UNIVERSITE PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE - U.F.R. SCIENCES DE LA VIE
ECOLE DOCTORALE 387 INTER///BIO

THÈSE

Spécialité : Structure, Fonction et Ingénierie des Protéines

Présentée par

Jérôme SEGUIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Influence de la température sur la structure et la dynamique des protéines collectrices de lumière des bactéries pourpres dans leur environnement natif

Soutenue le 13 juin 2008 devant le jury composé de :

Pr.	**Germain TRUGNAN**	Président
Dr.	**Sophie LECOMTE**	Rapporteur
Pr.	**James STURGIS**	Rapporteur
Dr.	**Cécile BREYTON**	Examinateur
Dr.	**Bruno ROBERT**	Examinateur
Dr.	**Maïté PATERNOSTRE**	Directeur de thèse

A mon père,

"Pureté Pigmentaire "



Chromatophores Bactériens sur Toile
JS, juin 2008

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au CEA Saclay dans le Laboratoire de Bioénergétique Membranaire et Stress du Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes, unité de recherche associée CEA-CNRS 2096.

Je tiens à remercier Bruno Robert pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans son service et pour son soutien durant notre longue collaboration.

Je remercie tout particulièrement Maïté Paternostre, ma directrice de thèse, pour l'ensemble de sa contribution à ce projet. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir guidé au cours de cette thèse. Son incroyable dynamisme, son enthousiasme et son soutien m'ont permis de réaliser ce travail dans de très bonnes conditions, autant sur le plan scientifique qu'humain. Maïté a ainsi contribué à me convertir de navigateur cellulaire en explorateur moléculaire…

Je suis particulièrement reconnaissant à Luc Bordes pour son aide précieuse lors des expériences de spectroscopie. Sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse ont été des atouts importants dans la réussite et la fiabilité de mes mesures. Je le remercie également pour tous les bons moments passés en sa compagnie : ses récits passionnés m'ont beaucoup fait voyager, au cours du temps notamment, et m'ont permis quelques évasions non scientifiques appréciables.

Je remercie également Ghada Ajlani pour sa contribution dans la construction du mutant S1S et pour m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire. Merci à Andrew Gall et Alain Desbois pour leur aide et leurs conseils au cours de nos discussions. Je remercie Renée Gobin et Jean-Marc Verbavatz pour m'avoir consacré un peu de leur temps pour la réalisation des clichés de microscopie électronique, et Leonas Valkunas pour sa collaboration et l'intérêt qu'il porte à ce travail.

Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans la venue de Nicolas Fay en séjour post-doctoral dans notre équipe. Sa bonne humeur et son humour inégalable m'ont permis de passer d'excellents moments en sa compagnie.

Hors du laboratoire, le bureau est un endroit dans lequel se font en autre le traitement des données, l'interprétation des résultats et la rédaction du manuscrit. C'est donc un lieu de réflexion qui nécessite beaucoup de calme. J'ai donc eu la chance et le plaisir de partager au quotidien cet

espace avec Adrienne Gomez de Gracia pendant ces quatre années. Je la remercie vivement pour sa gentillesse, sa discrétion et son soutien.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire avec qui j'ai partagé d'agréables moments : Andy Pascal, Julie Keirsse, Thibaut Desquilbet, Cristian Ilioaia et Charlène Cheul, à qui je souhaite beaucoup de réussite dans ses projets d'avenir.

Un grand merci à tous les membres du SB^2SM, et tout particulièrement Jocelyne Ergotte, Karine Belin et Pascale Filoche pour leur aide administrative ainsi que Christian Chauvin et Louis Liagre pour avoir réalisé les montages nécessaires au développement de certaines expériences.

Je souhaite associer dans ces remerciements deux jeunes chercheurs qui, par le passé, ont grandement contribué à mon épanouissement dans le milieu de la recherche scientifique : Delphine Pon, pour avoir guidé mes premiers pas dans un laboratoire et permis de réaliser mes toutes premières expériences et Véronique Arluison, pour m'avoir transmis sa passion pour l'étude des protéines et pour m'avoir guidé et soutenu au cours de toutes ces années.

Je voudrais enfin remercier infiniment mes parents qui ont toujours compris, accepté et soutenu mes choix. Ils ont réalisé très tôt que mon bonheur serait toujours étroitement lié à ma passion pour les sciences de la vie. Je remercie également tous les membres de ma famille pour leur soutien.

Merci Sylvie. Pour ta compréhension, ton soutien et toute l'attention que tu portes au quotidien sur ce que je suis et ce que je réalise… Merci pour tout.

Merci à tous mes amis qui se sont intéressés à mon travail, et en particulier la célèbre équipe de football de l'ASCEA Saclay !

Que tout ceux que j'aurais involontairement oubliés dans ces remerciements me pardonnent.

Pour terminer, je tiens à remercier Mesdames Sophie Lecomte et Cécile Breyton, et Messieurs James Sturgis, Germain Trugnan et Bruno Robert qui me font l'honneur de bien vouloir être les membres de mon jury de thèse.

Tables des matiéres

Avant-propos ……...- 15 -

Chapitre 1.....- 19 -
Introduction générale

1.1 Organisation des membranes biologiques et structure des protéines membranaires- 21 -
1.1.1 Organisation des membranes biologiques.....- 21 -
1.1.2 Structure des protéines membranaires.....- 31 -
1.2 Description de l'appareil photosynthétique bactérien.....- 44 -
1.2.1 Photosynthèse bactérienne.....- 44 -
1.2.2 Structures et variétés des complexes impliqués dans la photosynthèse bactérienne. - 49 -
1.2.3 Fonction des protéines collectrices de lumière (protéines antennes).....- 57 -
1.2.4 Biosynthèse et assemblage du photosystème bactérien.....- 61 -
1.2.5 Les protéines antennes des bactéries pourpres : un système modèle pour des études en environnement membranaire.....- 65 -
1.3 Objectif de l'étude.....- 67 -

Chapitre 2.....- 69 -
Influence de la température sur la dynamique des protéines LH1 et LH2

2.1 Présentation des trois souches de *Rhodospirillum rubrum* : S1, S1S et G9.....- 71 -
2.2 Temperature dependence of LH1 spectrum reflects the protein natural flexibility: a study of LH1 in native intracytoplasmic membranes.....- 73 -
2.3 Résumé de l'article.....- 96 -
2.4 Effet de la température sur la structure des protéines antennes LH2.....- 97 -

Chapitre 3.....- 109 -
Dissociation des protéines LH1 de *Rhodospirillum rubrum* dans leurs membranes natives

3.1 Introduction.....- 111 -
3.1.1 Enoncé de la problématique.....- 111 -
3.1.2 Synthèse des études de dissociation en présence de détergent : la protéine LH1 de *Rsp. rubrum* G9.....- 112 -
3.2 Dissociation/réassociation de la protéine LH1 en présence de détergent.....- 116 -
3.2.1 Dissociation de la protéine LH1 dans les membranes intracytoplasmiques chez *Rsp. rubrum* G9: effet du détergent βOG.....- 116 -
3.2.2 Dissociation de la protéine RC-LH1 purifiée (G9 et S1) en DDM : effet de la température.....- 118 -
3.3 Influence de la température sur le processus de dissociation-réassociation des protéines LH1 de S1, G9 et S1S en membranes natives.....- 125 -
3.3.1 Effet de la température sur l'oligomérisation des protéines LH1 : étude par spectroscopie d'absorption.....- 127 -
3.3.2 Analyse du processus de dissociation-réassociation du LH1 de S1, G9 et S1S - 131 -

3.4 Conclusion : chemin de dissociation et réassociation de la protéine LH1 en membrane native…… - 144 -

Chapitre 4 - 147 -
Conclusions et perspectives

Chapitre 5 - 155 -
Matériels et méthodes

5.1 Souches et cultures bactériennes - 157 -
5.1.1 *Rhodospirillum rubrum* S1, S1S et G9+ - 157 -
5.1.2 *Rhodobacter sphaeroides* DD13-LH2 - 157 -
5.2 Microscopie électronique - 158 -
5.3 Préparation des membranes - 158 -
5.4 Extraction et purification des complexes LH1 et RC-LH1 - 160 -
5.5 Spectroscopie d'absorption Visible-IR en fonction de la température - 160 -
5.6 Spectroscopie Raman de résonance - 161 -
5.7 Dichroïsme circulaire - 163 -
5.8 Caractérisation du mutant Rsp. rubrum S1S - 163 -
5.8.1 Construction du mutant - 163 -
5.8.2 Cinétique de croissance et morphologie des bactéries - 163 -
5.8.3 Caractérisation spectroscopique des membranes intracytoplasmiques - 167 -

Annexes ……- 171 -
Bibliographie ……- 191 -

Abréviations

AFM : Atomic Force Microscopy

βOG : n-octyl-β-D-glucopyranoside

ATCC : American type culture collection

ATP : adénosine triphosphate

Bchl : bactériochlorophylle

Bpheo : bactériophéophytine

Car : caroténoïde

CHAPS : Cholamidopropyl-dimethylammonio-propanesulfonate

CMC : concentration micellaire critique

DC : dichroïsme circulaire

DHPC : Diheptanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine

DO : densité optique

DOPC : Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine

FT- Raman : Raman à transformée de Fourier

FWHM : full width at half maximum

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

kDa : kilodalton

LDAO : lauryldiméthylamine-N-oxide

LH1: light-harvesting 1: protéine antenne cœur

LH2: light-harvesting 2: protéine antenne périphérique

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells

PC : phosphatidylcholine

PDB : Protein Data Bank

PE : phosphatidyléthanolamine

PG : phosphatidylglycérol

RC : reaction center : centre réactionnel

Rb : Rhodobacter

Rps : Rhodopseudomonas

Rsp : Rhodospirillum

RMN : Résonance magnétique nucléaire

Spx : spirilloxanthine

Tris : Tris (hydroxymethyl)- aminométhane

UV : ultraviolet

Avant-propos

Les protéines membranaires sont codées par environ 20 à 30% des génomes eucaryotes et procaryotes et sont des macromolécules essentielles pour permettre le fonctionnement de nombreux processus tels que la communication cellulaire, la transduction des signaux et le transport ou l'échange de molécules à travers la membrane.

