and P. S. Weiss. 1996. Are Single Molecular Wires Conducting? Science 271:1705-1707.
- Byler, D. M. and H. Susi. 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. Biopolymers 25:469-487.
- Carter, F. L. 1987. Molecular Electronic Devices II. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Casey, P. 1992a. G proteins. Visual differences. Nature 359:671-672.
- Casey, P. J. 1992b. Biochemistry of protein prenylation. J Lipid Res 33:1731-1740.
- Castano, S. 1998. Étude physico-chimique de peptides amphipathiques en interaction avec des membranes biologiques et modèles: Une étude par spectroscopies de fluorescence, PM-IRRAS et par dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université Bordeaux I. 398 p.
- Chabre, M. 1978. Diamagnetic anisotropy and orientation of alpha helix in frog rhodopsin and meta II intermediate. Proc Natl Acad Sci U S A 75:5471-5474.

- Chabre, M. 1992. Transduction du signal visuel dans les cellules rétinienne. C R Acad Sci III 314:1-5.
- Chabre, M., B. Antonny, F. Bruckert and T. M. Vuong. 1993a. The G protein cascade of visual transduction: kinetics and regulation. The GTPase Superfamily. Chichester: Wiley. p 112-120.
- Chabre, M. and P. Deterre. 1989. Molecular mechanism of visual transduction. Eur J Biochem 179:255-266.
- Chabre, M., H. Saibil and D. L. Worcester. 1976. Neutron diffraction studies of oriented retinal rods. Brookhaven Symp Biol:III77-III85.
- Chen, A. H., F. Derguini, P. Franklin, S. Hu, K. Nakanishi, B. R. Silvo and J. Wang. 1992. The triggering process of visual transduction. Structure and Function of Retinal Proteins 221:243-246.
- Chen, J., L. C. Calvet, M. A. Reed, D. W. Carr, D. S. Grubisha and D. W. Bennett. 1999a. Electronic transport through metal-1,4-phenylene diisocyanide-metal junctions. Chemical Physics Letters 313:741-748.
- Chen, J., M. A. Reed, A. M. Rawlett and J. M. Tour. 1999b. Large On-Off Ratios and Negative Differential Resistance in a Molecular Electronic Device. Science 286:1550-1551.
- Chen, J., W. Wang, M. A. Reed, A. M. Rawlett, D. W. Price and J. M. Tour. 2000. Room-temperature negative differential resistance in nanoscale molecular junctions Applied Physics Letters 77:1224-1227.
- Chen, Y. S. and W. L. Hubbell. 1973. Temperature- and light-dependent structural changes in rhodopsin-lipid membranes. Exp Eye Res 17:517-532.
- Chen, Z., D. Govender and R. R. Birge. 1995. Advances in protein-based three-dimensional optical memories. Biosystems 35:45-54.

- Chirgadze, Y. N. and N. A. Nevskaya. 1976a. Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet. Biopolymers 15:607-625.
- Chirgadze, Y. N. and N. A. Nevskaya. 1976b. Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheets. Biopolymers 15:627-636.
- Cohen, G. B., D. D. Oprian and P. R. Robinson. 1992. Mechanism of activation and inactivation of opsin: role of Glu113 and Lys296. Biochemistry 31:12592-12601.
- Cornell, B. 1987. Gramicidin A-phospholipid model systems. J Bioenerg Biomembr 19:655-676.
- Cornell, B. A., V. L. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek and R. J. Pace. 1997. A biosensor that uses ion-channel switches. Nature 387:580-583.
- Cornell, B. A., V. L. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek and R. J. Pace. 1999. The gramicidin-based biosensor: a functioning nano-machine. Novartis Found Symp 225:231-249.
- Cowan, D. O. and R. L. Drisko. 1976. Elements of Organic Photochemistry. New York: Plenum Press. p 561-565.
- Creighton, T. E. 1993. Proteins: Structures and Molecular Properties. W. H. Freeman, editor. New York.
- Crennell, K. M. 1999. Time line for British Crystallography.
- Cross, T. A., A. Arseniev, B. A. Cornell, J. H. Davis, J. A. Killian, R. E. Koeppe, 2nd, L. K. Nicholson, F. Separovic and B. A. Wallace. 1999. Gramicidin channel controversy--revisited. Nat Struct Biol 6:610-611.



- Dekker, C., S. J. Tans, L. J. Geerligs, A. Bezryadin, J. Wu and G. Wegner. 1997. Towards electrical transport on single molecules. First results on nanofabrication and phthalocyanine polymers. NATO ASI Series E Applied Sciences - Advanced Study Institute 341:129-138.
- Demain, A. L. and J. M. Piret. 1979. Relationship between antibiotic biosynthesis and sporulation. Proc FEBS Meet 55:183-188.
- Demel, R. A., Y. London, W. S. Geurts van Kessel, F. G. Vossenberg and L. L. van Deenen. 1973. The specific interaction of myelin basic protein with lipids at the air-water interface. Biochim Biophys Acta 311:507-519.
- Déry, M. 1991. Dissipation d'énergie par les pigments visuels lors de la transition Lumi -> Métarhodopsine I: mise au point d'une méthode numérique pour l'analyse cinétique et étude de l'effet de l'environnement moléculaire sur cette transition. Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières. 185 p.
- Devaux, H. 1903. PV Soc Phys Nat Bordeaux.
- Dhathathreyan, A., U. Baumann, A. Muller and D. Mobius. 1988. Characterization of complex gramicidin monolayers by light reflection and Fourier transform infrared spectroscopy. Biochim Biophys Acta 944:265-272.
- Dhirani, A., P. H. Lin, P. Guyot-Sionnest, R. W. Zehner and L. R. Sita. 1997. Self-assembled molecular rectifiers. Journal of Chemical Physics 106:5249-5253.
- Dixon, R. A., B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlman, T. Friele, M. A. Bolanowski, C. D. Bennett, E. Rands, R. E. Diehl and et al. 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. Nature 321:75-79.
- Dizhoor, A. M., C. K. Chen, E. Olshevskaya, V. V. Sinelnikova, P. Phillipov and J. B. Hurley. 1993. Role of the acylated amino terminus of recoverin in Ca(2+)-dependent membrane interaction. Science 259:829-832.

- Doly, M. and G. Meyniel. 1989. La transduction rétinienne. Journal de Médecine Nucléaire et Biophysique 13:337-341.
- Donhauser, Z. J., B. A. Mantoosh, K. F. Kelly, L. A. Bumm, J. D. Monnell, J. J. Stapleton, D. W. Price Jr, A. M. Rawlett, D. L. Allara, J. M. Tour and P. S. Weiss. 2001. Conductance Switching in Single Molecules Through Conformational Changes. Science 292:2303-2306.
- Dousseau, F. 1991. Détermination de la structure secondaire des protéines en solution aqueuse à partir de leur spectre infrarouge. Thèse de doctorat. Université Laval.
- Dousseau, F. and M. Pézolet. 1990. Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. Biochemistry 29:8771-8779.
- Dousseau, F., M. Therrien and M. Pézolet. 1989. On the Spectral Subtraction of Water from the FTIR Spectra of Aqueous Solutions of Proteins. Appl Spectrosc 43:538-542.
- Dowling, J. E. 1987. The retina an approachable part of the brain. Boston: Belknap.
- Dratz, E. A., G. P. Miljanich, P. P. Nemes, J. E. Gaw and S. Schwartz. 1979. The structure of rhodopsin and its disposition in the rod outer segment disk membrane. Photochem Photobiol 29:661-670.
- Ducharme, D., D. Vaknin, M. Paudler, C. Salesse, H. Riegler and H. Möhwald. 1996. Surface Properties of Valine-Gramicidin A at the Air/Water interface. Thin Solid Films 284-285:90-93.
- Dumke, C. L., V. Y. Arshavsky, P. D. Calvert, M. D. Bownds and E. N. Pugh, Jr. 1994. Rod outer segment structure influences the apparent kinetic parameters of cyclic GMP phosphodiesterase. J Gen Physiol 103:1071-1098.

- Endo, T., N. Nui, D. T. Organisciak, Y. Sato, A. Kobata and E. L. Kean. 1996. Analysis of the oligosaccharide chains of rhodopsin from normal rats and those with hereditary retinal dystrophy. Experimental Eye Research 63:395-405.
- Fahmy, K. and T. Sakmar. 1993. Regulation of the rhodopsin-transducin interaction by a highly conserved carboxylic acid group. Biochemistry 32:7229-7236.
- Farahbakhsh, Z. T., K. Hideg and W. L. Hubbell. 1993. Photoactivated conformational changes in rhodopsin: A time-resolved spin label study. Science 262:1416-1419.
- Farahbakhsh, Z. T., K. D. Ridge, H. G. Khorana and W. L. Hubbell. 1995. Mapping light-dependent structural changes in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin: a site-directed spin labeling study. Biochemistry 34:8812-8819.
- Faurobert, E., A. Otto-Bruc, P. Chardin and M. Chabre. 1993. Tryptophan W207 in transducin T alpha is the fluorescence sensor of the G protein activation switch and is involved in the effector binding. EMBO J 12:4191-4198.
- Fisher, R. and T. Blumenthal. 1982. An interaction between gramicidin and the sigma subunit of RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 79:1045-1048.
- Fossel, E. T., W. R. Veatch, U. A. Ovchinnikov and E. R. Blout. 1974. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study of gramicidin A in monomer and dimer forms. Biochemistry 13:5264-5275.
- Frazier, G. 1988. An Ideology for Nanoelectronics. Concurrent Computations: Algorithms, Architecture, and Technologie. New York: Plenum Press.
- Fukuda, M. N., D. S. Papermaster and P. A. Hargrave. 1979. Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH<sub>2</sub> terminus. J Biol Chem 254:8201-8207.

- Fukuzawa, K. 1994. Motion-sensitive position sensor using bacteriorhodopsin. Appl Optics 33:7489-7495.
- Fukuzawa, K., L. Yanagisawa and H. Kuwano. 1996. Photoelectrical cell utilizing bacteriorhodopsin on a hole array fabricated by micromachining techniques. Sensors and Actuators B, Chemical Biochemical Sensors 30:121-126.
- Fung, B. K., J. B. Hurley and L. Stryer. 1981. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. Proc Natl Acad Sci U S A 78:152-156.
- Gaines, G. L. 1966. Insoluble Monolayers at Liquid/Gas Interfaces. New York: Interscience.
- Glickson, J. D., D. F. Mayers, J. M. Settine and D. W. Urry. 1972. Spectroscopic studies on the conformation of gramicidin A'. Proton magnetic resonance assignments, coupling constants, and H-D exchange. Biochemistry 11:477-486.
- Gonzalez, G. and F. MacRitchie. 1970. Equilibrium adsorption of proteins. J Colloid Interface Sci 32:55-61.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux and J. M. Ruyschaert. 1994a. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. Subcell Biochem 23:329-362.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux and J. M. Ruyschaert. 1994b. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange. Subcell Biochem 23:363-403.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux and J. M. Ruyschaert. 1994c. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. Subcell Biochem 23:405-450.

- Goormaghtigh, E., V. Raussens and J. M. Ruyschaert. 1999. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. Biochim Biophys Acta 1422:105-185.
- Groves, M. 1995. <http://www.cs.flinders.edu.au/research/CA/MC/benefit.html>.
- Haas, H., G. Brezesinski and H. Mohwald. 1995. X-ray diffraction of a protein crystal anchored at the air/water interface. Biophys J 68:312-314.
- Hamm, H. E. 1991. Molecular interactions between the photoreceptor G protein and rhodopsin. Cellular and Molecular Neurobiology 11:563-577.
- Hampf, N. 1993. Optical materials: Heat-proof proteins. Nature 366:12.
- Hargrave, P. A. 1977. The amino-terminal tryptic peptide of bovine rhodopsin. A glycopeptide containing two sites of oligosaccharide attachment. Biochim Biophys Acta 492:83-94.
- Hargrave, P. A. 1982. Rhodopsin chemistry, structure and topography. Progress in Retinal Research. New York: Pergamon Press.
- Hargrave, P. A. 1995. Future directions for rhodopsin structure and function studies. Behavioral and Brain Sciences 18:403-414.
- Hargrave, P. A. and S. L. Fong. 1977. The amino- and carboxyl-terminal sequence of bovine rhodopsin. J Supramol Struct 6:559-570.
- Hargrave, P. A., S. L. Fong, J. H. McDowell, M. T. Mas, D. R. Curtis, J. K. Wang, E. Juszczak and D. P. Smith. 1980. The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane. Neurochem 1:231-244.
- Hargrave, P. A. and J. H. McDowell. 1992a. Rhodopsin and phototransduction. Int Rev Cytol 137B:49-97.

- Hargrave, P. A. and J. H. McDowell. 1992b. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. The FASEB Journal 6:2323-2331.
- Hargrave, P. A., J. H. McDowell, D. R. Curtis, J. K. Wang, E. Juszczak, S. L. Fong, J. K. Rao and P. Argos. 1983. The structure of bovine rhodopsin. Biophys Struct Mech 9:235-244.
- Hatcher, M. E., J. G. Hu, M. Belenky, P. Verdegem, J. Lugtenburg, R. G. Griffin and J. Herzfeld. 2002. Control of the Pump Cycle in Bacteriorhodopsin: Mechanisms Elucidated by Solid-State NMR of the D85N Mutant. Biophys J 82:1017-1029.
- Hawkes, G. E., L. Y. Lian, E. W. Randall, K. D. Sales and E. H. Curzon. 1987. The conformation of gramicidin A in dimethylsulphoxide solution. A full analysis of the one- and two-dimensional <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N nuclear-magnetic-resonance spectra. Eur J Biochem 166:437-445.
- Heck, M. and K. P. Hofmann. 1993. G-protein-effector coupling: a real-time light-scattering assay for transducin-phosphodiesterase interaction. Biochemistry 32:8220-8227.
- Heitz, F., G. Spach, P. D. Cary and C. Crane-Robinson. 1979. 270-MHz nuclear-magnetic-resonance study on linear gramicidin A in dimethylsulfoxide. A new interpretation. Eur J Biochem 93:135-139.
- Heitzman, H. 1972. Rhodopsin is the predominant protein of rod outer segment membrane. Nature New Biol 235:114.
- Herzyk, P. and R. E. Hubbard. 1998. Combined biophysical and biochemical information confirms arrangement of transmembrane helices visible from the three-dimensional map of frog rhodopsin. J Mol Biol 281:741-754.
- Hickok, N. J., K. Kustin and W. Veatch. 1986. Relaxation spectra of gramicidin dimerization in a lipid bilayer membrane. Biochim Biophys Acta 858:99-106.

- Hladky, S. B. and D. A. Haydon. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel. Biochim Biophys Acta 274:294-312.
- Hol, W. G. J., P. T. Van Duijnen and H. J. C. Berendsen. 1978. The alpha-helix dipole and the properties of proteins. Nature 273:443-446.
- Hong, F. T. 1989. Molecular Electronics: Biosensors and Biocomputers. New York: Plenum Press.
- Hong, F. T. 1994. Molecular Electronics: Science and Technology For the Future. in IEEE Engineering in Medicine and Biology:25-32.
- Hotchkiss, R. D. and R. J. Dubos. 1940. Fractionation of bactericidal agent from cultures of a soil bacillus. J Biol Chem 132:791-792.
- Hyono, A., S. Kuriyama, K. Tsuji and Y. Hosoya. 1962. Monolayer film of rhodopsin at the air/water Interface. Nature 193:679-680.
- Iniguez-Lluhi, J. A., M. I. Simon, J. D. Robishaw and A. G. Gilman. 1992. G protein beta gamma subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of gamma. J Biol Chem 267:23409-23417.
- Iqbal, Z. and E. Weidekamm. 1980. Raman and infrared spectroscopic study of gramicidin A conformations. Arch Biochem Biophys 202:639-649.
- Irreverre, F., A. L. Stone, H. Shichi and M. S. Lewis. 1969. Biochemistry of visual pigments. I. Purification and properties of bovine rhodopsin. J Biol Chem 244:529-536.
- Joachin, C. and J. F. Vinuesa. 1996. Length dependence of the electronic transparenence (Conductance) of a molecular wire. Europhys Lett 33:635-640.

- Kabsch, W. and C. Sander. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers 22:2577-2637.
- Kaminima, T. 1991. Biocomputers, the next generation from Japan. New York: Chapman and Hall. p 107-118.
- Karan, H. I., R. E. Hirsch and S. S. Brody. 1978. Stability and regeneration of rhodopsin absorption spectra at an air-water interface. Z Naturforsch [C] 33:317-320.
- Karnik, S. S., T. P. Sakmar, H. B. Chen and H. G. Khorana. 1988. Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. Proc Natl Acad Sci U S A 85:8459-8463.
- Katz, E. and A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriol Rev 41:449-474.
- Kaupp, U. B. and K. W. Koch. 1986. Mechanism of photoreception in vertebrate vision. Trends Biochem Sci 11:43-47.
- Kemp, G. and C. Wenner. 1976. Solution, interfacial, and membrane properties of gramicidin A. Arch Biochem Biophys 176:547-555.
- Kendrew, J. C. 1958. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. Nature 181:662-666.
- Keyes, R. W. 1988. Miniaturization of electronics and its limits. IBM Journal of Research and Development:24-28.
- Keyes, R. W. 1992. The future of solid-state electronics. Physics Today August:42-48.
- Keyes, R. W. 1993. The future of the transistor. Scientific American June:70-78.



- Killian, J. A. 1992. Gramicidin and gramicidin-lipid interactions. Biochim Biophys Acta 1113:391-425.
- Killian, J. A., L. K. Nicholson and T. A. Cross. 1988a. Solid-state <sup>15</sup>N-NMR evidence that gramicidin A can adopt two different backbone conformations in dimyristoylphosphatidylcholine model membrane preparations. Biochim Biophys Acta 943:535-540.
- Killian, J. A., K. U. Prasad, D. Hains and D. W. Urry. 1988b. The membrane as an environment of minimal interconversion. A circular dichroism study on the solvent dependence of the conformational behavior of gramicidin in diacylphosphatidylcholine model membranes. Biochemistry 27:4848-4855.
- Killian, J. A. and D. W. Urry. 1988. Conformation of gramicidin in relation to its ability to form bilayers with lysophosphatidylcholine. Biochemistry 27:7295-7301.
- Kim, J. M., C. Altenbach, R. L. Thurmond, H. G. Khorana and W. L. Hubbell. 1997. Structure and function in rhodopsin: rhodopsin mutants with a neutral amino acid at E134 have a partially activated conformation in the dark state. Proc Natl Acad Sci U S A 94:14273-14278.
- Kinsella, B. T. and D. J. O'Mahony. 1994. Lipid modification of G proteins. Trends Cardiovascular Medicine 4:27-34.
- Kisselev, O. G., M. V. Ermolaeva and N. Gautam. 1994. A farnesylated domain in the G protein gamma subunit is a specific determinant of receptor coupling. J Biol Chem 269:21399-21402.
- Knebel, D., M. Sieber, R. Reichelt, H. J. Galla and M. Amrein. 2002. Scanning force microscopy at the air-water interface of an air bubble coated with pulmonary surfactant. Biophys J 82:474-480.
- Koenig, J. L., D. L. Tabb. 1980. Infrared spectra of globular proteins in aqueous solution. NATO Adv. Study Inst. Ser. 57: 241-255.

- Korenbrodt, J. I. 1977. Ion transport in membranes: incorporation of biological ion-translocating proteins in model membrane systems. Annu Rev Physiol 39:19-49.
- Korenbrodt, J. I. and O. Jones. 1979. Linear dichroism of rhodopsin in air-water interface films. J Membr Biol 46:239-254.
- Korenbrodt, J. I. and M. J. Pramik. 1977. Formation, structure, and spectrophotometry of air-water interface films containing rhodopsin. J Membr Biol 37:235-262.
- Krebs, A., C. Villa, P. C. Edwards and G. F. Schertler. 1998. Characterisation of an improved two-dimensional p22121 crystal from bovine rhodopsin. J Mol Biol 282:991-1003.
- Krebs, W. and H. Kuhn. 1977. Structure of isolated bovine rod outer segment membranes. Exp Eye Res 25:511-526.
- Krimm, S. and J. Bandekar. 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. Adv Protein Chem 38:181-364.
- Kubo, T., A. Maeda, K. Sugimoto, I. Akiba, A. Mikami, H. Takahashi, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa and et al. 1986. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. FEBS Lett 209:367-372.
- Kubota, K. 1987. Membranous phosphoglyceride-linked biosynthesis of pentadecapeptide, linear gramicidin, by *Bacillus brevis* ATCC 8185. Biochem Biophys Res Commun 144:203-209.
- Kuehne, W. 1878. Ueber den Sehpurpur. In Untersuchungen aus dem Physiologischen: Institut der Universitaet Heidelberg. p 15-113.
- Kurahashi, K. 1981. In: J. W. Corcoran, editor. In Antibiotics IV. New York: Springer Verlag. p 325-352.

- Labarthet, F. L., T. Buffeteau, M. Pérolet and C. Sourisseau. 1998. Study of Photoinduced Orientation in Azopolymers by Time Dependent Visible and FTIR Spectroscopies. Polymer Preprints 39:350-351.
- Lamb, T. D. and E. N. Pugh, Jr. 1992. G-protein cascades: gain and kinetics. Trends Neurosci 15:291-298.
- Langs, D. A. 1988. Three-dimensional structure at 0.86 Å of the uncomplexed form of the transmembrane ion channel peptide gramicidin A. Science 241:188-191.
- Launday, J. P. and C. Coudret. 1998. Chemical Approaches of Molecular Switches. In: Molecular Electronics: Science and Technology. M. R. A. Aviram, editor. New York: New York Acad. Sci. p 116-132.
- Lebeau, L., F. Lach, C. Venien-Bryan, A. Renault, J. Dietrich, T. Jahn, M. G. Palmgren, W. Kuhlbrandt and C. Mioskowski. 2001. Two-dimensional crystallization of a membrane protein on a detergent-resistant lipid monolayer. J Mol Biol 308:639-647.
- Lenne, P. F., B. Berge, A. Renault, C. Zakri, C. Venien-Bryan, S. Courty, F. Balavoine, W. Bergsma-Schutter, A. Brisson, G. Grubel, N. Boudet, O. Konovalov and J. F. Legrand. 2000. Synchrotron radiation diffraction from two-dimensional protein crystals at the air/water interface. Biophys J 79:496-500.
- Liebman, P. A., K. R. Parker and E. A. Dratz. 1987. The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment. Annu Rev Physiol 49:765-791.
- Linderstrøm-Lang, K. U. 1952. The Lane Medical Lectures. S. U. Press, editor. Stanford, California: Stanford University Press.
- Linderstrøm-Lang, K. U. and J. A. Shellman. 1959. Protein structure and enzyme activity. In: E. P.D. Boyer, editor. The Enzymes. 2nd ed. New York: Academic Press, New York. p 443-510.

- Lipmann, F. 1971. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis. Science 173:875-884.
- Lipmann, F. 1980. Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates. Adv Microb Physiol 21:227-266.
- Litman, B. J. 1979. Rhodopsin: its molecular substructure and phospholipid interactions. Photochem Photobiol 29:671-677.
- LoGrasso, P. V., F. d. Moll and T. A. Cross. 1988. Solvent history dependence of gramicidin A conformations in hydrated lipid bilayers. Biophys J 54:259-267.
- Lorenzi, G. P., C. Gerber and H. Jackle. 1984. Head-to-head dimerization of parallel beta helices in a synthetic model of the linear gramicidins. Biopolymers 23:1905-1916.
- Luscombe, J. H. 1993. Current issues in nanoelectronic modeling. Nanotechnology 4:1-20.
- Luscombe, J. H. and W. R. Frensley. 1990. Models for nanoelectronic devices. Nanotechnology 1:131-140.
- Maccioni, E., G. Radicchi, V. Erokhin, S. Paddeu, P. Facci and C. Nicolini. 1996. Bacteriorhodopsin thin film as a sensitive layer for an anaesthetic sensor. Thin Solid Films 284-285:898-900.
- MacRitchie, F. 1978. Proteins at interfaces. Adv Protein Chem 32:283-326.
- MacRitchie, F. 1986. Spread monolayers of proteins. Adv Colloid Interface Sci 25:341-385.
- Mahler, G., V. May and M. Schreiber. 1996. Molecular Electronics. New York: Marcel Dekker Inc.

- Mau, N. D., P. Daumas, D. Lelievre, Y. Trudelle and F. Heitz. 1987. Linear gramicidins at the air-water interface. Biophys J 51:843-845.
- Maxia, L., G. Radicchi, I. M. Pepe and C. Nicolini. 1995. Characterization of Langmuir-Blodgett films of rhodopsin: thermal stability studies. Biophys J 69:1440-1446.
- Mazzoni, M. R. and H. E. Hamm. 1993. Tryptophan<sup>207</sup> is involved in the GTP-dependent conformational switch in the alpha subunit of the G protein transducin: chymotryptic digestion patterns of the GTP gamma S and GDP-bound forms. J Protein Chem 12:215-221.
- Meinders, M. B., G. G. van den Bosch and H. H. de Jongh. 2001. Adsorption properties of proteins at and near the air/water interface from IRRAS spectra of protein solutions. Eur Biophys J 30:256-267.
- Méthot, M. 1996. Aspects structuraux et fonctionnels de films de membranes pourpres. Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières.
- Metzger, R. M., B. Chen, U. Hopfner, M. V. Lakshmikantham, D. Vuillaume, T. Kawai, X. Wu, H. Tachibana, T. V. Hughes, H. Sakurai, J. W. Baldwin, C. Hosch, M. P. Cava, L. Brehmer and G. J. Ashwell. 1997. Unimolecular Electrical Rectification in Hexadecylquinolinium Tricyanoquinodimethanide. J Am Chem Soc 119:10455-10466.
- Michel-Villaz, M., H. R. Saibil and M. Chabre. 1979. Orientation of rhodopsin alpha-helices in in retinal rod outer segment membranes studied by infrared linear dichroism. Proc Natl Acad Sci U S A 76:4405-4408.
- Miyasaka, T. and K. Koyama. 1991. Photoelectrochemical behavior of purple membrane Langmuir-Blodgett films. Chemistry Letters:1645-1648.
- Miyasaka, T. and K. Koyama. 1992. Rectified photocurrents from purple membrane Langmuir-Blodgett films at the electrode-electrode interface. Thin Solid Films 210/211:146-149.

- Miyasaka, T., K. Koyama and I. Itoh. 1992. Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor. Science 255:342-344.
- Miyazawa, T. 1958. Symmetrization of secular determinant for normal vibration calculation. J Chem Phys 29:246.
- Miyazawa, T. 1960. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide Ccains in various configurations. J Chem Phys 32:1647-1652.
- Miyazawa, T. 1967. Infrared spectra and helical conformations. in: G. D. Fasman, editor. In Poly- $\alpha$ -Amino Acids. New York: Marcel Dekker, inc. p 69-103.
- Mujica, V., M. Kemp and M. A. Ratner. 1994a. Electron conduction in molecular wires. I. A scattering formalism. J Chem Phys 101:6849-6855.
- Mujica, V., M. Kemp and M. A. Ratner. 1994b. Electron conduction in molecular wires. II. Application to scanning tunneling microscopy. J Chem Phys 101:6856-6864.
- Naik, V. M. and S. Krimm. 1984. The structure of crystalline and membrane-bound gramicidin A by vibrational analysis. Biochem Biophys Res Commun 125:919-925.
- Natansohn, A., P. Rochon, X. Meng, C. Barrett, T. Buffeteau, S. Bonenfant and M. Pézolet. 1998. molecular addressing? selective photoinduced cooperative motion of polar ester groups in copolymers containing azobenzene groups. Macromolecules 31:1155-1161.
- Nathans, J. 1992. Rhodopsin: structure, function, and genetics. Biochemistry 31:4923-4931.
- Nathans, J. and D. S. Hogness. 1983. Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. Cell 34:807-814.

- Nespurek, S. and J. Sworakowski. 1994. Electroactive and Photochromatic Molecular Materials for Wires, Switches and Memories. IEEE Engineering in Medicine and Biology 13:45-57.
- Neubert, T. A., R. S. Johnson, J. B. Hurley and K. A. Walsh. 1992. The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. J Biol Chem 267:18274-18277.
- Nevskaya, N. A. and Y. N. Chirgadze. 1976. Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibration of alpha-helix. Biopolymers 15:637-648.
- Nicolini, C. 1996. Molecular Bioelectronics. New Jersey: World Scientific.
- Nicolini, C., V. Erokhin, F. Antolini, P. Catasti and P. Facci. 1993. Thermal stability of protein secondary structure in Langmuir-Blodgett films. Biochim Biophys Acta 1158:273-278.
- O'Brien, P. J. 1978. Rhodopsin: A light-sensitive membrane glycoprotein. Receptors and recognition. London: Chapman et Hall.
- Oesterhelt, D., C. Brauchle and N. Hampp. 1991. Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing. Q Rev Biophys 24:425-478.
- Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius. 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. Nat New Biol 233:149-152.
- Ohguro, H., Y. Fukada, T. Takao, Y. Shimonishi, T. Yoshizawa and T. Akino. 1991. Carboxyl methylation and farnesylation of transducin gamma-subunit synergistically enhance its coupling with metarhodopsin II. EMBO J 10:3669-3674.
- Osborne, H. B. 1977. The hydrophobic heart of rhodopsin revealed by an infrared 1H-2H exchange study. FEBS Lett 84:217-220.

- Ovchinnikov, Y. A. 1982. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. FEBS Lett 148:179-191.
- Ovchinnikov, Y. A., N. G. Abdulaev and A. S. Bogachuk. 1988. Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. FEBS Lett 230:1-5.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 289:739-745.
- Papermaster, D. S. and W. J. Dreyer. 1974. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. Biochemistry 13:2438-2444.
- Pattus, F., C. Rothen, M. Streit and P. Zahler. 1981. Structure, composition, enzymatic activities of human erythrocyte and sarcoplasmic reticulum membrane films. Biochim Biophys Acta 647:29-39.
- Pepe, I. M., L. Maxia and C. Nicolini. 1996. Properties of Langmuir-Blodgett films of rhodopsin. Thin Solid Films 284-285:739-742.
- Pepe, I. M. and C. Nicolini. 1996. Langmuir-Blodgett films of photosensitive proteins. J Photochem Photobiol B 33:191-200.
- Perez-Sala, D., E. W. Tan, F. J. Canada and R. R. Rando. 1991. Methylation and demethylation reactions of guanine nucleotide-binding proteins of retinal rod outer segments. Proc Natl Acad Sci U S A 88:3043-3046.
- Peroutka, S. J. 1994. Handbook of Receptors and Channels, G-Protein Coupled Receptors. C. Press, editor: CRC Press.
- Peteanu, L. A., R. W. Schoenlein, Q. Wang, R. A. Mathies and C. V. Shank. 1993. The first steps in vision occurs in femtoseconds: Complete blue and red spectral studies. Proc Natl Acad Sci U S A 90:11762-11766.



- Peterson, I. R. 1992. Langmuir-Blodgett Films, from Molecular Electronics. Taunton, Somerset, England: Research Studies Press Ltd.
- Pézolet, M., C. Pellerin, R. E. Prud'homme and T. Buffeteau. 1998. Study of polymer orientation and relaxation by polarization modulation and 2D-FTIR spectroscopy. Vibrational Spectroscopy 18:103-110.
- Pfister, C., N. Bennett, F. Bruckert, P. Catty, A. Clerc, F. Pages and P. Deterre. 1993. Interactions of a G-protein with its effector: transducin and cGMP phosphodiesterase in retinal rods. Cell Signal 5:235-241.
- Phillips, M. C., H. Hauser, R. B. Leslie and D. Oldani. 1975. A comparison of the interfacial interactions of the apoprotein from high density lipoprotein and beta-casein with phospholipids. Biochim Biophys Acta 406:402-414.
- Pogozheva, I. D., A. L. Lomize and H. I. Mosberg. 1997. The transmembrane 7-alpha-bundle of rhodopsin: distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. Biophys J 72:1963-1985.
- Powell, J. R., F. M. Wasacz and R. J. Jakobsen. 1986. An algorithm for the reproducible spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of proteins in dilute solutions and absorbed monolayers. Appl Spectrosc 40:339-344.
- Prasad, A. V. K., J. J. Plantner and E. L. Kean. 1992. Effect of enzymatic deglycosylation on the regenerability of bovine rhodopsin. Experimental Eye Research 54:913-920.
- Pugh Jr, E. N. and T. D. Lamb. 1993. Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. Biochim Biophys Acta 1141:111-149.
- Quist, P. O. 1998. <sup>13</sup>C solid-state NMR of gramicidin A in a lipid membrane. Biophys J 75:2478-2488.
- Rafferty, C. N. 1977. Spectral studies on the conformation of rhodopsin. Biophys Struct Mech 3:123-126.

- Rafferty, C. N., J. Y. Cassim and D. G. McConnell. 1977. Circular dichroism, optical rotatory dispersion, and absorption studies on the conformation of bovine rhodopsin in situ and solubilized with detergent. Biophys Struct Mech 2:227-320.
- Ramachandran, G. M. and R. Chandrasekaran. 1972. Conformation of peptide chains containing both L- & D- residues: Part I - helical structure with alternating L- & D- residues with special reference to the LD-ribbon & the LD-helices. Ind J Biochem Biophys 9:1-11.
- Rarick, H. M., N. O. Artemyev and H. E. Hamm. 1992. A site on rod G protein alpha subunit that mediates effector activation. Science 256:1031-1033.
- Rayer, B., M. Naynert and H. Stieve. 1990. Phototransduction: different mechanisms in vertebrates and invertebrates. J Photochem Photobiol B 7:107-148.
- Reed, M. A. 1999. Molecular-scale electronics. Proceedings of the IEEE 87:652-658.
- Reed, M. A., C. Zhou, M. R. Deshpande and C. J. Muller. 1998. The electrical measurement of molecular junctions. Annals of the New York Academy of Sciences 852:133-144.
- Reed, M. A., C. Zhou, C. J. Muller, T. P. Burgin and J. M. Tour. 1997. Conductance of a molecular junction. Science 278:252-253.
- Reinerth, W. A., L. Jones II, T. P. Burgin, C. W. Zhou, C. J. Muller, M. R. Deshpande, M. A. Reed and J. M. Tour. 1998. Molecular scale electronics: syntheses and testing. Nanotechnology 9:246-250.
- Richardson, J. S. and D. C. Richardson. 1989. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation. G. D. Fasman, editor. New York: Plenum Press New York and London.
- Ridge, K. D., C. Zhang and H. G. Khorana. 1995. Mapping of the amino acids in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin. Chemical reactivity

in the dark state following single cysteine replacements. Biochemistry 34:8804-8811.

Ries, H. E. and H. Swift. 1987. Monolayers of two transmembrane channel formers and an ionophore. J Colloid and Interface Science 117:584-588.

Ristow, H. 1977. The peptide antibiotic gramicidin D. A specific reactivator of tyrocidine-inhibited transcription. Biochim Biophys Acta 477:177-184.

Ristow, H., W. Pschorn, J. Hansen and U. Winkel. 1979. Induction of sporulation in *Bacillus brevis* by peptide antibiotics. Nature 280:165-166.

Ristow, H., B. Schazschneider, K. Bauer and H. Kleikauf. 1975a. Tyrocidine and the linear gramicidin. Do these peptide antibiotics play an antagonistic regulative role in sporulation? Biochim Biophys Acta 390:246-252.

Ristow, H., B. Schazschneider and H. Kleinkauf. 1975b. Effects of the peptide antibiotics tyrocidine and the linear gramicidin on RNA SYNTHESIS AND SPORULATION OF *Bacillus brevis*. Biochem Biophys Res Commun 63:1085-1092.

Ristow, H., B. Schazschneider, J. Vater and H. Kleinkauf. 1975c. Some characteristics of the DNA-tyrocidine complex and a possible mechanism of the gramicidin action. Biochim Biophys Acta 414:1-8.

Roberts, G. 1990. Langmuir-Blodgett Films. New York: Plenum Press.

Robinson, W. E., A. Gordon-Walker and D. Bownds. 1972. Molecular weight of frog rhodopsin. Nat New Biol 235:112-114.

Rossi, D. D., A. Ahluwalia and M. Mule. 1994. Molecular and supermolecular systems for sensing and actuation. In: IEEE Engineering in Medicine and Biology. p 103-110.

- Rothschild, K. J., J. R. Andrew, W. J. De Grip and H. E. Stanley. 1976. Opsin structure probed by raman spectroscopy of photoreceptor membranes. Science 191:1176-1178.
- Rothschild, K. J., W. J. DeGrip and R. Sanches. 1980a. Fourier transform infrared study of photoreceptor membrane. I. Group assignments based on rhodopsin delipidation and reconstitution. Biochim Biophys Acta 596:338-351.
- Rothschild, K. J., R. Sanches, T. L. Hsiao and N. A. Clark. 1980b. A spectroscopic study of rhodopsin alpha-helix orientation. Biophys J 31:53-64.
- Rothschild, K. J. and H. E. Stanley. 1974. Raman spectroscopic investigation of gramicidin A' conformations. Science 185:616-618.
- Rothschild, K. J. and H. E. Stanley. 1975. Models of ionic transport in biological membranes. Raman spectroscopy as a probe of valinomycin, gramicidin A', and rhodopsin conformations. Am J Clin Pathol 63:695-713.
- Sabanayagam, C. R. 1999. Molecular DNA Switches and DNA Chips. In: I. S. f. O. Engineering, editor. Micro- and Nanofabricated Structures and Devices for Biomedical Environmental Applications II. San Jose. p 90-96.
- Saibil, H., M. Chabre and D. Worcester. 1976. Neutron diffraction studies of retinal rod outer segment membranes. Nature 262:266-270.
- Sale, G. J., P. Towner and M. Akhtar. 1978. Topography of the rhodopsin molecule. Identification of the domain phosphorylated. Biochem J 175:421-430.
- Salemme, F. R. 1988. Structural polymorphism in transmembrane channels. Science 241:145, 230.
- Salesse, C., D. Ducharme, R. M. Leblanc and F. Boucher. 1990. 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 29:4567-4575.

- Sardet, C., A. Tardieu and V. Luzzati. 1976. Shape and size of bovine rhodopsin: a small-angle x-ray scattering study of a rhodopsin-detergent complex. J Mol Biol 105:383-407.
- Sarges, R. and B. Witkop. 1965a. Gramicidin A. V. The structure of valine- and isoleucine-gramicidine A. J Am Chem Soc 87:2011-2020.
- Sarges, R. and B. Witkop. 1965b. Gramicidin A. VI. The synthesis of valine- and isoleucine-gramicidine A. J Am Chem Soc 87:2020-2027.
- Sarkar, N., D. Langley and H. Paulus. 1977. Biological function of gramicidin: selective inhibition of RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 74:1478-1482.
- Sarkar, N., D. Langley and H. Paulus. 1979. Studies on the mechanism and specificity of inhibition of ribonucleic acid polymerase by linear gramicidin. Biochemistry 18:4536-4541.
- Sarkar, N. and H. Paulus. 1972. Function of peptide antibiotics in sporulation. Nature 239:228-230.
- Schafer, W. R. and J. Rine. 1992. Protein prenylation: genes, enzymes, targets, and functions. Annu Rev Genet 26:209-237.
- Schertler, G. F. 1998. Structure of rhodopsin. Eye 12:504-510.
- Schertler, G. F. 1999. Structure of rhodopsin. Novartis Found Symp 224:54-66.
- Schertler, G. F. and P. A. Hargrave. 1995. Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. Proc Natl Acad Sci U S A 92:11578-11582.
- Schertler, G. F. and P. A. Hargrave. 2000. Preparation and analysis of two-dimensional crystals of rhodopsin. Methods Enzymol 315:91-107.

- Schertler, G. F., C. Villa and R. Henderson. 1993. Projection structure of rhodopsin. Nature 362:770-772.
- Schoenlein, R. W., L. A. Peteanu, R. A. Mathies and C. V. Shank. 1991. The first step in vision: femtosecond isomerization of rhodopsin. Science 254:412-415.
- Schulz, G. E. and R. H. Schirmer. 1979. Principles of Protein Structure. C. R. Cantor, editor. New York: Springer-Verlag Inc. 314 p.
- Schwartz, S., J. E. Cain, E. A. Dratz and J. K. Blasie. 1975. An analysis of lamellar x-ray diffraction from disordered membrane multilayers with application to data from retinal rod outer segments. Biophys J 15:1201-1233.
- Shen, Y., C. R. Safinya, K. S. Liang, A. F. Ruppert and K. J. Rothschild. 1993. Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140°C in two-dimensional films. Nature 366:4850.
- Shichi, H. 1983. Biochemistry of vision. New York: Academic press.
- Shichi, H. 1994. Molecular biology of vision. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and medical Aspects. New York: Raven Press Ltd.
- Shieh, T., M. Han, T. P. Sakmar and S. O. Smith. 1997. The steric trigger in rhodopsin activation. J Mol Biol 269:373-384.
- Spence, A. P. and E. B. Mason. 1983. Anatomie et physiologie: une approche intégrée. Éditions du renouveau pédagogique. Montréal.
- Stipp, D. 1997. <http://linkage.rockefeller.edu/wli/news/affymetrix.html>.
- Stix, G. 1995. Toward 'Point One'. Scientific American February:90-95.
- Storrs, M., D. J. Merhl and J. F. Walkup. 1996. Programmable spatial filtering with bacteriorhodopsin. Applied Optics 35:4632-4636.

- Stryer, L. 1986. Cyclic GMP cascade of vision. Ann Rev Neuroscience 9:87-119.
- Stryer, L. 1991. Visual excitation and recovery. J Biol Chem 266:10711-10714.
- Stryer, L. and H. R. Bourne. 1986. G proteins: a family of signal transducers. Annu Rev Cell Biol 2:391-419.
- Surewicz, W. K., H. H. Mantsch and D. Chapman. 1993. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. Biochemistry 32:389-394.
- Tans, S. J. and C. Dekker. 2000. Molecular transistors: Potential modulations along carbon nanotubes. Nature 404:834.
- Tans, S. J., M. H. Devoret, H. Dai, A. Thess, R. E. Smalley, L. J. Geerligs and C. Dekker. 1997. Individual single-wall carbon nanotubes as quantum wires. Nature 386:474-476.
- Taylor, S. E., B. Desbat, D. Blaudez, S. Jacobi, L. F. Chi, H. Fuchs and G. Schwarz. 2000. Structure of a fusion peptide analogue at the air-water interface, determined from surface activity, infrared spectroscopy and scanning force microscopy. Biophys Chem 87:63-72.
- Teller, D. C., T. Okada, C. A. Behnke, K. Palczewski and R. E. Stenkamp. 2001. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Biochemistry 40:7761-7772.
- Thorgeirsson, T. E., J. W. Lewis, S. E. Wallace-Williams and D. S. Kliger. 1992. Photolysis of rhodopsin results in deprotonation of its retinal Schiff's base prior to formation of metarhodopsin II. Photochem and Photobiol 56:1135-1144.
- Tortora, G. J. and S. Grabowski. 1994. Principes d'anatomie et de physiologie. Saint-Laurent, éditeur. Québec.

- Tour, J. M., A. M. Rawlett, M. Kozaki, Y. Yao, R. C. Jagessar, S. M. Dirk, D. W. Price, M. A. Reed, C. W. Zhou, J. Chen, W. Wang and I. Campbell. 2001. Synthesis and preliminary testing of molecular wires and devices. Chemistry - a European Journal 7:5118-5134.
- Tournois, H., P. Gieles, R. Demel, J. de Gier and B. de Kruijff. 1989. Interfacial properties of gramicidin and gramicidin-lipid mixtures measured with static and dynamic monolayer techniques. Biophys J 55:557-569.
- Tournois, H., J. A. Killian, D. W. Urry, O. R. Bokking, J. de Gier and B. de Kruijff. 1987. Solvent determined conformation of gramicidin affects the ability of the peptide to induce hexagonal HII phase formation in dioleoylphosphatidylcholine model membranes. Biochim Biophys Acta 905:222-226.
- Tu, A. T. 1982. Raman Spectroscopy in Biology. In: J. W. a. sons, editor. New-York. p 187.
- Ulman, A. 1991. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self assembly. Boston: Academic Press.
- Ulrich, W. P. and H. Vogel. 1999. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers at the air/water interface. Biophys J 76:1639-1647.
- Unger, V. M., P. A. Hargrave, J. M. Baldwin and G. F. Schertler. 1997. Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. Nature 389:203-206.
- Unger, V. M. and G. F. Schertler. 1995. Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. Biophys J 68:1776-1786.
- Urban, B. W., S. B. Hladky and D. A. Haydon. 1978. The kinetics of ion movements in the gramicidin channel. Fed Proc 37:2628-2632.
- Urban, B. W., S. B. Hladky and D. A. Haydon. 1980. Ion movements in gramicidin pores. An example of single-file transport. Biochim Biophys Acta 602:331-354.



- Urry, D. W. 1971. The gramicidin A transmembrane channel: a proposed  $\pi(L,D)$  helix. Proc Natl Acad Sci U S A 68:672-676.
- Urry, D. W. 1972. A molecular theory of ion-conducting channels: a field-dependent transition between conducting and nonconducting conformations. Proc Natl Acad Sci U S A 69:1610-1614.
- Urry, D. W., J. D. Glickson, D. F. Mayers and J. Haider. 1972. Spectroscopic studies on the conformation of gramicidin A'. Evidence for a new helical conformation. Biochemistry 11:487-493.
- Urry, D. W., M. C. Goodall, J. D. Glickson and D. F. Mayers. 1971. The gramicidin A transmembrane channel: characteristics of head-to-head dimerized (L,D) helices. Proc Natl Acad Sci U S A 68:1907-1911.
- Urry, D. W., R. G. Shaw, T. L. Trapane and K. U. Prasad. 1983. Infrared spectra of the Gramicidin A transmembrane channel: the single-stranded-beta 6-helix. Biochem Biophys Res Commun 114:373-379.
- Van Mau, N., Y. Trudelle, P. Daumas and F. Heitz. 1988. Mixed monolayers of linear gramicidins and phospholipid. Surface pressure and surface potential studies. Biophys J 54:563-567.
- Veatch, W. 1976. The structure of the gramicidin A transmembrane channel. J Supramol Struct 5:431(435)-451(455).
- Veatch, W. and L. Stryer. 1977. The dimeric nature of the gramicidin A transmembrane channel: conductance and fluorescence energy transfer studies of hybrid channels. J Mol Biol 113:89-102.
- Veatch, W. R. and E. R. Blout. 1974. The aggregation of gramicidin A in solution. Biochemistry 13:5257-5264.
- Veatch, W. R., E. T. Fossel and E. R. Blout. 1974. The conformation of gramicidin A. Biochemistry 13:5249-5256.

- Venkatachalam, C. M. 1968. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V conformation of a system of three linked peptide units. Biopolymers 6:1425-1436.
- Verclas, S. A., P. B. Howes, K. Kjaer, A. Wurlitzer, M. Weygand, G. Buldt, N. A. Dencher and M. Losche. 1999. X-ray diffraction from a single layer of purple membrane at the air/water interface. J Mol Biol 287:837-843.
- Virmaux, N., M. Weller and P. Mandel. 1975. Localisation of the major site of light stimulated phosphorylation in a region of rhodopsin distinct from the chromophore binding site. FEBS Lett 53:320-323.
- Wallace, B. A. 1983. Gramicidin A adopts distinctly different conformations in membranes and organic solvents. Biopolymers 22:397-402.
- Wallace, B. A. 1986. Structure of gramicidin A. Biophys J 49:295-306.
- Wallace, B. A. 1990. Gramicidin channels and pores. Annu Rev Biophys Biophys Chem 19:127-157.
- Wallace, B. A. 1992. Crystallographic studies of a transmembrane ion channel, gramicidin A. Prog Biophys Mol Biol 57:59-69.
- Wallace, B. A. 1998. Recent advances in the high resolution structures of bacterial channels: gramicidin A. J Struct Biol 121:123-141.
- Wallace, B. A., W. R. Veatch and E. R. Blout. 1981. Conformation of gramicidin A in phospholipid vesicles: circular dichroism studies of effects of ion binding, chemical modification, and lipid structure. Biochemistry 20:5754-5760.
- Wang, J. and M. A. El-Sayed. 2001. Time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy of the polarizable proton continua and the proton pump mechanism of bacteriorhodopsin. Biophys J 80:961-971.

- Weinstein, S., J. T. Durkin, W. R. Veatch and E. R. Blout. 1985. Conformation of the gramicidin A channel in phospholipid vesicles: a fluorine-19 nuclear magnetic resonance study. Biochemistry 24:4374-4382.
- Weinstein, S., B. A. Wallace, E. R. Blout, J. S. Morrow and W. Veatch. 1979. Conformation of gramicidin A channel in phospholipid vesicles: a <sup>13</sup>C and <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance study. Proc Natl Acad Sci U S A 76:4230-4234.
- Weinstein, S., B. A. Wallace, J. S. Morrow and W. R. Veatch. 1980. Conformation of the gramicidin A transmembrane channel: A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study of <sup>13</sup>C-enriched gramicidin in phosphatidylcholine vesicles. J Mol Biol 143:1-19.
- Weitz, C. J. and J. Nathans. 1993. Rhodopsin activation: Effects on the metarhodopsin I-Metarhodopsin II equilibrium of neutralization or introduction of changed amino acids within putative transmembrane segments. Biochemistry 32:2155-2161.
- Wessling-Resnick, M. and G. L. Johnson. 1987. Allosteric behavior in transducin activation mediated by rhodopsin: Initial rate analysis of guanine nucleotide exchange. J Biol Chem 262:3697-3705.
- Xu, G., W. Wang, J. T. Groves and M. H. Hecht. 2001. Self-assembled monolayers from a designed combinatorial library of de novo beta-sheet proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 98:3652-3657.
- Yamazaki, A., M. W. Bitensky and J. A. Garcia-Sainz. 1987. The GTP-binding protein of rod outer segments. II. An essential role for Mg<sup>2+</sup> in signal transduction. J Biol Chem 262:9324-9331.
- Yamazaki, A., F. Hayashi, M. Tatsumi, M. W. Bitensky and J. S. George. 1990. Interactions between the subunits of transducin and cyclic GMP phosphodiesterase in *Rana catesbiana* rod photoreceptors. J Biol Chem 265:11539-11548.

- Yamazaki, A., P. J. Stein, N. Chernoff and M. W. Bitensky. 1983. Activation mechanism of rod outer segment cyclic GMP phosphodiesterase. Release of inhibitor by the GTP/GTP-binding protein. J Biol Chem 258:8188-8194.
- Yan, M., D. Manor, G. Weng, H. Chao, L. Rothberg, T. M. Jedju, R. R. Alfano and R. H. Callender. 1991. Ultrafast spectroscopy of visual pigment rhodopsin. Proc Natl Acad Sci U S A 88:9809-9812.
- Yoshizawa, T. and O. Kuwata. 1995. Organic Photochemistry and Photobiology. In: W. H. a. P. Song, editor. Vision: Photochemistry. New York: CRC Press. p 1493-1499.
- Young, M. and J. Mandelstam. 1979. Early events during bacterial endospore formation. Adv Microb Physiol 20:103-162, 321-103.
- Zasadzinski, J. A., R. Viswanathan, L. Madsen, J. Garnaes and D. K. Schwartz. 1994. Langmuir-Blodgett films. Science 263:1726-1733.
- Zheng, S., J. Strzalka, C. Ma, S. J. Opella, B. M. Ocko and J. K. Blasie. 2001. Structural studies of the HIV-1 accessory protein Vpu in Langmuir monolayers: synchrotron X-ray reflectivity. Biophys J 80:1837-1850.
- Zhou, C., M. R. Deshpande, M. A. Reed, L. Jones II and J. M. Tour. 1997a. Nanoscale metal/self-assembled monolayer/metal heterostructures. Applied Physics Letters 71:611-613.
- Zhou, C., M. R. Deshpande, M. A. Reed, L. Jones II and J. M. Tour. 1997b. Erratum: Nanoscale metal/self-assembled monolayer/metal heterostructures (Appl. Phys. Lett. 71, 611 (1997)). Applied Physics Letters 71:2857.
- Zvyaga, T. A., K. C. Min, M. Beck and T. P. Sakmar. 1993. Movement of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin by one helix turn reverses the pH dependence of the metarhodopsin by metarhodopsin I to metarhodopsin II transition. J Biol Chem 268:4661-4667.

## **CHAPITRE 2**

### **Spectroscopic and Structural Properties of Valine Gramicidin A in monolayers at the Air-Water Interface**

Accepté par la revue Biophysical Journal avec corrections mineures

## Résumé

Ce chapitre présente l'étude de films monomoléculaires de la valine gramicidine A (VGA) *in situ* à l'interface air-eau par réflectivité des rayons X, diffraction des rayons X à angle rasant et spectroscopie de réflectivité infrarouge différentielle par modulation de polarisation (PM-IRRAS). Ces techniques ont été combinées pour obtenir de l'information sur la structure secondaire et l'orientation de la VGA en films monomoléculaires ainsi que pour caractériser l'épaule observé dans l'isotherme de pression de surface. L'épaisseur du film à différentes pressions de surface a été obtenue par réflectivité des rayons X. La structure secondaire de la VGA *in situ* à l'interface air-eau a été déterminée à différentes pressions de surface en utilisant les caractéristiques de la bande amide I des spectres PM-IRRAS expérimentaux et simulés. À grande aire moléculaire, la VGA montre une structure secondaire désordonnée et une épaisseur de 5-9Å. À petite aire moléculaire, la VGA adopte une conformation en double hélice  $\beta$ 5.6 antiparallèle entrelacée possédant une orientation de 30° par rapport à la normale et une épaisseur de 25Å. L'interface entre la monocouche de VGA et l'eau a été étudiée par réflectivité des rayons X et par comparaison des spectres PM-IRRAS expérimentaux et simulés sur H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O. Ces résultats suggèrent la présence d'une couche d'eau organisée entre la monocouche et l'eau massique.

**SPECTROSCOPIC AND STRUCTURAL PROPERTIES OF VALINE GRAMICIDIN  
A IN MONOLAYERS AT THE AIR-WATER INTERFACE**

**Hugo Lavoie<sup>†¶</sup>, Daniel Blaudez<sup>‡</sup>, David Vaknin<sup>§</sup>, Bernard Desbat<sup>¶</sup>, Benjamin M. Ocko<sup>¥</sup> and Christian Salesses<sup>†\*</sup>**

<sup>†</sup>Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7 and CERSIM, Université Laval, Québec, Canada; <sup>‡</sup>Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne, UMR 5798 du CNRS, Université Bordeaux I, 33405 Talence, France; <sup>§</sup>Ames Laboratory and Department of Physics, Iowa state University, Ames, IA 50011, USA; <sup>¶</sup>Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire, UMR 5803 Université Bordeaux I, 33405 Talence, France; and <sup>¥</sup>Brookhaven National Laboratory, Department of Physics, Upton, NY 11973 USA.

\*Corresponding Author:

Département de Chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

**Keywords:** Gramicidin, monolayers, Infrared spectroscopy, X-ray reflectivity, XGID, conformation.

**Running title:** Organization of gramicidin in monolayers

## 2.1 Abstract

Monomolecular films of valine gramicidin A (VGA) were investigated *in situ* at the air-water interface by X-ray reflectivity and X-ray grazing incidence diffraction as well as polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS). These techniques were combined to obtain information on the secondary structure and the orientation of VGA and to characterize the shoulder observed in its  $\pi$ -A isotherm. The thickness of the film was obtained by X-ray reflectivity and the secondary structure of VGA was monitored using the frequency position of the amide I band. The PM-IRRAS spectra were compared with the simulated ones in order to identify the conformation adopted by VGA in monolayer. At large molecular area, VGA shows a disordered secondary structure whereas, at smaller molecular areas, VGA adopts an anti-parallel double strand intertwined  $\beta^{5,6}$  helical conformation with  $30^\circ$  orientation with respect to the normal with a thickness of 25 Å. The interface between bulk water and the VGA monolayer was investigated by X-ray reflectivity as well as by comparing the experimental and the simulated PM-IRRAS spectra on D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O which suggested the presence of oriented water molecules between the bulk and the monolayer.



## 2.2 Introduction

It has long been suggested that proteins can denature upon spreading at the air-water interface (for a review, see MacRitchie 1978 and 1986). Gidalevitz *et al.* (1999) have shown by X-ray reflectivity that this indeed is the case for glucose oxidase, urease and alcohol dehydrogenase. Wu *et al.* (1999) have also shown that annexin V experiences a marked alteration of its secondary structure in the absence of lipid. Although denaturation usually occurs upon spreading the protein film, it has been shown recently that by manipulating external factors such as, surface pressure, subphase conditions (ion concentration and pH), spreading procedures and others, that the native structure of proteins can be maintained at the air-water interface. This in fact was demonstrated by Gallant *et al.* (1998), Blaudez *et al.* (1999) and Lavoie *et al.* (1999) who have shown by *in situ* infrared spectroscopy that the native secondary structure of the membrane proteins photosystem II core complex, bacteriorhodopsin and rhodopsin, respectively, can be retained in monolayers at the air-water interface. However, all of those proteins contain extensive secondary structures which complicate the understanding of the mechanism taking place during spreading and compression of polypeptides. In this paper, we have made use of the simple aliphatic peptide gramicidin to facilitate the analysis of this process and to improve our understanding of its behavior upon compression.

Linear gramicidin is a hydrophobic antibiotic polypeptide composed of 15 hydrophobic amino acids in D- and L- alternate conformers with the following sequence: formyl-L-X-gly-L-ala-D-leu-L-ala-D-val-L-val-D-val-L-trp-D-leu-L-trp-D-leu-L-trp-D-leu-L-trp-ethanolamine where X represents either valine or isoleucine. Whether amino acid 11 is tryptophan, phenylalanine or tyrosine, gramicidins are called A, B or C, respectively (Sarges and Witkop 1965). In bilayers, it is well known that valine gramicidin A (VGA) forms ion channels that allow conduction of monovalent cations through lipid membranes (Hladky and Haydon 1972; Urban *et al.* 1978 and 1980). Several structural arrangements of the polypeptide that show the formation of these channels have been proposed (Langs 1988; Salemme 1988; Wallace 1998). Channel formation has been explained in terms of two helical monomers placed end to end, or in terms of parallel or antiparallel intertwined double helices (Wallace 1986; Quist 1998; Wallace 1998). The conformation of VGA

depends on the type of solvent used and the monovalent ions present in the solution (Wallace 1986; LoGrasso *et al.* 1988; Killian 1992). However, in monolayers, divergent results have been reported on the conformation and orientation of VGA at the air-water interface (Dhathathreyan *et al.* 1988; Ulrich and Vogel 1999). The shoulder region ( $\pi = 15-17 \text{ mNm}^{-1}$ ) in the surface pressure isotherm of VGA has been attributed to different phenomena such as structural phase transition, cluster formation, reorientation of the molecules, reorganization of the film or the molecules, molecular structure change or transition from monomer to dimer (Kemp and Wenner 1976; Tournois *et al.* 1989).

*In situ* techniques to probe the monomolecular layers at the air-water interface are now well established. For instance, X-ray (XR) and neutron reflectivity, and X-ray grazing incidence diffraction (XGID) of free liquid surfaces allow determination of the electron density across the interface, and two-dimensional arrangements in the film on a molecular length scale (Als-Nielsen and Kjaer 1989). Infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS) (Dluhy and Mendelsohn 1988) and polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) (Blaudez *et al.* 1993) are additional powerful tools that were recently used to extract information on the secondary structure and orientation of peptide and protein monolayers at the air-water interface (Dluhy *et al.* 1989; Flach *et al.* 1994; Cornut *et al.* 1996; Flach *et al.* 1996; Gallant *et al.* 1998; Castano *et al.* 1999; Ulrich and Vogel 1999; Wu *et al.* 1999; Castano *et al.* 2000; Dieudonne *et al.* 2001). In the present study, we combined the use of X-ray scattering techniques (XR and XGID) and PM-IRRAS to shed light on the structure and organization of VGA in monolayer at various points along its  $\pi$ -A isotherm. The effect of the VGA film on the organization of interfacial water is also discussed.

## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Surface pressure isotherms

High-purity valine gramicidin A was generously provided by Dr. J. Morell (NIH, Bethesda, MD, USA). VGA was dissolved in Megasolv-HPLC grade chloroform (Omega, Lévis, QC, Canada), and aliquots of this solution were spread onto Millipore water (18.2 M $\Omega$ ·cm). Surface pressure was measured with a Wilhelmy type balance (M-balance R&K, Mainz, Germany). The film was compressed either continuously or stepwise at a rate of 0.05 nm<sup>2</sup> per monomer per minute with no marked difference between the resulting isotherms.

### 2.3.2 X-ray reflectivity and X-ray GID measurements

XR and XGID measurements were performed *in situ* at the air-water interface on the X22B liquid surface diffractometer at the National Synchrotron Light Source Brookhaven National Laboratory which has been described in detail elsewhere (Als-Nielsen and Pershan 1983). An X-ray wavelength  $\lambda=1.527\pm 0.006\text{\AA}$  was selected by Bragg reflection from the (111) plane of a germanium crystal. The intensity of the incident beam, before reaching the sample, was continuously monitored to account for all kinds of primary beam fluctuations. In order to reduce liquid-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 0.3 mm thick. A dynamic vibration isolation system (JRS MOD-2 Affoltern, Switzerland) was used to eliminate mechanical vibrations. The Langmuir trough was contained in an air-tight aluminum enclosure with Kapton windows and its temperature was constantly maintained at 20°C. After spreading the monolayer, the sealed container was flushed with helium for approximately one hour prior to X-ray measurements to reduce background due to air scattering. For diffraction measurements, Soller slits with the leaves oriented vertically were placed just before the detector, yielding in-plane resolution function with a full width of  $\sim 0.01\text{\AA}^{-1}$ .

### 2.3.3 *PM-IRRAS measurements*

PM-IRRAS spectra were recorded at the air-water interface by co-addition of 800 scans at a resolution of  $8\text{ cm}^{-1}$  using a Nicolet 740 spectrometer following the experimental procedure previously described (Blaudez et al. 1993). The PM-IRRAS spectra of covered surface,  $S_{\text{film}}$ , as well as that of the bare water ( $\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $S_W$ , were measured and the normalized difference  $\Delta S = [S_{\text{film}} - S_W] / S_W$  is presented. On dielectric substrates, PM-IRRAS presents a specific surface selection rule, such that a transition dipole moment lying in the plane or perpendicular to the surface yields a positive or a negative absorption band signal, respectively, with respect to the baseline (Blaudez et al. 1996). For an intermediate orientation of the transition dipole moment, the two contributions are competing and the absorption band vanishes when the transition dipole moment is tilted at approximately  $39^\circ$  from the surface normal of the water subphase (Blaudez et al. 1996).

## 2.4 Results and Discussion

### 2.4.1 X-ray Reflectivity, Thickness and Surface Pressure Measurements

Figure 2.1A shows typical normalized X-ray reflectivity curves of VGA at different surface pressures as a function of the momentum transfer  $Q_z$ . The measured reflectivity curves  $R(Q_z)$  were normalized to the Fresnel reflectivity  $R_F(Q_z)$  calculated for an ideally flat water surface with an electron density,  $\rho_w = 0.334 \text{ e}/\text{\AA}^3$ . The solid lines are the best-fit calculated reflectivities using the scattering length density profiles  $\rho(z)$  shown in Figure 2.1B. These profiles consist of step functions (*box model*) that are convoluted with a Gaussian of width  $\sigma$  (surface roughness) to yield smooth error functions (Als-Nielsen and Kjaer 1989). In refining the model, it is initially assumed that the film consists of a single homogeneous slab and a second slab is added only if it improves the quality of the fit. The thickness of the box, the electron density and the surface roughness are the free variables in the refinement (Als-Nielsen and Kjaer 1989). Figure 2.1B shows that the best fit is obtained with the one slab model at low surface pressures (below approximately  $10 \text{ mNm}^{-1}$ ) whereas at high surface pressures a second slab between the monolayer and the substrate has to be included. The structural parameters of the two-box model for VGA on water as determined from X-ray reflectivity measurements is presented in Table 1.

The surface pressure ( $\pi$ -A) isotherm of pure VGA at the air-water interface presented in Figure 2.2A is in agreement with previously published data (Kemp and Wenner 1976; Mau *et al.* 1987; Tournois *et al.* 1989; Ducharme *et al.* 1996). A liquid-like phase extends from the onset of the surface pressure ( $\sim 4.75 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ ) to the characteristic shoulder which takes place between  $\sim 12.5$  and  $15 \text{ mNm}^{-1}$  (between  $2.5$  and  $1.8 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ ). An inflection is then observed at the end of the shoulder and the film becomes highly incompressible and rigid.

The monolayer thickness obtained from the X-ray reflectivity measurements at different surface pressures is shown in Figure 2.2B. This figure shows that the film thickness remains unchanged at low surface pressure (from  $0$  to  $10 \text{ mNm}^{-1}$  or  $5$  to  $3 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ ). This behavior is completely different from that of amphiphilic molecules, which straighten up regularly upon compression. It can be interpreted in

terms of a reorganization of the secondary structure of VGA as suggested by the PM-IRRAS data (see below). The thickness of the film at low surface pressures ( $d \approx 6 - 9 \text{ \AA}$ ) is significantly smaller than the minimal dimension of VGA in the  $\beta$  helical conformation as determined by its crystal structure (the smaller axis of VGA is  $14 - 16 \text{ \AA}$  whereas the larger one is  $26 - 30 \text{ \AA}$ ; Wallace and Ravikumar 1988; Langs, 1988). This strongly suggests that the polypeptide at low densities is unfolded. Ries and Swift (1987) pointed out that the isotherm at low surface pressures yields an area per amino acid of approximately  $0.25 \text{ nm}^2$ , proposing that the VGA molecules lie flat, presumably with polar groups immersed in the water and the hydrophobic moieties extending at the interface. As noted above, different studies suggested different conformations of the molecule depending on the environment, namely the type of solvent or in crystal structure (Wallace 1986; LoGrasso *et al.* 1988; Killian 1992). The presence of an unfolded polypeptide at large molecular area is in fact supported by the IR spectra. As will be shown below, when VGA is spread on a  $\text{D}_2\text{O}$  subphase, a complete exchange of hydrogen by deuterium in the backbone of the peptide (N-H to N-D) takes place as evidenced by the large shift in the amide II band. Such an efficient exchange is possible only if the hydrophilic moieties are immersed in water and if the polypeptide is unfolded.

As the monolayer is compressed to high surface pressures, Figure 2.2B shows an abrupt change in film thickness from  $d \approx 6 - 9 \text{ \AA}$  to  $d \approx 25 \text{ \AA}$ . This latter thickness value is slightly smaller than the one of  $26 - 30 \text{ \AA}$  found for the larger axis of VGA in the  $\beta$  helical conformation determined from the 3D crystal structure (Wallace and Ravikumar 1988) and suggests that VGA is not oriented parallel to normal of the monolayer. We therefore propose that, in the compression along the shoulder region of the isotherm ( $10\text{-}15 \text{ mNm}^{-1}$ ;  $2.7\text{-}1.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ ) up to the inflection point at the end of the shoulder, a gradual transformation of the secondary structure of VGA takes place in which polypeptides in the film take the tubular shape with a  $\beta$  helical conformation. Above that point, the behavior of the isotherm resembles that of a lipid where the hydrophobic alkyl tails are densely packed. This view is supported by the XGID measurements that show Bragg reflection associated with VGA only above a threshold pressure of  $17\text{-}20 \text{ mNm}^{-1}$  (Figure 2.3).

To correlate the electron density (Figure 2.1B) with the molecular density at the interface, we proceeded by calculating the number of electrons per molecule assuming an average molecular area  $A$ , as follows

$$N_{ref} = A \int \rho(z) dz \quad (1)$$

The empirical formula for VGA yields a total number of electrons per monomer,  $N_{total} = 1010$ . For comparison, at high surface pressures  $\pi \geq 20 \text{ mNm}^{-1}$ , Eq. (1) yields  $N_{ref} = 1009 \pm 50$  electrons per monomer which is in good agreement with  $N_{total}$ . However, this result indicates the lack of bound water molecules in any region of VGA, in particular it suggests that the channel is void of water molecules. By contrast, at very low surface pressures,  $N_{ref} = 1432 \pm 100$  electrons indicating that the film consists of VGA plus water molecules which is also consistent with the N-H to N-D exchanged measured by PM-IRRAS on  $\text{D}_2\text{O}$ . This result independently supports the view of an unfolded VGA at large molecular areas with a large number of bound water molecules. Another interesting result is the observation of an extra layer *sandwiched* between VGA and the bulk water at high surface pressures (see Figure 2.1B). The electron density in this slab (approximately  $10 \text{ \AA}$  thick) is just slightly higher than that of bulk water. We propose that this layer is composed of a restructured film of water and that this restructuring is induced by the densely packed VGA.

#### 2.4.2 X-ray GID measurements

Figure 2.3 shows X-ray grazing incidence diffraction (XGID) versus in-plane momentum transfer ( $Q_{xy}$ ) of VGA at  $25 \text{ mNm}^{-1}$ , with two peaks at  $Q_{xy}^1 = 0.459 \text{ \AA}^{-1}$  and  $Q_{xy}^2 = 1.159 \text{ \AA}^{-1}$ . The scan presented in this figure is obtained after subtracting a similar scan from bare water surface under similar conditions as for the VGA monolayer. Similar scans at pressures that are smaller than  $20 \text{ mNm}^{-1}$  did not yield any detectable signals. The d-spacing associated with the first peak is  $2\pi/Q_{xy}^1 = 13.69 \text{ \AA}$ , and the full width at half maximum (FWHM)  $\Delta Q_{xy}^1 = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ , indicating short range correlations in the film. The correlation length extends over 2-3 molecular lengths which in general, is characteristic of an amorphous solid or a liquid. Assuming that the short-range order is hexagonal in nature, the average molecular

area extracted from the diffraction is  $A_{X\text{-ray}} = 2.17 \pm 10 \text{ nm}^2$  at  $25 \text{ mNm}^{-1}$ . This molecular area is approximately twice as large as the one obtained from the isotherm at that surface pressure (Figure 2.2). It should be noted here that, in general, the molecular area presented in isotherms is calculated per monomer. This leads to propose that the observed diffraction peak corresponds to the ordering of dimers at the air-water interface. The in-plane d-spacing together with the thickness of the film extracted from the reflectivity, both imply that the polypeptide consists of an intertwined dimer that is folded most likely in a tubular shape which is consistent with the PM-IRRAS data (see below).

The d-spacing corresponding to the second peak  $2\pi/Q_{xy}^1 = 5.43 \text{ \AA}$ , with a correlation of approximately  $15 \text{ \AA}$ , is characteristic of an amorphous system. This d-spacing is approximately twice the average O-O distance of  $2.76 \text{ \AA}$  in water. Based on that and on the extra layer observed in the reflectivity, we hypothesize that this broad reflection is due to the restructuring of water underneath the VGA film with clusters of water with an approximate diameter that is twice the value of  $2.76 \text{ \AA}$  for the O-O distance in water.

#### 2.4.3 PM-IRRAS measurements on pure $H_2O$

Figure 2.4 shows PM-IRRAS spectra in the  $1900\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$  spectral range from a VGA monolayer on pure water at different surface pressures. At low surface pressures (below  $10 \text{ mNm}^{-1}$ ), the maximum of the amide I band at  $1645 \text{ cm}^{-1}$  indicates a disordered secondary structure, namely an almost completely unfolded polypeptide (Goormaghtigh et al. 1990) in agreement with the X-ray reflectivity data (see above). However, the orientation of the VGA molecules is probably not entirely isotropic since the ratio of the amide I/amide II intensity bands of 1.045 is much lower than the value of 1.920 obtained in bulk (Dhathathreyan et al. 1988). Considering the surface selection rule of PM-IRRAS at the air-water interface, this ratio of 1.045 indicates that the transition dipole moment of the amide II mode is more preferentially oriented in the interface plane than that of the amide I mode. At  $15 \text{ mNm}^{-1}$ , above the inflection point at the end of the shoulder in the  $\pi$ -A isotherm, the amide I band becomes sharper and shifts to  $1636 \text{ cm}^{-1}$ . Such a shift has also been observed by Ulrich and Vogel (1999). This shift of the peak position is indicative of a



reorganization of the secondary structure of VGA. The gradual shift of the peak and its narrowing show that the folding process takes place over a wide range of molecular areas as discussed above. At a surface pressure of  $40 \text{ mNm}^{-1}$ , a negative component can be observed in the PM-IRRAS spectrum at approximately  $1700 \text{ cm}^{-1}$ , which is associated with the  $\delta(\text{OH}_2)$  deformation mode of the liquid water as observed by Ulrich and Vogel (1999). This component originates from an optical effect (Grandbois et al. 2000) and can also be partly due to restructured water molecules underneath the monolayer (Blaudez et al. 1996) which is consistent with the X-ray data. To eliminate this contribution which interferes with both the peak position and the integrated intensity of the amide I band, PM-IRRAS spectra of VGA in monolayer were also conducted on  $\text{D}_2\text{O}$  subphase. The use of a  $\text{D}_2\text{O}$  subphase is particularly important for the spectral simulations presented hereafter.

#### 2.4.4 PM-IRRAS measurements on pure $\text{D}_2\text{O}$

Figure 2.5 shows the PM-IRRAS spectra of a VGA monolayer obtained at different surface pressures on a pure  $\text{D}_2\text{O}$  subphase. The disappearance of the amide II band (combination of  $\delta\text{N-H}$  and  $\nu\text{C-N}$ ) and its replacement by the amide II' (pure  $\nu\text{C-N}$ ) located at  $1440 \text{ cm}^{-1}$  proves the complete exchange of hydrogen atoms by deuterium atoms during the course of the experiment. Moreover, no extra signal due to  $\text{H}_2\text{O}$  in exchange with  $\text{D}_2\text{O}$  subphase in the  $1500$  and  $1800 \text{ cm}^{-1}$  range is visible. At low surface pressure ( $\pi = 0.8 \text{ mNm}^{-1}$ ), the amide II' band is hardly observed whereas the amide I' is not observed at all. The amide I' becomes predominant as  $\pi$  increases, as observed for the monolayer on  $\text{H}_2\text{O}$ . However, we would like to emphasize that, compared with  $\text{H}_2\text{O}$ , the main modification occurring in the spectrum with the use of the  $\text{D}_2\text{O}$  subphase concerns the increase of the amide I intensity by a factor of approximately 2. We will see that simulations allow to explain this behavior (see below). The peak position at  $1627 \text{ cm}^{-1}$  and the presence of a shoulder near  $1660 \text{ cm}^{-1}$  suggest that VGA adopts an antiparallel  $\beta^{5,6}$  helical conformation at high surface pressure, in agreement with results of LB films of VGA on glass plates (Dhathathreyan et al. 1988).

Figure 2.6A shows the amide I' peak position of VGA on  $\text{D}_2\text{O}$  as a function of surface pressure. There are two distinct regions upon compression. The amide I' band

frequency shifts gradually from 1642 to 1628  $\text{cm}^{-1}$  with increasing surface pressure from 0 to 15  $\text{mNm}^{-1}$  and then further shifts to reach a stable value of 1627  $\text{cm}^{-1}$  between 18 and 22  $\text{mNm}^{-1}$ . Ulrich and Vogel 1999 have measured one PM-IRRAS spectrum of VGA at 14  $\text{mNm}^{-1}$  on  $\text{D}_2\text{O}$ . The maximum of their amide I' band is located at 1630  $\text{cm}^{-1}$  in good agreement with our data. The first region between 0 and 18-22  $\text{mNm}^{-1}$  shows that VGA undergoes a change in secondary structure. This rearrangement takes place all along the compression and ends at a surface pressure between 18 and 22  $\text{mNm}^{-1}$  corresponding to the end of the shoulder on the  $\pi$ -A isotherm (Figure 2.2A). Further compression does not provide any change in the secondary structure of VGA. This demonstrates that the shoulder does not correspond to a phase transition but is essentially due to VGA secondary structure reorganization.

Figure 2.6B shows the integrated intensity of the amide I' band normalized to the in-plane density, as a function of the surface pressure. The intensity of this band shows a broad maximum in 10 and 20  $\text{mNm}^{-1}$  range. Considering the amide I' peak position (Figure 2.6A), the three succeeding regimes observed in Figure 2.6B can be interpreted as follows: (i) The first increase between 0 and 10  $\text{mNm}^{-1}$  can be attributed to a reorganization of the secondary structure of VGA with the formation of intertwined  $\beta$ -helix, in good agreement with the shift of the amide I' peak position observed by PM-IRRAS (see Figure 2.6A). (ii) The plateau between 10 and 20  $\text{mNm}^{-1}$  in Figure 2.6B shows that only the surface density of VGA changes with the compression in this surface pressure range. (iii) The decrease after 20  $\text{mNm}^{-1}$  suggests that the intertwined  $\beta$ -helix, which are initially likely flat at the interface, are tilting with the compression of the film.