Les protéines membranaires ne représentent à l'heure actuelle qu'environ 1% des structures déposées dans la "Protein Data Bank" car elles sont difficiles à étudier. En effet, le caractère hydrophobe de ces macromolécules entraîne des difficultés particulières au cours des étapes de production, d'extraction et de purification par rapport aux protéines solubles. Des études par cristallographie aux rayons X ont permis de révéler de nouvelles structures de protéines membranaires à haute résolution et d'ouvrir de nouveaux champs d'investigations concernant notamment la relation structure/fonction de ces macromolécules, leurs interactions avec les lipides et avec de nombreux cofacteurs ou ligands. A partir des structures obtenues, de nouvelles informations sont nécessaires pour appréhender la fonction des protéines membranaires et comprendre comment ces macromolécules s'insèrent dans leur environnement naturel (repliement) et comment elles s'organisent au cœur de la membrane (assemblage). La

détermination des ces informations nécessite de s'intéresser aux changements de conformation et à la dynamique des protéines membranaires qui sont des phénomènes dépendant en autres des interactions entres hélices transmembranaires, entre polypeptides et lipides. Des approches complémentaires de biochimie et de biophysique sont donc nécessaires pour pouvoir élargir la compréhension des propriétés physico-chimiques de ces macromolécules.
Depuis quelques années, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence les paramètres physiques, chimiques et énergétiques impliquées dans la reconnaissance et la stabilité entre polypeptides membranaires. Il est acquis aujourd'hui que les membranes biologiques constituent un environnement hydrophobe et dynamique qui impose des contraintes dans le repliement et l'assemblage des protéines membranaires.

Ce travail de thèse concerne l'étude de l'assemblage et de la stabilité des protéines membranaires à partir des propriétés spectroscopiques des protéines antennes des bactéries pourpres photosynthétiques. Ces protéines antennes constituent un modèle de choix dans le cadre de l'étude des processus de dissociation-réassociation à l'aide des protéines solubilisées en présence de détergent. Nous avons développé au laboratoire une approche "calorimétrique fonctionnelle" qui nous a permis d'analyser le processus d'association-dissociation de ces protéines antennes dans leur environnement naturel, les membranes intracytoplasmiques. Pour cela, le facteur dénaturant que nous appliquons est la température, qui affaiblit progressivement les interactions entre polypeptides transmembranaires.
Le chapitre 1 (Introduction générale) présente d'une part un état de l'art sur l'étude de la structure et de la fonction des protéines membranaires par des approches biochimiques et biophysiques, et d'autre part, les informations que nous connaissons à l'heure actuelle sur la structure de la protéine antenne photosynthétique LH1 et l'intérêt d'utiliser cette protéine "modèle" pour nos études. Le chapitre 2 présente les résultats que nous avons obtenus sur la protéine LH1 en température dite "non dénaturante" proche des conditions physiologiques. Ces conditions nous ont permis de mettre en évidence un équilibre entre deux formes spectrales démontrant une flexibilité conformationnelle de la protéine LH1 dans son environnement naturel. Dans le chapitre 3, nous nous intéressons plus particulièrement au processus de dissociation-réassociation de la protéine LH1 analysé à des températures élevées. Nous montrerons que ce processus suit des chemins différents de ceux observés à partir de la protéine solubilisée en détergent. Le chapitre 4 présente les conclusions issues de ces études et les perspectives envisagées, et le chapitre 5 les matériels et méthodes développés.

Chapitre 1

Introduction générale

1.1 Organisation des membranes biologiques et structure des protéines membranaires

1.1.1 Organisation des membranes biologiques

1.1.1.1 Rôle, composition et organisation des membranes

Les membranes biologiques peuvent être considérées comme l'un des « organites » cellulaires les plus importants des cellules puisque ce sont elles qui assurent les fonctions aussi essentielles à la vie que le transport des nutriments et des ions, la photosynthèse, la respiration et la synthèse d'ATP, la transduction des signaux, la migration cellulaire, ou bien encore le développement, aussi bien chez les microorganismes les plus primitifs que chez un être vivant aussi complexe que l'homme. Ce sont elles qui forment une interface entre les cellules et leur environnement. Il a fallu plus de 100 ans aux scientifiques pour parvenir à l'image que nous avons maintenant de l'organisation moléculaire et supramoléculaire des membranes. Quelques unes des avancées les importantes ayant jalonné ce domaine d'étude sont reportées sur la Figure 1-1.

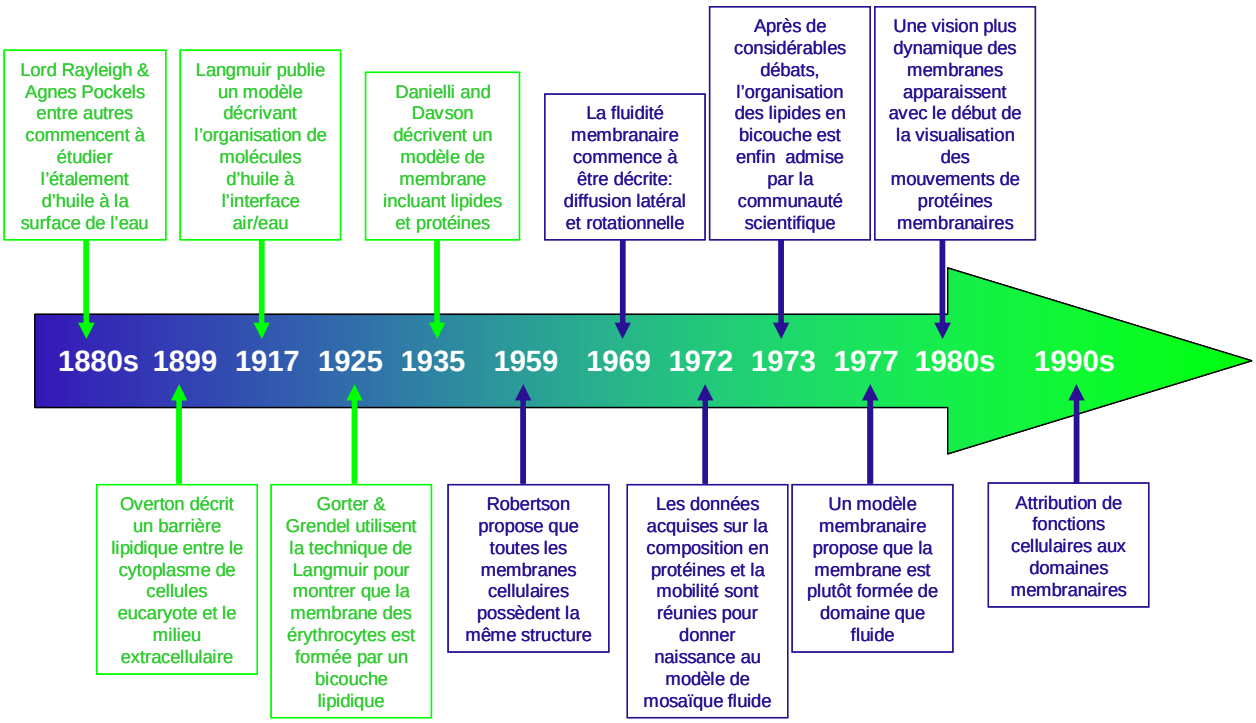


Figure 1-1 : les principales date clés de la découverte et de la compréhension de l'organisation des membranes cellulaires.