#### 2.4.5 *Simulation of the PM-IRRAS spectra and estimation of the water contribution*

In order to determine the secondary structure and the orientation of VGA at high surface pressure, we have carried out simulations of PM-IRRAS spectra using the extensive vibrational calculations of the six known conformations of VGA reported by Naik and Krimm (1986). We have assumed the validity of these calculated values. This remarkable work has provided, for each conformation, the frequency positions of each amide I component and their intensity in the three directions of the molecular

reference frame ( $u$ ,  $v$  and  $w$ ). We have used these values to build the anisotropic optical constants of each conformation ( $k_u$ ,  $k_v$  and  $k_w$ ). As vibrational calculation only gives the integrated intensity of a mode, we have attributed a Lorentzian band shape and a width at half intensity of  $30 \text{ cm}^{-1}$  to each component. The real part of the complex refractive indices ( $n_u$ ,  $n_v$ ,  $n_w$ ) has been obtained by Kramers-Kronig inversion of the extinction coefficients  $k_u$ ,  $k_v$  and  $k_w$ . Then, these optical constants have been expressed in the monolayer frame ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) with the condition for the film to be uniaxial ( $n_u = n_v \neq n_z$ ,  $k_x = k_y \neq k_z$ ). A general software previously described (Buffeteau et al. 1999) has been used to obtain the simulated PM-IRRAS spectra.

Figure 2.7 shows the simulated spectra of the six known conformations at different tilt angles (from  $0^\circ$  to  $90^\circ$ ) with respect to the surface normal in the amide I spectral region. The optical constants have been slightly perturbed in order to get a simulated spectrum with an intensity as close as possible from the experimental spectrum on  $\text{D}_2\text{O}$  at  $40 \text{ mNm}^{-1}$ . In all cases, the thickness has been fixed to  $25 \text{ \AA}$  as determined by x-ray reflectivity and the  $\text{D}_2\text{O}$  optical constants were those given by Bertie *et al.* (1989). Several conformations can be discarded by comparing the experimental spectrum at  $40 \text{ mNm}^{-1}$  (Figure 2.5) and the simulated spectra shown in Figure 2.7. It can first be seen that the band position of several spectra is not consistent with the experimental data. This is the case of the parallel double strand  $\beta^{5.6}$  helices (5.6p) and  $\beta^{7.2}$  (7.2p) with an amide I' band position of  $1659$  and  $1673 \text{ cm}^{-1}$ , respectively. For the remaining conformations, the  $\beta^{7.2}$  (7.2a),  $\beta^{6.3}$  (6.3) and  $\beta^{4.4}$  (4.4) helices can be ruled out because their amide I' band does not show any shoulder, contrary to the experimental spectrum. Finally, the best fit for the main band at  $1627 \text{ cm}^{-1}$  on the experimental spectrum is obtained with the anti-parallel  $\beta^{5.6}$  helical (5.6a) conformation. In contrast, Ulrich and Vogel 1999 could not distinguish between the  $\beta^{5.6a}$  and  $\beta^{6.3}$  conformations mainly because their spectra were more noisy than in the present study and they did not have thickness data to implement their simulations. Moreover, the antiparallel  $\beta^{5.6}$  conformation is the only structure which presents a dichroic ratio near the unit value for its main vibrational band. The quasi unit value is a necessary condition to explain the small change observed in the PM-IRRAS spectral shape with monolayer compression. We have then refined the simulations by attributing a width at a half intensity of  $30 \text{ cm}^{-1}$  for the main band and  $50 \text{ cm}^{-1}$  for the other components (with the same band shape). Figure 2.8 shows that the intensity of

the amide I band is best fitted with a tilt angle of  $30^\circ$  to the normal of the film. Using the same conditions for the optical indices ( $\beta^{5.6a}$ , tilt angle of  $30^\circ$ , surface pressure of  $40 \text{ mNm}^{-1}$ ), we have calculated the PM-IRRAS spectrum of VGA on  $\text{H}_2\text{O}$ . The comparison between the simulated and the experimental spectra (Figure 2.9) shows large discrepancies: the intensity of the amide I band of the experimental spectrum is lower and the high frequency region (between  $1650$  and  $1750 \text{ cm}^{-1}$ ) of this spectrum presents a completely different shape compared to the simulated spectrum. These discrepancies show that the model used, a VGA monolayer on an isotropic water subphase, is probably too simple and suggests that a structured water layer might be present underneath the VGA monolayer as proposed from the X-ray reflectivity findings.

## 2.5 Conclusions

The combined results of X-ray and vibrational spectroscopy of VGA monolayers at different surface pressures can be summarized as follows:

1. At large molecular area, the spread monolayer at the air-water interface is most likely unfolded. This was first proposed by Ries and Swift (1987) based on observations of the  $\pi$ -A isotherm. The film thickness obtained from the reflectivity (6 – 9 Å) strongly supports this view. Indeed, this film thickness is significantly smaller than any dimension of the folded molecule (the smaller dimension of VGA being approximately 15 Å on the basis of the crystal structure). In addition, no signal that is associated with the in-plane ordering in the film is observed with XGID below approximately 20 mNm<sup>-1</sup>. This is consistent with the lack of internal organization in the polypeptide (helical conformation). The folded polypeptide is known to be highly hydrophobic and, as such, would have a tendency to aggregate into partially ordered clusters, as seen with similar systems (Fukuto et al. 1997). In these studies, the GID signal due to the short range order is observed at all surface pressures (Fukuto et al. 1997). This view of an almost unfolded polypeptide at large molecular areas is also evidenced by PM-IRRAS, where the amide I band is very broad and shifted from the position that is associated with any of the known  $\beta$  helical conformations of VGA as well as by the observation of an efficient exchange of N-H to N-D on D<sub>2</sub>O.
2. The conformation of the polypeptide changes with compression of the monolayer to reach a stable conformation after the shoulder in the  $\pi$ -A isotherm and thus clearly shows that folding of gramicidin is taking place upon compression. The PM-IRRAS data and the simulation of the spectra strongly suggest that the secondary structure of VGA at high surface pressure is an antiparallel intertwined  $\beta^{5,6}$  helices. This structure is stable above 20 mNm<sup>-1</sup> and undergoes a reorientation from 90° to 30° with respect to the normal at high surface pressure as schematically presented in Figure 2.10. At such surface pressure, XGID showed the existence of

short range order of VGA molecules. This result is a good demonstration of the potential of XGID for a structural determination approach of membrane-associated polypeptides (Haas *et al.* 1995; Verclas *et al.* 1999).

3. The VGA monolayer, at high surface pressure, induces the formation of an intermediate layer of water between the monolayer and the subphase water with characteristics that are different from those of bulk water. This can be seen in the electron density model and also in the diffraction pattern that show an extra broad liquid-like peak that can be associated with the formation of water clusters of 5.5 Å in diameter. In addition, the PM-IRRAS spectral simulations on H<sub>2</sub>O also suggest the presence of such an intermediate layer. The possible presence of such a structured layer of water is schematically presented in Figure 2.10.

## 2.6 *Acknowledgements*

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support. HL also thanks SPPUQTR and FUQTR for their financial support. CS is a chercheur-boursier senior of the FRSQ. Ames Laboratory is operated for the U.S. Department of Energy by Iowa State University under Contract No. W-7405-Eng-82. The work at Ames was supported by the Director for Energy Research, Office of Basic Energy Sciences.

## 2.7 References

- Als-Nielsen J, Kjaer K. 1989. Phase transitions in soft condensed matter. Proc. Of the NATO Advanced Study Institute 211(Serie B):113-138.
- Als-Nielsen J, Pershan PS. 1983. Synchrotron x-ray diffraction study of liquid surface. Nucl. Instrum. Methods 208:545-548.
- Bertie JE, Ahmed MK, Eysel HH. 1989. Infrared intensities of liquids. 5. Optical and dielectric constants, integrated intensities, and dipole moment derivatives of H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O at 22°C. J. Phys. Chem. 93:2210-2218.
- Blaudez D, Boucher F, Buffeteau T, Desbat B, Grandbois M, Salesse C. 1999. Determination of the anisotropic optical constants of bacteriorhodopsin in the mid infrared. Applied Spectroscopy 53:1299-1304.
- Blaudez D, Buffeteau T, Cornut JC, Desbat B, Escafre N, Pézolet M, Turlet JM. 1993. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air-water interface. Appl. Spectrosc. 47:869-874.
- Blaudez D, Turlet J-M, Dufourcq J, Bard D, Buffeteau T, Desbat B. 1996. Investigation at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 92:525-530.
- Buffeteau T, Blaudez D, Pere E, Desbat B. 1999. Optical Constant Determination in the Infrared of Uniaxially Oriented Monolayers from Transmittance and Reflectance Measurements. J. Phys. Chem. B 103:5020-5027.



- Castano S, Desbat B, Dufourcq J. 2000. Ideally amphipathic beta-sheeted peptides at interfaces: structure, orientation, affinities for lipids and hemolytic activity of (KL)(m)K peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1463:65-80.
- Castano S, Desbat B, Laguerre M, Dufourcq J. 1999. Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj(i=2j) peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1416:176-194.
- Cornut I, Desbat B, Turlet JM, Dufourcq J. 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.
- Dhathathreyan A, Baumann U, Muller A, Mobius D. 1988. Characterization of complex gramicidin monolayers by light reflection and Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 944:265-272.
- Dieudonne D, Mendelsohn R, Farid R, Flach C. 2001. Secondary structure in lung surfactant SP-B peptides: IR and CD studies of bulk and monolayer phases. *Biochim. Biophys. Acta* 1511:99-112.
- Dluhy R, Mendelsohn R. 1988. Emerging techniques in biophysical FT-IR. *Anal. Chem.* 60:269A-278A.
- Dluhy R, Reilly K, Hunt R, Mitchell M, Mautone A, Mendelsohn R. 1989. Infrared spectroscopic investigations of pulmonary surfactant. Surface film transitions at the air-water interface and bulk phase thermotropism. *Biophys. J.* 56:1173-1181.

- Ducharme D, Vaknin D, Paudler M, Salesse C, Riegler H, Möhwald H. 1996. Surface Properties of Valine-Gramicidin A at the Air/Water interface. *Thin solid film* 284-285:90-93.
- Flach C, Brauner J, Taylor J, Baldwin R, Mendelsohn R. 1994. External reflection FTIR of peptide monolayer films in situ at the air/water interface: experimental design, spectra-structure correlations, and effects of hydrogen-deuterium exchange. *Biophys. J.* 67:402-410.
- Flach C, Prendergast F, Mendelsohn R. 1996. Infrared reflection-absorption of melittin interaction with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biophys. J.* 70:539-546.
- Fukuto M, Penanen K, Heilmann RK, Pershan PS, Vaknin D. 1997. C60-propylamine adduct monolayers at the gas/water interface: A Brewster angle microscopy and x-ray scattering study. *J. Chem. Phys.* 107:5531-5546.
- Gallant J, Desbat B, Vaknin D, Salesse C. 1998. Polarization-modulated infrared spectroscopy and x-ray reflectivity of photosystem II core complex at the gas-water interface. *Biophys J* 75:2888-2899.
- Gidalevitz D, Huang Z, Rice S. 1999. Protein folding at the air-water interface studied with x-ray reflectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:2608-2011.
- Goormaghtigh E, Cabiliaux V, Ruyschaert JM. 1990. Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *Eur. J. Biochem.* 193:409-420.

- Grandbois M, Desbat B, Salesse C. 2000. Monitoring of phospholipid monolayer hydrolysis by phospholipase A2 by use of polarization-modulated Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. Chem.* 88:127-135.
- Haas H, Brezesinski G, Mohwald H. 1995. X-ray diffraction of a protein crystal anchored at the air/water interface. *Biophys. J.* 68:312-314.
- Hladky SB, Haydon DA. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel. *Biochim. Biophys. Acta* 274:294-312.
- Kemp G, Wenner C. 1976. Solution, interfacial, and membrane properties of gramicidin A. *Arch. Biochem. Biophys.* 176:547-555.
- Killian JA. 1992. Gramicidin and gramicidin-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1113:391-425.
- Langs DA. 1988. Three-dimensional structure at 0.86 Å of the uncomplexed form of the transmembrane ion channel peptide gramicidin A. *Science* 241:188-191.
- Lavoie H, Gallant J, Grandbois M, Blaudez D, Desbat B, Boucher F, Salesse C. 1999. The behavior of membrane proteins in monolayers at the gas-water interface: comparison between photosystem II, rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Materials Science and Engineering C* 10:147-154.
- LoGrasso PV, Moll Fd, Cross TA. 1988. Solvent history dependence of gramicidin A conformations in hydrated lipid bilayers. *Biophys. J.* 54:259-267.
- MacRitchie F. 1978. Proteins at interfaces. *Adv. Protein Chem.* 32:283-326.

- MacRitchie F. 1986. Spread monolayers of proteins. *Adv. Colloid Interface Sci.* 25:341-385.
- Mau ND, Daumas P, Lelievre D, Trudelle Y, Heitz F. 1987. Linear gramicidins at the air-water interface. *Biophys. J.* 51:843-845.
- Naik VM, Krimm S. 1986. Vibrational analysis of the structure of gramicidin A. I. Normal mode analysis. *Biophys. J.* 49:1131-1145.
- Quist PO. 1998. <sup>13</sup>C solid-state NMR of gramicidin A in a lipid membrane. *Biophys. J.* 75:2478-2488.
- Ries HE, Swift H. 1987. Monolayers of two transmembrane channel formers and an ionophore. *J. Colloid and Interface Science* 117:584-588.
- Salemme FR. 1988. Structural polymorphism in transmembrane channels. *Science* 241:145, 230.
- Sarges R, Witkop B. 1965. Gramicidin A. V. The Structure of Valine- and Isoleucine-gramicidine A. *J. Am. Chem. Soc.* 87:2011-2020.
- Tournois H, Gieles P, Demel R, de Gier J, de Kruijff B. 1989. Interfacial properties of gramicidin and gramicidin-lipid mixtures measured with static and dynamic monolayer techniques. *Biophys. J.* 55:557-569.
- Ulrich WP, Vogel H. 1999. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers at the air/water interface. *Biophys. J.* 76:1639-1647.
- Urban BW, Hladky SB, Haydon DA. 1978. The kinetics of ion movements in the gramicidin channel. *Fed. Proc.* 37:2628-2632.

- Urban BW, Hladky SB, Haydon DA. 1980. Ion movements in gramicidin pores. An example of single-file transport. *Biochim. Biophys. Acta* 602:331-354.
- Verclas SA, Howes PB, Kjaer K, Wurlitzer A, Weygand M, Buldt G, Dencher NA, Losche M. 1999. X-ray diffraction from a single layer of purple membrane at the air/water interface. *J. Mol. Biol.* 287:837-843.
- Wallace BA. 1986. Structure of gramicidin A. *Biophys. J.* 49:295-306.
- Wallace BA. 1998. Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *J. Struct. Biol.* 121:123-141.
- Wallace BA, Ravikumar K. 1988. The gramicidin pore: Crystal structure of Cesium complex. *Science* 241:182-187.
- Wu F, Flach C, Seaton B, Mealy T, Mendelsohn R. 1999. Stability of annexin V in ternary complexes with Ca<sup>2+</sup> and anionic phospholipids: IR studies of monolayer and bulk phases. *Biochemistry* 38:792-799.

Tableau 2.1: Structural parameter of the two-box model for VGA on water as determined from X-ray reflectivity measurements. One box model is sufficient for the description of VGA, whereas at high surface-pressures a layer associated with the restructuring of water is required in order to get the best fit to the data.  $N_{\text{Water}}$  corresponds to the number of water molecules that are integrated in the VGA box.

$\pi^*$ ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ )	A ( $\text{nm}^2\cdot\text{molecule}^{-1}$ )	$d_{\text{water}}$ ( $\text{\AA}$ )	$\rho_{\text{water}}$ ( $\text{e}/\text{\AA}^3$ )	$d_{\text{VGA}}$ ( $\text{\AA}$ )	$\rho_{\text{VGA}}$ ( $\text{e}/\text{\AA}^3$ )	$N_{\text{water}}$
0.3	6.36	-	-	$5.7^{+2.8}_{-2.0}$	$0.393^{-0.035}_{+0.08}$	$41^{+52}_{-30}$
1.8	4.18	-	-	$8.1^{+2.9}_{-4.1}$	$0.383^{-0.020}_{+0.148}$	$58^{+46}_{-50}$
9.7	2.97	-	-	$9.0^{+1.0}_{-1.0}$	$0.416^{-0.015}_{+0.021}$	$18^{+8}_{-8}$
13.8	2.06	-	-	$10.0^{+1.0}_{-1.0}$	$0.416^{-0.013}_{+0.023}$	$-6^{+6}_{-6}$
15.0	1.83	-	-	$11.5^{+1.0}_{-1.0}$	$0.406^{-0.015}_{+0.02}$	-
25.0	1.35	$10.1 \pm 5$	$0.347 \pm 0.005$	$24.2^{+1.0}_{-1.0}$	$0.402^{-0.015}_{+0.02}$	-
27.0	1.29	$8.5 \pm 5$	$0.344 \pm 0.005$	$25.1^{+1.0}_{-1.0}$	$0.389^{-0.01}_{+0.01}$	-

\*  $\pi$ : Surface pressure  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$

A: Area per molecule ( $\text{nm}^2\cdot\text{molecule}^{-1}$ )

$\rho$ : Electronic density ( $\text{e}\cdot\text{\AA}^{-3}$ )

$N_{\text{water}}$ : Number of water molecule

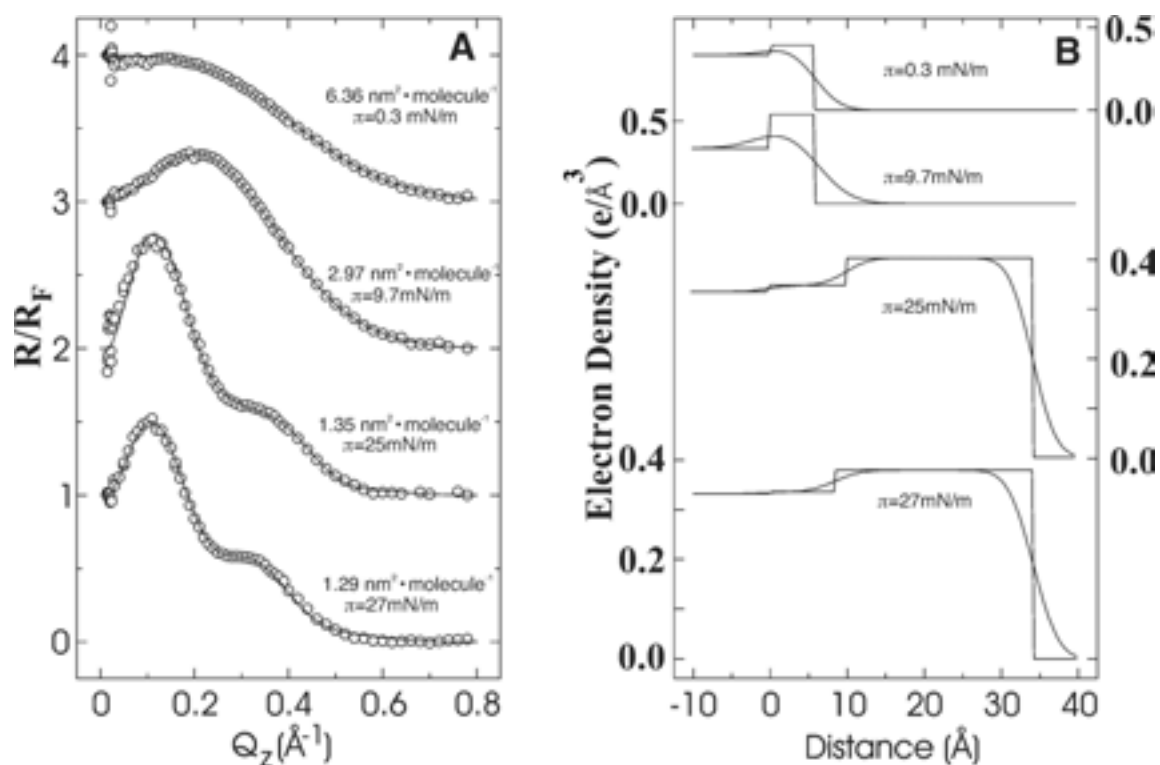


Figure 2.1: (A) X-ray reflectivity of VGA at 20°C normalized to the reflectivity of pure water subphase. The solid line is calculated from an electron density profile shown in B. The step-like line illustrates the ideally sharp interfaces that are Gaussian-smeared due to surface roughness to yield the smooth line. (B) A depiction showing the correspondence between the electron density and the molecular arrangement.

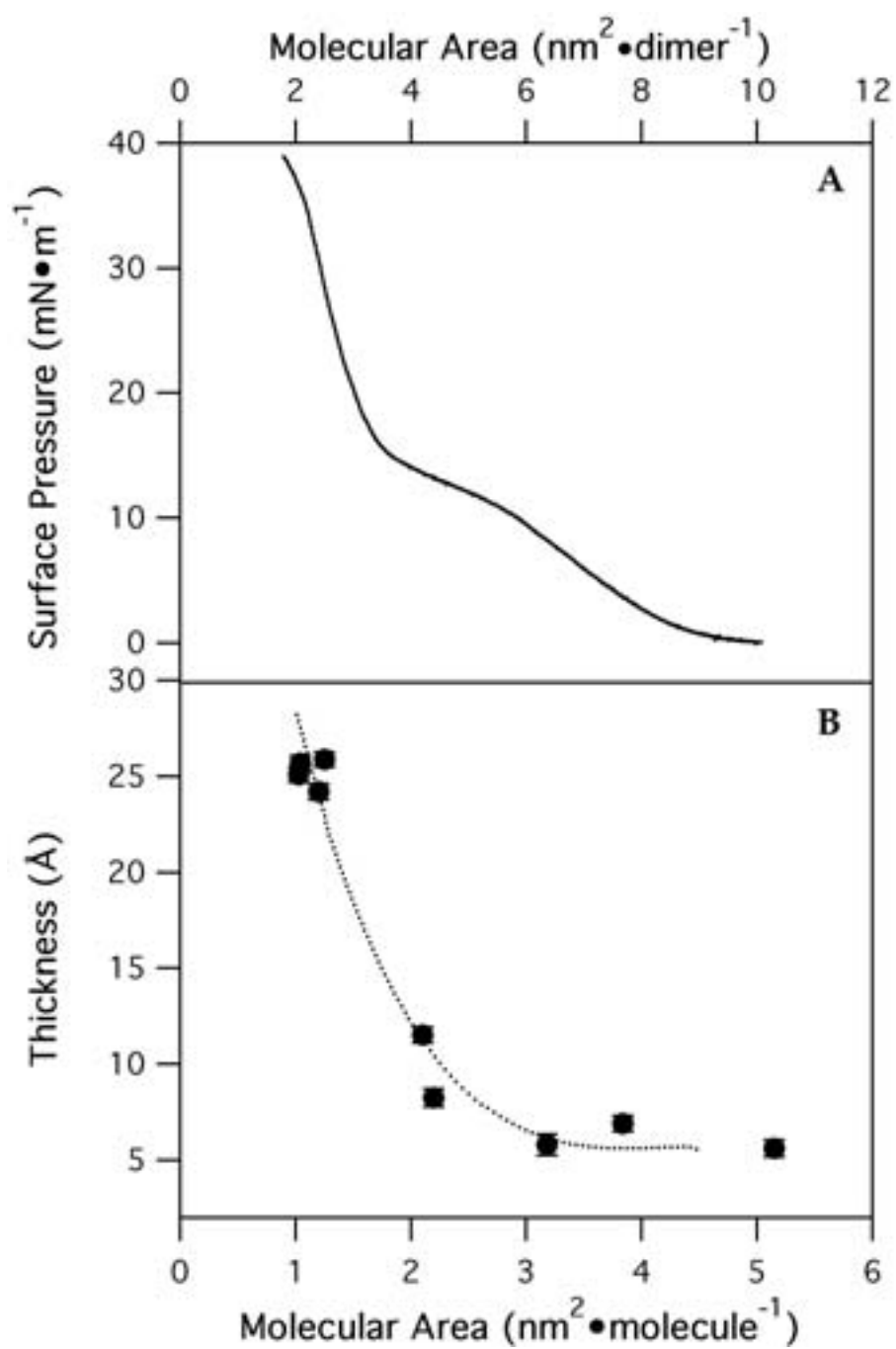


Figure 2.2: (A) Surface pressure isotherm of VGA at 20°C on pure water. (B) Thickness of VGA on pure water versus the molecular area as determined by X-ray reflectivity.



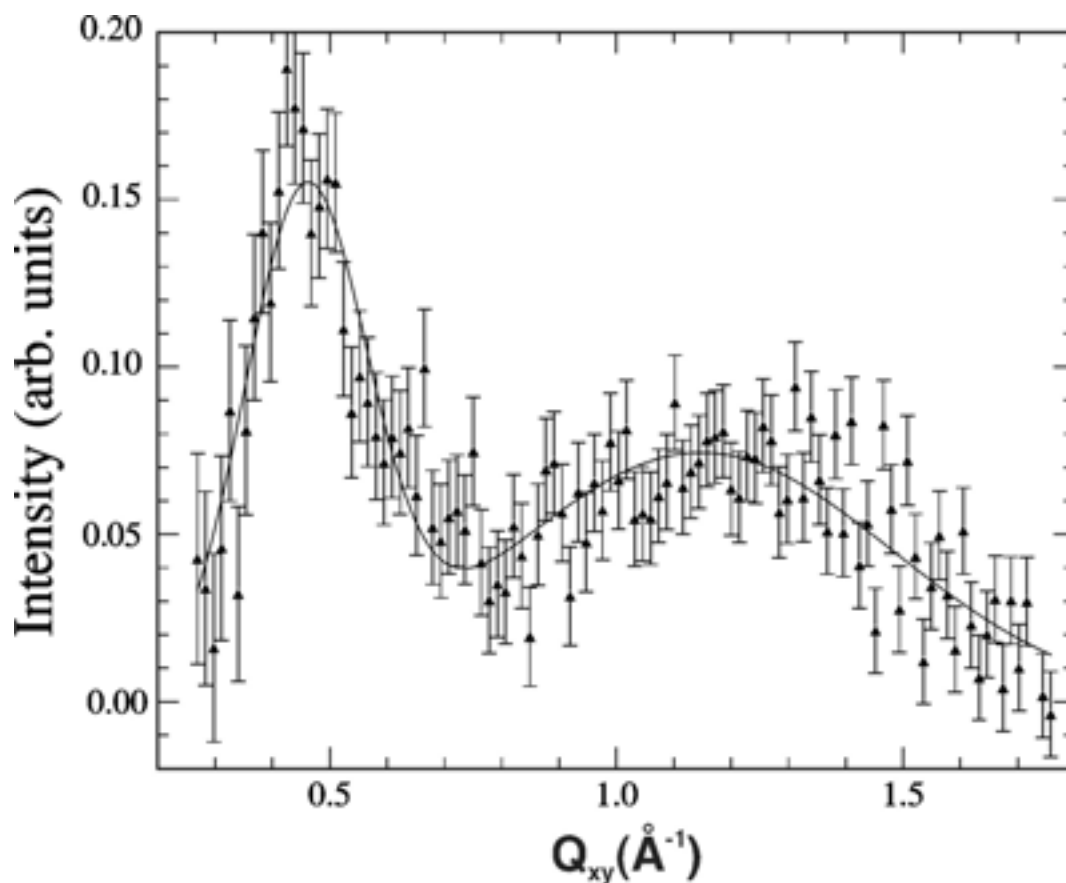


Figure 2.3: X-ray grazing incidence diffraction of VGA *in situ* at the air/water interface at a surface pressure of  $25 \text{ mNm}^{-1}$  ( $1,4 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ ). The sharper peak (at  $Q_{xy}^1 = 0.459 \text{\AA}^{-1}$ ) is due to the short-range in-plane order of the folded protein, whereas the broader peak is associated with restructured water molecules underneath the monolayer.

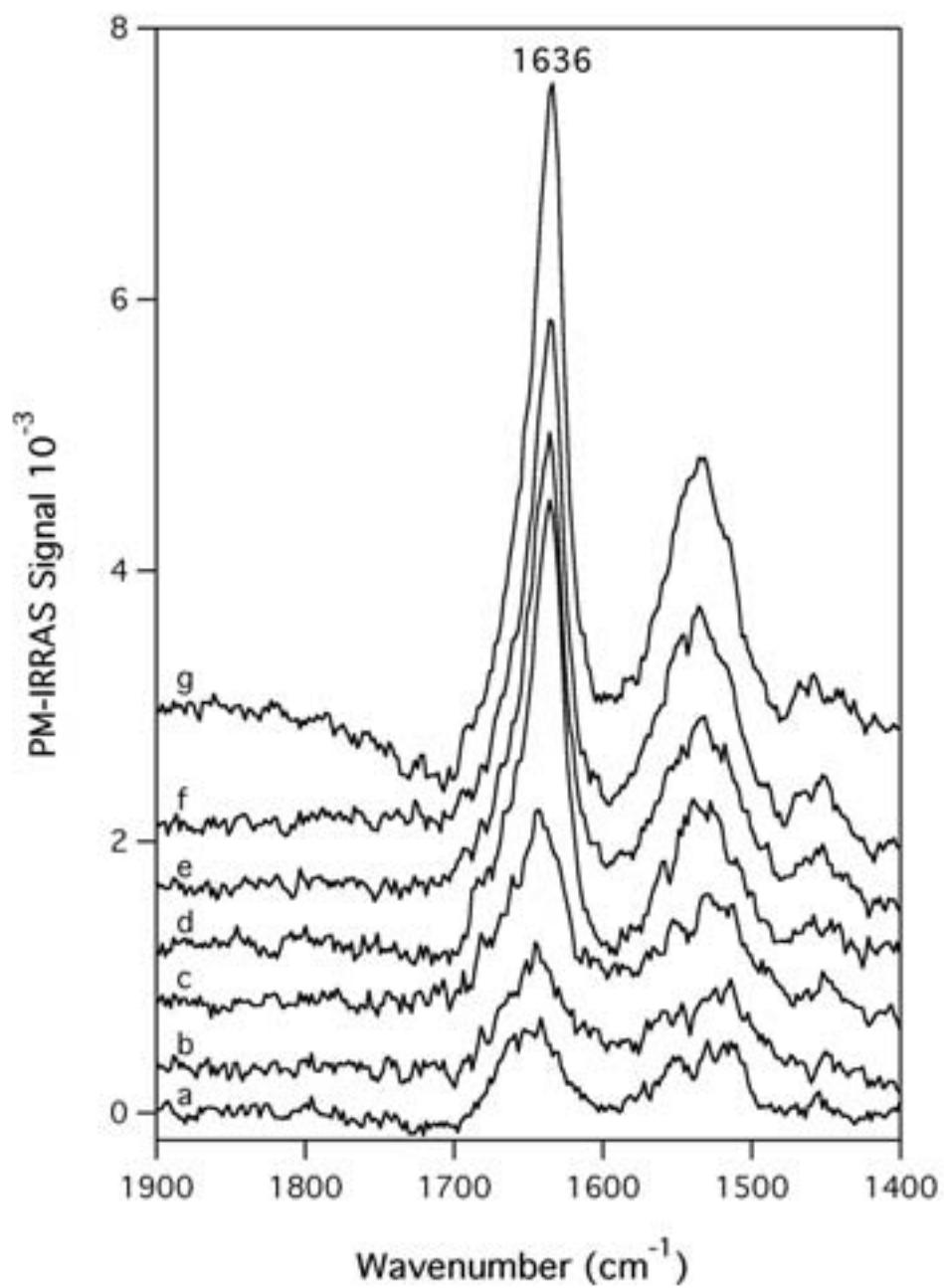


Figure 2.4: PM-IRRAS spectra of VGA *in situ* at the air/water interface on pure H<sub>2</sub>O at different surface pressures (a, 0; b, 5; c, 10; d, 15; e, 20; f, 30; g, 40 mNm<sup>-1</sup>).

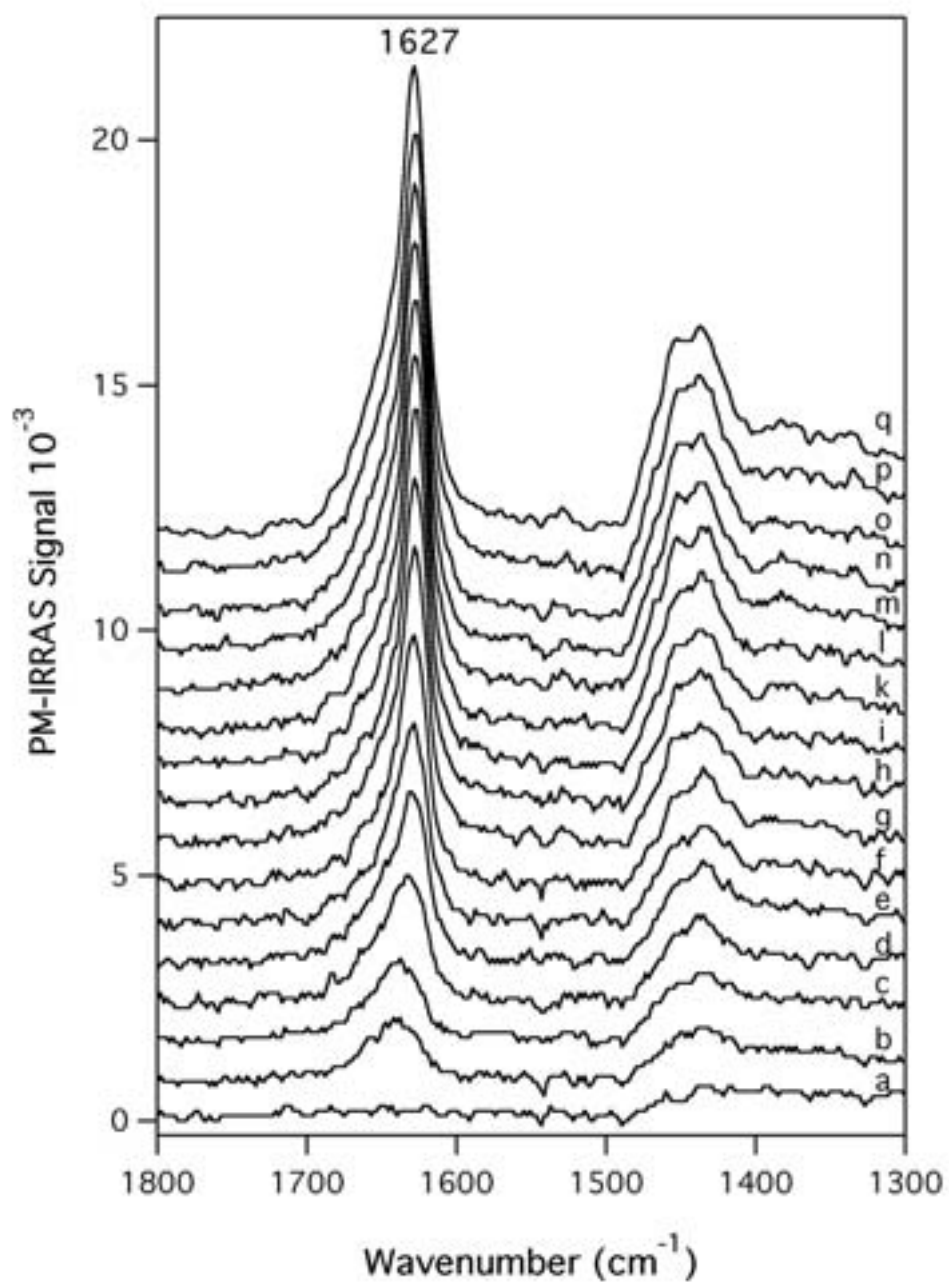


Figure 2.5: PM-IRRAS spectra of VGA *in situ* at the air/water interface on pure D<sub>2</sub>O at different surface pressures (a, 0.8; b, 1.6; c, 5; d, 9; e, 12; f, 13; g, 15; h, 16.5; i, 18.5; j, 22; k, 26; l, 30; m, 35; n, 40; o, 45; q, 52 mNm<sup>-1</sup>).

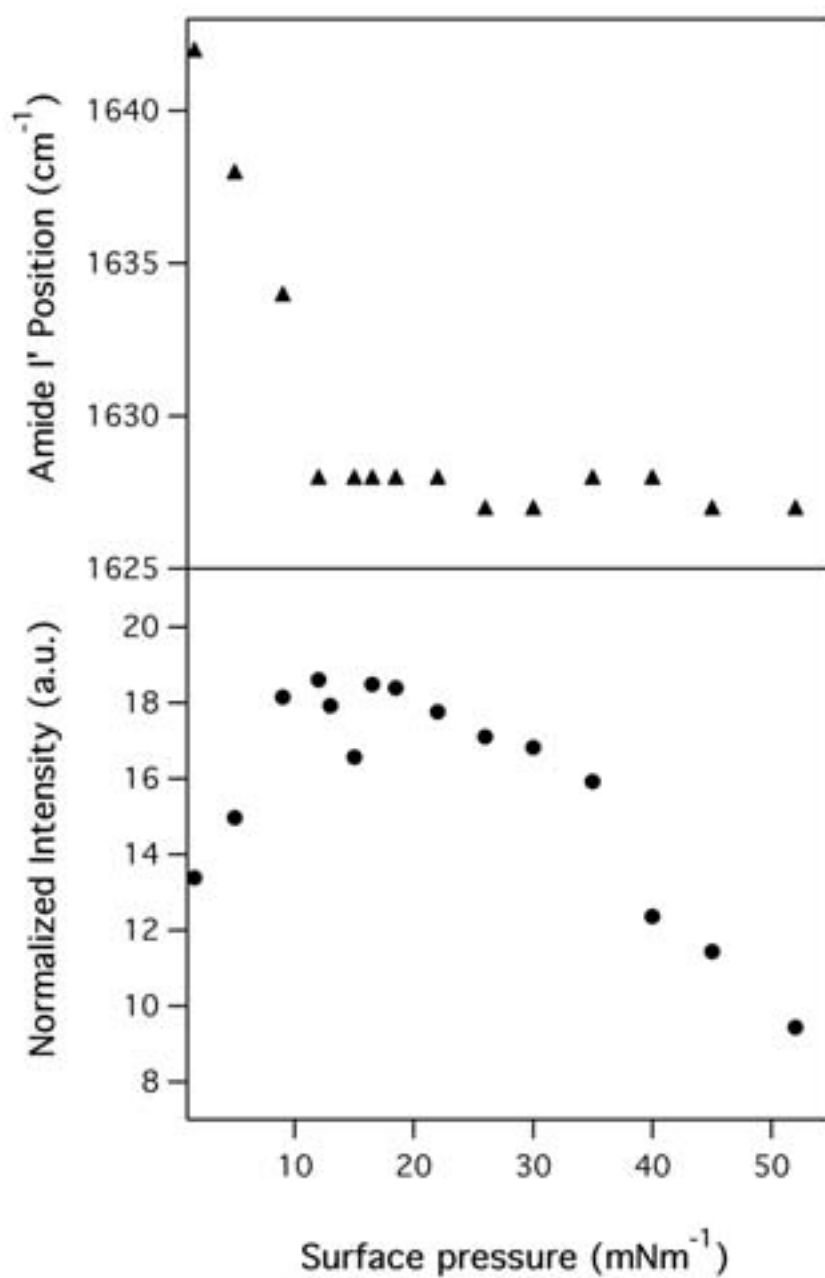


Figure 2.6: (A) Peak position of the amide I' band and (B) Intensity of the amide I' band normalized to the in-plane density as a function of the surface pressure (mNm<sup>-1</sup>).