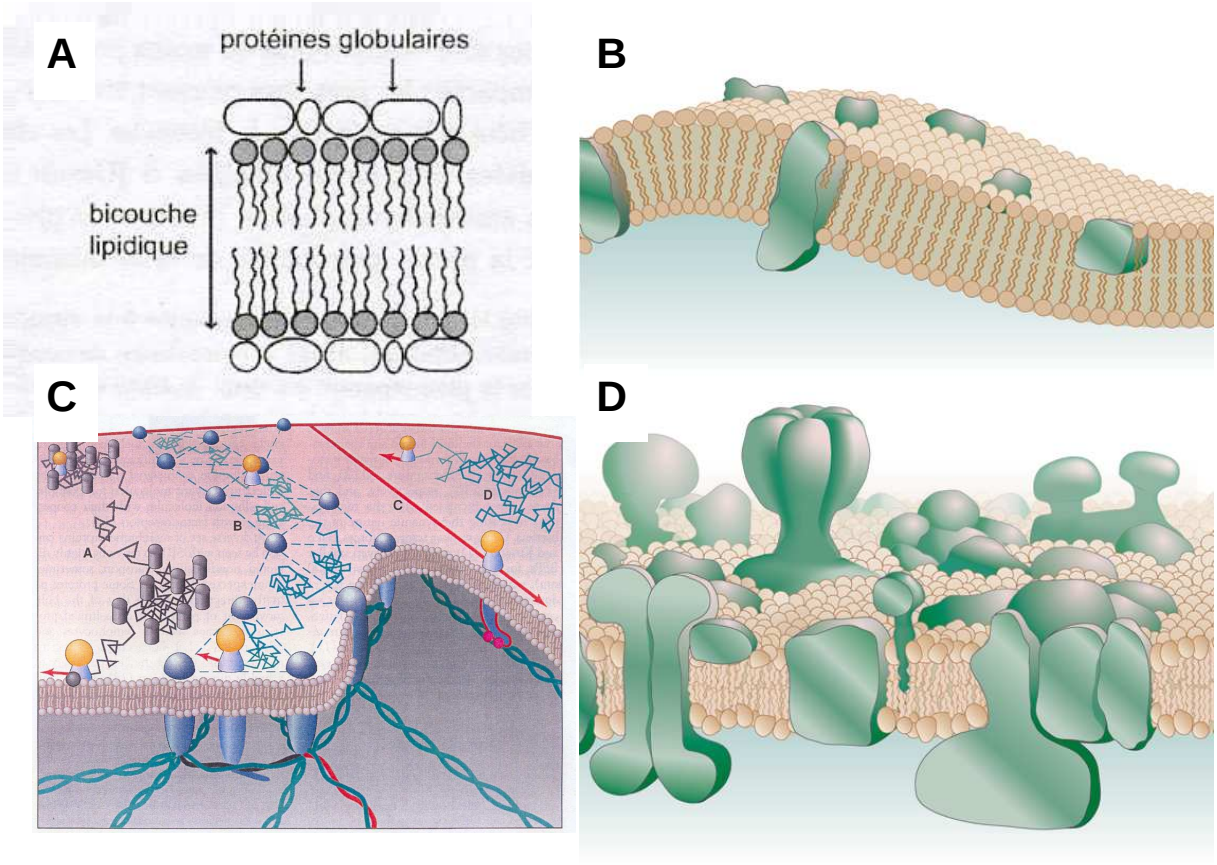
Depuis très longtemps, il est connu que des films huileux à la surface de l'eau diminuent très notablement l'amplitude des vagues. Il a cependant fallu attendre les travaux de Lord Rayleigh et surtout d'Agnes Pockels (Pockels, 1891) à la fin du 19ème siècle pour que les premières études scientifiques soient réalisées sur les films mono-moléculaires étalés à la surface de l'eau. A noter que c'est Miss A. Pockels qui a inventé la balance dite de Langmuir, et qu'elle faisait ses expériences dans sa cuisine, n'ayant aucune formation scientifique et surtout aucune position académique. C'est en 1917 que I. Langmuir (Langmuir, 1917) propose que les molécules d'acide gras s'organisent en monocouche à la surface de l'eau et qu'elles s'ordonnent spontanément, projetant leur chaînes aliphatiques dans l'air. En parallèle, E. Overton montre la présence majoritaire des lipides dans les membranes cellulaires (Overton, 1899). L'organisation en bicouche des lipides a été révélée pour la première fois en 1925 par Gorter et Grendel qui étudiaient les extraits lipidiques issus de membranes d'érythrocytes (Gorter and Grendel, 1925). A partir d'une quantité connue d'érythrocyte et après extraction des lipides en solvant organique, les auteurs ont étalé les lipides à la surface air/eau, calculé la surface occupée par molécule et déduit que les lipides étaient organisés en bicouche dans la membrane des érythrocytes. Jusqu'à cette date, la présence de protéine n'est pas mise en évidence et il faut encore attendre une dizaine d'année pour que le modèle de Danielli (Danielli and Davson, 1935) mette en évidence une bicouche purement lipidique avec des protéines en interaction avec leur tête polaires (Fig. 1-2A). Cependant, il faut attendre les années 1970 pour que l'organisation en bicouche des lipides soit admise par l'ensemble de la communauté scientifique et généralisée à toutes les membranes biologiques. C'est également à cette époque, que les premières mesures de « fluidité membranaire » sont réalisées, montrant les mouvements latéral et rotationnel des lipides, et que le modèle membranaire en mosaïque fluide apparaît (Fig. 1-2B) (Singer and Nicolson, 1972).

Les membranes biologiques sont alors schématisées comme une "mer" de lipides maintenant en solution des protéines monomériques très dispersées et dont la surface est en contact direct avec le milieu aqueux environnant. Une fois ce modèle posé et accepté et pendant les décennies qui ont suivi, l'intérêt de la communauté scientifique s'est porté exclusivement sur l'étude de la structure et de la fonction des protéines ancrées dans les membranes, en considérant que les lipides ne servaient qu'à maintenir les protéines dans la bicouche. Face à cette attitude, il y avait pourtant un certain nombre d'indices suggérant que les lipides remplissaient un rôle plus important dans le fonctionnement des protéines membranaires, à savoir l'homéostasie ainsi que l'asymétrie de la composition lipidiques des feuillets internes et externes par exemple mais aussi au niveau cellulaire la corrélation entre apoptose et apparition de phosphatidyl-serine sur la

surface externe des membranes plasmiques (Rothman and Lenard, 1977; Tyurina et al., 2000; Zimmerberg and Gawrisch, 2006). Le modèle de Singer et Nicholson a été progressivement réactualisé, en changeant d'une part la vision de la membrane se comportant comme une frontière dynamique du vivant et non plus comme une barrière inerte et présentant une composition et une épaisseur variable, ainsi qu'une concentration élevée de complexes protéiques (1-2C-D) (Engelman, 2005; Jacobson et al., 1995). Une autre voie a été ouverte il y a une quinzaine d'années par la découverte que les membranes biologiques n'étaient pas un milieu bidimensionnel dans lequel se solvataient librement les protéines membranaires, mais plutôt comme un milieu bidimensionnel avec localement de très grandes hétérogénéités de composition en lipide et en protéine. Plus particulièrement, cette voie a été ouverte par Brown & Rose ((Brown and Rose, 1992) et plus tard (Melkonian et al., 1995)) quand il se sont aperçu qu'une fraction des membranes de cellules épithéliales de rein de chien (MDCK) était résistante au traitement par un détergent puissant le Triton X100. L'analyse de ces fractions de membranes insolubles a mené à la conclusion, qu'outre un enrichissement en protéines à ancre GPI, ces « radeaux » contenaient aussi une proportion beaucoup plus forte que le reste de la membrane en sphingomyéline et en cholestérol. Ces deux lipides sont depuis largement étudiés non seulement par les physico-chimiques pour leur comportement propre et leur capacité à former des phase lamellaires liquide-ordonnée (Lo), mais aussi par les biochimistes pour leur capacité à générer des ilots membranaires dynamiques dans lesquels seraient plus ou moins triés certaines protéines membranaires.

La notion de « radeau » est alors apparue, sous-entendant une compartimentation latérale des fonctions au sein des architectures membranaires. En effet, les membranes biologiques sont le site de nombreuses fonctions assurées par les protéines membranaires et souvent par l'action concertée de plusieurs protéines. Ainsi, au niveau du fonctionnement des membranes, il est tentant de croire que les membranes possèdent une architecture bidimensionnelle dynamique qui permettrait de compartimenter les différentes fonctions. Ainsi, s'est développé un axe de recherche sur la visualisation des architectures membranaires et en particulier de l'organisation latérale de leurs composants. Ces recherches ont d'autre part bénéficiées du grand essor technologique dans le domaine de la microscopie AFM d'une part (Scheuring, 2006; Scheuring et al., 2005b) et de la visualisation de particules uniques d'autre part (Fujiwara et al., 2002). La Fig. 1-2D, décrit un modèle dynamique d'une membrane plasmique caractérisé par les différents types de mouvements que les protéines adoptent dans la membrane. Il faut aussi noter que ce modèle relie l'architecture de la membrane avec celle du cytosquelette qui est en forte interaction avec le

feuillet intra-cytoplasmique de la membrane et qu'il participe à la compartimentalisation de la membrane.



<u>Figure 1-2</u> : Différents modèles de membranes biologiques.
A : Danielli et Dawson (1935) ; B : Le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson (1972) ; C : modèle dynamique de la membrane cellulaire (Jacobson et al., 1995); D : une version contemporaine revisitée (Engelman, 2005)

Les dernières évolutions de la compréhension des membranes et des structures des protéines membranaires font que l'étude des interactions protéines-lipides est actuellement en plein développement. Il a été montré en particulier à partir de structures cristallographiques de protéines membranaires, que certains lipides pouvaient se lier spécifiquement aux protéines et influenceraient/participeraient directement à l'insertion et au repliement de ces protéines et qu'ils contribueraient également à leur structure, leur stabilité et leur fonction (Hunte, 2005). Pour exemple, la structure à haute résolution d'une protéine membranaire, l'aquaporine (PDB, AQP0), a révélé l'affinité de la protéine avec ses lipides environnants dans un cristal bidimensionnel (Gonen et al., 2005). Cet exemple apporte des informations très précises au niveau moléculaire sur le rôle des différents groupements chimiques des lipides et de la protéine en interaction (Fig.

1-3). D'autres exemples similaires montrant des structures de protéines membranaires comme la bacteriorhodopsine et le centre réactionnel photosynthétique obtenues à haute résolution, ont permis de mettre en évidence la présence de lipides en interaction et de leur associer un rôle fonctionnel (Lee, 2003). Les protéines membranaires jouent de leur côté un rôle prépondérant dans la forme, la courbure (McMahon and Gallop, 2005; Zimmerberg and Kozlov, 2006) et l'épaisseur de la bicouche lipidique (Freites et al., 2005) (mésappariement hydrophobe, (Killian, 1998)).