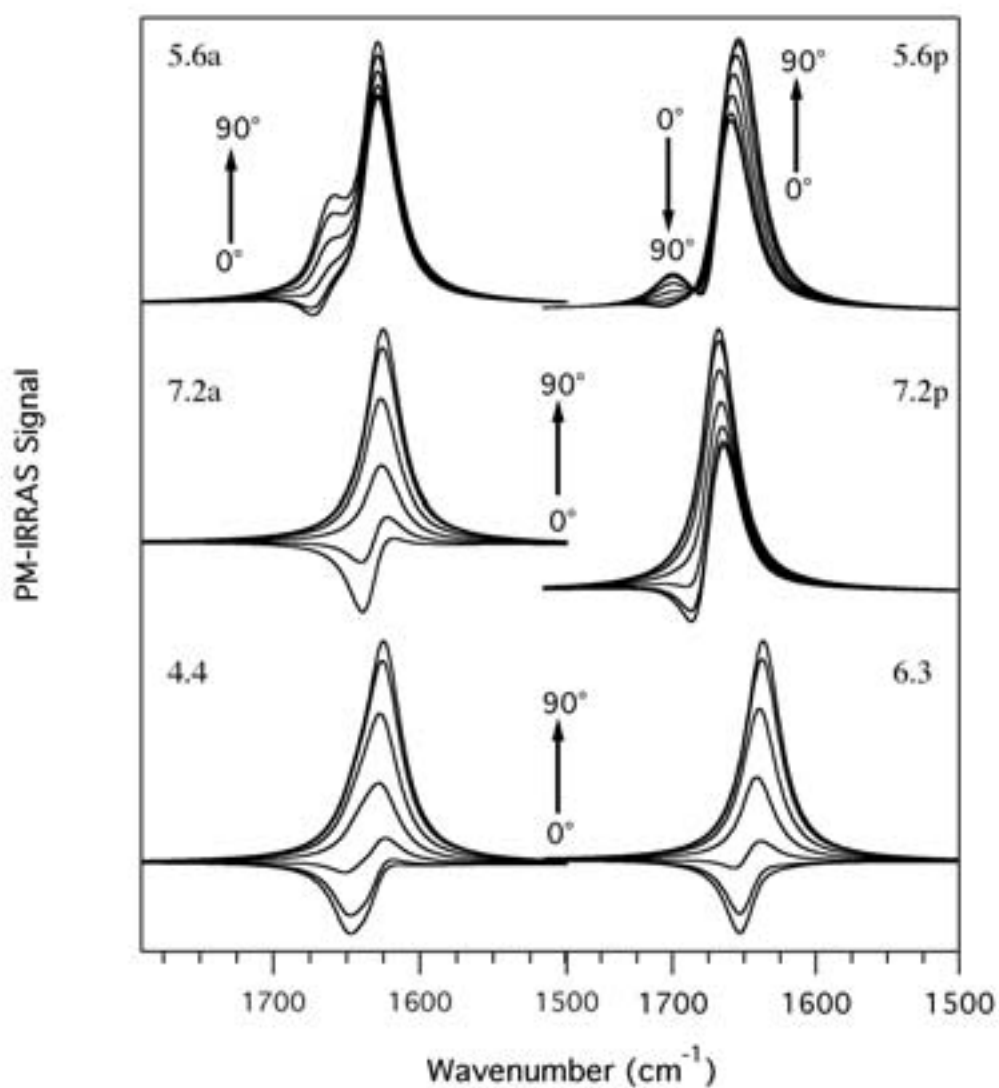


Figure 2.7: PM-IRRAS spectra simulation of six different gramicidin secondary structures. Simulation of each set of conformations is performed at different tilt angles of the transition dipole moment (0 to 90°).

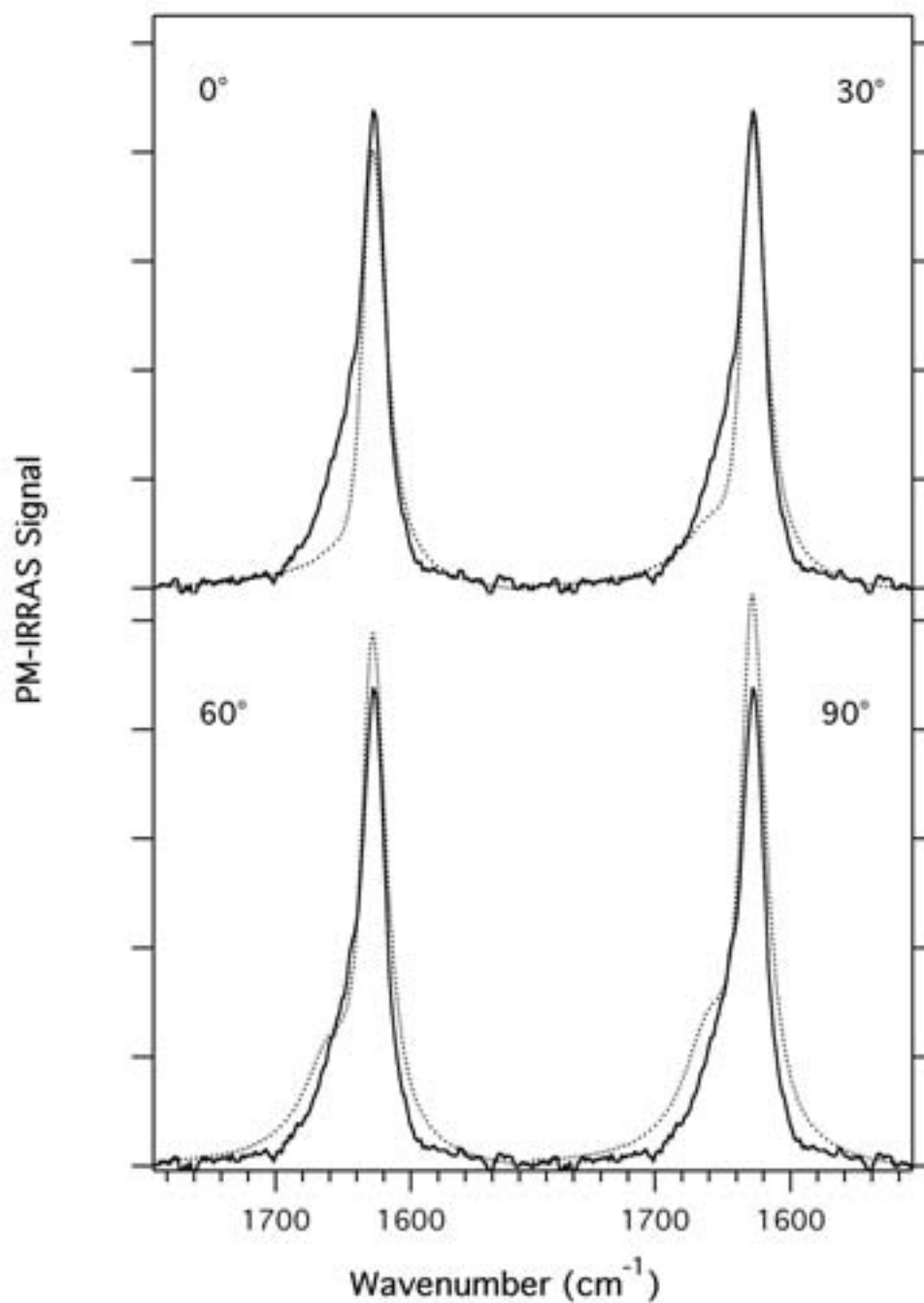


Figure 2.8: Comparison between the simulated and the experimental spectra of gramicidin. Intensity comparison of the simulated spectra with the experimental spectra at 40 mNm<sup>-1</sup> on D<sub>2</sub>O at different angles with respect to the normal.

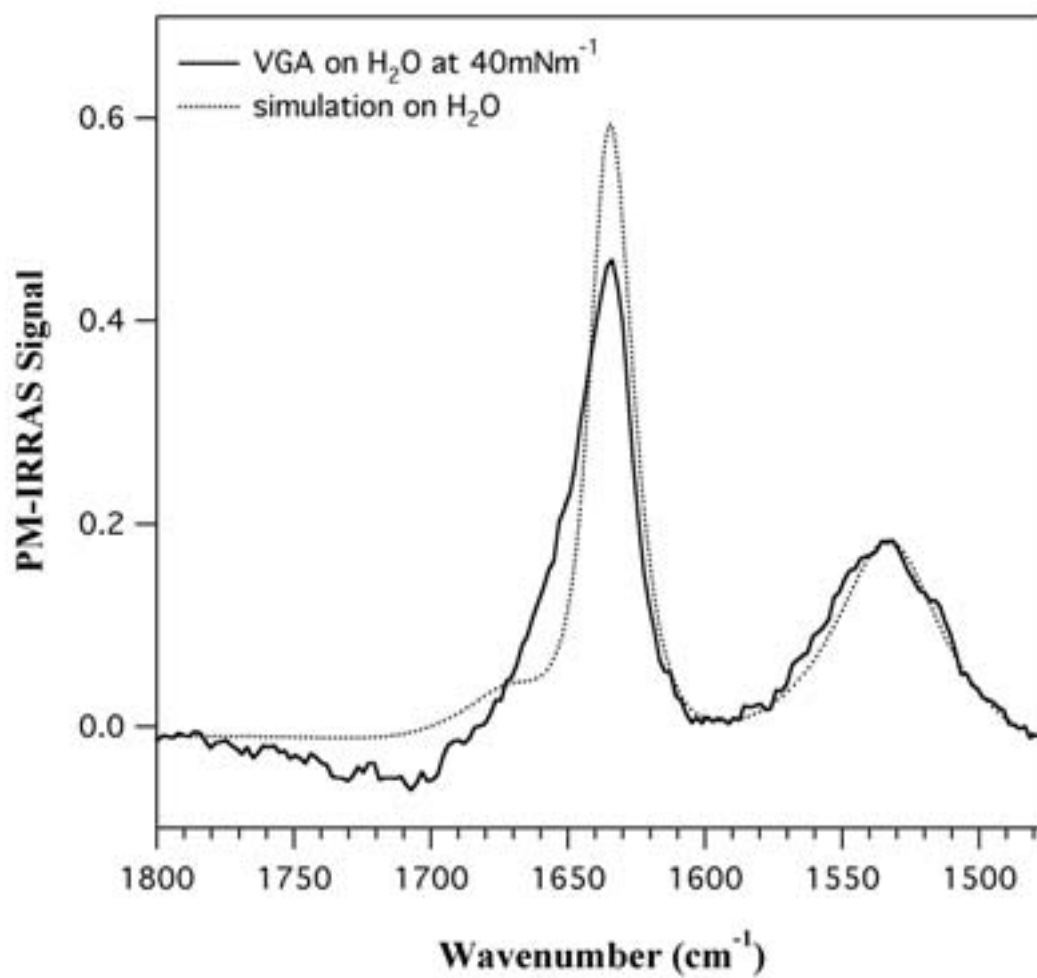


Figure 2.9: Comparison between the simulated and the experimental spectra at 40 mNm<sup>-1</sup> on H<sub>2</sub>O using the same parameters as those used on D<sub>2</sub>O.

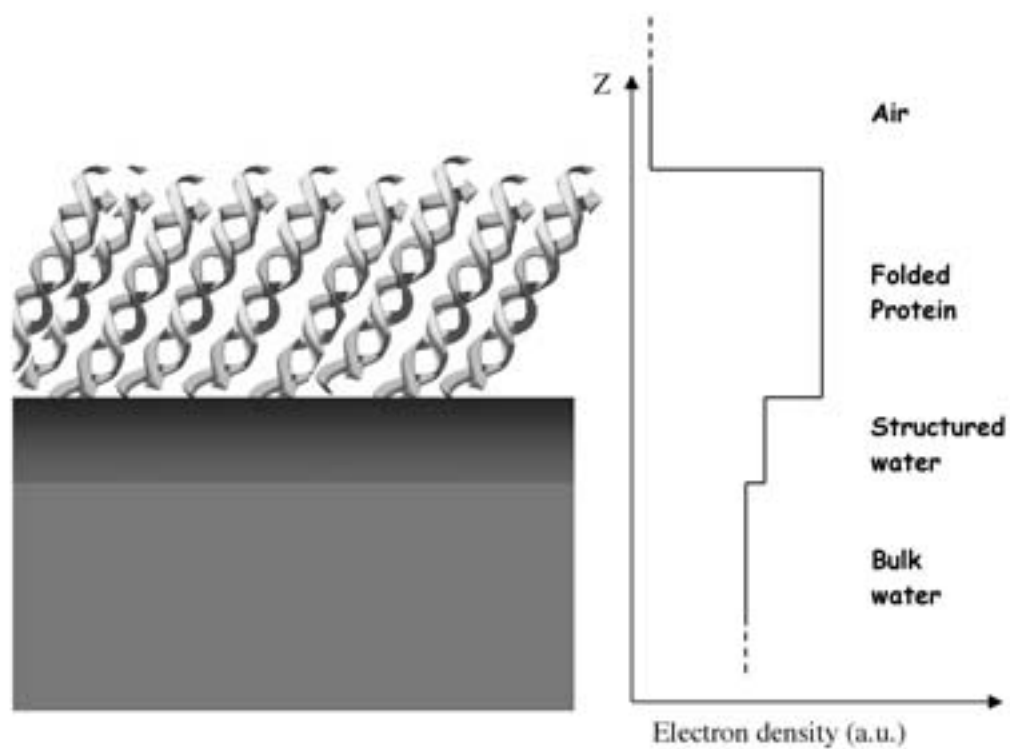


Figure 2.10: Schematic representation of VGA in monolayers at the air-water interface. The  $30^\circ$  orientation of the intertwined antiparallel  $\beta^{5,6}$  conformation of VGA and the layer of structured water is also represented in this figure together with the box model from the X-ray reflectivity data.



## **CHAPITRE 3**

### **Structure of Rhodopsin in Monolayers at the Air-Water Interface: a PM-IRRAS and X-ray Reflectivity Study**

Soumis à la revue Biophysical Journal

## Résumé

Ce chapitre présente l'étude de films monomoléculaires de rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau par réflectivité des rayons X et par spectroscopie de réflectivité infrarouge différentielle par modulation de polarisation (PM-IRRAS). Cette étude a permis de déterminer les conditions qui permettent de maintenir la structure secondaire native de la rhodopsine. L'étalement de la rhodopsine à une pression de surface de 0 ou 5 mNm<sup>-1</sup> suivi d'une incubation de 30 minutes à 21°C mène à la dénaturation de sa structure secondaire comme le démontre l'augmentation de son aire moléculaire sur les isothermes de pression de surface, la faible épaisseur du film obtenue par réflectivité des rayons X et la présence d'une forte contribution à 1630 cm<sup>-1</sup> attribuable à l'apparition de feuilletts  $\beta$  sur les spectres PM-IRRAS. En revanche, lorsque l'étalement est effectué à une pression de surface de 5 ou 10 mNm<sup>-1</sup> et une température de 4 et 21°C respectivement, suivi d'une compression immédiate à 4,5 nm<sup>2</sup>•molécule<sup>-1</sup>•minute<sup>-1</sup>, la structure secondaire de la rhodopsine est maintenue et l'épaisseur du film est en accord avec les données extraites de la structure cristalline. De plus, à l'aide des données cristallographiques et des isothermes de pression de surface de la rhodopsine, il a été possible d'estimer que la pression latérale des membranes discales des segments externes des bâtonnets est de 23.5 mNm<sup>-1</sup>. Finalement, les spectres PM-IRRAS effectués sur les membranes discales étalées à la surface de l'eau suggèrent que l'environnement lipidique contribue au maintien de la structure secondaire de la rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau.

**STRUCTURE OF RHODOPSIN IN MONOLAYERS AT THE AIR-WATER  
INTERFACE: A PM-IRRAS AND X-RAY REFLECTIVITY STUDY**

**Hugo Lavoie,<sup>†¶</sup> Bernard Desbat,<sup>¶</sup> David Vaknin,<sup>§</sup> and Christian Salesse<sup>†\*</sup>**

<sup>†</sup> Département de Chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7 and Centre de recherche en sciences et ingénierie des macromolécules, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4. <sup>¶</sup>Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire, URM 5803 Université Bordeaux I, 33405 Talence, France, and <sup>§</sup> Ames Laboratory and Department of physics, Iowa state University, Ames, IA 50011, USA,

\* Corresponding author: Fax: (819) 376-5057; e-mail: christian\_salesse@uqtr.ca

**Running title:** Monolayers of rhodopsin

**Keywords:** rhodopsin, PM-IRRAS, X-ray reflectivity, protein structure and monolayers, rod outer segment disk membranes

### 3.1 Abstract

Monomolecular films of the membrane protein rhodopsin have been investigated *in situ* at the air-water interface by polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) and X-ray reflectivity in order to find conditions that retain the native protein secondary structure. The spreading of rhodopsin at 0 or 5 mNm<sup>-1</sup> followed by a 30 min incubation time at 21°C resulted in the denaturation of rhodopsin as evidenced from the large increase of its molecular area, its small monolayer thickness and the extensive formation of  $\beta$ -sheets at the expense of the  $\alpha$ -helices originally present in native rhodopsin. In contrast, when spreading is performed at 5 or 10 mNm<sup>-1</sup> followed by an immediate compression at, respectively, 4 or 21°C, the secondary structure of rhodopsin is retained and the thickness of these films is in good agreement with the size of rhodopsin determined from its crystal structure. Moreover, given that the dimensions of rhodopsin are known, we have estimated the lateral surface pressure of rod outer segment disk membranes to 23.5 mNm<sup>-1</sup> using the surface-pressure isotherm of rhodopsin. In addition, the PM-IRRAS spectra of rod outer segment disk membranes in monolayers suggest that rhodopsin also retained its secondary structure in these films.

### 3.2 Introduction

Monolayer formation and molecular packing at air-water interfaces is an intriguing issue in the basic research of bio- and artificial membranes, and also in surface science, molecular manipulation and film patterning. With the advent of surface sensitive techniques (i.e., synchrotron X-rays, microscopy, FTIR, and others) simple long-chain monomolecular layers at the air-water interfaces have been widely used to shed light on some aspects of biomembrane characteristics (for recent reviews, see Kaganer et al., 1999; Dynarowicz-Latka et al., 2001). To elucidate processes near biomembranes, extensive studies of the interaction between lipid monolayers and soluble proteins in the subphase have been conducted using a variety of methods (for a review, see Vollhardt and Fainerman, 2000). Membrane proteins which are embedded in a lipid bilayer have been purified and spread at air-water interfaces. For example, purified proteins like rhodopsin (Korenbrodt and Pramik, 1977; Karan et al., 1978; Korenbrodt and Jones, 1979; Salesse et al., 1990; Maxia et al., 1995; Pepe et al., 1996), photosystem II reaction center (Alegria and Dutton, 1991; Hirata et al., 1992; Fang et al., 1995; Uphaus et al., 1997), photosystem II core complex (PSII CC) (Gallant et al., 1998a, b) and the serotonin receptor (Faivre et al., 2000 and 2001) have been studied at the air-water interface. Moreover, liposomes containing membrane proteins (Pattus et al., 1978a; Schurholz and Schindler, 1991) and whole biomembranes like rod outer segment (ROS) disk membranes (Azuma and Takagi, 1966; Karan and Brody, 1975; Korenbrodt and Pramik, 1977; Salesse et al., 1990), purple membranes (Hwang et al., 1977a, b; Korenbrodt and Hwang, 1980; Méthot et al., 1996; Volkov et al., 1997; Blaudez et al., 1999; Verclas et al., 1999; Min et al., 2001), sarcoplasmic reticulum (Pattus et al., 1981; Kanno et al., 1983), erythrocyte membranes (Pattus et al., 1978b and 1981), intestinal brush border (Pattus et al., 1978b), cytoplasmic membrane of *E. coli* (Pattus et al., 1978b), myelin (Oliveira et al., 1998) and axolemma membrane (Calderon et al., 1993 and 1995) have been studied in monolayers at the air-water interface. However, the high surface tension of water can lead to protein denaturation (MacRitchie, 1986) and the structure of these proteins must be assessed prior to drawing conclusions on their properties in these films. Indeed, we have previously demonstrated by infrared spectroscopy that spreading and incubation of PSII CC at low surface pressure leads

to its denaturation in monolayers whereas tight protein-protein interactions and a minimum spreading surface-pressure of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  retains the native structure of this protein complex (Gallant et al., 1998a).

Rhodopsin is a member of the large family of G-protein coupled receptors. It is found in ROS disk membranes where it constitutes 80% of the total protein content and 95 mol% of membrane proteins (Amis et al., 1981). It contains 7 transmembrane  $\alpha$ -helices and its chromophore, 11-*cis* retinal, is covalently bound to lysine 296 through a Schiff base linkage (for a review on the structure of rhodopsin, see Teller et al., 2001). Rhodopsin is covalently modified by the addition of two N-linked oligosaccharides at asparagines 2 and 15 and by palmitoylation at cysteines 322 and 323. An essential disulfide bond has also been identified between cysteines 110 and 187. Its structure has been recently determined at 2.8 Å resolution (Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001). We have undertaken this study to assess the state of rhodopsin in monolayers at the air-water interface, and to search for appropriate conditions that retain protein secondary structure in these films.

*In situ* techniques to probe monomolecular layers at the air-water interface are well established by now. For instance, X-ray and neutron reflectivity, and grazing incidence diffraction of free liquid surfaces allow determination of the electron density across the interface, and two-dimensional arrangements in the film on a molecular length scale (Als-Nielsen and Kjaer, 1989). Infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS) (Dluhy and Mendelsohn, 1988) and polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) (Blaudez et al., 1993) are additional powerful tools that were recently used to extract information on the secondary structure and orientation of peptide and protein monolayers at the air-water interface (Dluhy et al., 1989; Flach et al., 1994; Cornut et al., 1996; Flach et al., 1996; Gallant et al., 1998a; Castano et al., 1999 and 2000; Ulrich and Vogel, 1999; Wu et al., 1999; Dieudonne et al., 2001). In the present study, X-ray reflectivity and PM-IRRAS were combined to carefully investigate the structure of Langmuir monolayers of the purified membrane protein rhodopsin in detergent as well as in its native lipid environment of ROS disk membranes. We demonstrate the effect of different parameters on rhodopsin structure *in situ* at the air-water interface.

### 3.3 *Experimental methods*

#### 3.3.1 *Purification of rod outer segment disk membranes and rhodopsin*

All manipulations involving rhodopsin were carried under dim red light ( $\lambda > 650$  nm). Highly purified bovine ROS membranes were prepared by continuous sucrose concentration gradient as previously described (Salesse et al., 1984). Purification of ROS disk membranes was then achieved by flotation on Ficoll as described previously (Smith and Litman, 1982) with slight modifications (Salesse et al., 1988). ROS were solubilized in ammonyx LO and rhodopsin was purified by concanavalin A-sepharose 4B affinity chromatography and the detergent was changed for octyl glucoside as described by Litman (1982) and modified by Salesse et al. (1990). An absorbance ratio ( $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$ ) of 1.8 was obtained for the purity of rhodopsin which is comparable to published data (Litman, 1982). The concentration of the rhodopsin samples was determined by absorption spectroscopy using an extinction coefficient of  $40000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  at 500 nm.

#### 3.3.2 *Film formation*

Rhodopsin and ROS disk membranes were spread onto Millipore water ( $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) containing 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) and 100 mM NaCl using the method of Trurnit (Trurnit, 1960) as described earlier in detail (Salesse et al., 1990). The method of Trurnit allows quantitative spreading of proteins. The presence of NaCl is essential for the formation of monolayers of membrane proteins (Pattus et al., 1981). In fact, in the absence of NaCl, no isotherm can be measured unless a very large amount of protein is spread. A molecular weight of 42000 Da for rhodopsin was used in estimating its area per molecule. Surface pressure-area isotherms were measured using a home-made Langmuir trough with a Wilhelmy type balance which has been described elsewhere (Gallant et al., 1998b).

### 3.3.3 PM-IRRAS measurements

PM-IRRAS spectra were recorded at the air-water interface by co-addition of 800 scans at a resolution of  $8\text{ cm}^{-1}$  using a Nicolet 740 spectrometer following an experimental procedure previously described (Blaudez et al., 1993). The PM-IRRAS spectra of covered surface,  $S_{\text{film}}$ , as well as that of the bare water,  $S_{\text{W}}$ , were measured and the normalized difference  $\Delta S = [S_{\text{film}} - S_{\text{W}}] / S_{\text{W}}$  is presented. On dielectric substrates, PM-IRRAS presents a specific surface selection rule, such that a transition moment lying in the plane or perpendicular to the surface yields a positive or a negative absorption band, respectively (Blaudez et al., 1996). For an intermediate orientation of the transition moment, the two contributions are competing and the absorption band vanishes when the transition moment is tilted at approximately  $39^\circ$  from the surface normal to the water subphase (Blaudez et al., 1996).

### 3.3.4 X-ray reflectivity

X-ray reflectivity measurements were performed *in situ* at the air-water interface on a liquid surface reflectometer at Ames Laboratory. This reflectometer has been described elsewhere in details (Als-Nielsen and Pershan, 1983). Briefly, 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 intensity of the incident beam was continuously monitored to account for possible fluctuations of the X-ray beam. 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 0.3 mm thick. A dynamic vibration isolation system (JRS MOD-2 Affoltern, Switzerland) was used to eliminate mechanical vibrations. The Langmuir trough was contained in an air-tight aluminum enclosure with Kapton windows, and its temperature was constantly maintained at  $20^\circ\text{C}$ . The sealed container was flushed with helium for 1 hour before the beginning of the X-ray measurements to reduce background due to air scattering. Gas flow was allowed during compression of the monolayer to the required surface pressure and it was stopped during X-ray data collections.



The specular X-ray experiments yield the electron density profiles across the interface and can be related to molecular arrangements in the film. The electron density profile across the interface  $\rho(z)$  is extracted by refining the multiple slab model that best fits the measured reflectivity using a non-linear least-square method. The reflectivity from the slab model at a momentum transfer  $Q_z$  is calculated by (Als-Nielsen and Kjaer, 1989; Vaknin, 2001)

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

where  $R_0(Q_z)$  is the reflectivity from step-like functions calculated by the recursive dynamical method (Parratt, 1954), and  $\sigma$  is an effective surface roughness, accounting for the smearing of all interfaces (conformal surface roughness) due to thermal capillary waves and surface inhomogeneities (Als-Nielsen and Kjaer, 1989; Ocko et al., 1994).

### 3.3.5 Surface roughness

The surface roughness of a pure liquid-vapor interface is dominated by thermally excited capillary waves,  $\sigma_{CW}$ , that depend on surface tension  $\gamma$  ( $\sigma_{CW}^2 \propto k_B T/\gamma$ ). In addition, the effective surface roughness  $\sigma$  depends on the intrinsic roughness  $\sigma_I$ , due to the size, shape and organization of the molecule 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 capillarity 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 of surface tension) as discussed above (Als-

Nielsen and Kjaer, 1989). The effective surface roughness for these monolayers at moderate surface pressure (20-35 mNm<sup>-1</sup>) is in the range 2.8-4.0 Å.

### 3.4 Results and Discussion

#### 3.4.1 Effect of different parameters on the molecular area of rhodopsin

Protein properties can be drastically altered when spread in monolayers at the air-water interface (Tiede, 1985; MacRitchie, 1986). We have previously demonstrated that the initial surface pressure of spreading and the incubation of PSII CC at low surface pressure were very critical parameters for its structure in monolayers (Gallant et al., 1998a, b). Lowering the temperature was shown to reduce protein denaturation whereas compression speed had no effect on the structure of PSII CC (Gallant et al., 1998a). These parameters were thus also used to find the most appropriate experimental conditions to retain the native properties of rhodopsin in monolayers at the air-buffer interface. The isotherms of rhodopsin measured in different experimental conditions are shown in Fig. 3.1.

##### 3.4.1.1 Effect of spreading surface pressure, temperature and incubation time

Very similar isotherms of rhodopsin are measured at 4 and 21°C (curves a and b, respectively, Fig. 3.1A) when the film is spread at an initial surface pressure of 0 mNm<sup>-1</sup>, incubated for 30 min and then compressed at a speed of 1 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup>•min<sup>-1</sup>. In fact, only a small difference in collapse pressure and in molecular area can be observed between these two isotherms. For both temperatures, surface pressure rise begins at ~61 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup> and the collapse of the monolayer at 21°C occurs at 43.8 mNm<sup>-1</sup> (15.8 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup>) compared to 42 mNm<sup>-1</sup> (14 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup>) at 4°C. However, these conditions were shown to result in the denaturation of PSII CC (Gallant et al., 1998a, b). In fact, during this 30 min incubation at 0 mNm<sup>-1</sup>, most of the octyl glucoside which is used to solubilize rhodopsin is likely lost into the subphase as shown by Salesse et al. (1990). The spreading of rhodopsin results in a positive surface pressure (2-3 mNm<sup>-1</sup>) which decreases to 0 mNm<sup>-1</sup> during the 30 min incubation time. At this point, the available molecular area for rhodopsin is very large (77 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup>) and unfolding could hardly be prevented. The isotherms shown in Fig. 3.1A are slightly shifted to lower molecular areas by ~0.4 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup> compared the one reported by Salesse et al.

(1990). However, in that case, the rhodopsin monolayer was incubated at  $0 \text{ mNm}^{-1}$  for a period of time much longer than the 30 min incubation time in the present study. Such a long incubation at low surface pressure could explain their slightly larger molecular area if more extensive unfolding of rhodopsin had taken place.

#### *3.4.1.2 Effect of temperature, immediate compression after spreading and compression speed*

As shown in Fig. 3.1B, very different isotherms are measured at 4 and 21°C when the film is spread at an initial surface pressure of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  and then immediately compressed at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Indeed, the isotherm at 4°C (curve a, Fig. 3.1B) is found at a much lower molecular area than that at 21°C (curve b, Fig. 3.1B). Moreover, no collapse can be distinguished in the isotherm at 4°C up to  $48 \text{ mNm}^{-1}$  whereas a clear collapse can be seen at  $42 \text{ mNm}^{-1}$  in the isotherm at 21°C. The decrease in surface pressure from 5 to  $\sim 2 \text{ mNm}^{-1}$  observed between 70 and  $50 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$  (Fig. 3.1B) has previously been explained by the solubilization of octyl glucoside into the subphase during compression (Salesse et al., 1990). The most striking feature is that both isotherms of Fig. 3.1B are shifted to lower molecular areas compared to those shown in Fig. 3.1A. These results are consistent with the previous data we have obtained with PSII CC (Gallant et al., 1998b). Indeed, we have shown that spreading of PSII CC at an initial surface pressure of  $0 \text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time leads to a molecular area twice as large as when spreading was performed at an initial surface pressure of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression. This increase in molecular area was clearly shown to result from the unfolding of PSII CC at an initial surface pressure of  $0 \text{ mNm}^{-1}$  (Gallant et al., 1998a, b). However, spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  retained the secondary structure of this protein complex (Gallant et al., 1998a). These data suggest that rhodopsin is unfolded when spreading is performed at 21°C (Fig. 3.1A) whereas its native secondary structure is maintained when the film is spread at an initial surface pressure of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  at 4°C followed by an immediate compression (Fig. 3.1B). These conclusions are further supported by the PM-IRRAS measurements (see below).

### 3.4.1.3 *Molecular area of rhodopsin and estimation of ROS disk membrane lateral pressure*

On the basis of the high resolution structure of rhodopsin, Teller et al. (2001) have estimated its molecular area. Given that rhodopsin bears an ellipsoidal shape, the length and width of the elliptic footprint on the plane at the middle of the membrane have been estimated roughly to 4.5 and 3.7 nm, respectively (Teller et al., 2001). The molecular area of rhodopsin,  $A$ , can be estimated to  $13.1 \text{ nm}^2$  using the relation  $A = \pi ab$  where  $a$  and  $b$  correspond, respectively, to the radius of the length and width of the elliptic footprint of rhodopsin. This value is in good agreement with the estimated area of 7  $\alpha$ -helices of  $11.2\text{-}14.0 \text{ nm}^2$  which has been calculated using an area of  $1.6\text{-}2.0 \text{ nm}^2$  for each individual  $\alpha$ -helix (Fidelio et al., 1986). By assuming that the structure of rhodopsin is not denatured when its surface pressure isotherm is measured at  $4^\circ\text{C}$  (curve a, Fig. 3.1B), one can use this isotherm to estimate the lateral pressure of ROS disk membranes. The lateral pressure corresponding to the area of rhodopsin at  $13.1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$  is  $23.5 \text{ mNm}^{-1}$ . This value is much lower than our previous estimation of  $38 \text{ mNm}^{-1}$  for the lateral pressure of ROS disk membranes which was based on the measurement of the thickness of rhodopsin monolayers (Salesse et al., 1990). However, on the basis of the present PM-IRRAS data (see below), rhodopsin was most probably denatured in these films. The present value of  $23.5 \text{ mNm}^{-1}$  for ROS disk membrane lateral pressure is close to other estimations of membrane lateral pressure which lie between 25 and  $34 \text{ mNm}^{-1}$  (Demel et al., 1975; Seelig, 1987; James et al., 1994).

### 3.4.2 *Infrared spectrum of native rhodopsin in ROS disk membranes*

Since spreading of pure rhodopsin in monolayers at the air-buffer interface could lead to protein denaturation, the infrared spectrum of ROS disk membranes was measured in solution to get the spectrum of rhodopsin in its native environment. This spectrum will thus provide information on the shape and position of the bands of native rhodopsin. Rhodopsin is by far the main component of ROS disk membranes as it comprises 95 mol% of membrane proteins (Amis et al., 1981). The spectrum in Fig. 3.2 from  $1400$  to  $1800 \text{ cm}^{-1}$  shows that the amide I and the amide II vibrations of

the protein backbone are centered at  $1655\text{ cm}^{-1}$  and  $1545\text{ cm}^{-1}$ , respectively. The position of these bands is in very good agreement with the data reported on rhodopsin (Rothschild et al., 1980; Pistorius and de Grip, 1994). Given that there are 72 lipids per rhodopsin in ROS disk membranes (Miljanich et al., 1981), a lipid ester carbonyl stretch vibration can be identified at  $1734\text{ cm}^{-1}$  which is in very good agreement with other reports (Rothschild et al., 1980; Pistorius and de Grip, 1994). Previous studies have shown that a direct correlation exists between the frequency of the amide I band and protein secondary structure (Krimm and Bandekar, 1986; Dousseau and Pézolet, 1990). The position of the amide I band at  $1655\text{ cm}^{-1}$  suggests that rhodopsin contains an extensive proportion of  $\alpha$ -helices as clearly demonstrated in the high resolution structure of rhodopsin (Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001). Indeed, rhodopsin contains 7 transmembrane  $\alpha$ -helices as well as a smaller  $\alpha$ -helix located in the C-terminal region which is parallel to the plane of the membrane. In addition, the position of the shoulder at  $1632\text{ cm}^{-1}$  and the weaker vibration near  $1685\text{ cm}^{-1}$  in the spectrum indicate the presence of a certain amount of  $\beta$ -sheet conformation in native rhodopsin (Arrondo et al., 1993; Surewicz et al., 1993; Goormaghtigh et al., 1994). In fact, the high resolution structure of rhodopsin clearly shows the presence of one antiparallel  $\beta$ -sheet in the loop between  $\alpha$ -helices 4 and 5 and another one near the N-terminal (Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001). Moreover, this spectrum presents an amide I/amide II ratio of 1.47 which is very similar to the data obtained by other groups (Rothschild et al., 1980; Pistorius and de Grip, 1994).

### 3.4.3 *Effect of different parameters on the structure of rhodopsin in monolayers*

#### 3.4.3.1 *Effect of incubation time on the structure of rhodopsin in monolayers*

Figure 3.3 presents the PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin at different surface pressures at the air-buffer interface at  $21^\circ\text{C}$ . These spectra were measured after spreading rhodopsin at an initial surface pressure of  $0\text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time prior to compression (Figs. 3.3A and 3.3B) or at an initial surface pressure of  $5\text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time prior to compression (Figs. 3.3C and 3.3D). The compression speed for the spectra shown in Figs. 3.3A and

3.3C was  $1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$  compared to  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$  for those presented in Figs. 3.3B and 3.3D. When compared to the spectrum of native rhodopsin shown in Fig. 3.2, all of these spectra show clear signs of protein denaturation. Indeed, two components in the amide I band at  $1655$  and  $1630 \text{ cm}^{-1}$  with varying intensities can be seen in these spectra which indicate the presence of both  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets. Therefore, these experimental conditions lead to the formation of additional  $\beta$ -sheets at the expense of the  $\alpha$ -helices originally present in native rhodopsin (compare Figs. 3.2 and 3.3). The effect of compression rate can be readily seen when comparing Figs. 3.3A and 3.3B. Indeed, the ratio between the components of the amide I band at  $1630$  and  $1655 \text{ cm}^{-1}$  in the spectra of Figs. 3.3A and 3.3B suggests that more  $\beta$ -sheets are formed when the rhodopsin film is compressed respectively at a speed of  $1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$  than at  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$ . These data thus suggest that spreading rhodopsin at  $0 \text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time at a compression speed of  $1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$  (Fig. 3.3A) are the most harmful experimental conditions for rhodopsin. The initial surface pressure of spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  (Figs. 3.3C and 3.3D) does not prevent denaturation of rhodopsin probably because this surface pressure decreases to almost  $0 \text{ mNm}^{-1}$  during the 30 min incubation time after spreading which is likely due to the solubilization of most of the octyl glucoside into the subphase. Altogether these data support the interpretation of the increase in molecular area observed in Fig. 3.1A as a result of the large molecular area available for rhodopsin after spreading ( $77 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ ) where unfolding could hardly be prevented. These results are consistent with those we have previously obtained with PSII CC where denaturation was also observed in similar experimental conditions (Gallant et al., 1998a). These conclusions are supported by the X-ray reflectivity measurements.

Figure 3.4A 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 the rhodopsin monolayer spread at an initial surface pressure of  $0.1 \text{ mNm}^{-1}$ . The solid line in Fig. 3.4A is the best-fit calculated reflectivity from the electron density model structure shown in Fig. 3.4B as a solid line. The reflectivity was calculated by assuming a two-box model (Als-Nielsen and Kjaer, 1989). The dotted line in Fig. 3.4B 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  $22.9 \pm 2 \text{ \AA}$  and  $17.6 \pm 2 \text{ \AA}$  with electron number densities of  $0.35 \pm 0.02$  and  $0.39 \pm 0.02 \text{ e/\AA}^3$ , respectively, and a surface roughness,  $\sigma = 3.2 \pm 0.5 \text{ \AA}$ . The two-box model suggests that rhodopsin may be composed of two distinct electron density zones. The total thickness of the rhodopsin film as extracted from the box model in the absence of surface roughness is  $40.5 \pm 4 \text{ \AA}$ . This thickness value is much smaller than the size of rhodopsin ( $75 \text{ \AA}$ ) determined directly from its crystal structure (Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001) and thus suggests that rhodopsin is unfolded in these conditions which leads to a large increase in molecular area as observed in Fig. 3.1A.