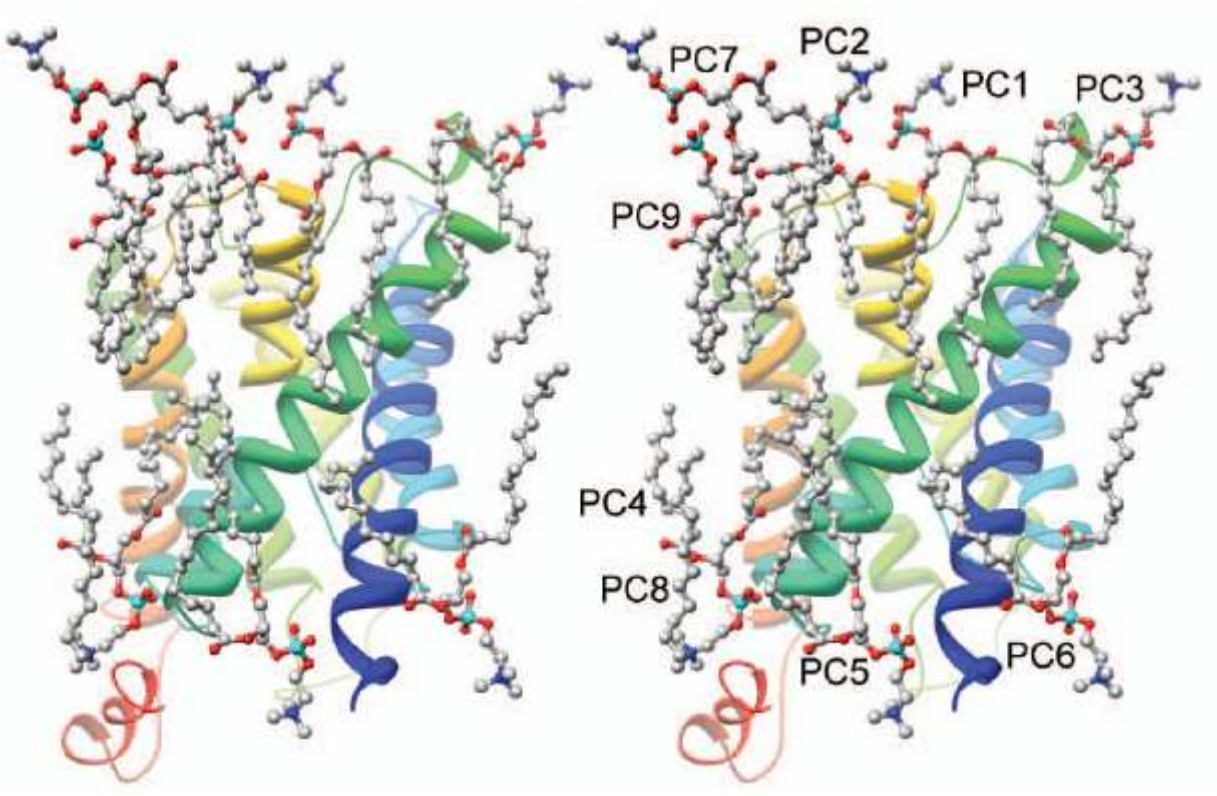


Figure 1-3 : Lipides en interaction avec un monomère d'aquaporine AQP0 dans un cristal 2D (vue en stéréo). PC1 à PC7 sont les lipides formant un anneau en contact direct avec la protéine, à la différence de PC8 et PC9. Les hélices H1 à H6 du monomère AQP0 sont en couleur (Gonen et al., 2005)

1.1.1.2 Lipides membranaires

Les membranes sont constituées majoritairement de deux types de molécules : les lipides et les protéines. Les lipides membranaires font essentiellement partie de la classe des lipides polaires, c'est-à-dire qu'ils possèdent tous un ou plusieurs groupements polaires leur conférant leur double affinité pour l'eau et pour l'huile. Parmi les lipides polaires constitutifs des membranes, trois classes de lipides sont particulièrement représentés : les glycolipides, les stérols et les

phospholipides, ces derniers étant les plus représentés notamment chez les procaryotes. Parmi les lipides les plus rencontrés dans la nature, on peut citer les sphingolipides avec la sphingomyéline en particulier, les phospholipides avec la phosphatidylcholine en particulier et le cholestérol (Fig. 1-4).

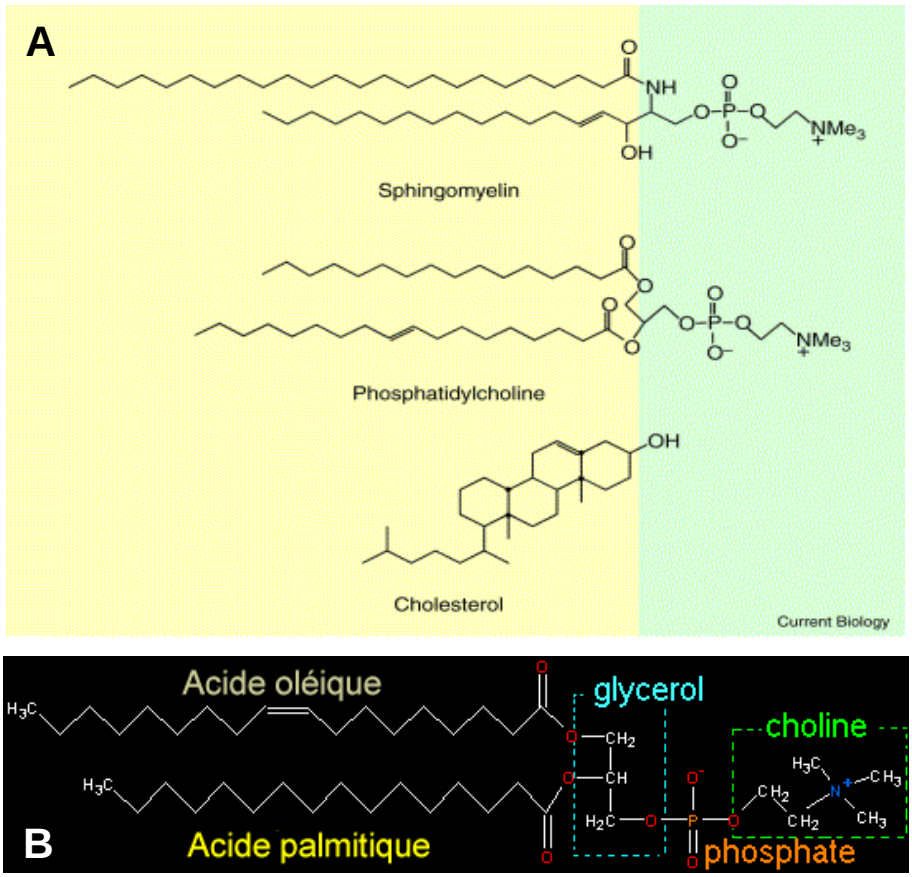


Figure 1-4 : A : Structures chimiques de sphingomyéline (classe des sphingolipides), de phosphatidylcholine, (classe des glycérophospholipides ; PC) et du cholestérol (Lee, 2001). B : structure détaillée de la phosphatidylcholine.

Les phospholipides, composants ubiquitaires des membranes biologiques sont principalement représentés par les glycérophospholipides. Ces molécules sont structurées de la façon suivante : sur un squelette glycérol commun sont substitués deux chaines aliphatiques et une tête polaire constituée d'un groupement phosphate lui-même substitué par des groupements polaires variables (Fig. 1-4B).

Les phospholipides naturels sont classés en fonction de la nature de leur tête polaire (Fig. 1-5B : phosphatidyl -choline, -sérine, -éthanolamine, etc.). Les phospholipides extraits de leur membrane biologique sont purifiés en fonction de leur tête polaire. Cependant, un lipide ainsi purifié correspond à un mélange de lipides dont les chaînes aliphatiques sont de longueur et de nombre d'insaturation différents. En raison de leur nature amphiphile, les phospholipides s'auto-

assemblent spontanément dans l'eau, en protégeant leurs chaînes aliphatiques hydrophobes alors que leurs têtes polaires restent en contact de l'eau. Dès 1976, Israelachvili (Israelachvili et al., 1976; Israelachvili et al., 1977) a proposé que l'organisation moléculaire des assemblages lipidiques ainsi que leur forme étaient reliées à un paramètre moléculaire exprimé par le rapport entre les surfaces occupées par la tête polaire et par les chaînes hydrophiles des lipides (Fig. 1-5A). Plus précisément, si S désigne la surface occupée par tête polaire, V le volume occupé par les chaînes aliphatiques et l leur longueur, les lipides s'assembleront pour former des micelles sphériques pour V/S*l<1/ 3, des micelles cylindriques pour 1/3<V/S*l<1/ 2 et des bicouches planes pour ½<V/S*l<1. En ce qui concerne les lipides polaires, ce paramètre géométrique dépend des conditions d'hydratation et de température. Les assemblages lipidiques sont lyotropes et thermotropes, c'est la raison pour laquelle un même lipide peut s'assembler en micelles sphériques, cylindriques ou phases lamellaires en fonction de sa concentration ou de la température d'où la richesse et la complexité des diagrammes de phase des lipides. Ce phénomène explique aussi que dans une membrane naturelle contenant des mélanges de lipides de longueurs de chaînes et de têtes polaires variables, les fluctuations des lipides puissent générer des variations locales et dynamiques des épaisseurs et des rayons de courbures de la membrane. Ainsi, si l'organisation des lipides membranaires est globalement une organisation lamellaire (en bicouche), cette organisation peut être localement très différente, soit sous l'influence de la fluctuation des compositions lipidiques locales, soit du fait de la présence des protéines membranaires mais aussi des protéines solubles en forte interaction avec les membranes.