#### *3.4.3.2 Effect of immediate compression after spreading on the structure of rhodopsin in monolayers*

Figure 3.5 presents the PM-IRRAS spectra measured after spreading rhodopsin at an initial surface pressure of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of 1 (Fig. 3.5A) or  $4.5 \text{ (Fig. 3.5B) nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$ . It can be seen that the increase of compression speed by a factor of 4.5 (or an equivalent decrease in time) highly improved the quality of the spectra of rhodopsin when compared to the spectrum of native rhodopsin in ROS disk membranes (Fig. 3.2). Indeed, a faster compression speed allows to retain a larger proportion of the  $\alpha$ -helices of rhodopsin (compare Figs. 3.5A and 3.5B). Indeed, only a shoulder at  $1630 \text{ cm}^{-1}$  is observed in these spectra (Fig. 3.5B) in contrast to the well resolved component at  $1630 \text{ cm}^{-1}$  in the spectra shown in Fig. 3.5A. However, the intensity of the shoulder in the spectra of Fig. 3.5B, when compared to the shoulder in the spectrum of Fig. 3.2, suggests that rhodopsin is partly denatured in these conditions. The effect of compression speed suggests that time is a critical parameter in the denaturation of rhodopsin in monolayers. However, as shown in Fig. 3.1B, because of the solubilization of octyl glucoside into the subphase, the initial surface pressure of spreading of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  quickly decreases down to  $\sim 2 \text{ mNm}^{-1}$  during compression and then remains constant until the onset of the surface pressure rise. This decrease in surface pressure could thus also contribute to the denaturation of rhodopsin. These results contrast with those we have previously obtained with PSII CC. Indeed, when PSII CC was spread at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression, no denaturation was observed



(Gallant et al., 1998a). Moreover, no effect of compression speed was observed. This higher sensitivity of rhodopsin than PS II CC to denaturation is rather surprising. Indeed, PS II CC is made of several proteins and could be expected to be less stable than a single polypeptide chain like rhodopsin.

### *3.4.3.3 Effect of the decrease in surface pressure during compression on the structure of rhodopsin in monolayers*

In order to evaluate the effect of the decrease in surface pressure during compression prior to the onset of the surface pressure rise, PM-IRRAS spectra of rhodopsin were measured at different surface pressures when spreading was performed at an initial surface pressure of  $10 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$  (see Fig. 3.6). This initial surface pressure of spreading quickly decreased down to  $\sim 4.5 \text{ mNm}^{-1}$  and this surface pressure remained constant during the rest of the compression until the onset of the surface pressure rise. It can be seen in Fig. 3.6 that the amide I band in these spectra is centered at  $1655 \text{ cm}^{-1}$  and that there is no sign of rhodopsin denaturation. Indeed, the presence of a shoulder at  $1630 \text{ cm}^{-1}$  can hardly be distinguished in these spectra whereas it was obvious in the spectra shown in Fig. 3.5B. It can thus be postulated that when a surface pressure of at least  $4.5 \text{ mNm}^{-1}$  is maintained during compression, no denaturation occurs in the rhodopsin film. Such a surface pressure might be sufficient to provide lateral interactions between rhodopsin molecules and thus prevent their denaturation.

Figure 3.7A 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 the rhodopsin monolayer spread at an initial surface pressure of  $9.5 \text{ mNm}^{-1}$ . The dotted line in Fig. 3.7B 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  $30 \pm 2 \text{ \AA}$  and  $37.5 \pm 2 \text{ \AA}$  with electron number densities of  $0.35 \pm 0.02$  and  $0.38 \pm 0.02 \text{ e/\AA}^3$ , respectively, and a surface roughness,  $\sigma = 5.4 \pm 0.5 \text{ \AA}$ . The two-box model suggests that rhodopsin may be composed of two distinct electron density zones. The roughness is too large to be accounted for by capillary waves only, and possibly the roughness is dominated by the intrinsic part, which, using equation 2, is estimated at

$\sigma_f \sim 4.5\text{-}5.0 \text{ \AA}$ . The total homogenous thickness of the rhodopsin film as extracted from the box model in the absence of surface roughness is  $67.5 \pm 4 \text{ \AA}$ . This thickness value reflects the average size of the densely packed rhodopsin. The difference between this value of  $67.5 \text{ \AA}$  and the dimension of rhodopsin perpendicular to the membrane ( $75 \text{ \AA}$ ) determined from its crystal structure (Teller et al., 2001) may be explained by: 1) the larger intrinsic roughness of the rhodopsin film which can be associated with the staggering between proteins and with the irregularity inherent to the morphology of rhodopsin, i.e. the presence of the hydrophilic loops that link together the transmembrane  $\alpha$ -helices of rhodopsin that are not folded into the densely folded part of the protein and 2) the cytoplasmic loops are poorly determined in the model of Teller et al. (2001). Nevertheless, this data thus suggests that the dimension of rhodopsin in these experimental conditions is in good agreement with the dimension of native rhodopsin and thus further supports that the native structure of rhodopsin is retained under these conditions. These data also indicate that the rhodopsin film is composed of a single layer of protein homogeneously distributed at the interface.

#### 3.4.4 *Effect of temperature on the structure of rhodopsin in monolayers*

Figure 3.8 shows the PM-IRRAS spectra of rhodopsin spread at an initial surface pressure of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  at  $4^\circ\text{C}$  and compressed immediately at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . It can be seen that the amide I band is centered at  $1655 \text{ cm}^{-1}$  and that there is no sign of protein denaturation. It is interesting to compare these data with those presented in Fig. 3.5B because the temperature at this measurement is the only different experimental condition between these two sets of data. The presence of the shoulder at  $1630 \text{ cm}^{-1}$  is very obvious in the spectra of Fig. 3.5B whereas there is no obvious sign for the presence of this shoulder in the spectra of Fig. 3.8. It can thus be concluded that lowering the temperature to  $4^\circ\text{C}$  prevents rhodopsin denaturation. These spectra are also similar to those presented in Fig. 3.6 and thus suggests that it is possible to retain the native secondary structure of rhodopsin when the film is maintained at a surface pressure of at least  $4.5 \text{ mNm}^{-1}$  (Fig. 3.6) or when measurements are performed at  $4^\circ\text{C}$  (Fig. 3.8).

### 3.4.5 *Effect of surface pressure on the secondary structure of rhodopsin*

PM-IRRAS signal increases with surface pressure, suggesting an increase in rhodopsin surface concentration. This change can also be attributed to structural or orientational changes upon compression to higher surface pressures. The amide I/amide II ratio (AI/AII) was used to estimate the relative orientation change taking place during compression. Indeed, it was previously reported (Cornut et al., 1996) that the AI/AII ratio can vary from -1 to 6.5 when  $\alpha$ -helices are oriented, respectively, parallel and perpendicular to the normal to the interface. To visualize those changes, if any, we compared normalized spectra of rhodopsin monolayers at 10 and 30  $\text{mNm}^{-1}$  (see inset of Figs. 3.6 and 3.8). It can be seen that the shape of the amide I band of rhodopsin is very similar at both surface pressures whereas the AI/AII ratio slightly varies with surface pressure. Indeed, a ratio of 2.5 and 3.3 is obtained at 30 and 10  $\text{mNm}^{-1}$ , respectively. It is thus clear from these spectra that compression to higher surface pressures did not affect the  $\alpha$ -helix content of rhodopsin. However, the orientation of rhodopsin slightly changes when increasing the surface pressure.

### 3.4.6 *Stability of rhodopsin structure in monolayers as a function of time*

Figure 3.9 shows the PM-IRRAS spectra measured after spreading rhodopsin at an initial surface pressure of 5  $\text{mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of 4.5  $\text{nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$  at 4°C until a surface pressure of 20  $\text{mNm}^{-1}$  is reached. The spectra were then taken every 30 min for 2 h. It can be seen that the intensity of the amide I band increases during the first 30 min and then remains unchanged. This can be interpreted by the solubilization of the detergent octyl glucoside into the subphase, as mentioned above, which results in an increase in rhodopsin surface concentration. The inset of this figure shows normalized spectra at 0 and 120 min incubation time. The shape of these two spectra is almost identical which suggests that the secondary structure of rhodopsin remains unchanged when incubated for 120 min at 4°C. Moreover, the fact that the AI/AII ratio remains unchanged (see inset of Fig. 3.9) strongly suggests that the orientation of rhodopsin also remains unchanged as a function of time at a surface pressure of 20  $\text{mNm}^{-1}$  even though an increase of the intensity of the amide I band is observed during the first 30 min of incubation.

### 3.4.7 *Comparison between the films of rhodopsin in different experimental conditions*

Figure 3.10 shows the normalized PM-IRRAS spectra of rhodopsin at  $20 \text{ mNm}^{-1}$  extracted from Fig. 3.6 (spectrum b in Fig. 3.10), Fig. 3.8 (spectrum c in Fig. 3.10) and Fig. 3.9 (spectrum after 120 min incubation) (spectrum a in Fig. 3.10). It can be seen that the shape of the amide I band is almost identical whatever is the experimental condition. This suggests that the secondary structure of rhodopsin at  $20 \text{ mNm}^{-1}$  is very similar when spreading is performed at 5 or  $10 \text{ mNm}^{-1}$  and compressed immediately at 4 and  $21^\circ\text{C}$ , respectively, or when the film is maintained at  $20 \text{ mNm}^{-1}$  for 120 min at  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.4.8 *PM-IRRAS spectra of monolayers of ROS disk membranes*

Figure 3.11 shows the PM-IRRAS spectra of a film of ROS disk membranes spread at the air-buffer interface at an initial surface pressure of either 0, 5 or  $10 \text{ mNm}^{-1}$  without any noticeable change in the shape of the amide I band. These spectra show a band at  $1740 \text{ cm}^{-1}$  attributed to the ester carbonyl ( $\nu_s \text{ C=O}$ ) of the membrane phospholipids, an amide I band centered at  $1655 \text{ cm}^{-1}$  and the amide II vibration band at  $1545 \text{ cm}^{-1}$ . When compared to the spectra of intact rhodopsin (Figs. 3.6 and 3.8) and the spectrum of ROS disk membranes in solution (Fig. 3.2), several differences can be observed. In Fig. 3.11, the intensity of the ester carbonyl band at  $1740 \text{ cm}^{-1}$  is much stronger than that of the amide I band whereas it is a much weaker band in Fig. 3.2. This difference can be explained by the selection rules in PM-IRRAS. Indeed, it has been determined (Blaudez et al., 1994) that an upward-oriented band indicates a transition moment occurring preferentially in the plane of the monolayer, whereas a downward-oriented band reveals an orientation preferentially perpendicular to the monolayer. For a given oscillator strength, bands associated with transition moments that are parallel to the surface are more intense than those perpendicular to the surface (Cornut et al., 1996). Such a large intensity of the band at  $1740 \text{ cm}^{-1}$  could be explained if the ester carbonyl group of the ROS membrane phospholipids were oriented parallel to the surface as previously demonstrated for pure phospholipids (Cornut et al., 1996). Moreover, the ROS membrane phospholipids might partly remain as bilayers upon spreading and such a

phenomenon could thus contribute to the larger intensity of the ester carbonyl band compared to the amide I band observed in Fig. 3.11. The data of Korenbrot and Pramik (1977) and Salesse et al. (1990) support this possibility. Indeed, Korenbrot and Pramik (1977) have shown by electron microscopy that rhodopsin-egg phosphatidylcholine monolayer films transferred onto glass consisted of non-overlapping, randomly distributed membrane fragments separated by a lipid monolayer. Salesse et al. (1990) observed that ROS disk membranes form multilayers at their collapse pressure in monolayers and that this property is facilitated by the presence of a shell of phospholipids surrounding rhodopsin in these films.

The intensity of the amide I band of pure rhodopsin monolayers is approximately twice as large as that of ROS disk membranes at the same surface pressure (compare Figs. 3.6 and 3.8 with Fig. 3.11). This can be partly explained by the decrease in rhodopsin surface concentration due to the presence of the ROS disk membrane phospholipids. There are 72 phospholipids per rhodopsin (Miljanich et al., 1981) and ROS membrane phospholipids have an average molecular area of  $0.67 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$  at  $23.5 \text{ mNm}^{-1}$  (Ducharme et al., 1985). By assuming that ROS disk membranes retain their bilayer organization in monolayers, these phospholipids will occupy an area of  $\sim 24 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$  per molecule of rhodopsin. Thus, a total area of  $37.1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$  can be calculated for rhodopsin in ROS disk membranes when taking into account the area of pure rhodopsin ( $13.1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ ) and its surrounding phospholipids ( $24.0 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ ). Rhodopsin thus accounts for only  $\sim 33\%$  of this area. This data can thus at least partly explain the reduced intensity of the amide I band in the spectra of Fig. 3.11 compared to those shown in Figs. 3.6 and 3.8 as well as the large intensity of the ester carbonyl band at  $1740 \text{ cm}^{-1}$  compared to that of the amide I band (Fig. 3.11) since ROS disks membrane phospholipids account for  $\sim 66\%$  of the area in these films.

Although water vapor is not very well compensated in the spectra shown in Fig. 3.11, the position of the amide I band is centered at approximately  $1655 \text{ cm}^{-1}$  and there is no obvious sign of denaturation whatever spreading is performed at  $0 \text{ mNm}^{-1}$  or at higher values of initial surface pressure. These data suggest that the presence of lipids surrounding rhodopsin prevent its denaturation upon spreading in monolayers. Moreover, the AI/AII ratio in these films is close to 1 which contrasts with the ratios

observed for pure rhodopsin (compare Fig. 3.11 with Figs. 3.6 and 3.8). This suggests that the orientation of pure rhodopsin in monolayers is very different compared to when it is surrounded by ROS disk membrane phospholipids.

### 3.5 Conclusion

The combination of the measurement of surface pressure isotherms with X-ray reflectivity and PM-IRRAS provide a significant contribution to the improvement of our knowledge of the structural properties of membrane proteins spread in monolayers at the air-water interface. Indeed, molecular information on the secondary structure of rhodopsin has been obtained together with film thickness which allowed a thorough characterization of the behavior of rhodopsin in monolayers. The results demonstrated that the surface pressure of spreading, the temperature and the initial surface pressure during compression are very important parameters to retain the  $\alpha$ -helical secondary structure of rhodopsin. In fact, the experimental conditions widely used to form films of amphiphilic molecules at the air-water interface (low rate of compression, initial low surface pressure prior to compression and others) when applied to rhodopsin lead to the alteration of its secondary structure. In contrast, it was found that spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression on a subphase at  $4^\circ\text{C}$  or compression at a constant surface pressure of at least  $4.5 \text{ mNm}^{-1}$  maintains the native secondary structure of rhodopsin in monolayers. Such conditions could eventually be used to attempt to prepare two-dimensional crystals of rhodopsin.

This paper thus shows evidence that experimental conditions can be found where the secondary structure of membrane proteins such as rhodopsin can be retained when spread in monolayers. The present data together with previous studies (Gallant et al., 1998a) demonstrate that *in situ* infrared spectroscopy can provide direct information on the secondary structure of proteins in such films. Finally, it must be kept in mind that, although we have determined the conditions that retain the native secondary structure of rhodopsin in monolayers which are also likely valid for other G-protein coupled receptors, the present conditions may not work for other types of membrane proteins and the secondary structure of each individual protein must be assessed prior to drawing conclusions on their properties when spread in monolayers.

Moreover, the data obtained with ROS disk membranes open the way to studies using other types of membranes.

### 3.6 *Acknowledgements*

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support. HL also thanks SPPUQTR and FUQTR for a scholarship. CS is a chercheur-boursier senior of the Fonds de recherche en santé du Québec. Ames Laboratory is operated for the U.S. Department of Energy by Iowa State University under Contract No. W-7405-Eng-82. The work at Ames was supported by the Director for Energy Research, Office of Basic Energy Sciences.



### 3.7 References

- Alegria G., P. L. Dutton. 1991. 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., P. S. Pershan. 1983. Synchrotron x-ray diffraction study of liquid surface. *Nucl. Instrum. Methods.* 208:545-548.
- Als-Nielsen J., K. Kjaer. 1989. Phase transitions in soft condensed matter. *Proc. of the NATO Advanced Study Institute.* 211:113-138.
- Amis E. J., D. A. Davenport, H. Yu. 1981. Photopigment content of isolated bovine disk membrane vesicles. *Anal. Biochem.* 114:85-91.
- Arrondo J. L., A. Muga, J. Castresana, F. M. Goni. 1993. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59:23-56.
- Azuma K., M. Takagi. 1966. Rhodopsin film at air-water interface. Annual Report of Biological Works. Osaka: Osaka University. p 1473-1481.
- Blaudez D., T. Buffeteau, J. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pézolet, J. M. Turllet. 1993. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air-water interface. *Applied Spectroscopy.* 47:869-874.
- Blaudez D., J.-M. Turllet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, B. Desbat. 1996. Investigation at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:525-530.
- Blaudez D., F. Boucher, T. Buffeteau, B. Desbat, M. Grandbois, C. Salesse. 1999. Anisotropic Optical Constants of Bacteriorhodopsin in the Mid-Infrared:

Consequence on the Determination of  $\alpha$ -Helix Orientation. *Applied Spectroscopy*. 53:1299-1304.

Calderon R. O., B. Maggio, T. J. Neuberger, G. H. De Vries. 1993. Surface behavior of axolemma monolayers: physico-chemical characterization and use as supported planar membranes for cultured Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* 34:206-218.

Calderon R. O., B. Maggio, T. J. Neuberger, G. H. DeVries. 1995. Modulation of Schwann cell Po glycoprotein and galactocerebroside by the surface organization of axolemma. *J. Neurosci. Res.* 40:349-358.

Castano S., B. Desbat, M. Laguerre, J. Dufourcq. 1999. Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj(i=2j) peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1416:176-194.

Castano S., B. Desbat, J. Dufourcq. 2000. Ideally amphipathic beta-sheeted peptides at interfaces: structure, orientation, affinities for lipids and hemolytic activity of (KL)(m)K peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1463:65-80.

Cornut I., B. Desbat, J. M. Turlet, 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.

Demel R. A., W. S. Geurts van Kessel, R. F. Zwaal, B. Roelofsen, L. L. van Deenen. 1975. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 406:97-107.

Dieudonne D., R. Mendelsohn, R. S. Farid, C. R. Flach. 2001. Secondary structure in lung surfactant SP-B peptides: IR and CD studies of bulk and monolayer phases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1511:99-112.

- Dluhy R., R. Mendelsohn. 1988. Emerging techniques in biophysical FT-IR. *Anal. Chem.* 60:269A-278A.
- Dluhy R. A., K. E. Reilly, R. D. Hunt, M. L. Mitchell, A. J. Mautone, R. Mendelsohn. 1989. Infrared spectroscopic investigations of pulmonary surfactant. Surface film transitions at the air-water interface and bulk phase thermotropism. *Biophys. J.* 56:1173-1181.
- Dousseau F., M. Pézolet. 1990. Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry.* 29:8771-8779.
- Ducharme D., C. Salesse, R. M. Leblanc. 1985. Ellipsometric studies of rod outer segment phospholipids at the nitrogen-water interface. *Thin Solid Films.* 132:83-90.
- Dynarowicz-Latka P., A. Dhanabalan, O. N. Oliveira. 2001. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* 91:221-294.
- Faivre V., P. Manivet, J. C. Callaway, M. M. Airaksinen, H. Morimoto, A. Baszkin, J. M. Launay, V. Rosilio. 2000. Ligand interaction with the purified serotonin transporter in solution and at the air/water interface. *FEBS Lett.* 471:56-60.
- Faivre V., V. Rosilio, P. Manivet, D. Langevin, J. M. Launay, A. Baszkin. 2001. Molecular organization of the human serotonin transporter at the air/water interface. *FEBS Lett.* 492:14-19.
- Fang J. Y., D. F. Gaul, G. Chumanov, T. M. Cotton. 1995. Characterization of photosynthetic reaction centers from *Rhodobactor sphaeroides* at the air-water interface and in Langmuir-Bldgett films. *Langmuir.* 11:4366-4370.
- Fidelio G. D., B. M. Austen, D. Chapman, J. A. Lucy. 1986. Properties of signal-sequence peptides at an air-water interface. *Biochem. J.* 238:301-304.

- Flach C. R., J. W. Brauner, J. W. Taylor, R. C. Baldwin, R. Mendelsohn. 1994. External reflection FTIR of peptide monolayer films in situ at the air/water interface: experimental design, spectra-structure correlations, and effects of hydrogen-deuterium exchange. *Biophys. J.* 67:402-410.
- Flach C. R., F. G. Prendergast, R. Mendelsohn. 1996. Infrared reflection-absorption of melittin interaction with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biophys. J.* 70:539-546.
- Gallant J., B. Desbat, D. Vaknin, C. Salesse. 1998a. Polarization-modulated infrared spectroscopy and x-ray reflectivity of photosystem II core complex at the gas-water interface. *Biophys. J.* 75:2888-2899.
- Gallant J., H. Lavoie, A. Tessier, G. Munger, R. M. Leblanc, C. Salesse. 1998b. Surface and spectroscopic properties of photosystem II core complex at the nitrogen/water interface. *Langmuir.* 14:3954-3963.
- Goormaghtigh E., V. Cabiaux, J. M. Ruyschaert. 1994. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Subcell. Biochem.* 23:329-362.
- Hirata Y., K. Nukanobu, M. Hara, Y. Asada, J. Miyake, M. Fujihira. 1992. Preparation of stable Langmuir-Blodgett films of photosynthetic bacterial reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* using poly-L-lysine. *Chem. Lett.* 12:2277-2280.
- Hwang S. B., J. I. Korenbrot, W. Stoeckenius. 1977a. Proton transport by bacteriorhodopsin through an interface film. *J. Membr. Biol.* 36:137-158.
- Hwang S. B., J. I. Korenbrot, W. Stoeckenius. 1977b. Structural and spectroscopic characteristics of bacteriorhodopsin in air-water interface films. *J. Membr. Biol.* 36:115-135.
- James S. R., R. A. Demel, C. P. Downes. 1994. Interfacial hydrolysis of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by turkey erythrocyte phospholipase C. *Biochem. J.* 298 (Pt 2):499-506.

- Kaganer V. M., H. Mohwald, P. Dutta. 1999. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. *Reviews of Modern Physics*. 71:779-820.
- Kanno T., M. Setaka, T. Hongo, T. Kwan. 1983. Spontaneous formation of a monolayer membrane from sarcoplasmic reticulum at an air-water interface. *J. Biochem. (Tokyo)*. 94:473-477.
- Karan H. I., S. S. Brody. 1975. Studies on fragments of rod outer segments from bovine retinas. *Z Naturforsch [C]*. 30:796-799.
- Karan H. I., R. E. Hirsch, S. S. Brody. 1978. Stability and regeneration of rhodopsin absorption spectra at an air-water interface. *Z Naturforsch [C]*. 33:317-320.
- Korenbrodt J. I., M. J. Pramik. 1977. Formation, structure, and spectrophotometry of air-water interface films containing rhodopsin. *J. Membr. Biol.* 37:235-262.
- Korenbrodt J. I., O. Jones. 1979. Linear dichroism of rhodopsin in air-water interface films. *J. Membr. Biol.* 46:239-254.
- Korenbrodt J. I., S. B. Hwang. 1980. Proton transport by bacteriorhodopsin in planar membranes assembled from air-water interface films. *J. Gen. Physiol.* 76:649-682.
- Krimm S., J. Bandekar. 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein. Chem.* 38:181-364.
- Lavoie H, Gallant J, Grandbois M, Blaudez D, Desbat B, Boucher F, Salesse C. 1999. The behavior of membrane proteins in monolayers at the gas-water interface: comparison between photosystem II, rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Materials Science and Engineering C* 10:147-154.
- Litman B. J. 1982. Purification of rhodopsin by concanavalin A affinity chromatography. *Methods Enzymol* 81:150-153.

- MacRitchie F. 1986. Spread monolayers of proteins. *Adv. Colloid Interface Sci.* 25:341-385.
- Maxia L., G. Radicchi, I. M. Pepe, C. Nicolini. 1995. Characterization of Langmuir-Blodgett films of rhodopsin: thermal stability studies. *Biophys. J.* 69:1440-1446.
- Méthot M., F. Boucher, C. Salesse, M. Subirade, M. Pézolet. 1996. Determination of bacteriorhodopsin orientation in monolayers by infrared spectroscopy. *Thin Solid Films.* 284-285:627-630.
- Miljanich G. P., P. P. Nemes, D. L. White, E. A. Dratz. 1981. The asymmetric transmembrane distribution of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and fatty acids of the bovine retinal rod outer segment disk membrane. *J. Membr. Biol.* 60:249-255.
- Min J., H. G. Choi, B. K. Oh, W. H. Lee, S. H. Paek, J. W. Choi. 2001. Visual information processing using bacteriorhodopsin-based complex LB films. *Biosens. Bioelectron.* 16:917-923.
- Ocko B. M., X. Z. Wu, E. B. Sirota, S. K. Sinha, M. Deutsch. 1994. X-ray reflectivity study of thermal capillary waves on liquid surfaces. *Phys. Rev. Lett.* 72:242-245.
- Oliveira R. G., R. O. Calderon, B. Maggio. 1998. Surface behavior of myelin monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1370:127-137.
- Palczewski K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 289:739-745.
- Parratt L. G. 1954. Surface studies of solids by total reflection of x-rays. *Phys. Rev.* 59:359-369.

- Pattus F., P. Desnuelle, R. Verger. 1978a. Spreading of liposomes at the air/water interface. *Biochim. Biophys. Acta.* 507:62-70.
- Pattus F., M. C. Piovant, C. J. Lazdunski, P. Desnuelle, R. Verger. 1978b. Spreading of biomembranes at the air/water interface. *Biochim. Biophys. Acta.* 507:71-82.
- Pattus F., C. Rothen, M. Streit, P. Zahler. 1981. Further studies on the spreading of biomembranes at the air/water interface: Structure, composition, enzymatic activities of human erythrocyte and sarcoplasmic reticulum membrane films. *Biochim. Biophys. Acta.* 647:29-39.
- Pepe I. M., L. Maxia, C. Nicolini. 1996. Properties of Langmuir-Blodgett films of rhodopsin. *Thin Solid Films.* 284-285:739-742.
- Pistorius A. M., W. J. de Grip. 1994. Rhodopsin's secondary structure revisited: assignment of structural elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:1040-1045.
- Rothschild K. J., W. J. DeGrip, R. Sanches. 1980. Fourier transform infrared study of photoreceptor membrane. I. Group assignments based on rhodopsin delipidation and reconstitution. *Biochim. Biophys. Acta.* 596:338-351.
- Salesse C., F. Boucher, R. M. Leblanc. 1984. An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes. *Anal. Biochem.* 142:258-266.
- Salesse C., R. M. Leblanc, Y. Kito. 1988. Lipid contamination of disks depends on rod outer-segment purity. *Exp. Eye Res.* 46:285-287.
- Salesse C., D. Ducharme, R. M. Leblanc, F. Boucher. 1990. 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.* 29:4567-4575.

- Schurholz T., H. Schindler. 1991. Lipid-protein surface films generated from membrane vesicles: selfassembly, composition, and film structure. *Eur. Biophys. J.* 20:71-78.
- Seelig A. 1987. Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 899:196-204.
- Smith H. G., Jr., B. J. Litman. 1982. Preparation of osmotically intact rod outer segment disks by Ficoll flotation. *Methods Enzymol.* 81:57-61.
- Surewicz W. K., H. H. Mantsch, D. Chapman. 1993. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry.* 32:389-394.
- Teller D. C., T. Okada, C. A. Behnke, K. Palczewski, R. E. Stenkamp. 2001. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry.* 40:7761-7772.
- 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.
- Ulrich W. P., H. Vogel. 1999. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers at the air/water interface. *Biophys. J.* 76:1639-1647.
- Uphaus R. A., J. Y. Fang, R. Picorel, G. Chumanov, J. Y. Wang, T. M. Cotton, 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.



- Vaknin D. 2001. X-ray diffraction techniques to characterize liquid surfaces and monomolecular layers at gas-liquid interfaces. In: Kaufmann EN, editor. *Methods in Materials Research*. New York: John Wiley & Sons. p 10d.2.1-10.d.2.21.
- Verclas S. A., P. B. Howes, K. Kjaer, A. Wurlitzer, M. Weygand, G. Buldt, N. A. Dencher, M. Losche. 1999. X-ray diffraction from a single layer of purple membrane at the air/water interface. *J. Mol. Biol.* 287:837-843.
- Volkov V., Y. P. Svirko, V. F. Kamalov, L. Song, M. A. El-Sayed. 1997. Optical rotation of the second harmonic radiation from retinal in bacteriorhodopsin monomers in Langmuir-Blodgett film: evidence for nonplanar retinal structure. *Biophys. J.* 73:3164-3170.
- Vollhardt D., V. B. Fainerman. 2000. Penetration of dissolved amphiphiles into two-dimensional aggregating lipid monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* 86:103.
- Wu F., C. Flach, B. Seaton, T. Mealy, R. Mendelsohn. 1999. Stability of annexin V in ternary complexes with Ca<sup>2+</sup> and anionic phospholipids: IR studies of monolayer and bulk phases. *Biochemistry.* 38:792-799.

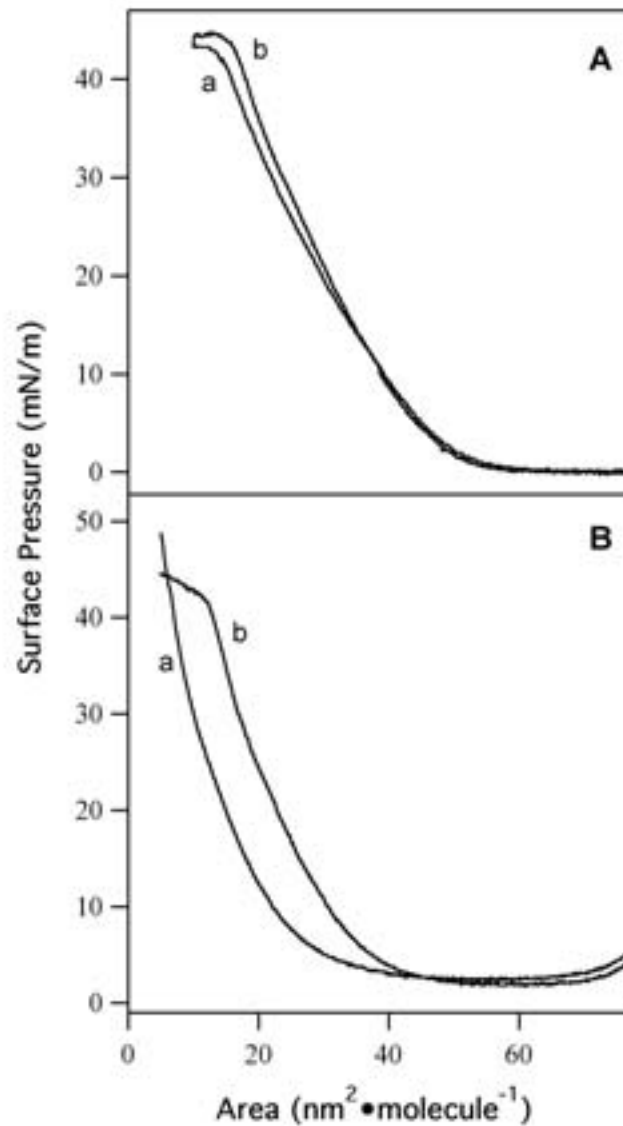


Figure 3.1: Surface pressure isotherms of pure rhodopsin at the air water interface. (A) Spreading at 0 mNm<sup>-1</sup> followed by a 30 min incubation time; compression speed is 1 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup>•minute<sup>-1</sup>; subphase temperature is 4°C (curve a) and 21°C (curve b). (B) Spreading at 5 mNm<sup>-1</sup> followed by an immediate compression; compression speed is 4.5 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup>• minute<sup>-1</sup>; subphase temperature is 4°C (curve a) and 21°C (curve b). Subphase contains 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) and 100 mM NaCl.

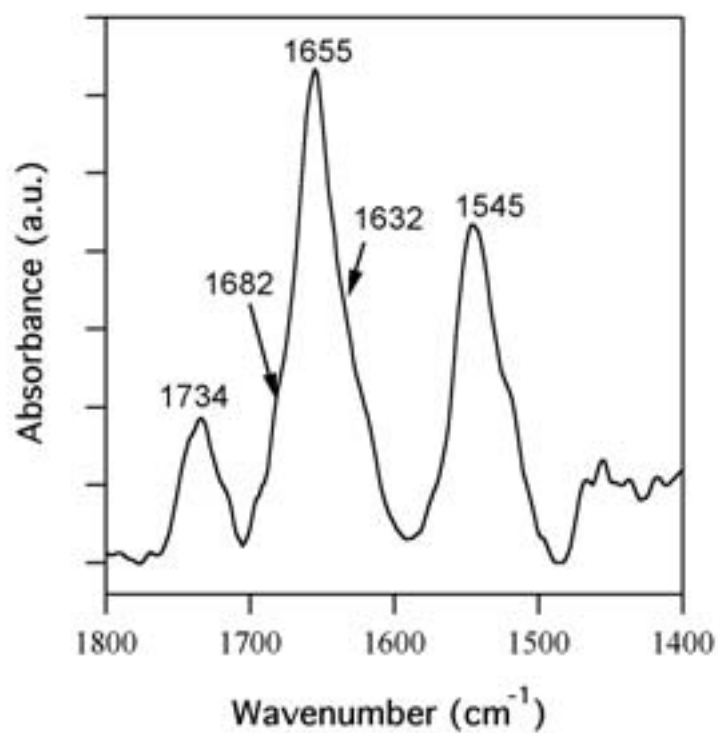


Figure 3.2: FTIR spectrum of the rod outer segment disk membranes in solution from 1400-1800  $\text{cm}^{-1}$  at room temperature between two  $\text{CaF}_2$  windows with a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . Spectrum was obtained with 300 scans for both the sample and the reference using a Nicolet 850.

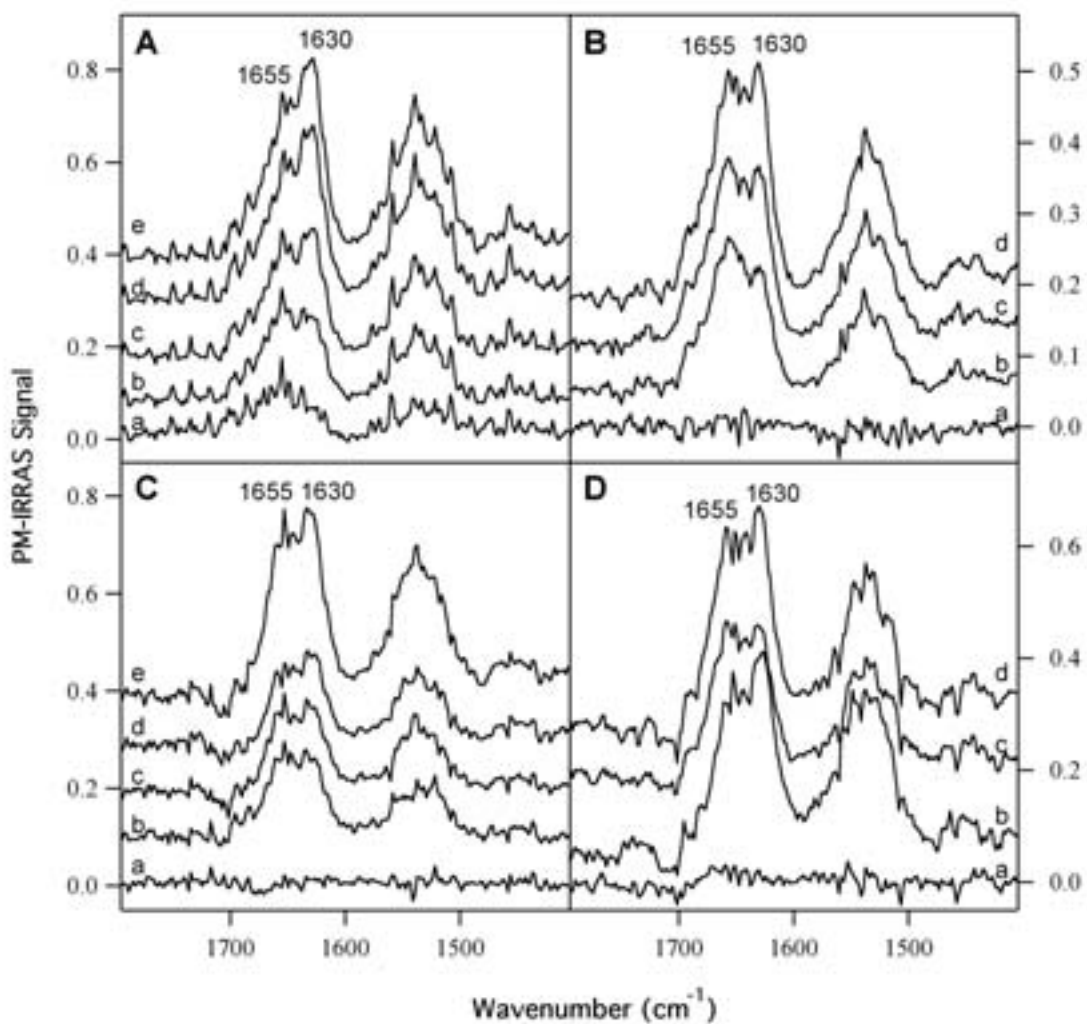


Figure 3.3: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. (**A** and **B**) Spreading at  $0 \text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time. (**C** and **D**) Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by a 30 min incubation time. Compression speed is  $1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (**A** and **C**) and  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (**B** and **D**). Spectra a to e were measured at 0, 10, 20, 30 and  $40 \text{ mNm}^{-1}$ , respectively (**A** and **C**). Spectra a to d were measured at 0, 10, 20 and  $30 \text{ mNm}^{-1}$ , respectively (**B** and **D**). Subphase is the same as in Fig. 3.1.