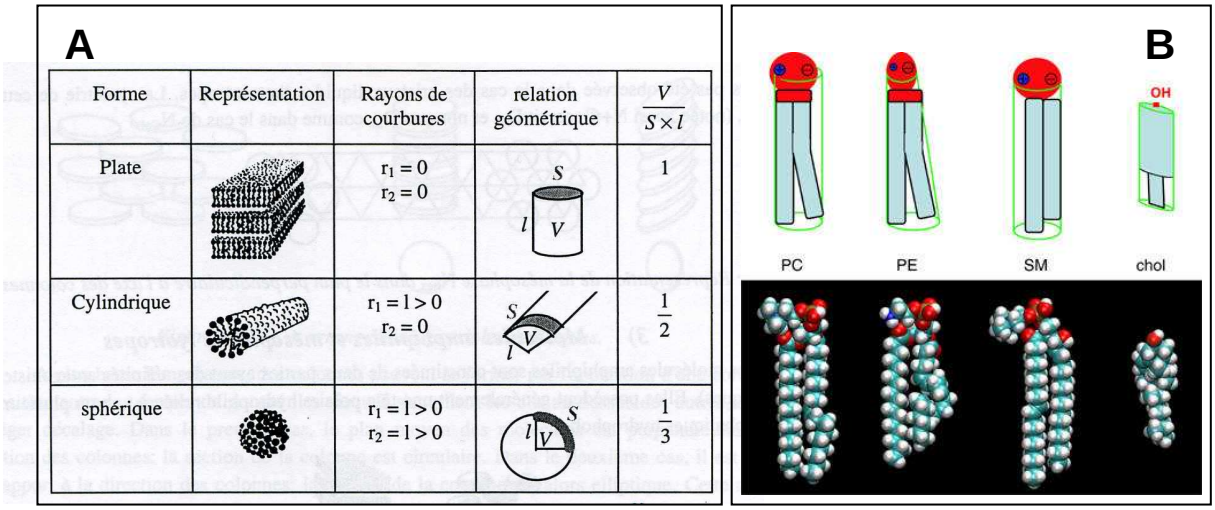
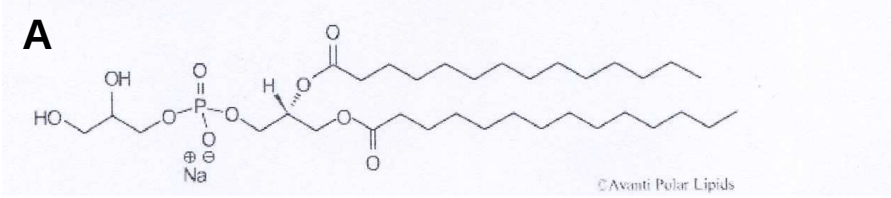
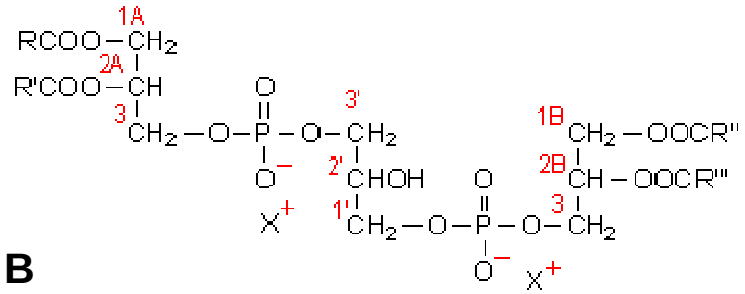


Figure 1-5 : A : relation entre le paramètre moléculaire défini par Israelachvili et l'organisation et la morphologie des assemblages lipidiques (Israelachvili, 1992) ; B : structure et géométrie de principaux lipides membranaires. PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; SM, sphingomyéline ; chol, cholestérol (van Meer, 2005)

Depuis quelques années, les scientifiques s'intéressent de plus près aux interactions entre protéines et phospholipides. Plus particulièrement, les structures de protéines membranaires à haute résolution ayant révélé la présence de lipides anioniques au cœur même des chaines polypeptidiques, les interactions entre protéines et phosphatidylglycerol et/ou cardiolipine ont été établies (Fig. 1-6). La cardiolipine (diphosphatidylglycerol, CL) est un lipide anionique de structure très atypique puisqu'il possède 4 chaines aliphatiques et qu'il est bi-anionique. A noter que les cardiolipines sont souvent présents en très faible quantité dans la composition des membranes biologiques.



Phosphatidylglycerol



Cardiolipine

<u>Figure 1-6</u> : Structures chimiques de A : phosphatidylglycérol et B : cardiolipine.

Il semblerait donc que les phospholipides puissent jouer un rôle de cofacteur structural et fonctionnel, comme des études cristallographiques l'ont montré pour la bactériorhodopsine (Luecke et al., 1999), ou bien encore pour le centre photo réactionnel bactérien (Camara-Artigas et al., 2002; McAuley et al., 1999). Très récemment, une étude a mis en évidence le possible rôle physiologique de 13 lipides (2 CL, 1 PC, 3 PE, 4 PG et 3 triglycérides) en interaction avec l'enzyme cytochrome c oxydase (Shinzawa-Itoh et al., 2007).

D'autre part, la découverte des « radeaux » membranaires (Brown and Rose, 1992; Melkonian et al., 1995), fortement enrichis en protéines à ancre GPI, en sphingomyéline et en cholestérol,

a déclenché un regain d'intérêt de la communauté scientifique vis-à-vis du comportement des lipides et de leurs mélanges en présence ou non de protéines membranaires.

1.1.1.3 Protéines membranaires

Dans les membranes biologiques, les protéines membranaires présentent une très grande diversité structurale et fonctionnelle. Certaines protéines peuvent s'attacher à la surface de la membrane alors que d'autres sont enfouies au cœur même de la bicouche lipidique. Il est donc possible de distinguer deux catégories de protéines membranaires selon la nature des interactions membrane-protéine.

Les protéines membranaires périphériques (protéines dites extrinsèques) n'interagissent pas avec le domaine hydrophobe des lipides mais avec leurs têtes polaires. Elles peuvent également être en interaction avec des protéines insérées dans la bicouche. Ces protéines sont impliquées généralement dans les processus d'adhésion cellulaire, de fusion et fission membranaire, et de signalisation cellulaire.

Les protéines membranaires intégrales (protéines dites intrinsèques) sont amphiphiles. Elles peuvent être monotopiques ou polytopiques, *i.e.* avoir un ou plusieurs segments polypeptidiques transmembranaires. Les segments transmembranaires sont eux même hydrophobes ou amphiphiles, c'est la raison pour laquelle ils se retrouvent ségréger au sein des membranes, en contact avec les chaînes aliphatiques des lipides. Les protéines membranaires intrinsèques peuvent être insérées en totalité dans la membrane, ou présenter de larges domaines extra membranaires (Fig. 1-7). Ces protéines transmembranaires sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques fondamentales comme la fixation de ligands (les récepteurs), le transport de molécules, les réactions chimiques ou enzymatiques.

Les analyses génomiques ont mis en évidence qu'environ 20 à 30% des protéines synthétisées chez l'homme, *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* sont des protéines membranaires (Wallin and von Heijne, 1998). La prédiction du nombre de séquences génétiques codant pour ces protéines a augmenté au cours des dernières années, mais le nombre de structures tridimensionnelles connues à ce jour est relativement faible bien que des progrès non négligeable ont été réalisé dans ce sens depuis le début des années 2000 (White, 2004). On recense actuellement un peu plus d'une centaine de structures 3D de protéines membranaires comme le montre la banque de données tenue à jour par le groupe de S. White (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html: Membrane Proteins of Known

3D Structure). L'étude structurale et fonctionnelle des protéines nécessite de disposer de quantités très importantes, or les protéines membranaires sont en général présentes en faible concentration dans les membranes biologiques, principalement chez les eucaryotes. C'est pourquoi les premiers cristaux de protéines membranaires ont été obtenus à partir de membranes biologiques dans lesquelles sont surexprimées naturellement les protéines d'intérêt. Actuellement, de nouvelles stratégies de surexpression, de purification et de cristallisation des protéines membranaires sont développées afin d'apporter des connaissances importantes notamment en pharmacologie, puisque environ 50% des protéines membranaires sont des cibles thérapeutiques potentielles. Cependant, le fait que peu de structures de protéines membranaires aient été résolues à l'heure actuelle est lié aux difficultés de cristalliser ces protéines mais également aux difficultés jalonnant toutes les étapes préliminaires à la cristallisation elle-même.

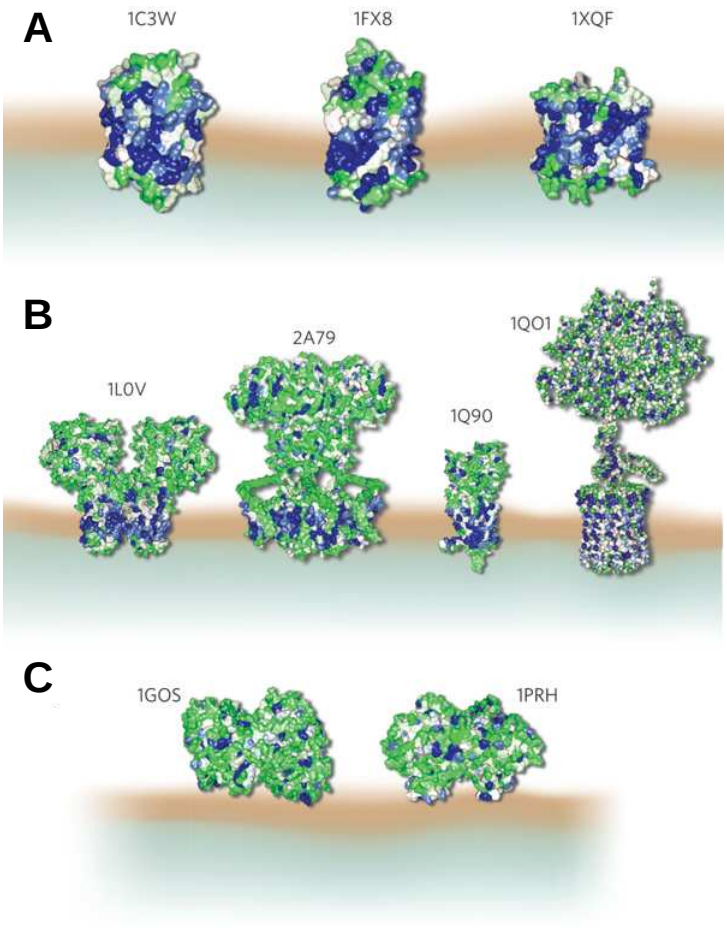


Figure 1-7 : Différentes catégories de protéines membranaires.
A: protéines intrinsèques ; B: protéines intrinsèques avec de larges régions extra membranaires ; C: protéines extrinsèques. En vert, résidus polaires ; en bleu, résidus apolaires ; en marron, bicouche lipidique (Engelman, 2005)