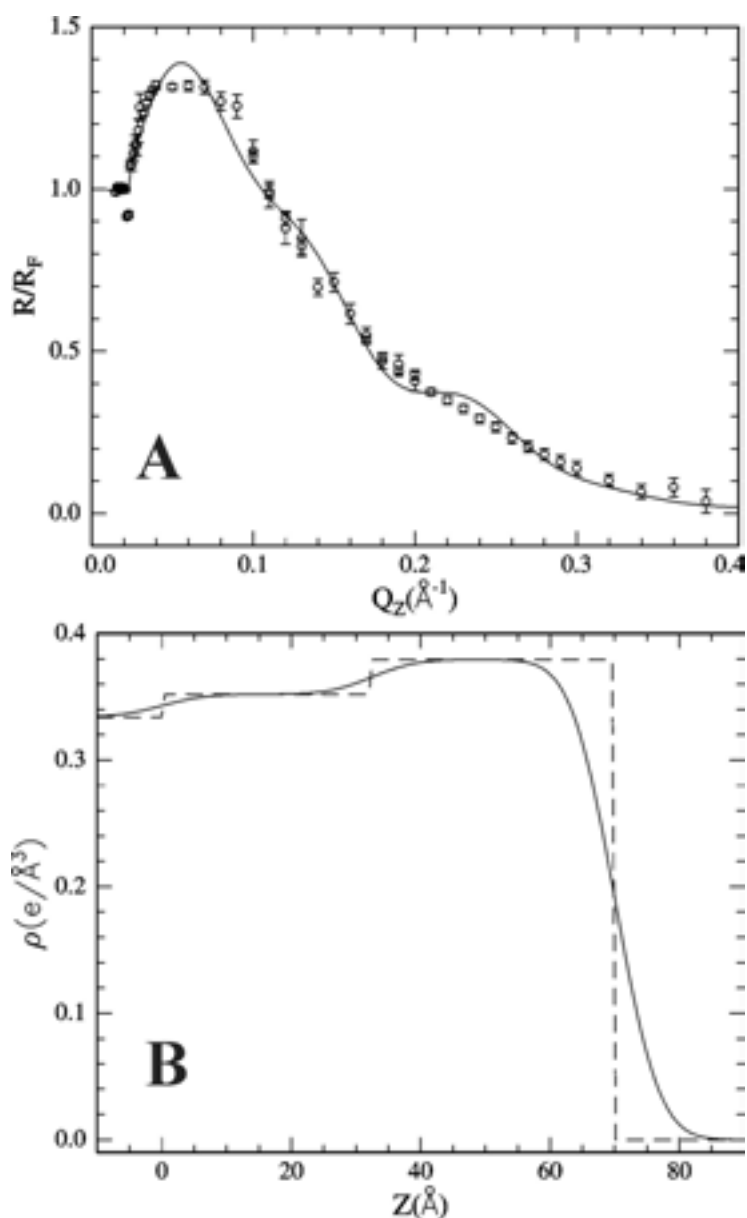


Figure 3.4 : (A) X-ray reflectivity (normalized to the Fresnel reflectivity  $R_F$  of ideally flat subphase) versus momentum transfer  $Q_z$  of a rhodopsin monolayer at  $11.7 \text{ mNm}^{-1}$ . The solid line is the calculated reflectivity obtained from the scattering length density profile shown as a solid line in (B). The dotted line in (B) corresponds to the box model that is smeared by a Gaussian to give the solid curve. Subphase is the same as in Fig. 3.1.

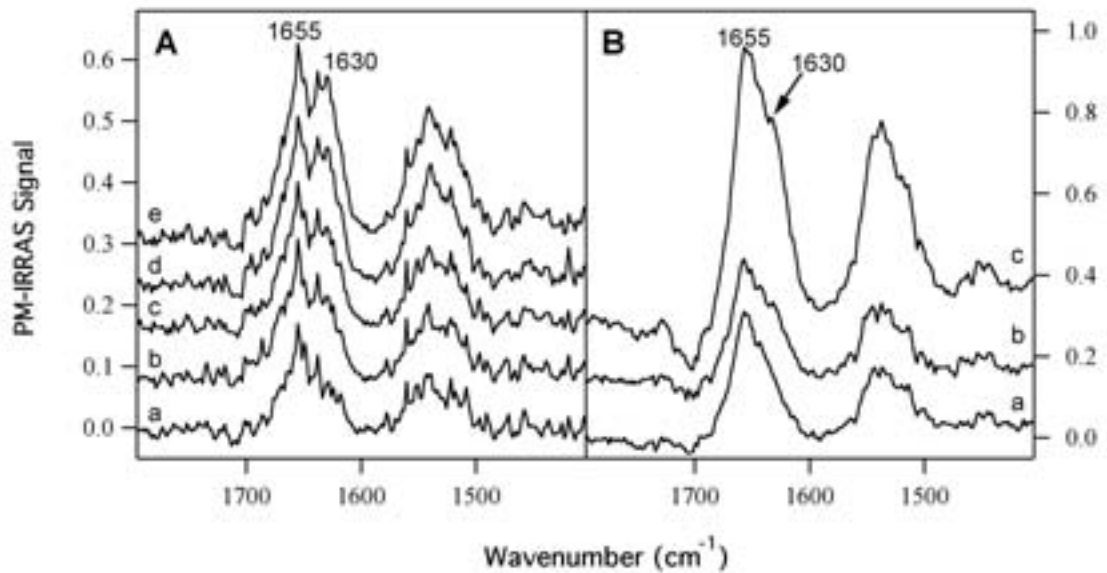


Figure 3.5: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. **(A)** Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , Spectra a to e were measured, respectively, at 0, 10, 20, 30 and  $40 \text{ mNm}^{-1}$ . **(B)** Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Spectra a to c were measured at, respectively, 10, 20 and  $30 \text{ mNm}^{-1}$ . Subphase is the same as in Fig. 3.1.

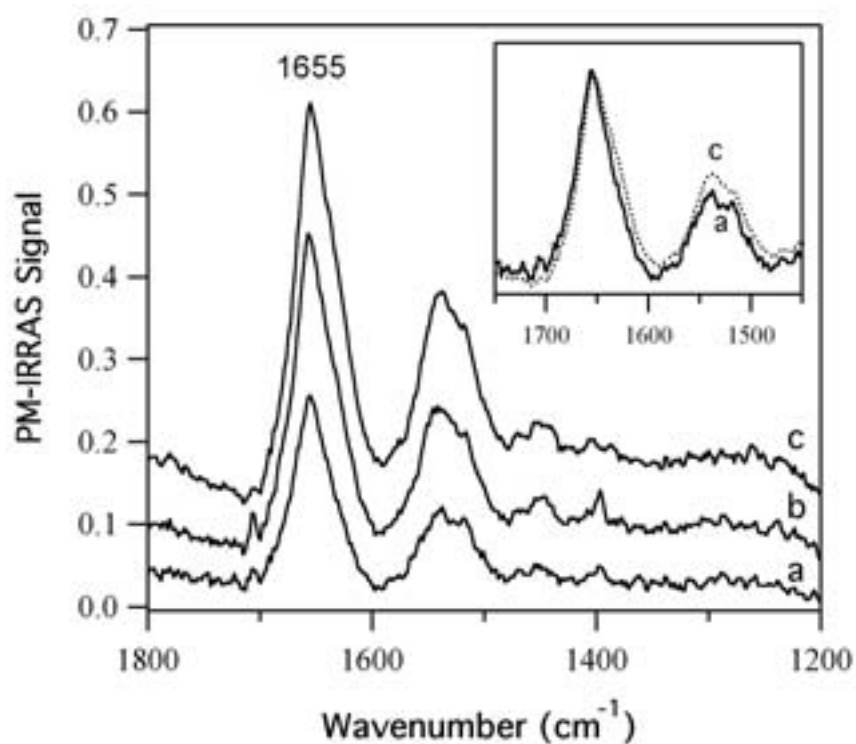


Figure 3.6: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. Spreading at  $10 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , Spectra a to c were measured, respectively, at 10, 20 and  $30 \text{ mNm}^{-1}$ . In the inset, the spectra at 10 (a, solid line) and 30 (c, dotted line)  $\text{mNm}^{-1}$  were normalized using the amide I band. Subphase is the same as in Fig. 3.1.

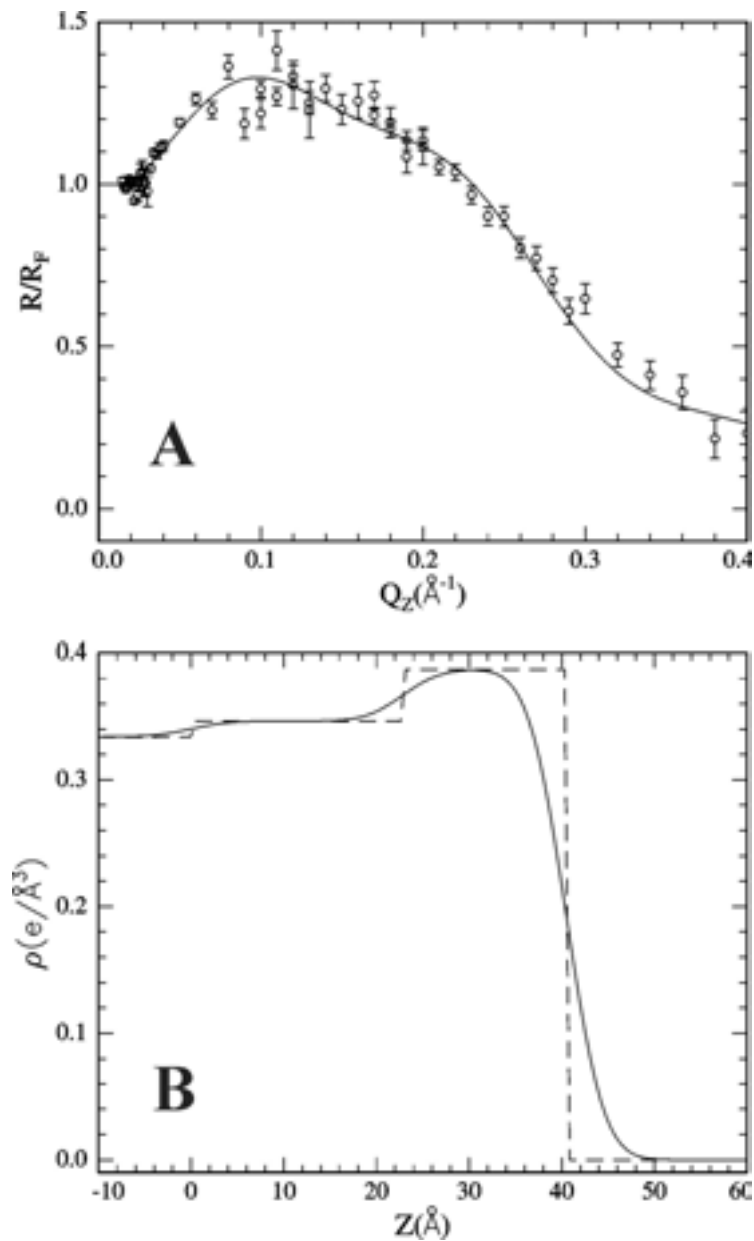


Figure 3.7: **(A)** X-ray reflectivity (normalized to the Fresnel reflectivity  $R_F$  of ideally flat subphase) versus momentum transfer  $Q_z$  of a rhodopsin monolayer at  $21 \text{ mNm}^{-1}$ . The solid line is the calculated reflectivity obtained from the scattering length density profile shown as a solid line in **(B)**. The dotted line in **(B)** corresponds to the box model that is smeared by a Gaussian to give the solid curve. Subphase is the same as in Fig. 3.1.



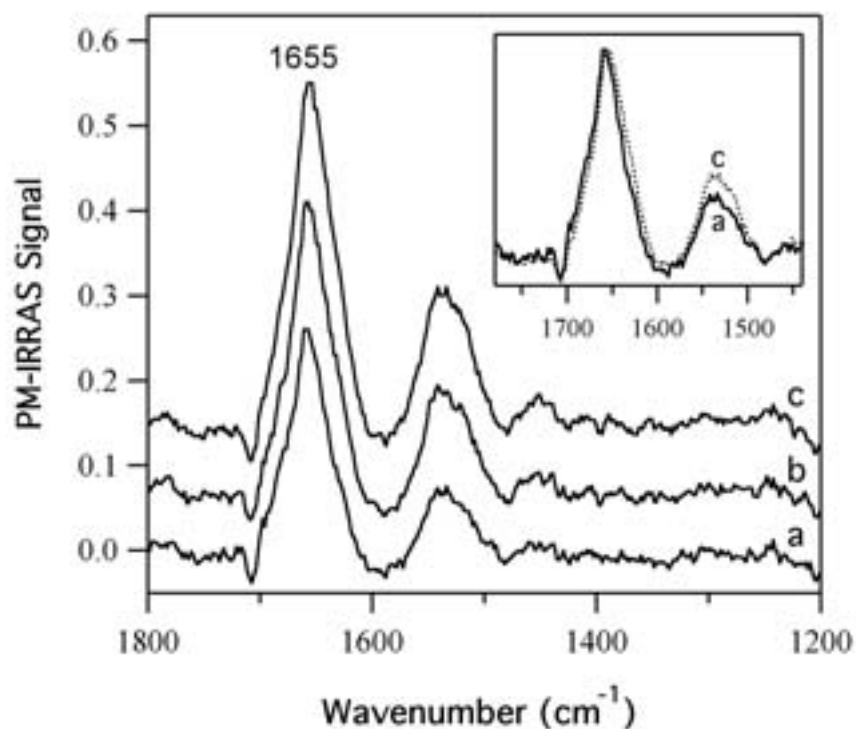


Figure 3.8: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin in monolayers at different surface pressures. Spreading at 5 mNm<sup>-1</sup> followed by an immediate compression at a speed of 4.5 nm<sup>2</sup>•molecule<sup>-1</sup>•min<sup>-1</sup> on a subphase at 4°C. Spectra a to c were measured, respectively, at 10, 20 and 30 mNm<sup>-1</sup>. In the inset, the spectra at 10 (a, solid line) and 30 (c, dotted line) mNm<sup>-1</sup> were normalized using the amide I band. Subphase is the same as in Fig. 3.1.

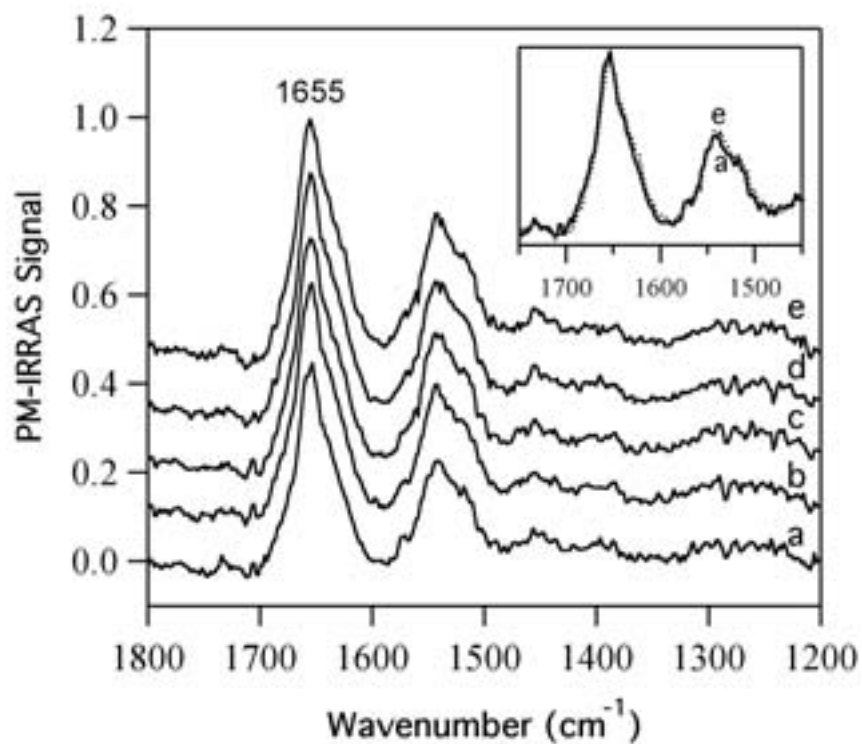


Figure 3.9: PM-IRRAS spectra of pure rhodopsin measured as a function of time. Spreading at  $5 \text{ mNm}^{-1}$  followed by an immediate compression at a speed of  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  on a subphase at  $4^\circ\text{C}$  until a surface pressure of  $20 \text{ mNm}^{-1}$  is reached. Spectra a to e were measured, respectively, at 0, 30, 60, 90 and 120 min. In the inset, the spectra at 0 (a, solid line) and 120 (e, dotted line) min were normalized using the amide I band. Subphase is the same as in Fig. 3.1.

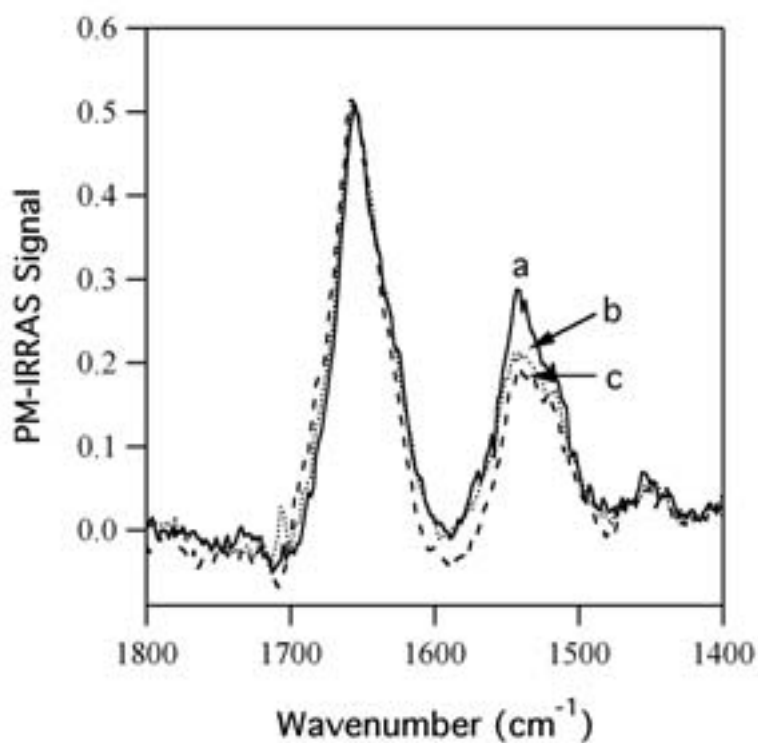


Figure 3.10: Normalized PM-IRRAS spectra of rhodopsin at 20 mNm<sup>-1</sup> using the amide I band. Spectrum a (solid line) is the spectrum at 120 min in Fig. 3.9 whereas spectra b (dotted line) and c (broken line) are the spectra at 20 mNm<sup>-1</sup> in Figs. 3.6 and 3.8, respectively. Spectra were normalized using the amide I band. Subphase is the same as in Fig. 3.1.

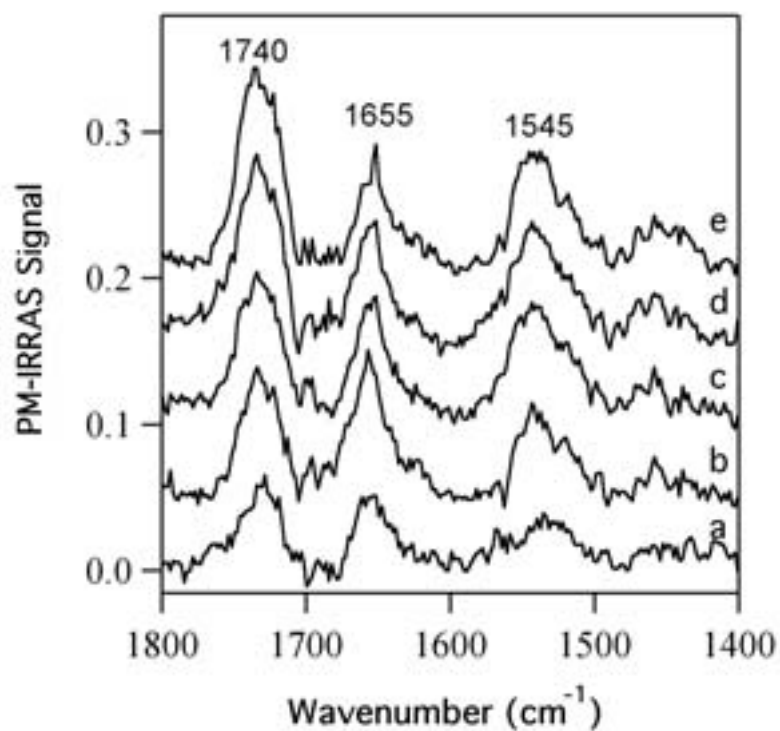


Figure 3.11: PM-IRRAS spectra of ROS disk membranes at different surface pressures. Spectra a to e were measured, respectively, at 0, 10, 20, 30 and 40 mNm<sup>-1</sup> on a subphase at 21°C. Compression speed is 10 cm<sup>2</sup>·min<sup>-1</sup>. Subphase is the same as in Fig. 3.1.

## **CHAPITRE 4**

**The behavior of membrane proteins in monolayers at the gas-water interface:  
comparison between photosystem II, rhodopsin and bacteriorhodopsin**

Publié dans la revue

Materials Science and Engineering C

(1999) 10, 147-154

## Résumé

Dans l'étude qui suit, l'effet de différentes conditions expérimentales sur la structure secondaire de trois protéines membranaires en monocouche *in situ* à l'interface air-eau a été étudié par spectroscopie PM-IRRAS. Nous avons constaté que le photosystème II core complex (PSIICC) est moins sensible à la dénaturation que la rhodopsine. En fait, l'étalement de la rhodopsine à basse température était nécessaire pour éviter qu'elle ne se dénature. Au contraire, la bactériorhodopsine (bR) s'est avéré très stable même dans des conditions qui ne peuvent maintenir la structure secondaire du PSIICC et de la rhodopsine. Ce comportement s'explique par le fait que la bR se retrouve naturellement sous la forme d'un cristal bidimensionnel et que cette structure est très stable. En conclusion, des conditions expérimentales peuvent être trouvées permettant de maintenir la structure secondaire native de protéines membranaires lorsqu'elles sont étalées à l'interface air-eau.

**THE BEHAVIOR OF MEMBRANE PROTEINS IN MONOLAYERS AT THE GAS-WATER INTERFACE: COMPARISON BETWEEN PHOTOSYSTEM II, RHODOPSIN AND BACTERIORHODOPSIN**

**Hugo Lavoie<sup>†</sup>, Judith Gallant<sup>†</sup>, Michel Grandbois<sup>†</sup>, Daniel Blaudez<sup>#</sup>, Bernard Desbat<sup>§</sup>, François Boucher<sup>†</sup> and Christian Salessé<sup>†\*</sup>**

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

<sup>#</sup>Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne, UMR 5798,

<sup>§</sup>Laboratoire de Physicochimie Moléculaire, UMR 5803

Université de Bordeaux I, 33405 Talence, France

\*Telephone number: (819) 376-5077

Fax number: (819) 376-5057

e-mail: christian\_salessé@uqtr.quebec.ca

**Keywords:** PM-IRRAS; photosystem II; rhodopsin; bacteriorhodopsin; protein secondary structure; monolayers

**Running title:** Monolayers of membrane proteins

#### 4.1 Abstract

It has been postulated for decades that proteins are denatured once spread in monolayers at the gas-water interface without supporting evidence. In the present study, the effect of different experimental conditions on the structure of three membrane proteins has been investigated by polarization modulated infrared reflection absorption spectroscopy *in situ* in monolayers at the gas-water interface. We have found that photosystem II core complex (PS II CC) is less sensitive to denaturation than rhodopsin. In fact, spreading of rhodopsin at low temperature was necessary to avoid its denaturation. In contrast, bacteriorhodopsin was found to remain native when monolayer spreading was performed in conditions that were found to denature both PS II CC and rhodopsin. This behavior may be explained by the two-dimensional crystalline structure of bacteriorhodopsin. In conclusion, conditions can be found where the native structure of membrane proteins is maintained after their spreading in monolayers at the gas-water interface.



## 4.2 Introduction

Spreading of proteins in monolayers at the air-water interface was long thought to result in protein denaturation where hydrophilic and hydrophobic amino acids would partition, respectively, in the aqueous subphase and in the air<sup>1</sup>. However, no direct evidence was provided to support this assertion. The recent development of very sensitive Fourier transform infrared (FTIR) spectrometers has allowed the characterization of monolayers at the air-water interface<sup>2,3</sup>. The subtraction of the bare subphase signal from that of the monolayer<sup>2</sup> or the use of a polarization modulation<sup>3</sup> has enabled to eliminate the strong infrared water vapor absorption bands and thus permitted to observe the protein amide bands. It is well known that the position of these bands allows the evaluation of protein secondary structure<sup>4</sup>. In the present work, polarization modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) was used to study the effect of different spreading conditions on the structure of three membrane proteins in monolayers at the gas-water interface.

Photosystem II core complex (PS II CC) is a pigment-protein complex located in higher plant thylakoid membranes, and is involved in the electron transport of the photosynthetic process<sup>5-7</sup>. PS II CC is the protein complex responsible for the photoinduced water oxidation which produces molecular oxygen as a byproduct. This protein complex consists of several hydrophobic and integral membrane polypeptides whose transmembrane spanning domains are believed to be mainly composed of  $\alpha$ -helices<sup>8</sup>. Integral polypeptides of PS II CC include the 32 and 34 kDa reaction center (RC) proteins known as D1 and D2, the RC cytochrome (cyt)  $b_{559}$ , containing two subunits of 9 and 4 kDa<sup>9</sup>, the chlorophyll-binding internal antenna proteins CP47 and CP43 (approximately 47 and 43 kDa, respectively), and a number of smaller proteins of known sequence 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<sup>10</sup>. This 33 kDa extrinsic polypeptide is necessary for stable oxygen evolution rates. PS II CC also binds different cofactors and pigments, among which chlorophylls (chls), pheophytins and carotenoids.

Rhodopsin (Rho) is the light receptor in vertebrate retina. It is found in the outer segments of rod photoreceptors where it constitutes approximately 80% of the protein<sup>11</sup>. It is a member of the large family of G-protein coupled membrane receptors containing 7  $\alpha$ -helices<sup>12</sup>. Its chromophore, 11-cis retinal, is covalently bound to lysine 296 through a Schiff base linkage<sup>13</sup>. Rho is covalently modified by the addition of two N-linked oligosaccharides at asparagines 2 and 15<sup>14</sup>, by palmitoylation at cysteines 322 and 323<sup>15</sup>, and by reversible light-dependent phosphorylation of up to seven serines and threonines near the carboxy terminus<sup>16</sup>. An essential disulfide bond has also been identified between cysteines 110 and 187<sup>17</sup>. At present, no high resolution three-dimensional model exists for rhodopsin or any other G-protein coupled receptor. However, the construction of a reasonably accurate low-resolution model of Rho was made possible on the basis of electron cryomicroscopy experiments<sup>18,19</sup>.

Bacteriorhodopsin (bR) is the single protein found in the purple membranes of the halophilic bacteria *H. halobium*<sup>20</sup> in which it exists as a two-dimensional crystal<sup>21,22</sup>. bR is similar to rhodopsin as it also contains 7 transmembrane alpha helices and its chromophore, all-trans retinal, is covalently linked to the protein backbone via a Schiff's base at lysine 216<sup>20</sup>. However, the detailed arrangement of the helices in Rho and bR is significantly different, despite a similar overall membrane topology<sup>18,19</sup>. A detailed structural model has been described for bR from high resolution electron cryomicroscopy<sup>22</sup> which has been used as a model for G-protein coupled receptors. In addition, high resolution structural models obtained by electron and X-ray diffraction are now available<sup>23,24</sup>. Moreover, its function is very different from that of rhodopsin as it is essentially responsible for direct transduction of light energy into transmembrane electrochemical energy<sup>25,26</sup>.

In this paper, we demonstrate the effect of different experimental conditions on PS II CC, Rho and bR secondary structure *in situ* in monolayers at the gas-water interface by PM-IRRAS. The intensity and position of PS II CC, Rho and bR amide I and II bands were used to get insight into  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet content of these proteins in monomolecular films.

### 4.3 Materials and Methods

#### 4.3.1 Purification of Photosystem II Core Complex

PS II CC was extracted and purified from fresh spinach leaves using the method of van Leeuwen et al.<sup>27</sup> with slight modifications as described by Gallant et al.<sup>28</sup>. Several methods were used to characterize PS II CC and to evaluate its integrity. Chl concentration was measured by absorption spectroscopy as described by Porra et al.<sup>29</sup>. The chl *a*/chl *b* ratio of PS II CC samples was 11. Samples showing lower chl *a*/chl *b* ratio were discarded since the presence of higher amounts of chl *b* indicates that CP29, a PS II associated intermediate antenna, was contaminating the samples. Functional intactness was verified by measurement of light-saturated oxygen evolution rates using a Clark-type electrode at 20°C as described previously<sup>28</sup>. Samples showing oxygen evolution rates lower than 1000  $\mu\text{mol O}_2/\text{mg chl h}$  were discarded. The concentration of PS II CC samples was determined by its cyt  $b_{559}$  content, as described by De Las Rivas et al.<sup>30</sup>.

#### 4.3.2 Purification of Rhodopsin

Rod outer segments were purified by sucrose density centrifugation as described by Salesse et al.<sup>31</sup>. Rod outer segments were then solubilized in amnonyx LO (ALO) and rhodopsin was purified by concanavalin affinity chromatography using octyl glucoside instead of ALO<sup>32</sup>. A value of  $A_{280}/A_{500\text{nm}}$  ratio of 1.8 was obtained for the purity of rhodopsin which is comparable to published data<sup>32</sup>. The concentration of the samples was determined by absorption spectroscopy using an extinction coefficient of 40 000  $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  at 500 nm.

#### 4.3.3 Purification of Purple Membranes

Purple membranes were purified from *H. halobium* as described by Kates et al.<sup>33</sup> and then stored in 4.3 M NaCl, 27 mM KCl and 81 mM  $\text{MgSO}_4$  at 4°C until use. Prior to monolayer measurements, an aliquot of this suspension was withdrawn and washed

three times by centrifugation in pure water. Purple membranes were then resuspended in pure water at a  $10^{-5}$  M concentration using an extinction coefficient of  $58\,000\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  at 568 nm for light-adapted bR.

#### 4.3.4 *Film Formation*

The specific resistivity of ultrapure water was  $18 \times 10^6\ \Omega \cdot \text{cm}$ . In all reported experiments, the subphase used for spreading PS II CC contained 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer at pH 8, 500 mM NaCl and 2 mM ascorbic acid. Rho and bR were respectively spread on 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) and on 40 mM carbonate buffer (pH 9.0) both containing 100 mM NaCl. The presence of NaCl is essential for the formation of monolayers of membrane proteins<sup>34</sup>. In fact, in the absence of NaCl, no isotherm can be measured unless a very large amount of proteins is spread. Tris and NaCl were purified by chloroform extraction<sup>35</sup>. The method of Trurnit<sup>36</sup> was used to spread drops of PS II CC and Rho at the gas-water interface whereas dropwise spreading was used for bR. All experiments were performed under dim green light for PS II CC, dim red light for Rho and room light for bR. In all calculations, we used a molecular mass of 240 kDa for PS II CC, 42 kDa for Rho and 26 kDa for bR.

#### 4.3.5 *PM-IRRAS Measurements*

The home-made Langmuir trough used in the PM-IRRAS was described elsewhere<sup>35</sup>. The sample concentration used in PM-IRRAS measurements was  $12.7 \times 10^{-6}$  M for PS II CC and  $1 \times 10^{-5}$  M for Rho and bR. Two initial surface pressures of 0.6 and 5.7  $\text{mNm}^{-1}$  were studied for PS II CC and 0 and 5  $\text{mNm}^{-1}$  for Rho whereas only an initial surface pressure of 0  $\text{mNm}^{-1}$  was used for bR. Compression rates of 10, 40 and 80  $\text{nm}^2/\text{molecule} \cdot \text{min}$  for PS II CC, 1 and 4.5  $\text{nm}^2/\text{molecule} \cdot \text{min}$  for Rho and 0.7  $\text{nm}^2/\text{molecule} \cdot \text{min}$  for bR were investigated. When PS II CC and Rho were spread at (or close to) 0  $\text{mNm}^{-1}$ , the monolayer was incubated for 30 min before compression compared to 50 min for bR. Monolayers were always kept under nitrogen to prevent hazardous contact of molecular oxygen with our sample and temperature was

maintained at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  for PS II CC and  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  for Rho and bR, unless otherwise stated. The complete optical set up and equations for PM-IRRAS measurements were described previously<sup>3</sup>.

#### 4.4 Results and Discussion

##### 4.4.1 Effect of Spreading of PS II CC and Rho at a Surface Pressure of 5 mNm<sup>-1</sup> on their Structure

To maintain the integrity of PS II CC and Rho in monolayers, we have spread these proteins at an initial surface pressure of 5.7 and 5 mNm<sup>-1</sup>, respectively, and compressed the films immediately. Figures 4.1A and 4.1B show PM-IRRAS spectra of PS II CC and Rho obtained at a compression speed of 10 and 4.5 nm<sup>2</sup>/molecule·min, respectively. The PM-IRRAS spectra of PS II CC are similar to published FTIR spectra of PS II RC which contain 67%  $\alpha$ -helices<sup>37</sup> as well as to infrared spectra of native PS II membrane particles<sup>38,39</sup> and to the ATR spectrum of PS II CC<sup>35</sup>. All spectra show the C=O ester carbonyl band at 1737 cm<sup>-1</sup>, due to chlorophylls and lipids. Also, all spectra show an amide I band centered at approximately 1655 cm<sup>-1</sup> indicating that the structure of PS II CC mainly contains  $\alpha$ -helices. In addition, a small shoulder appearing at approximately 1630 cm<sup>-1</sup> can be observed in all spectra indicating the presence of a certain amount of  $\beta$ -sheets in PS II CC. It thus appears that the structure of PS II CC remains intact when spread at an initial surface pressure of 5.7 mNm<sup>-1</sup>. The PM-IRRAS spectra of Rho in Figure 4.1B show an amide I band centered at 1655 cm<sup>-1</sup> and a shoulder at 1634 cm<sup>-1</sup> which suggest that Rho, in these conditions, contains  $\alpha$ -helices and a significant amount of  $\beta$ -sheets. In fact, when comparing these spectra to the FTIR spectra of native Rho published by Rothschild et al.<sup>40</sup>, a stronger component at 1634 cm<sup>-1</sup> can be seen in Figure 4.1B compared to native Rho, thus indicating the presence of a larger content of  $\beta$ -sheets when spread in monolayers. These data thus suggest that Rho is partially denatured when spread at 5 mNm<sup>-1</sup> and that it is more sensitive than PS II CC to denaturation.

Compression speed has very different effects on PS II CC and Rho. PS II CC was shown to be almost insensitive to compression speed when spread at 5.7 mNm<sup>-1</sup>. Indeed, the overall shape of the spectra at compression speeds of 40 and 80 nm<sup>2</sup>/molecule·min remains almost unchanged<sup>35</sup> compared to those shown in Figure

4.1A. In contrast, compression speed has a strong effect on the shape of the amide I and II bands in the spectra of Rho. Indeed, obvious signs of denaturation can be seen when compression speed is decreased down to 1 nm<sup>2</sup>/molecule·min (figure not shown; these spectra are very similar as those shown in Figure 4.3B).

#### 4.4.2 *Effect of Increasing Surface Pressure on the Structure of PS II CC and Rho*

PM-IRRAS signal in Figures 4.1A and 4.1B increased with surface pressure, suggesting an increase in PS II CC and Rho surface concentration. We examined the possibility of structural and orientation changes in PS II CC and Rho upon compression to higher surface pressures. The amide I/amide II ratio (AI/AII) was used to estimate the relative orientation changes of PS II CC and Rho taking place as a function of surface pressure. Indeed, it was previously reported<sup>41</sup> that AI/AII ratio varies from 6.5 to -1 when  $\alpha$ -helices are oriented parallel and perpendicular to the gas-water interface, respectively. Although the AI/AII ratio does not change linearly with  $\alpha$ -helix angle, on the average, a variation of one unity in AI/AII corresponds to a 12° change in orientation. To visualize those changes, if any, we compared normalized spectra, at 10 and 30 mNm<sup>-1</sup>, of PS II CC and Rho monolayers when spread under similar conditions. Examples of this comparison are shown in Figures 4.2A and 4.2B. The higher noise level in the 10 mNm<sup>-1</sup> spectrum (spectrum a, Figures 4.2A and 4.2B) is due to the reduced protein interfacial concentration at this surface pressure. It can be seen that the shape of the amide I and II bands of PS II CC and Rho is very similar at both surface pressures. Also, the AI/AII ratio of PS II CC is very similar at these two surface pressures (see Figure 4.2A). However, in the case of Rho, the AI/AII ratio varies with surface pressure (see Figure 4.2B). Indeed, a ratio of 1.37 and 1.79 is obtained at 10 and 30 mNm<sup>-1</sup>, respectively. It is thus clear from these spectra that compression to higher surface pressures did not affect the  $\alpha$ -helix content of PS II CC and Rho neither the orientation of PS II CC with respect to the interface normal. However, the orientation of Rho slightly changes when increasing the surface pressure.

#### 4.4.3 *Effect of Low Surface Pressure Incubation on the Structure of PS II CC and Rho*

Many publications discussed the denaturation of bacterial RC or PS II RC<sup>42-45</sup>, Rho<sup>46</sup> and bR<sup>47</sup> in monolayers. However, none of those studies provided molecular information on protein unfolding at the gas-water 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 and Rho as shown in Figures 4.3A and 4.3B, respectively. We observed that both PS II CC and Rho secondary structure was strongly altered by the low surface pressure treatment (see spectra a to e, Figures 4.3A and 4.3B). Indeed, an important increase was observed of the component of the amide I band located at 1629 cm<sup>-1</sup> for PS II CC and 1628 cm<sup>-1</sup> for Rho. This position is typical for  $\beta$ -sheets<sup>4</sup>. Unfolding of PS II CC and Rho at the gas-water interface may thus be monitored by observing the conversion of the dominant  $\alpha$ -helical structure of these proteins to a  $\beta$ -sheet rich structure.

We also observed that the intensity of the amide I band corresponding to  $\beta$ -sheets is much lower than what was previously observed for  $\alpha$ -helices (compare spectra in Figures 4.1A with 4.3A and those in Figures 4.1B with 4.3B). This reduction was attributed to the fact that unfolded  $\beta$ -sheets occupy a larger area at the interface than  $\alpha$ -helices. Indeed, the measurement of surface pressure-area isotherms showed that incubation of PS II CC at 0.6 mNm<sup>-1</sup> and Rho at 0 mNm<sup>-1</sup> leads to an increase of 1.7-4.3<sup>28</sup> and 1.9 (to be reported elsewhere) in molecular area, compared to monolayers spread at 5.7 and 5 mNm<sup>-1</sup>, respectively. The PM-IRRAS signal is thus lowered since the number of amino acid residues per surface area is reduced.

#### 4.4.4 *Effect of Low Temperature on the Structure of Rho*

Since the structure of Rho was found to be partially denatured upon spreading in monolayers at a surface pressure of 5 mNm<sup>-1</sup> (Figure 4.1B), we have attempted to find conditions where its structure would remain native. Figure 4.4 shows the spectra of Rho measured at 4°C at a surface pressure of 20 mNm<sup>-1</sup> over a period of 120 min after spreading at 5 mNm<sup>-1</sup>. The shape of these spectra is very similar to the one



published for native rhodopsin<sup>40</sup>. Indeed, a shoulder at *ca.* 1634 cm<sup>-1</sup> is still present in these spectra although reduced in intensity compared to those in Figure 4.1B. These data thus suggest that denaturation of Rho is avoided when spreading is performed at low temperature.

#### 4.4.5 *Effect of Spreading Purple Membranes on the Structure of bR in Monolayers*

bR exist as a two-dimensional crystal in purple membranes. It is thus bound to be much more stable in monolayers than PS II CC and Rho. Spreading of bR under conditions that were shown to be strongly denaturing for Rho and PS II CC (see Figure 4.3) did not lead to denaturation of bR (see Figure 4.5). Indeed, bR was spread at 0 mNm<sup>-1</sup> and compression was started after an incubation of 50 min. The amide I band in all spectra show a negative and a positive component and is centered at approximately 1665 cm<sup>-1</sup> indicating that the structure of bR mainly contains  $\alpha$ -helices. This value of 1665 cm<sup>-1</sup> is in good agreement with the 1664 cm<sup>-1</sup> value obtained from literature<sup>48</sup>. The shape of the spectra shown in Figure 4.5 is, however, very different from those measured by transmission FTIR<sup>48</sup> or ATR spectroscopy<sup>49</sup>. The shape of the amide bands of pure individual  $\alpha$ -helices as a function of its orientation with respect to the gas-water interface has been previously simulated by Cornut et al.<sup>41</sup> (see Figure 4.6). As an example, it can be seen in Figure 4.6 that maximum intensity is obtained when an  $\alpha$ -helix is lying flat on the surface whereas a negative band is observed when it is oriented perpendicular to the interface (or parallel to the normal to the interface). However, the situation is more complicated in the case of bR. Indeed, its 7  $\alpha$ -helices are linked together by loops. They can not thus behave as individual  $\alpha$ -helices. Moreover, there is a small difference in orientation between the 7  $\alpha$ -helices of bR<sup>18</sup>. In addition, bR molecules may experience different orientations with respect to the normal to the interface. Nonetheless, one can speculate that all bR molecules will have the same orientation in these films if its two-dimensional crystalline structure is maintained upon spreading. If this were true, the comparison between the shape of the spectra of bR shown in Figure 4.5 with those presented in Figure 4.6, allows to estimate an average orientation of the  $\alpha$ -helices of bR of approximately 30° with respect to the normal to the interface (tilt angle  $\theta$ ). In fact, a value of 26.5° has been calculated

when accurate simulations are performed.<sup>50</sup> This value is quite close to the one of 24° reported by Rothschild and Clark using multilamellar purple membrane films<sup>48</sup>. However, it is quite different from the value of 38-41° we have previously obtained by ATR for bR transferred onto a solid substrate.<sup>49</sup> This difference is simply due to the value of the angle  $\alpha$  used in these calculations. Indeed, when a value of 39° is used for the angle  $\alpha$  instead of 24°<sup>49</sup>, a tilt angle  $\theta$  of 27° is obtained which is in good agreement with our simulations.<sup>50</sup> It is noteworthy that the shape of the amide I band remains unchanged with compression. This suggests, as we previously concluded from ATR measurements<sup>49</sup>, that increasing surface pressure does not change the orientation of bR. This is consistent with the possibility that the two-dimensional crystalline structure of bR is maintained in these films upon spreading.

#### 4.4.6 Comparison Between the Intensity of the Amide I Band of PS II CC, Rho and bR

At 30 mNm<sup>-1</sup>, PM-IRRAS spectra of PS II CC showed maximum amide I intensities ranging from 1.60 (Figure 4.1A) to 1.91<sup>33</sup>. These intensities were compared with those of Rho and bR, under similar protein surface density. In the case of Rho, maximum amide I intensity was 0.66 (Figure 4.1B), whereas bR showed a maximum of 0.40 (a value of 0.75 is obtained when taking into account the contribution of the negative component of the amide I band in Figure 4.5; however, an accurate value is difficult to estimate because of the dispersion of this band of bR). The amide I band of PS II CC monolayers was thus approximately 2.5 times more intense than those of Rho or bR. It was previously shown that the intensity of the amide I band in PM-IRRAS spectra is sensitive to the orientation of  $\alpha$ -helices<sup>39</sup>, where the surface-lying  $\alpha$ -helices produce the strongest amide I bands (see Figure 4.6). Models of Rho and bR each show three  $\alpha$ -helices oriented nearly perpendicular to the membrane plane and four slightly tilted helices<sup>18</sup>. In contrast, models of PS II CC show that several polypeptides, among which D1 and D2<sup>48-50</sup> contain some  $\alpha$ -helices which are oriented approximately parallel to the membrane surface (perpendicular to the interface normal). Therefore, the presence of those surface-lying helices may explain

the high amide I signal observed for PS II CC monolayers, compared to those of Rho and bR.

#### 4.4.7 Comparison Between the Behavior of PS II CC, Rho and bR in Monolayers

One could suspect that the preparation of protein monolayers would be particularly detrimental for the structure of membrane proteins. Indeed, since these proteins span the whole bilayer thickness, one could speculate that the outer phospholipid leaflet of the bilayer (that should normally cover the outer surface of these proteins) will be destroyed upon spreading these proteins in monolayers. However, this may not be true when purified proteins solubilized in detergent are spread in monolayers, as performed in the present work for PS II CC and Rho in contrast to bR where whole purple membranes were used. Indeed, the excess detergent has been shown to be expelled into the subphase upon compression of PS II CC<sup>35</sup>, which will favor protein-protein interactions and, thus, may prevent protein denaturation.

The investigation of PS II CC, Rho and bR in monolayers has provided molecular information about the structure of these membrane proteins when spread at the gas-liquid interface. We have demonstrated that the spreading conditions are of particular importance to maintain the  $\alpha$ -helical secondary structure of PS II CC and Rho. We also showed that conditions could be found to form stable monolayers of intact membrane proteins. When PS II CC and Rho are spread at an initial surface pressure of  $5 \text{ mNm}^{-1}$  and immediately compressed, the  $\alpha$ -helical content is maintained only in the case of PS II CC. Only lower temperature allows the maintenance of Rho  $\alpha$ -helical content. We also found that spreading conditions, generally used for lipids, lead to the denaturation of PS II CC and Rho. In contrast, bR is not denatured in these conditions probably owing to its two-dimensional crystalline structure. The higher sensitivity of Rho than PS II CC to denaturation was, however, rather surprising. Indeed, PS II CC is made of several proteins and could be expected *a priori* to be less stable than a single polypeptide chain like rhodopsin. This result is intriguing and further experiments are required to assess this question.

Many investigators have previously raised hypotheses on the status of protein structure once spread in monolayers without any direct supporting evidence. This

paper demonstrates the powerful capacity of infrared spectroscopy to provide direct structural information on membrane proteins when spread in monolayers at the air-water interface. We have demonstrated that it is possible to prepare monolayers of membrane proteins where its native secondary structure is maintained. The use of such a model system where the native protein structure is preserved opens the door to a large variety of structure/function investigations of membrane proteins.

#### *4.5 Acknowledgments*

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), and FRSQ for financial support and to NATO for a Collaborative Research Grant. J.G. was supported by Le Syndicat des Chargé(e)s de Cours de l'Université du Québec à Trois-Rivières and the Fondation du CEU and M.G. by a scholarship from the Fonds FCAR.

#### 4.6 Références

- 1 MacRitchie, F., *Adv. Protein Chem.* 1978, 32, 283.
- 2 Mendelsohn, R., J.W. Brauner, and A. Gericke, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1995, 46, 305.
- 3 Blaudez, D., J.-M. Turlet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996, 92, 525.
- 4 Jackson, M., and H. H. Mantsch *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995, 30, 95.
- 5 Hankamer, B., J. Barber, and E. Boekema, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997, 48, 641.
- 6 Hanson, O., T. Wydrzynski, *Photosynth. Res.* 1990, 23, 131.
- 7 Nugent, J. H. A., *Eur. J. Biochem.* 1996, 237, 519.
- 8 Vermaas, W. F. J., S. Styring, W. P. Schröder and B. Andersson, *Photosynth. Res.* 1993, 38, 249.
- 9 Shuvalov, V. A., *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994, 26, 619.
- 10 Seidler, A., *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, 1277, 35.
- 11 Nathans, J., *Biochemistry* 1992, 31, 4923.
- 12 Peroutka, S.J., *Handbook of receptors and channels. G-protein coupled receptors* 1994, CRC Press.
- 13 Bownds, D., *Nature* 1967, 216, 1178.
- 14 Fukuda, M.N., D.P. Papermaster and P.A. Hargrave., *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 8201.

- 15 Ovchinnikov, Yu. A., N.G. Abdulaev and A.S. Bogachuk, FEBS Lett. 1988, 230, 1.
- 16 Wilden, U. and H. Kuhn, Biochemistry 1982, 21, 3014.
- 17 Karnik, S.S., T.P. Sakmar, H.-B. Chen and H.G. Khorana, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988, 85, 8459.
- 18 Schertler, G. F. X. and P. A. Hargrave. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995, 92, 11578.
- 19 Unger, V.M. and G.F.X. Schertler, Biophys. J. 1995, 68, 1776.
- 20 Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius, Nature New Biology 1971, 233, 149.
- 21 Henderson, R. and P.N.T. Unwin, Nature 1975, 257, 28.
- 22 Henderson, R., J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, and K.H. Downing, J. Mol. Biol. 1990, 213, 899.
- 23 Kimura, Y., D.G. Vassylyv, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Murata, T. Hirai and Y. Fujiyoshi, Nature 1997, 389, 206.
- 24 Pebay-Peyroula, E., G. Rummel, J.P. Rosenbuch and E.M. Landau, Science 1997, 277, 1676.
- 25 Oesterhelt, D. and B. Hess, Eur. J. Biochem. 1973, 37, 316.
- 26 Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973, 70, 2853.
- 27 van Leeuwen, P. J., M. C. Nieveen, E. J. van de Meent, J. P. Dekker, and H. J. van Gorkom, Photosynth. Res. 1991, 28, 149.
- 28 Gallant, J., H. Lavoie, A. Tessier, G. Munger, R. M. Leblanc, and C. Salesse, Langmuir 1998, 14, 3954.

- 29 Porra, R. J., W. A. Thompson, and P. E. Kriedemann, *Biochim. Biophys. Acta.* 1989, 975, 384.
- 30 De Las Rivas, J., J. Klein, and J. Barber, *Photosynth. Res.* 1995, 46, 193.
- 31 Salesse, C., F. Boucher, and R.M. Leblanc, *Anal. Biochem.* 1984, 142, 258.
- 32 Litman, B.J., *Methods Enzymol.* 1982, 81, 150.
- 33 Kates, M., S.C. Kushwaha and G.D. Sprott, *Methods Enzymol.* 1982, 88, 98.
- 34 Pattus, F., C. Rothen, M. Streit and P. Zhaler, *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 647, 29.
- 35 Gallant, J., B. Desbat, D. Vaknin and C. Salesse, *Biophys. J.* 1998, 75, 2888.
- 36 Trurnit, H. J., *J. Coll. Sci.* 1960, 15, 1.
- 37 He, W.-Z., W. R. Newell, P. I. Haris, D. Chapman, and J. Barber, *Biochemistry* 1991, 30, 4552.
- 38 Chapados, C., S. Lemieux, and R. Carpentier, *In Current Research in Photosynthesis*, 1990, M. Baltscheffsky, editor. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. I.2.343.
- 39 Chapados, C., S. Lemieux, and R. Carpentier, *Biophys. Chem.* 1991, 39, 225.
- 40 Rothschild, K.J., W.J. DeGrip and R. Sanches, *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 596, 338.
- 41 Cornut, I., B. Desbat, J. M. Turlet, and J. Dufourcq, *Biophys. J.* 1996, 70, 305.
- 42 Tiede, D. M., *Biochim. Biophys. Acta* 1985, 811, 357.
- 43 Alegria, G., and P. L. Dutton, *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1057, 239.



- 44 Yasuda, Y., Y. Hirata, H. Sugino, M. Kumei, M. Hara, J. Miyake, and M. Fujihara, *Thin Solid Films* 1992, 210/211, 733.
- 45 Uphaus, R. A., J. Y. Fang, R. Picorel, G. Chumanov, J. Y. Wang, T. M. Cotton and M. Seibert, *Photochem. Photobiol.* 1997, 65, 673.
- 46 Maxia, L., G. Radicchi, I.M. Pepe and C. Nicolini, *Biophys. J.* 1995, 69, 1440.
- 47 Furone, T. and H. Sasabe, *J. Colloid Interface Sci.* 1991, 147, 225.
- 48 Rothschild, K.J. and N. A. Clark, *Biophys. J.* 1979, 25, 473.
- 49 Méthot, M., F. Boucher, C. Salesse, M. Subirade and M. Pérolet, *Thin Solid Films* 1996, 284-285, 627.
- 50 Blaudez, D., F. Boucher, T. Buffeteau, B. Desbat, M. Grandbois, C. Salesse, *Applied Spectroscopy* 1998 (submitted).
- 51 Svensson, B., C. Etchebest, P. Tuffery, P. van Kan, J. Smith, and S. Styring, *Biochemistry* 1996, 35, 14486.
- 52 Svensson, B., I. Vass, E. Cedergren, and S. Styring *EMBO J.* 1990, 9, 2051.
- 53 Xiong, J., S. Subramaniam, and Govindjee, *Prot. Sci.* 1996, 5, 2054.

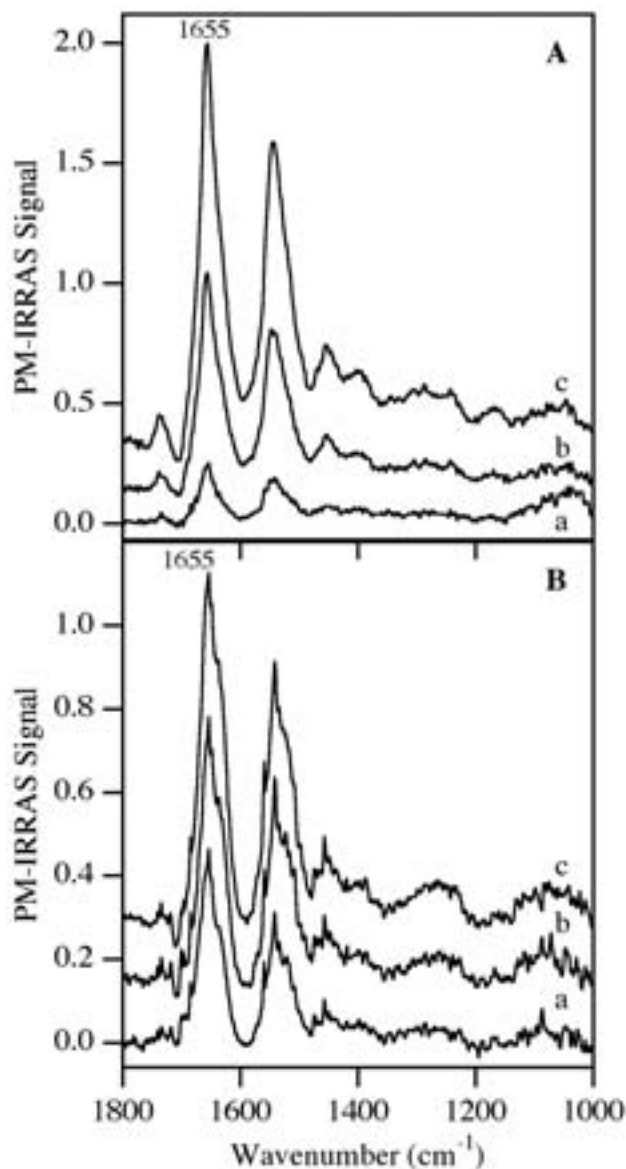


Figure 4.1: PM-IRRAS spectra of PS II CC and Rho monolayers at the nitrogen-water interface. **(A)** PS II CC - Initial surface pressure was set at  $5.7 \text{ mNm}^{-1}$ . Compression at  $10 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$  was started immediately after spreading of  $40 \text{ }\mu\text{L}$  of PS II CC. Spectra were measured at surface pressures of **a** -  $10 \text{ mNm}^{-1}$ , **b** -  $20 \text{ mNm}^{-1}$  and **c** -  $30 \text{ mNm}^{-1}$ . **(B)** Rho - Initial surface pressure was set at  $5 \text{ mNm}^{-1}$ . Compression at  $4.5 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$  was started immediately after spreading of  $150 \text{ }\mu\text{L}$  of Rho. Spectra were measured at surface pressures of **a** -  $20 \text{ mNm}^{-1}$ , **b** -  $30 \text{ mNm}^{-1}$  and **c** -  $40 \text{ mNm}^{-1}$ .

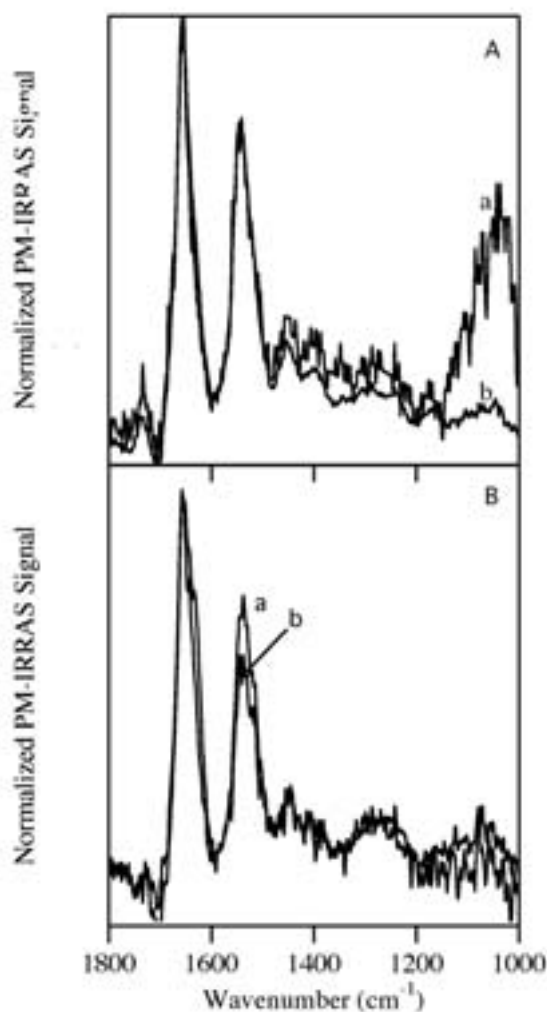


Figure 4.2 . Comparison of normalized PM-IRRAS spectra of **(A)** PS II CC and **(B)** Rho monolayers at the nitrogen-water interface spread at an initial surface pressure of 5.7 and 5.0  $\text{mNm}^{-1}$ , respectively. The spectra were normalized with respect to the amide I band. Compression at 80  $\text{nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$  (PS II CC) and 4.5  $\text{nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$  (Rho) was started immediately after spreading of 40  $\mu\text{L}$  of PS II CC and 150  $\mu\text{L}$  of Rho. Spectra were measured at **a** - 10  $\text{mNm}^{-1}$ , **b** - 30  $\text{mNm}^{-1}$  .

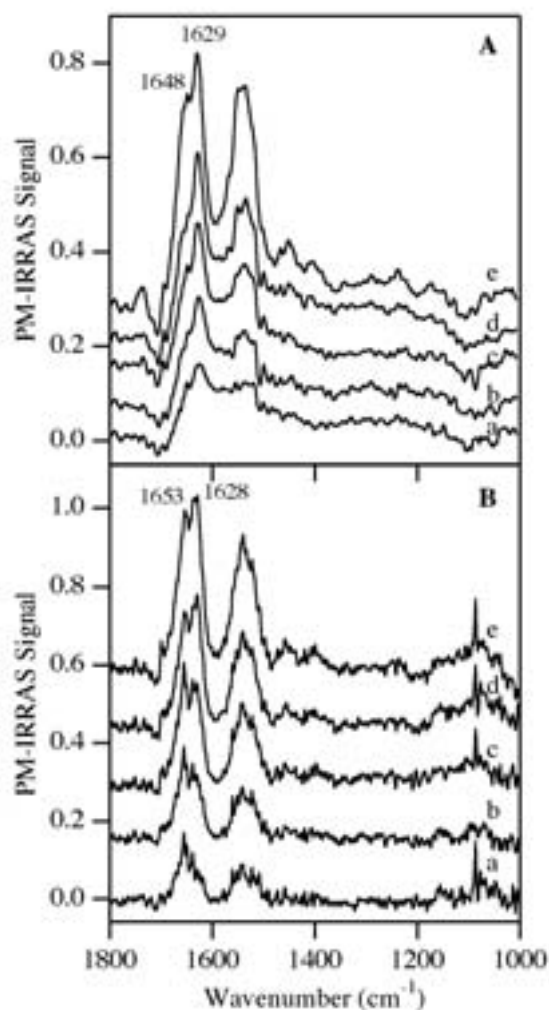


Figure 4.3: PM-IRRAS spectra of PS II CC and Rho monolayers at low surface pressure at the nitrogen-water interface. **(A)** PS II CC - Initial surface pressure was set at  $0.6 \text{ mNm}^{-1}$ . Compression at  $10 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$  was started 30 minutes after spreading of  $20 \mu\text{L}$  of PS II CC. Spectra were measured at **a** -  $0.6 \text{ mNm}^{-1}$ , **b** -  $10 \text{ mNm}^{-1}$ , **c** -  $20 \text{ mNm}^{-1}$ , **d** -  $30 \text{ mNm}^{-1}$  and **e** -  $40 \text{ mNm}^{-1}$ . **(B)** Rho - Initial surface pressure was set at  $0 \text{ mNm}^{-1}$ . Compression at  $1 \text{ nm}^2/\text{molecule}\cdot\text{min}$  was started 30 minutes after spreading of  $50 \mu\text{L}$  of Rho. Spectra were measured at **a** -  $0 \text{ mNm}^{-1}$ , **b** -  $10 \text{ mNm}^{-1}$ , **c** -  $20 \text{ mNm}^{-1}$ , **d** -  $30 \text{ mNm}^{-1}$  and **e** -  $40 \text{ mNm}^{-1}$ .

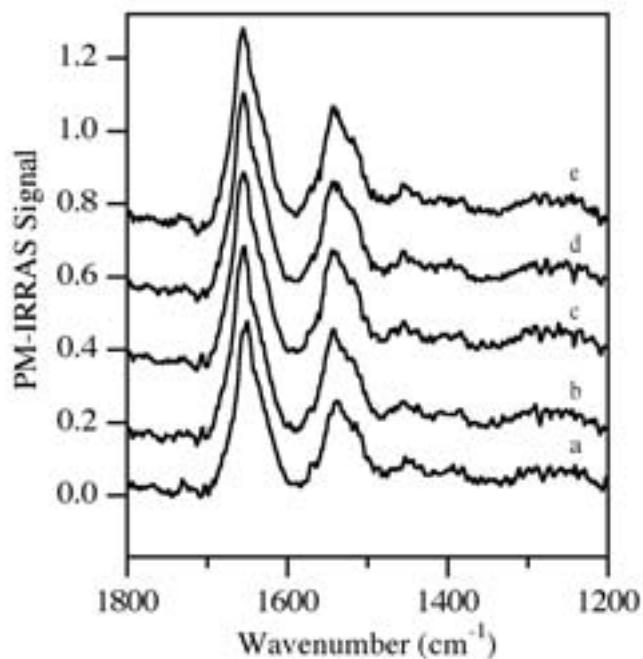


Figure 4.4: PM-IRRAS spectra of Rho monolayer at the nitrogen/water interface at 4°C. Initial surface pressure was set at 5.0 mNm<sup>-1</sup>. Compression at 4.5 nm<sup>2</sup>/molecule·min was started immediately after spreading of 150 μL of Rho. Surface pressure was maintained at 20 mNm<sup>-1</sup>. Spectra were measured at: **a** - 0 min, **b** - 30 min, **c** - 60 min, **d** - 90 min, and **e** - 120 min after reaching 20 mNm<sup>-1</sup>.

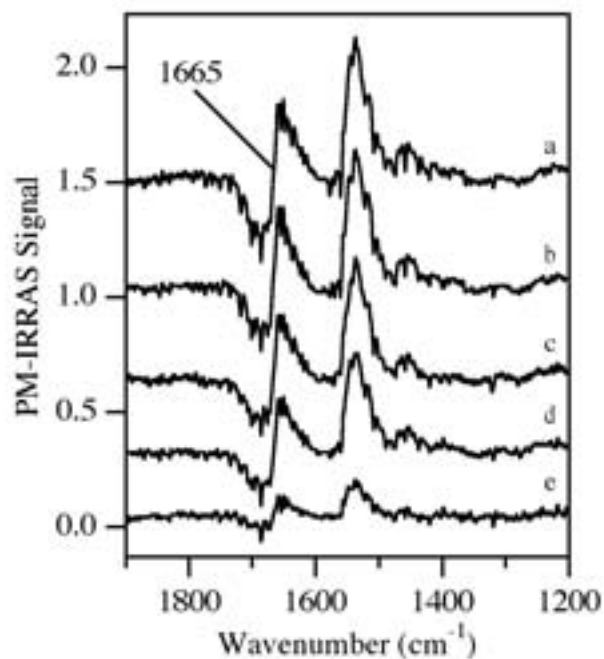


Figure 4.5: PM-IRRAS spectra of bacteriorhodopsin monolayers at the nitrogen-water interface. Initial surface pressure was set at 0 mNm<sup>-1</sup>. Compression at 0.7 nm<sup>2</sup>/molecule·min was started 50 minutes after spreading of 250 μL of bR. Spectra were measured at **a** - 0 mNm<sup>-1</sup>, **b** - 10 mNm<sup>-1</sup>, **c** - 20 mNm<sup>-1</sup>, **d** - 30 mNm<sup>-1</sup> and **e** - 40 mNm<sup>-1</sup>.

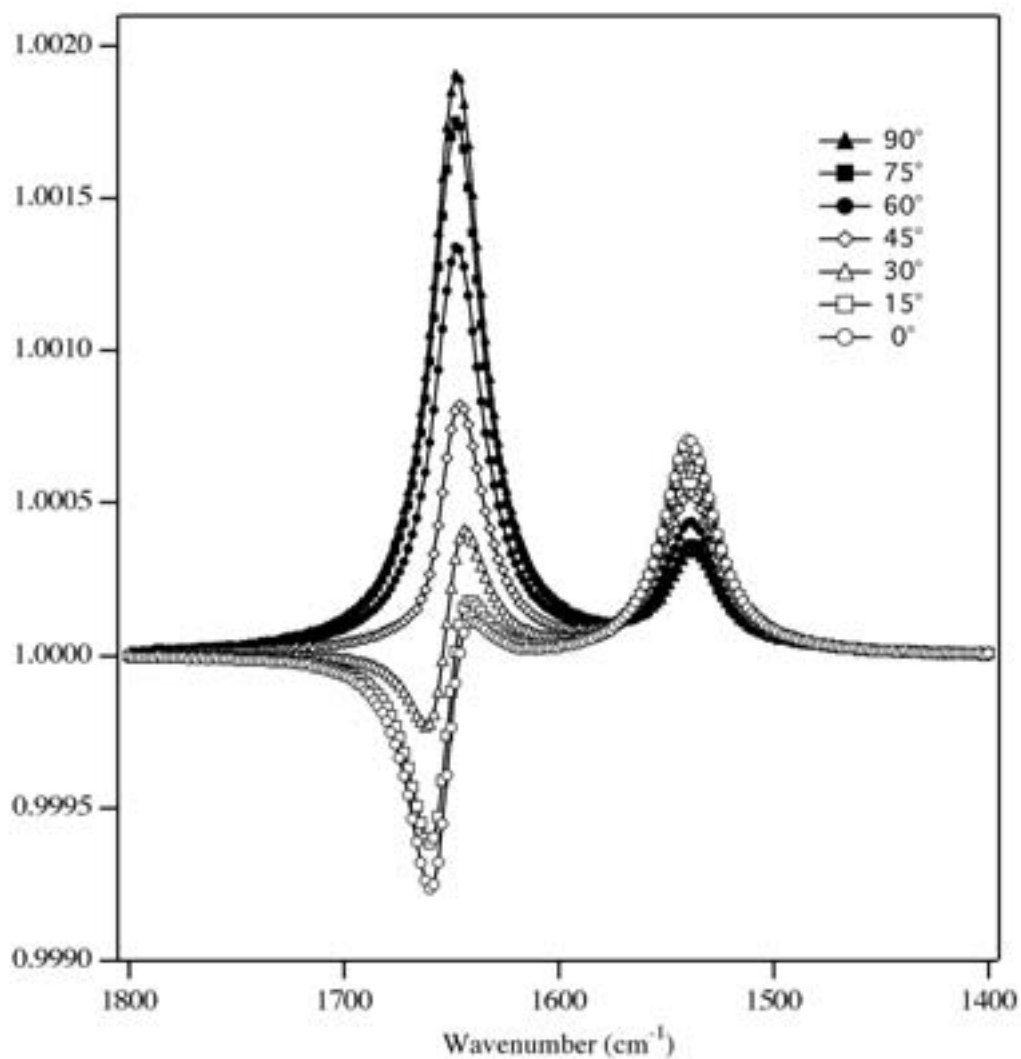


Figure 4.6: Calculated PM-IRRAS spectra in the amide I and amide II region of pure  $\alpha$ -helices versus the tilt angle between the helices' axis and the normal to the interface.





## CHAPITRE 5

### CONCLUSION

#### 5.1 *Récapitulation des résultats*

L'aspect fondamental de l'étude de films de VGA et de rhodopsine est de mieux comprendre les mécanismes de dénaturation prenant place lors de l'étalement de protéines membranaires à l'interface air-eau. La rhodopsine et la VGA représentent des modèles de protéines membranaires dont la structure secondaire est bien connue. La rhodopsine est toutefois un modèle plus complexe que la VGA, ce qui donne place à des interprétations très différentes.

Dans le but premier de mettre au point une méthode de cristallisation de protéines membranaires, la rhodopsine s'avère un bon modèle puisque sa structure est maintenant bien connue à haute résolution (Teller et al., 2001) et que cette approche peut être éprouvée en utilisant cette protéine. La connaissance des conditions expérimentales permettant de maintenir la structure native de protéines membranaires en monocouche s'avère donc, autant pour la cristallisation que pour l'utilisation de ces protéines dans les nanotechnologies, une étape indispensable à franchir.

##### 5.1.1 *La gramicidine A à l'interface air-eau*

Le chapitre 2 de la présente thèse regroupe la majorité des résultats obtenus pour un film de VGA à l'interface air-eau. Une brève rétrospective de ces résultats ainsi que quelques résultats additionnels seront présentés dans cette section.

##### 5.1.1.1 *La structure secondaire de la VGA*

La combinaison des résultats en rayons X et en spectroscopie infrarouge a permis de démontrer que la VGA étalée à l'interface air-eau pouvait prendre une structure et une organisation différentes à différents points de l'isotherme de pression de surface.

Tout d'abord, à grande aire moléculaire, les résultats en réflectivité des rayons X ainsi que les spectres PM-IRRAS montrent que la VGA se retrouve sous une forme désordonnée comme proposé par Ries et Swift en 1987 (voir chapitre 2). Par la suite, avec la compression, la VGA débute sa réorganisation structurale jusqu'à l'obtention de sa structure finale en double hélice  $\beta^{5,6}$  antiparallèle vers la fin du plateau de l'isotherme (voir Figure 2.2). Cette conclusion est appuyée par les mesures effectuées en PM-IRRAS sur une sous-phase de D<sub>2</sub>O (voir Figure 2.5). Cette structure secondaire s'avère stable de 20 mNm<sup>-1</sup> jusqu'à la fin de l'isotherme de pression de surface comme le confirme la position de la bande amide I (voir Figure 2.6).

#### 5.1.1.2 Orientation de la VGA à l'interface air-eau

Après 20 mNm<sup>-1</sup>, même si sa structure secondaire ne change plus, il y a un changement d'épaisseur du film monomoléculaire de VGA (voir Figure 2.2). En effet, il a été démontré qu'après le plateau dans l'isotherme de pression de surface, le changement d'intensité dans les spectres PM-IRRAS n'est pas seulement attribuable à une augmentation de la densité de surface mais aussi à une réorientation de la double hélice  $\beta^{5,6}$  antiparallèle (voir Figure 2.6).

Il a été déterminé, à l'aide de simulations spectrales, que l'intensité de la bande amide I est très sensible à l'orientation des moments de transition (Cornut *et al.*, 1996 et Figure 4.6). Cette propriété des spectres PM-IRRAS d'être sensible à l'orientation, l'utilisation de simulations spectrales et l'épaisseur du film de VGA déterminée par rayons X ont permis d'estimer l'angle moyen entre l'axe central de la structure en hélice  $\beta^{5,6}$  de la VGA et la normale (voir Figure 2.8). De plus, ces simulations et le graphique de l'intensité de la bande amide I corrigée pour l'aire moléculaire en fonction de la pression de surface montrent que la VGA se redresse avec la compression de 90° à 30° par rapport à la normale de la surface (voir Figure 2.6).

### 5.1.1.3 Organisation de la VGA à l'interface air-eau

À pression de surface élevée, les mesures de diffraction des rayons X (XGID) démontrent l'existence d'un certain degré d'organisation (voir Figure 2.3). Toutefois, cette organisation se répercute sur une courte distance comme le montre la largeur de la bande obtenue à  $0.459 \text{ \AA}^{-1}$  (voir Figure 2.3).

### 5.1.1.4 Structuration de l'eau

À forte pression de surface, les spectres PM-IRRAS montrent un accroissement du creux d'indice de l'eau à  $1680 \text{ cm}^{-1}$  (voir Figure 2.4). Ce creux est attribuable à deux phénomènes: soit tout d'abord au changement d'indice de réfraction entre le spectre de référence et le spectre de la monocouche ou soit à une orientation préférentielle du moment de transition des molécules d'eau près de la surface. Afin de clarifier cette problématique, les spectres PM-IRRAS de la VGA ont été repris sur une sous-phase de  $\text{D}_2\text{O}$  pour éliminer la contribution vibrationnelle de l'eau dans cette région (voir Figure 2.5). Ainsi, cette manipulation a permis de déterminer et de fixer les paramètres de simulation des spectres PM-IRRAS sans contribution de l'eau.

De plus, les mesures de réflectivité des rayons X ont confirmé ces données car le modèle à deux boîtes obtenu montre une première boîte de  $10 \text{ \AA}$  attribuable à une couche d'eau à l'interface possédant une densité électronique plus élevée que celle de l'eau massique (bulk water) (voir Figure 2.1).

Il est possible d'expliquer ces résultats en soulevant deux hypothèses: 1) l'existence d'une couche d'eau structurée où les molécules d'eau possèdent une orientation préférentielle (film d'eau anisotrope); 2) l'existence d'une couche d'eau possédant une densité volumique plus élevée, ce qui entraîne un indice de réfraction légèrement différent de l'eau massique. Aucune de ces hypothèses ne peut être écartée mais il est possible de simuler les résultats afin d'appuyer une de ces hypothèses.

#### 5.1.1.4.1 Simulations des spectres PM-IRRAS sur l'eau

Les simulations spectrales de la VGA sur D<sub>2</sub>O ont permis d'obtenir les paramètres d'indice et d'intensité requis pour les simulations de VGA sur H<sub>2</sub>O. Ceci fait, une simulation de la structure en double hélice  $\beta^{5,6}$  antiparallèle a été réalisée pour un film de VGA à 40 mNm<sup>-1</sup> sur H<sub>2</sub>O (voir Figure 2.9). On remarque sur cette figure que l'intensité de la bande Amide I et le creux d'indice de l'eau sont assez différents du spectre expérimental. Cette figure montre que le modèle utilisé lors de la simulation sur l'eau n'est pas tout à fait adéquat.

Afin d'améliorer ce modèle, nous avons ajouté un paramètre supplémentaire afin de simuler une couche d'eau anisotrope sous la monocouche de VGA (voir Figure 5.1). Pour ce faire, on a associé aux molécules d'eau de cette couche un paramètre d'anisotropie parallèle à la normale au plan de la surface.

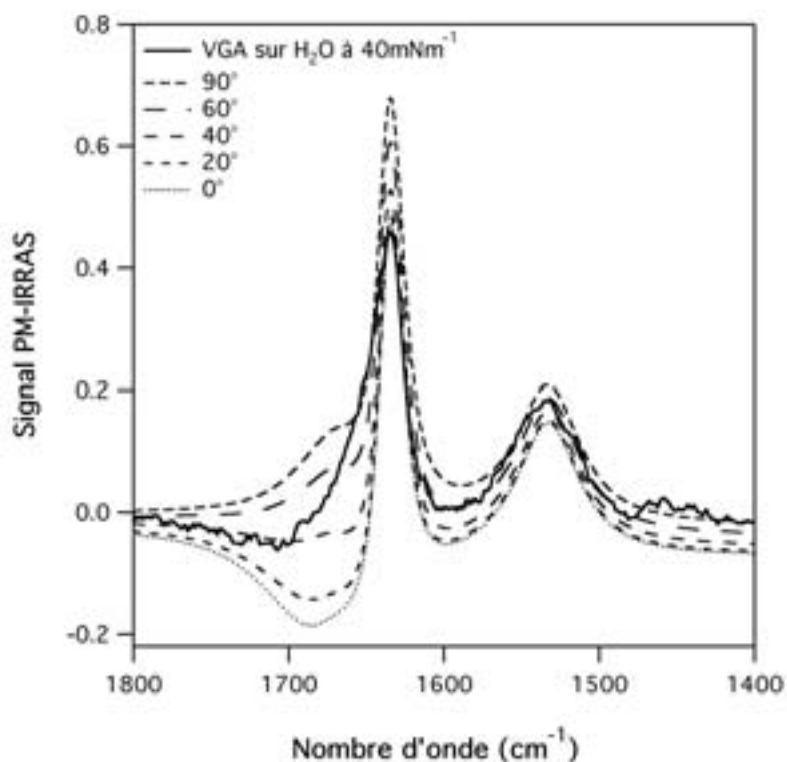


Figure 5.1: Simulation de la VGA sur l'eau avec l'ajout d'une couche d'eau anisotrope de 10 Å.