1.1.2 Structure des protéines membranaires

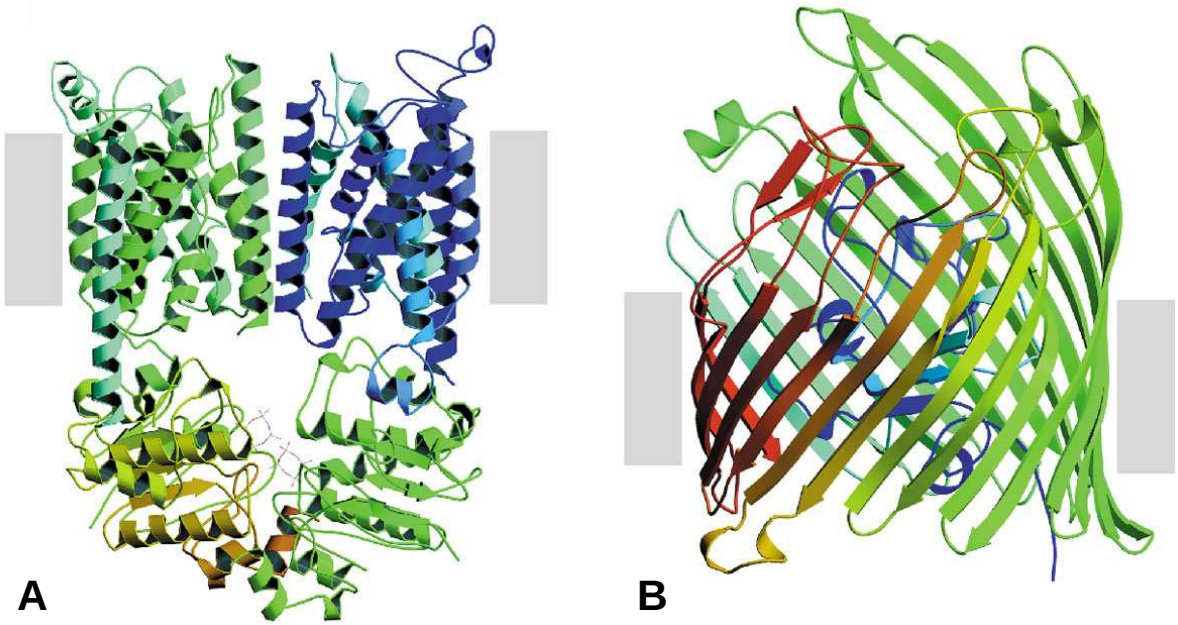


Figure 1-8 : Protéines membranaires modèles représentant les deux classes de structure transmembranaire.
A : structure en hélice α, exemple du transporteur BtuCD de la vitamine B12 (PDB code 1L7V). B : structure en feuillet β, exemple du récepteur FecA du citrate de fer (PDB code 1KMO). En gris, limite approximative de la bicouche lipidique (Walian et al., 2004)

Parmi la centaine de protéines membranaires dont on connaît la structure actuellement, les domaines transmembranaires sont toujours structurés et sont présents sous la forme d'hélices α ou de feuillets β (Fig. 1-8). Les protéines intégrales qui contiennent des domaines en hélices α sont stabilisées au sein de la membrane par effet hydrophobe avec les chaînes d'acides gras des lipides et par des liaisons de type ionique avec les têtes polaires. Ces propriétés seront détaillées dans la partie 1c de ce chapitre. L'exemple de la glycophorine *a* montre que ses deux segments transmembranaires sont stabilisés par des interactions spécifiques entre les résidus situés à l'interface membranaire (MacKenzie and Engelman, 1998). On retrouve ce type d'interactions dans les structures de protéines membranaires polytopiques comme le centre réactionnel bactérien dont les sous unités L et M contiennent 5 segments transmembranaires (Deisenhofer and Michel, 1989). Une importante famille de protéines membranaires intégrales est caractérisée

par la présence de sept hélices transmembranaires, c'est la cas par exemple de la bacteriorhodopsine (Henderson and Unwin, 1975). La seconde classe de protéines intégrales, moins répandue, est constituée de protéines qui présentent de nombreux segments transmembranaires en forme de feuillets β. L'exemple le plus représentatif de cette classe est la famille des porines dont la fonction est d'assurer le passage de molécules hydrosolubles à travers les membranes. Les segments transmembranaires de ces protéines ne comportent pas autant de résidus hydrophobes que peut en contenir un segment transmembranaire structuré en hélice α de même longueur. En effet, un monomère de porine présente une face hydrophobe, qui interagit avec les lipides membranaires ou un autre monomère de porine, et une face préférentiellement hydrophile, structure de base pour la formation du pore.

Nous allons détailler ci-dessous les différentes étapes nécessaires à l'obtention des cristaux de protéines membranaires afin de détailler les difficultés inhérentes à la cristallisation et plus généralement à la manipulation de ces protéines.

1.1.2.1 Surexpression des protéines

Les études structurales et fonctionnelles des protéines membranaires nécessitent de très fortes concentrations de protéines. Il existe actuellement plusieurs voies de surexpression des protéines membranaires, et notamment l'utilisation de cellules hôtes telles que la bactérie *Escherichia coli* chez les procaryotes et les cellules d'insectes ou de mammifères chez les eucaryotes. Un des problèmes majeurs de cette approche vient du fait que la surface de membrane disponible chez les cellules hôtes est limitée et souvent peu adaptée à la protéine d'intérêt exprimée. Par conséquent, la surexpression entraîne dans beaucoup de cas une toxicité importante pour la cellule hôte. Cette toxicité est liée à la formation de corps d'inclusion qui renferment des agrégats de la protéine trop surexprimés, mais surtout déclenchée lorsque la protéine d'intérêt est synthétisée dans les membranes. Ainsi, s'il semble possible d'exprimer des protéines membranaires structurées en feuillets β dans des corps d'inclusions, et ensuite de les extraire et les renaturer en utilisant différentes approches biochimiques (Bannwarth and Schulz, 2003). Il s'avère beaucoup plus délicat de réussir le même cheminement pour des protéines membranaires structurées en hélices α (Kiefer, 2003). Comme les étapes d'extraction nécessitent l'utilisation de lipides ou détergents, il semble préférable de limiter la surexpression des protéines d'intérêts tout en augmentant la quantité de cellules en cultures pour augmenter les quantités finales de protéines.

Une nouvelle voie s'est récemment ouverte à partir de la technique de synthèse *in vitro* des protéines mise au point par Spirin dans les années 80 (Spirin et al., 1988). Au début des années 2000, ce protocole a été automatisé (Système RTS "Rapid Translation System" de la société Roche) et a permis la production de protéines solubles natives sans les contraintes liées aux cellules hôtes. Des adaptations ont été nécessaires pour appliquer cette technique aux protéines membranaires, mais il semble que les premiers résultats obtenus soient convaincants (Berrier et al., 2004; Klammt et al., 2006; Schwarz et al., 2006).

En comparaison, l'étude des protéines membranaires naturellement surexprimées dans des organismes de type virus ou bactéries (facilement cultivable) présentent un avantage très important face à l'étude de protéines membranaires recombinantes. C'est pourquoi la majorité des protéines membranaire cristallisées provient de membranes naturellement enrichies.

1.1.2.2 Solubilisation, purification et reconstitution

Pour les études structurales et fonctionnelles, les protéines membranaires sont très souvent isolées de leur environnement natif lipidique et mis en solution à l'aide de détergents. Les détergents miment au mieux les propriétés hydrophiles et hydrophobes des membranes et permettent de solubiliser les protéines membranaires et de les manipuler ensuite par les techniques biochimiques mises au point sur les protéines solubles (colonne d'exclusion sur gel, d'affinité, électrophorèse, gradients de densité, etc.). Depuis le milieu des années 70, les détergents qui ont permis de réaliser au mieux cette étape sont des molécules amphiphiles de la famille des lipides, capables de s'insérer dans la bicouche lipidique, de perturber ainsi les propriétés de perméabilité des membranes biologiques et de maintenir en solution les protéines membranaires extraites (Helenius and Simons, 1972; Helenius and Simons, 1975).

Les détergents aliphatiques les plus utilisés en biochimie sont, tout comme les lipides aliphatiques polaires, des molécules qui possèdent un groupement chimique hydrophile relié à une chaîne carbonée hydrophobe. De part leur nature amphiphile, les détergents s'organise spontanément dans l'eau en assemblages supramoléculaires dont l'organisation dépend des conditions de pH, de concentration et de force ionique. Les assemblages formés par les détergents sont typiquement des micelles, des phases hexagonales ou des phases lamellaires. Ce sont les micelles qui intéressent tant les biochimistes des protéines membranaires. En effet, ces tous petits agrégats solubles se forment spontanément en solution quand leur concentration totale a atteint ou dépassé la concentration micellaire critique (CMC) du détergent (Helenius and Simons, 1975; le Maire et al., 2000; Lichtenberg, 1985; Ollivon et al., 2000; Racker et al., 1979)}. Ces micelles sont des agrégats de petites tailles (quelques nm) en équilibre dynamique avec le détergent sous forme

de monomères en solution. Ces petits objets sont souvent représentés comme des agrégats plus ou moins sphériques stabilisés à leur surface par les têtes polaires et possédant un corps huileux séparé de l'eau. Ces micelles présentent la capacité, bien utile pour les biochimistes, d'accueillir en leur sein tout type de molécules amphiphiles (protéines membranaires et lipides polaires en particulier), plus ou moins insolubles dans l'eau.

Quand ces détergents sont mis en présence de membranes, leur action solubilisante s'effectue en plusieurs étapes schématisées sur la Fig. 1-9. Leur utilisation en présence de membranes biologiques permet l'extraction des protéines en créant un environnement favorable de « type lipidique ». Les détergents imitent les lipides membranaires en interagissant avec les régions transmembranaires hydrophobes des protéines, et génèrent ainsi un complexe protéine-détergent manipulable par les techniques classiques de biochimie (chromatographie, électrophorèse) (Fig.1-9)

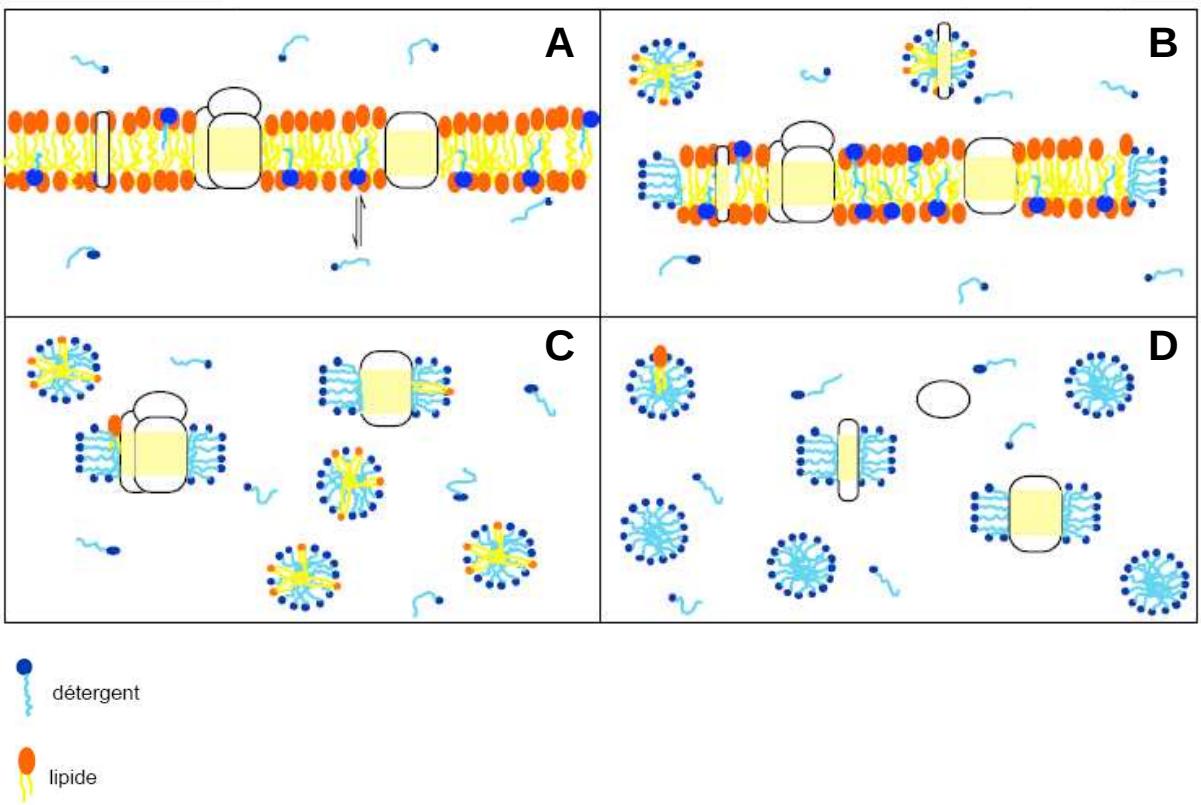


Figure 1-9 : Etapes de solubilisation des protéines membranaires.
A : partition du détergent dans la membrane ; B : solubilisation sélective de lipides et de protéines ; C : solubilisation totale de la membrane ; D : délipidation (d'après C. Breyton, IBPC, France)

Le choix des détergents est très important et est fortement lié aux propriétés physico-chimiques de ceux-ci mais aussi aux propriétés physicochimiques des protéines et des lipides que l'on cherche à solubiliser. Les détergents se caractérisent par la capacité à former des micelles en solution à partir d'une concentration définie par la concentration micellaire critique (CMC). Il est cependant toujours aussi difficile d'élaborer un chemin de solubilisation standard des protéines membranaires puisque la CMC est très sensible à des facteurs tels que le pH, la force ionique et la température (Ollivon et al., 2000; Paternostre et al., 1997). Les paramètres les plus importants au cours de cette étape sont le rendement d'extraction et la stabilité structurale et fonctionnelle de la protéine d'intérêt. Les détergents les plus utilisés sont essentiellement non ioniques (Triton X-100, OG et DDM par exemple) ou zwiterioniques (CHAPS), car ils sont bien souvent non dénaturants et n'interfèrent pas avec les techniques de chromatographie utilisées après solubilisation. Malheureusement, les détergents sélectionnés pour l'extraction des protéines membranaires ne sont pas forcément toujours de bons candidats pour les étapes de cristallogenèse (Newman, 1996). C'est pourquoi sont apparus depuis quelques années de nouveaux surfactants synthétisés qui permettraient d'améliorer les rendements de solubilisation tout en favorisant la formation de cristaux après purification (Fig. 1-10). Parmi ces nouveaux surfactants, il est possible de citer par exemple les amphipols, qui ont une très forte affinité pour la région transmembranaire des protéines intégrales (Popot et al., 2003; Tribet et al., 1996) et les lipopeptides, agents amphiphiles capables de mimer la géométrie des lipides membranaires. Ces derniers sont des peptides structurés en hélices α et qui possèdent à chaque extrémité des chaînes alkyles (McGregor et al., 2003). Différents groupes de recherche ont également testé des peptitergents (Schafmeister et al., 1993) et des tripodes amphiphiles (Yu et al., 2000), capables d'auto assemblage et de dispersion des lipides membranaires tout en maintenant la conformation native de protéines membranaires tests comme la bactériorhodopsine. Il est difficile actuellement de juger le potentiel de ces nouveaux surfactants et d'admettre qu'ils auront un impact aussi fort que les détergents dans la manipulation des protéines membranaires. Car la plupart des résultats convaincants ont été obtenus avec des protéines membranaires réputées stables et à l'heure actuelle, aucune protéine n'a pu être cristallisée en utilisant ce type de surfactants.

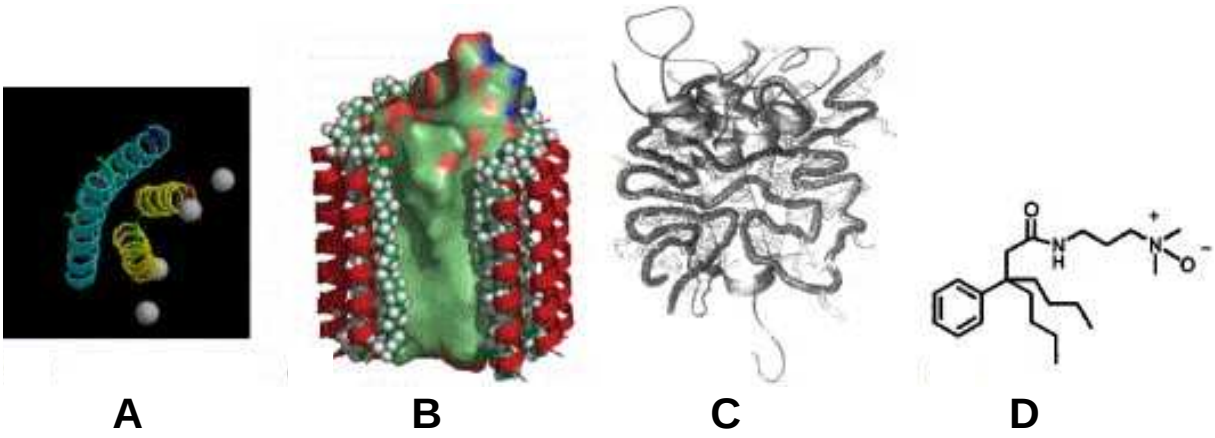


Figure 1-10 : Nouvelles classes de molécules amphiphiles.
A : peptitergents ; B : lipopeptides ; C : amphipols ; D : tripodes amphiphiles (Nollert, 2005)

Les techniques de purification des protéines membranaires sont similaires à celles utilisées pour les protéines solubles, notamment les techniques classiques de chromatographie. Les protéines membranaires ont tendance à interagir fortement avec les résines de chromatographie de part leur nature hydrophobe, ce qui pose de sérieux problèmes d'efficacité lors de ces étapes. La technique de chromatographie d'affinité semble être le meilleur choix pour purifier des protéines membranaires recombinantes fusionnées à une étiquette histidine (Mohanty and Wiener, 2004).
En vue des études structurales et fonctionnelles des protéines membranaires, il peut s'avérer intéressant d'échanger le détergent, pour améliorer par exemple le protocole de cristallogenèse, mais également de retirer le détergent pour reconstituer les protéines membranaires dans un environnement lipidique artificiel comme les liposomes (Paternostre et al., 1988; Rigaud et al., 1988) ou les bicelles (Sanders and Prosser, 1998). De nombreuses méthodes sont efficaces pour réussir cette étape : dialyse, adsorption hydrophobe à l'aide de Bio-Beads (résines hydrophobes capable d'adsorber les détergents) (Rigaud et al., 1997) et les techniques de chromatographie échangeuse d'ions ou de filtration sur gel.

1.1.2.3 Caractérisation structurale

Il existe actuellement plusieurs approches pour déterminer la structure des protéines membranaires : la cristallographie aux rayons X, la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et la microscopie électronique 3D. C'est la cristallographie aux rayons X qui, jusqu'à présent, a eu la contribution la plus importante à la connaissance des structures des protéines en général, et des protéines membranaires en particulier. La RMN s'est beaucoup développée notamment pour

l'étude de protéines ou de peptides qui présentent de très grandes surfaces hydrophobes, favorisant ainsi leur insolubilité à forte concentration.