La Figure 5.1 présente les résultats des simulations PM-IRRAS obtenus en introduisant une couche d'eau anisotrope de 10 Å sous la monocouche de VGA. Les spectres simulés en fonction du degré d'anisotropie des molécules d'eau sous la monocouche de VGA montrent que plus le nombre de molécules d'eau possédant un moment de transition orienté parallèle à la normale est élevé, plus le creux d'indice de l'eau est prononcé. Bien que ces simulations ne prouvent pas clairement la présence d'une couche d'eau orientée, elle permettent d'appuyer les mesures en réflectivité des rayons X ainsi que l'hypothèse voulant que les molécules d'eau sous la monocouche de VGA possèdent une orientation préférentielle de leur moment de transition.

#### *5.1.1.5 Comparaison entre la valine gramicidine et l'isoleucine gramicidine*

La gramicidine A possède deux structures primaires différentes. Elles se distinguent par leur premier acide aminé qui peut être une valine (VGA) ou une isoleucine (IGA) (voir chapitre I, section 1.6.1). Cette différence dans la structure primaire pourrait mener à des différences dans la formation, la structure et l'organisation de la gramicidine à l'interface air-eau. On a donc procédé aux mesures PM-IRRAS avec l'IGA afin de comparer ses propriétés spectroscopiques avec la VGA (voir Figure 5.2). La Figure 5.2 montre que les spectres PM-IRRAS de l'IGA et de la VGA sont à peu près identiques. On peut donc conclure que le changement de la valine pour l'isoleucine n'a pas d'effet sur l'organisation et la structure de la gramicidine A en monocouche à l'interface air-eau. Plus précisément, la comparaison des spectres à  $40 \text{ mNm}^{-1}$  de l'IGA et de la VGA présentés à la Figure 5.2 ne montre aucune différence marquée dans leurs propriétés spectrales (voir Figure 5.3).

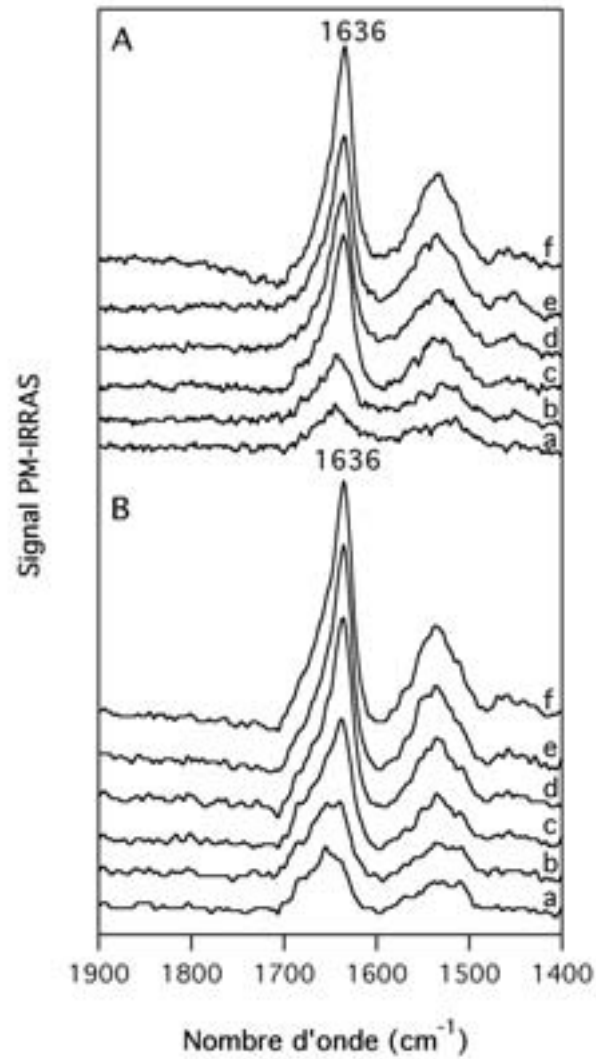


Figure 5.2: Spectre (A) de la valine gramicidine A et (B) de l'isoleucine gramicidine A à différentes pressions de surface (de 5 à 40 mNm<sup>-1</sup>). Les spectres sont pris à 5, 10, 15, 20, 30 et 40 mNm<sup>-1</sup> (a à f, respectivement).

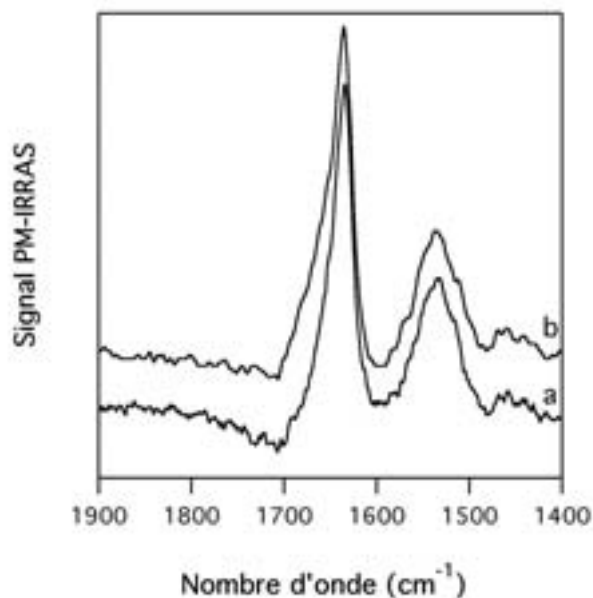


Figure 5.3: Comparaison entre les spectres de la VGA (a) et l'IGA (b) à  $40 \text{ mNm}^{-1}$ .

#### 5.1.1.6 Effet du solvant d'étalement sur la structure de la gramicidine

Afin de démontrer que l'utilisation de la méthode des monocouches permet d'éliminer les phénomènes dus aux solvants qui ont été observés lors de la détermination de la structure de la VGA en solution (Urry *et al.*, 1971; Killian et Urry, 1988; Killian, 1992; Bouchard et Auger, 1993), des mesures ont été réalisées en utilisant différents solvants d'étalement. En effet, il a été démontré qu'en solution la gramicidine A pouvait prendre différentes structures secondaires en fonction du solvant utilisé. On a donc voulu voir si le solvant d'étalement avait le même effet sur la structure de la gramicidine en monocouche à l'interface air-eau. Les mesures ont donc été faites avec quatre solvants différents: le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthanol (EtOH) et le méthanol (MeOH) (voir Figure 5.4).

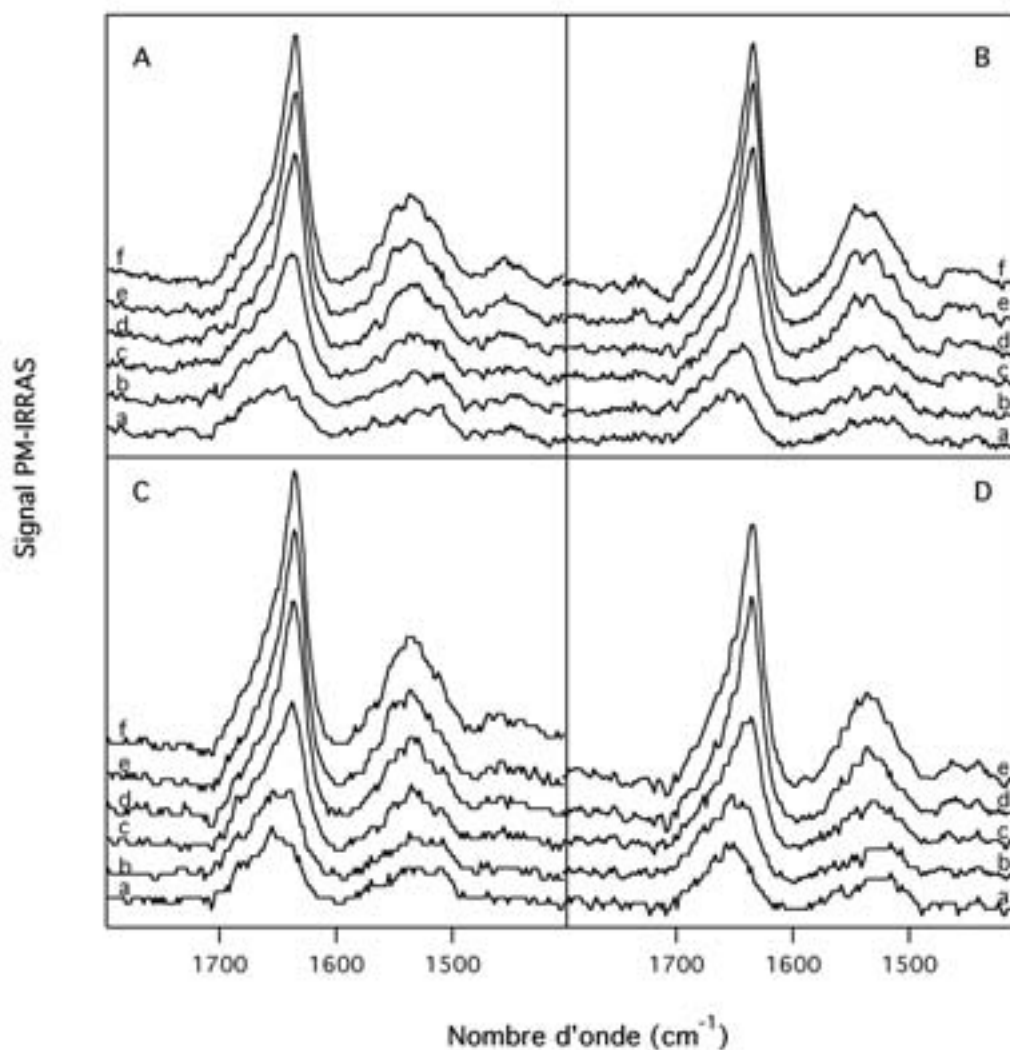


Figure 5.4: Spectres de l'isoleucine gramicidine A à différentes pressions de surface étalée avec différents solvants: (A) DMSO, (B) éthanol, (C) chloroforme et (D) méthanol. Les spectres sont pris à 5, 10, 15, 20, 30 et 40  $\text{mNm}^{-1}$  (a à f, respectivement).

La comparaison entre les spectres obtenus à 40  $\text{mNm}^{-1}$  avec différents solvants d'étalement montre très peu de différence, ce qui permet de supposer que ces solvants n'ont pas ou très peu d'effet sur la structure de l'IGA (voir Figure 5.5). Cette observation est très intéressante et importante car elle démontre clairement que l'étalement d'un polypeptide membranaire à l'interface air-eau, tel que la gramicidine, lui procure un environnement exempt de toute perturbation due à la solvatisation.



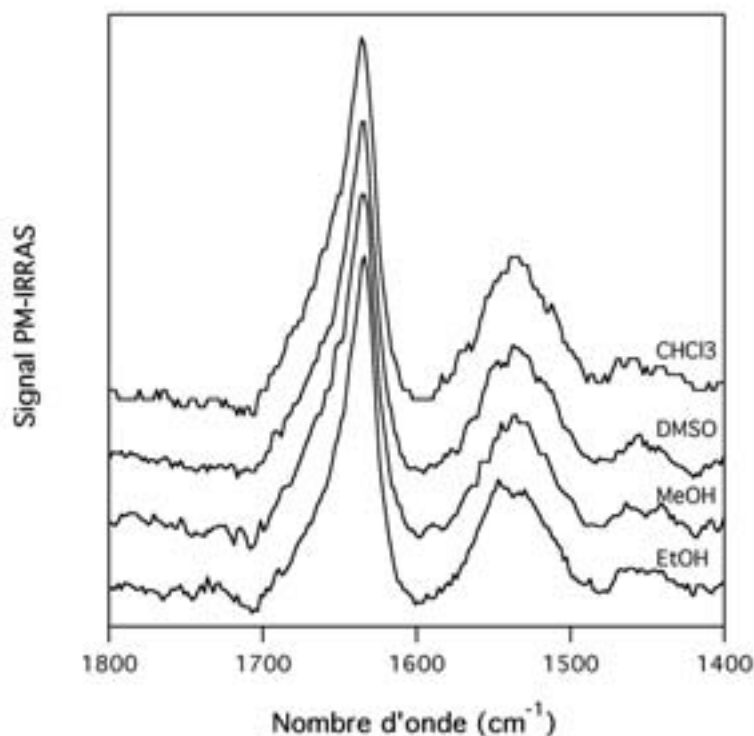


Figure 5.5: Comparaison entre les spectres de l'isoleucine gramicidine A à une pression de surface de  $40 \text{ mNm}^{-1}$  suite à leur étalement avec différents solvants.

### 5.1.2 La rhodopsine à l'interface air-eau

Le chapitre 3 de la présente thèse regroupe la majorité des résultats obtenus pour la rhodopsine en monocouche à l'interface air-eau. Une brève rétrospective de ces résultats ainsi que quelques résultats additionnels seront présentés dans cette section.

#### 5.1.2.1 Effet de différentes conditions expérimentales sur la structure de la rhodopsine

Dans un premier temps, on a étudié la problématique de l'intégrité structurale de la rhodopsine en film monomoléculaire en fonction de diverses conditions expérimentales. Les conditions telles que la vitesse de compression, la pression de surface initiale d'étalement et la température de la sous-phase ont fait l'objet de cette étude sur la structure de la rhodopsine en film monomoléculaire.

#### 5.1.2.1.1 Effet de la vitesse de compression

Tout d'abord, toutes les mesures ont été faites à deux vitesses de compression différentes car il a été posé comme hypothèse qu'une vitesse de compression plus rapide permettait de réduire la dénaturation de protéines membranaires à l'interface air-eau. La comparaison d'une vitesse considérée comme lente ( $1 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) avec une vitesse plus rapide ( $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) démontre bien qu'une vitesse de compression rapide permet de favoriser le maintien de l'intégrité structurale de la rhodopsine (voir Figure 3.5). On peut expliquer ce résultat par le fait que la rhodopsine reste moins longtemps à une faible pression de surface.

On remarque toutefois que la vitesse de compression n'est pas la seule condition expérimentale permettant de prévenir la dénaturation de la rhodopsine. En effet, une vitesse rapide ne peut éliminer les dommages infligés à la rhodopsine lors d'une période d'incubation à faible pression de surface (voir Figure 3.3).

#### 5.1.2.1.2 Effet de la pression de surface initiale

Contrairement aux molécules simples tels que les lipides qui font appel aux méthodes expérimentales habituelles pour la formation de films monomoléculaires, la rhodopsine, comme le PSII CC (Gallant *et al.*, 1998a et b), requiert une pression de surface égale ou supérieure à  $5 \text{ mNm}^{-1}$  pour maintenir son intégrité structurale. Cette pression de surface initiale ainsi que l'utilisation de la méthode de Trurnit lors de l'étalement permet l'existence d'interaction protéines-protéines et, si la compression s'effectue assez rapidement, de ne jamais laisser à la rhodopsine suffisamment d'espace et de temps pour s'étendre et se dénaturer à la surface. De plus, cette pression permet d'obtenir un film de rhodopsine relativement stable. Par contre, comme le montre la Figure 3.6, il est aussi essentiel de maintenir une pression de surface d'au moins  $4.5 \text{ mNm}^{-1}$  avant le début de l'isotherme pour prévenir la dénaturation de la rhodopsine.

#### 5.1.2.1.3 *Effet de la période d'incubation*

Comme dans le cas de la pression de surface initiale, une période d'incubation à 0 ou 5 mNm<sup>-1</sup> a un effet dramatique sur l'intégrité structurale de la rhodopsine. En effet, les mesures PM-IRRAS montrent clairement que l'incubation de la monocouche de rhodopsine à faible pression de surface mène à sa dénaturation (voir Figure 3.3). Dans tous les cas observés (voir Figure 3.3), quelle que soit la pression de surface initiale (0 ou 5 mNm<sup>-1</sup>) ou la vitesse de compression (1 ou 4.5 nm<sup>2</sup>•molécule<sup>-1</sup>•min<sup>-1</sup>), les mesures PM-IRRAS démontrent qu'une période d'incubation de 30 minutes mène à un accroissement de la bande des feuilletts-β à 1630 cm<sup>-1</sup>.

Il est donc primordial, pour le maintien de l'intégrité structurale de la rhodopsine, d'initier la compression du film monomoléculaire de rhodopsine immédiatement après son étalement.

#### 5.1.2.1.4 *L'effet de la température*

Il a été démontré que la réduction de la température de la sous-phase jouait un rôle important sur le maintien de l'intégrité structurale de la rhodopsine à l'interface air-eau. Contrairement à d'autres protéines membranaires telles que la bactériorhodopsine et le PS II CC (voir chapitre 4) lors de leur étalement à une pression de surface initiale de 5 mNm<sup>-1</sup> ou moins, la structure native de la rhodopsine n'est pas complètement conservée à l'interface air-eau et cela même dans les meilleures conditions expérimentales (voir Figure 3.5). En effet, afin de maintenir l'intégrité structurale de la rhodopsine à l'interface air-eau, il est nécessaire de réduire la température de la sous-phase lorsque l'étalement est fait à 5 mNm<sup>-1</sup> (voir Figure 3.8). Par contre, une température de 21°C permet aussi de maintenir l'intégrité structurale de la rhodopsine si une pression de surface minimale de 4.5 mNm<sup>-1</sup> est maintenue pendant toute la compression (voir Figure 3.6).

### 5.1.2.2 Stabilité du film de rhodopsine en fonction du temps

Les mesures effectuées en fonction du temps à  $20 \text{ mNm}^{-1}$  à une température de  $21^\circ\text{C}$  montrent un accroissement avec le temps de la bande à  $1630 \text{ cm}^{-1}$  attribuée aux feuillets- $\beta$  (voir Figure 5.6 A). Toutefois, en diminuant la température de la sous-phase à  $4^\circ\text{C}$ , il est possible de maintenir la structure de la rhodopsine pendant une période minimale de deux heures lorsque l'étalement est fait à une pression de surface initiale de  $5 \text{ mNm}^{-1}$  à une vitesse de compression de  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (voir Figure 5.6 B). Cette observation représente un atout important dans l'optique de la mise au point d'une méthode de cristallisation bidimensionnelle de protéines membranaires à l'interface air-eau ou pour les utiliser comme constituant dans les nanotechnologies. En effet, en comparaison avec les films de rhodopsine étalés à une pression de surface initiale de  $10 \text{ mNm}^{-1}$ , l'étalement de la rhodopsine à une pression de surface plus faible devrait permettre d'obtenir un film plus homogène. Ces conditions expérimentales devraient être un atout important lors d'essais de cristallisation bidimensionnelle de protéines membranaires car elles devraient permettre de favoriser les interactions protéines-protéines et de réduire leurs mouvements tout en limitant les risques de dénaturation à l'interface air-eau (Gallant, 1997).

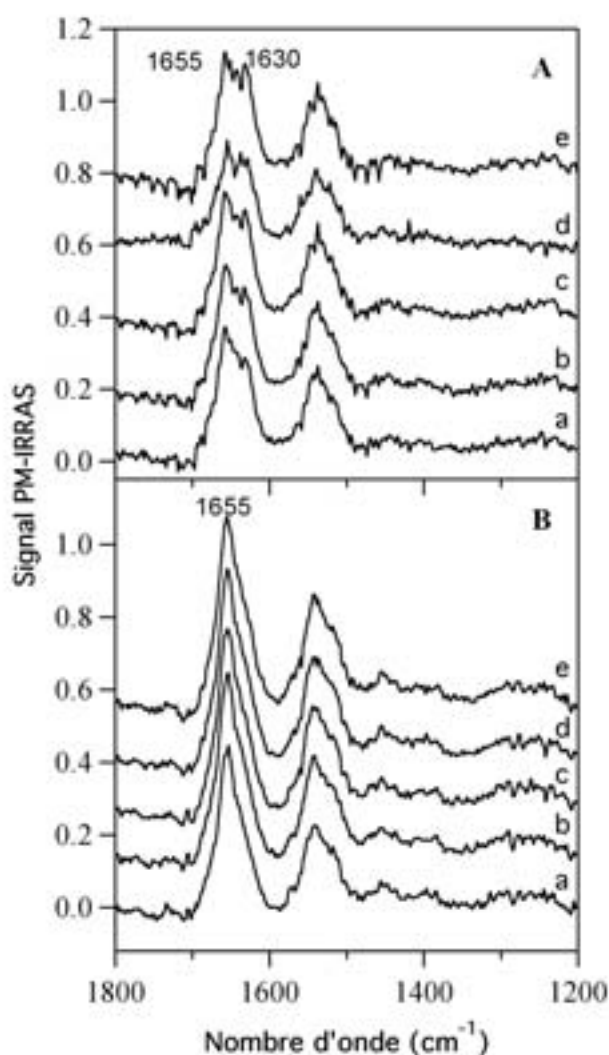


Figure 5.6: Spectre d'un film de rhodopsine maintenu à  $20 \text{ mNm}^{-1}$  en fonction du temps sur une sous-phase à (A)  $21^\circ\text{C}$  et (B)  $4^\circ\text{C}$ . Les spectres sont pris à toutes les 30 minutes de 0 à 120 minutes (a à e, respectivement).

### 5.1.2.3 Épaisseur du film de rhodopsine

Des mesures de réflectivité des rayons X ont été réalisées sur différents films de rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau. Le Tableau 5.1 montre le résumé des mesures effectuées sur ces films de rhodopsine. Ces mesures montrent qu'un film étalé à une pression de surface initiale de  $9.5 \text{ mNm}^{-1}$  possède une épaisseur de  $67.5 \text{ \AA}$  à  $21 \text{ mNm}^{-1}$ . Cette épaisseur est très proche de celle de  $75 \text{ \AA}$  déterminée par Teller *et al.* (2001) à partir de la structure tridimensionnelle de la rhodopsine. La

différence entre ces deux valeurs peut provenir du fait que la région des boucles entre les hélices du côté cytoplasmique et intradiscal est mal définie (Teller *et al.*, 2001). Cependant, lorsque le film de rhodopsine est étalé à 21°C à une pression de surface initiale plus faible ( $3.1 \text{ mNm}^{-1}$ ), l'épaisseur du film diminue à 53.4 Å (voir tableau 5.1). Cette diminution d'épaisseur devrait être le résultat d'une dénaturation partielle de la rhodopsine. Cette conclusion est appuyée par les résultats obtenus en PM-IRRAS dans les mêmes conditions expérimentales. Les mesures de réflectivité des rayons X d'un film de rhodopsine étalé à une faible pression de surface initiale ( $0.1 \text{ mNm}^{-1}$ ) montrent une épaisseur de 40.5 Å (voir tableau 5.1), ce qui suggère un fort degré de dénaturation car cette épaisseur est beaucoup plus faible que la valeur de 75 Å déterminée par Teller *et al.* (2001). Les données en réflectivité des rayons X appuient celles en PM-IRRAS en démontrant qu'une protéine membranaire dénaturée tend à s'étendre à la surface de l'eau, ce qui résulte en une diminution de son épaisseur.

Tableau 5.1: Résumé des mesures en réflectivité des rayons X. Pression de surface initiale ( $\pi_i$ ); pression de surface de la mesure ( $\pi$ ); épaisseur de la première boîte (d1); épaisseur de la deuxième boîte (d2) et épaisseur totale ( $d_{\text{tot}}$ ).

$\pi_i \text{ (mNm}^{-1}\text{)}$	$\pi \text{ (mNm}^{-1}\text{)}$	d1(Å)	d2(Å)	$d_{\text{tot}}$ (Å)
9.5	20.3-22.8	30.0	37.5	67.5
3.1	21.5-23.6	19.6	34.0	53.4
0.1	11.2-11.7	22.9	17.6	40.5

#### 5.1.2.4 Effet de la lumière

Il a été démontré par d'autres groupes que la rhodopsine sous l'effet de la lumière changeait de conformation et que la spectroscopie infrarouge était sensible à ces changements (Garcia-Quintana *et al.*, 1995; Kandori et Maeda, 1995; Nishimura *et al.*, 1995; DeLange *et al.*, 1999). On a donc tenté de voir s'il était possible d'observer ces changements par PM-IRRAS avec un film monomoléculaire de rhodopsine.

Comme le montre la Figure 5.7, l'effet de la lumière sur les films de rhodopsine *in situ* à l'interface air-eau n'est pas évident. En effet, il n'y a aucun changement visible dans les spectres PM-IRRAS entre un film de rhodopsine avant et après illumination pendant quelques minutes (voir Figure 5.7). Il est toutefois difficile de conclure catégoriquement que la rhodopsine en films monomoléculaires ne change pas de conformation après illumination car ces changements sont minimes et très difficiles à observer à haute concentration en solution (Garcia-Quintana *et al.*, 1995; Kandori et Maeda, 1995; Nishimura *et al.*, 1995; DeLange *et al.*, 1999).

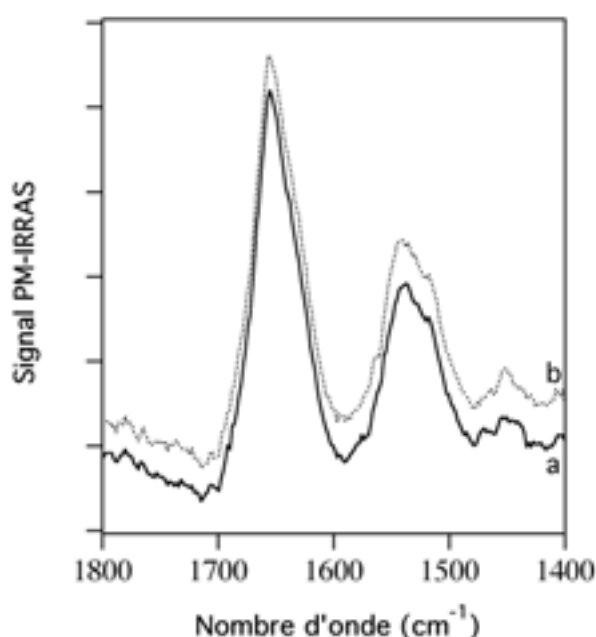


Figure 5.7: Spectre de rhodopsine à  $25\text{mNm}^{-1}$  avant (a) et après (b) illumination. Les spectres ont été décalés pour une meilleure clarté.

#### 5.1.2.5 Les conditions idéales pour maintenir l'intégrité de la rhodopsine

Suite aux mesures effectuées, il est possible de conclure que les meilleures conditions expérimentales permettant de maintenir l'intégrité structurale de la rhodopsine afin d'utiliser ces films monomoléculaires pour des études de cristallisation bidimensionnelle ou comme composant actif en nanotechnologie sont: un étalement à l'aide de la méthode de Trunitt à une pression de surface de  $5\text{mNm}^{-1}$ , suivi d'une compression immédiate à  $4.5\text{nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  et une sous-

phase à 4°C ou, encore, un étalement à l'aide de la méthode de Trurnit à une pression de surface de  $10 \text{ mNm}^{-1}$ , suivi d'une compression immédiate à  $4.5 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  et une sous-phase à 21°C

## 5.2 Perspectives de recherche

### 5.2.1 Les avenues de recherche pour la gramicidine

Maintenant que la structure de la gramicidine A et l'absence d'influence du solvant d'étalement sur sa structure ont été déterminées à l'interface air-eau, il serait intéressant de poursuivre les mesures de Ulrich et Vogel (1999) de détermination structurale de la gramicidine A dans une matrice lipidique à l'interface air-eau. Il s'agirait de déterminer l'effet du type de lipide de la matrice sur la structure de la gramicidine (lipide chargé positivement, négativement, zwitterionique ou neutre).

Dans le même ordre d'idée, comme la gramicidine est un pore à cations, il serait très intéressant de déterminer l'effet de cations monovalents introduits dans la sous-phase sur la structure de la gramicidine. Comme il est très difficile d'interpréter les structures obtenues en solution car elles sont fonction du solvant utilisé et que nous avons démontré que la gramicidine en monocouche n'est pas sujette à cette propriété, les changements observés seraient uniquement fonction de la force ionique et du type de cation présent.

### 5.2.2 Les avenues de recherche pour la rhodopsine

#### 5.2.2.1 Tentatives de cristallisation

Maintenant que les conditions expérimentales qui permettent le maintien de l'intégrité structurale de la rhodopsine à l'interface air-eau sont connues, il serait intéressant d'explorer la possibilité de former des cristaux bidimensionnels de cette protéine. Des mesures préliminaires en microscopie électronique ont démontré que les films de rhodopsine montraient un certain degré d'organisation (voir Figure 5.8). Ces résultats préliminaires sont très prometteurs dans l'optique d'optimisation de la



méthode d'obtention de cristaux bidimensionnels à l'interface air-eau. Il est donc important de déterminer les conditions optimales pour induire la cristallisation de la rhodopsine en deux dimensions.

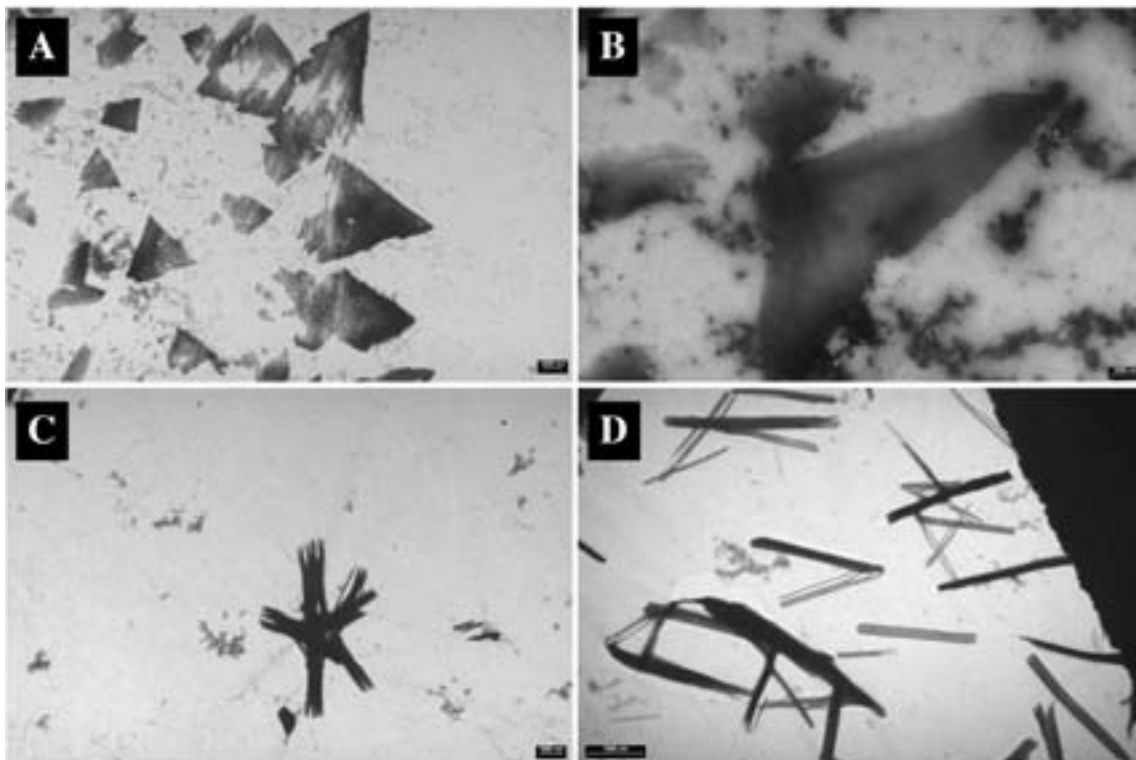


Figure 5.8 : Images en microscopie électronique d'un film de rhodopsine transféré à l'aide de la méthode de Langmuir-Schaffer. Transfert d'un film à  $30 \text{ mNm}^{-1}$  étalé sur une sous-phase à  $4^\circ\text{C}$  (A et B) et d'un film à  $10 \text{ mNm}^{-1}$  sur une sous-phase à  $21^\circ\text{C}$  (C et D)

Dans cette quête d'obtention de cristaux bidimensionnels, le détergent joue un rôle important. Il est donc primordial d'éliminer toute perturbation induite par celui-ci. Pour ce faire, il est possible d'employer un agent qui emprisonnera le détergent et l'éliminera de la sous-phase. De récents travaux (Rigaud *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 1999) montrent qu'il est possible à l'aide de Biobeads de piéger le détergent et ainsi faciliter la formation de cristaux bidimensionnels de protéines à l'interface air-eau.

Les mesures effectuées avec un film de membranes discales ont démontré que la rhodopsine étalée dans une matrice lipidique maintient son intégrité structurale. Ces données ouvrent la porte à une autre approche qui pourrait être mise au point pour préparer des cristaux bidimensionnels de protéines membranaires. Il serait ainsi

possible d'envisager de reconstituer la rhodopsine dans des vésicules de phospholipides possédant des chaînes grasses de 14 carbones et de les étaler à l'interface air-eau. On sait que l'hydrolyse de ces phospholipides par la phospholipase A2 injectée dans la sous-phase mène à la solubilisation des deux produits d'hydrolyse (Grainger *et al.*, 1990) et devrait ainsi permettre de concentrer les molécules de rhodopsine et, possiblement, d'induire leur cristallisation.

#### *5.2.2.2 Modèle simplifié d'interactions moléculaires*

Dans un autre ordre d'idée, maintenant qu'il est possible de maintenir la structure native de la rhodopsine à l'interface air-eau, il serait très intéressant de l'utiliser comme modèle simplifié pour étudier les interactions moléculaires prenant place au cours du processus visuel. Les interactions moléculaires entre la rhodopsine et la protéine G, la rhodopsine et l'arrestine ou la rhodopsine et la rhodopsine kinase pourraient être étudiées en utilisant la méthode des monocouches car la protéine G, l'arrestine et la rhodopsine kinase sont des protéines solubles et pourraient donc être injectées dans la sous-phase d'une monocouche de rhodopsine.

### 5.3 Références

- Bouchard, M. and M. Auger. 1993. Solvent history dependence of gramicidin-lipid interactions: a Raman and infrared spectroscopic study. Biophys J 65:2484-2492.
- Cornut, I., B. Desbat, J. M. Turllet 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.
- DeLange, F., P. H. Bovee-Geurts, A. M. Pistorius, K. J. Rothschild and W. J. DeGrip. 1999. Probing intramolecular orientations in rhodopsin and metarhodopsin II by polarized infrared difference spectroscopy. Biochemistry 38:13200-13209.
- Gallant, J. 1997. Spectroscopie et propriétés interfaciales du photosystème II en film monomoléculaire à l'interface air-eau. Thèse de doctorat. Université du Québec à Trois-Rivières. 158 p.
- Gallant, J., B. Desbat, D. Vaknin and C. Salesse. 1998a. Polarization-modulated infrared spectroscopy and x-ray reflectivity of photosystem II core complex at the gas-water interface. Biophys J 75:2888-2899.
- Gallant, J., H. Lavoie, A. Tessier, G. Munger, R. M. Leblanc and C. Salesse. 1998b. Surface and spectroscopic properties of photosystem II core complex at the nitrogen/water interface. Langmuir 14:3954-3963.
- Garcia-Quintana, D., A. Francesch, P. Garriga, A. R. de Lera, E. Padros and J. Manyosa. 1995. Fourier transform infrared spectroscopy indicates a major conformational rearrangement in the activation of rhodopsin. Biophys J 69:1077-1082.
- Grainger, D. W., A. Reichert, H. Ringsdorf, C. Salesse, D. E. Davies and J. B. Lloyd. 1990. Mixed monolayers of natural and polymeric phospholipids: structural

- characterization by physical and enzymatic methods. Biochim Biophys Acta 1022:146-154.
- Kandori, H. and A. Maeda. 1995. FTIR spectroscopy reveals microscopic structural changes of the protein around the rhodopsin chromophore upon photoisomerization. Biochemistry 34:14220-14229.
- Killian, J. A. 1992. Gramicidin and gramicidin-lipid interactions. Biochim Biophys Acta 1113:391-425.
- Killian, J. A. and D. W. Urry. 1988. Conformation of gramicidin in relation to its ability to form bilayers with lysophosphatidylcholine. Biochemistry 27:7295-7301.
- Levy, D., G. Mosser, O. Lambert, G. S. Moeck, D. Bald and J. L. Rigaud. 1999. Two-dimensional crystallization on lipid layer: A successful approach for membrane proteins. J Struct Biol 127:44-52.
- Nishimura, S., J. Sasaki, H. Kandori, J. Lugtenburg and A. Maeda. 1995. Structural changes in the lumirhodopsin-to-metarhodopsin I conversion of air-dried bovine rhodopsin. Biochemistry 34:16758-16763.
- Ries, H. E. and H. Swift. 1987. Monolayers of two transmembrane channel formers and an ionophore. J Colloid and Interface Science 117:584-588.
- Rigaud, J. L., G. Mosser, J. J. Lacapere, A. Olofsson, D. Levy and J. L. Ranck. 1997. Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. J Struct Biol 118:226-235.
- Teller, D. C., T. Okada, C. A. Behnke, K. Palczewski and R. E. Stenkamp. 2001. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Biochemistry 40:7761-7772.
- Ulrich, W. P. and H. Vogel. 1999. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers at the air/water interface. Biophys J 76:1639-1647.

Urry, D. W., M. C. Goodall, J. D. Glickson and D. F. Mayers. 1971. The gramicidin A transmembrane channel: characteristics of head-to-head dimerized (L,D) helices. Proc Natl Acad Sci U S A 68:1907-1911.

## **RÉSUMÉ**

Il a été postulé pendant des décennies que l'étalement des protéines à l'interface air-eau provoque leur dénaturation. Toutefois, jusqu'à tout récemment, aucune évidence directe permettait de confirmer cette affirmation. L'avènement de techniques telles que la réflectivité et la diffraction des rayons X ainsi que la spectroscopie de réflectivité infrarouge différentielle par modulation de polarisation (PM-IRRAS) a permis d'étudier la structure secondaire et l'organisation de protéines en films monomoléculaires in situ à l'interface air-eau. Afin de clarifier ce postulat, nous avons étudié la structure secondaire et l'organisation de deux protéines membranaires modèles in situ à l'interface air-eau, soit la gramicidine, un pentadecapeptide utilisé comme antibiotique, et la rhodopsine, la chromoprotéine responsable de la première étape du cycle visuel. La combinaison des techniques de pointe (rayons X et le PM-IRRAS) pour l'étude de films minces a permis de mieux comprendre l'organisation structurale et les mécanismes de dénaturation de ces protéines membranaires à l'interface air-eau. Les résultats obtenus permettent de démontrer que la gramicidine se réorganise à l'interface air-eau tout au long de l'isotherme de pression de surface et qu'elle adopte une structure en double hélice  $\beta$ 5.6 antiparallèle entrelacée. Les mesures effectuées avec la rhodopsine montrent qu'il est possible, à l'aide de conditions expérimentales bien définies, de maintenir sa structure secondaire native.

## ***MOTS CLÉS***

Spectroscopie infrarouge

Film monomoléculaires

Rhodopsine

Gramicidine

Structure secondaire

Organisation et orientation moléculaire

PM-IRRAS