1.1.2.3.1 Cristallographie aux rayons X

Vingt-cinq années séparent la détermination de la première structure 3D de protéine soluble à haute résolution (Kendrew et al., 1960) de celle de la première protéine membranaire au milieu des années 80 (Deisenhofer et al., 1985). L'analyse comparative de détermination des structures 3D de protéines solubles et membranaires proposée par S. White montre clairement une évolution plus rapide concernant les protéines solubles (White, 2004). En effet, une étude menée par Dickerson montre que 132 structures de protéines solubles ont été déterminées 18 ans après la première en 1960 par Kendrew, tandis que sur la même période on retrouve seulement 75 structures de protéines membranaires (entre 1985 et 2003). Il est possible de prévoir qu'environ 2200 structures de protéines membranaires seront résolues en 2025. En pratique, la stratégie de cristallisation des protéines membranaires n'est pas différente de celle utilisée pour les protéines solubles. Le but est de réduire la solubilité de la protéine d'intérêt sous diverses conditions afin de permettre la croissance de cristaux qui se développent à partir des contacts entre protéines voisines. Le facteur le plus important concernant les protéines membranaires est évidemment la présence d'une concentration de détergent qui permet à la protéine de ne pas s'agréger. Pour mener à bien l'étape critique de cristallogenèse, il est indispensable de tester un maximum de détergents à des concentrations variables. Hormis l'utilisation des détergents, de nouvelles méthodes se développent comme l'utilisation de bicelles (Faham and Bowie, 2002) et la cristallisation en phase cubique de lipides (Landau and Rosenbusch, 1996). Ces phases de lipides permettent de solubiliser la protéine dans un environnement plus proche des membranes naturelles et favorisent donc leur stabilisation. L'objectif de ces deux techniques est de placer la protéine solubilisée dans un environnement quasi natif afin d'augmenter les chances de cristallisation. Des résultats ont été obtenus pour la famille des rhodopsines, mais le challenge est d'essayer de les étendre à d'autres familles de protéines membranaires.

1.1.2.3.2 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN se présente depuis quelques années comme une alternative à la cristallographie aux rayons X pour l'étude structurale des protéines. La première structure de protéine membranaire obtenue par RMN a été déposée dans la PDB (Protein Data Bank) en 1997 (MacKenzie et al., 1997). Il existe deux approches de RMN adaptées à la détermination structurale des protéines

membranaires : ce sont la RMN en solution et la RMN en phase solide. Pour les expériences en RMN solution, les protéines membranaires purifiées doivent être solubilisées en micelles de détergent (Fernandez and Wuthrich, 2003). Par le passé, le paramètre limitant concernait la taille de l'assemblage protéine/détergent/lipide ainsi obtenu, mais actuellement il est possible de travailler sur des complexes ayant une taille jusqu'à environ 900 kDa comme le montre le travail réalisé par Wüthrich et ses collaborateurs (Fiaux et al., 2002). La RMN en phase solide est également une technique puissante pour l'étude de la dynamique structurale des protéines membranaires à une résolution atomique (Hong, 2006). Il est possible en effet de déterminer l'orientation, la dynamique globale ou par domaines des protéines et la structure oligomérique de protéines membranaires structurées en hélices α et en feuillets β. Comme les études en cristallographie, les expériences en RMN nécessitent de fortes concentrations de protéines mais également que celles-ci soient marquées avec le coûteux triple label ^{2}H, ^{13}C et ^{15}N.

1.1.2.3.3 Microscopie électronique et à force atomique

Les protéines membranaires peuvent être étudiées dans un environnement quasi-natif en présence de lipides et observées à l'aide de la microscopie électronique et de la tomographie moléculaire, ce qui représente une alternative à la radiocristallographie X. En effet, les cristaux 2D de protéines membranaires reconstitués en présence de lipides créent un environnement proche de la membrane biologique et permettent ainsi l'observation de la fonction et de la structure des protéines à une résolution proche de 3Å comme ce fut le cas pour l'aquaporine (Gonen et al., 2004). De Rosier et Klug ont décrit pour la première fois en 1968 comment reconstruire la structure 3D d'un échantillon biologique à partir d'une succession d'images obtenues en microscopie électronique (De Rosier and Klug, 1968): il s'agit de la cristallographie électronique 3D encore appelée tomographie moléculaire. Depuis prés de 40 ans cette technique a permis progressivement de calculer la structure 3D de protéines membranaires à haute résolution comme par exemple la bactériorhodopsine (Henderson et al., 1990) et une protéine antenne collectrice de lumière des plantes (Kuhlbrandt et al., 1994), mais le plus souvent avec une résolution de 5 à 10Å comme par exemple le transporteur EmrE (Ubarretxena-Belandia et al., 2003) et le complexe Sec YEG (Breyton et al., 2002).

La microscopie à force atomique (AFM) se révèle être la technique idéale pour obtenir des images directement issues des membranes natives, en conservant l'échantillon dans un tampon proche des conditions physiologiques (Binnig et al., 1986). Les progrès récents dans la préparation des échantillons et dans l'instrumentation permettent d'obtenir des topographies de la surface membranaire capable de révéler des détails nano-moléculaires et la dynamique de protéines

membranaires (Engel and Muller, 2000). Avec ce type de microscope, il est également possible d'effectuer des mesures de force d'interaction entre molécules biologiques au sein des membranes, et ainsi obtenir des informations sur la manière dont elles coopèrent (Muller et al., 2006).

A l'heure actuelle, ces méthodes présentent des limites technologiques concernant l'instrumentation, l'acquisition des données et la manipulation des images. Si on prend l'exemple de l'AFM, il sera nécessaire notamment de produire des cantilevers (petites pointes nanométriques) plus petits et que ceux-ci présentent des propriétés de déflection de plus grande sensibilité. Les conditions de préparation des échantillons de membranes biologiques restent également une étape délicate et très souvent source de controverse: les images observées sur des membranes isolées correspondent-elles à une réalité biologique *in vivo* ? (Chabre et al., 2003; Fotiadis et al., 2003).

1.1.2.3.4 Simulation par dynamique moléculaire

La détermination de nouvelles structures tridimensionnelles de protéines membranaires depuis 1995, grâce notamment à l'apport de la cristallographie aux rayons X, a permis au cours de ces années l'émergence de la bioinformatique. La simulation de dynamique moléculaire se présente comme une méthode de choix pour la compréhension des mécanismes moléculaires associés à la fonction des protéines dans les membranes. Les scientifiques ont pris conscience que les protéines sont avant tout des macromolécules dynamiques et que les caractérisations structurales apportent uniquement une vue très statique des protéines étudiées. Le fonctionnement des protéines membranaires est dirigé par une étroite relation entre structure, dynamique et contraintes environnementales. Chacun de ces trois paramètres a une influence sur les autres, mais c'est collectivement qu'ils permettent aux protéines d'assurer leur fonction. Pour les études de simulation moléculaire, l'environnement est certainement le facteur le plus important à prendre en compte et c'est pourquoi il est nécessaire d'incorporer, hormis les protéines, la bicouche lipidique, l'eau et les ions pour mener à bien les calculs. L'augmentation de la puissance des ordinateurs permet actuellement de pouvoir modéliser des systèmes de très grande taille, en sachant que la simulation d'une petite protéine nécessite de prendre en compte environ 50000 atomes. Il est possible par cette technique d'étudier les interactions entre protéines membranaires et lipides (Sansom et al., 2005), mais également avec les détergents (Bond et al., 2005) et d'obtenir des informations dynamiques sur l'insertion et l'assemblage de ces protéines (Bond and Sansom, 2006). Les protéines les plus étudiées sont notamment les canaux ioniques, les aquaporines, les transporteurs et les protéines bioénergétiques (Ash et al., 2004) (Fig. 1-11)

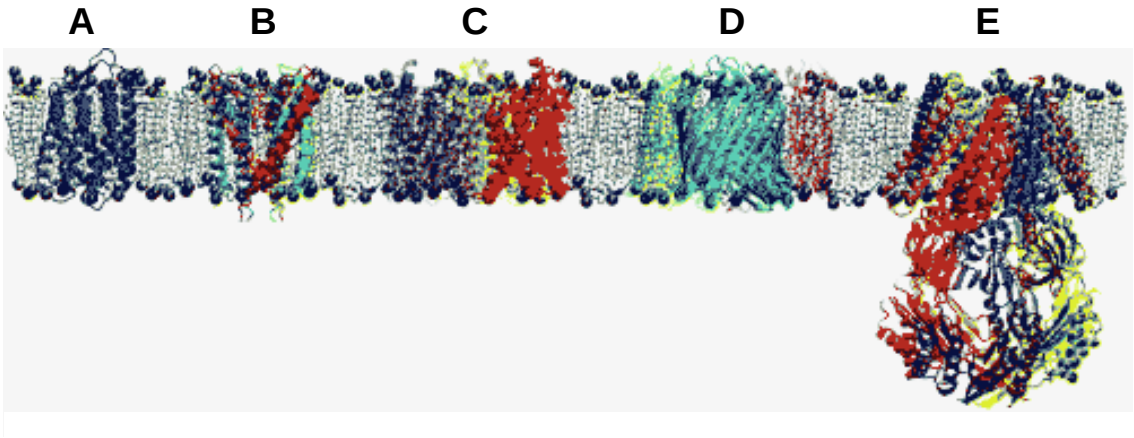


Figure 1-11: Exemples de protéines membranaires étudiées par simulation de dynamique moléculaire.
A : bactériorhodopsine, B : canal KcsA, C : aquaporine GlpF, D : porine OmpF, E : canal MscS (Gumbart et al., 2005)

1.1.2.4 Repliement, assemblage et stabilité des protéines membranaires structurées en hélice α

1.1.2.4.1 Ciblage et insertion dans la membrane *in vivo*

Comme les protéines solubles, les protéines membranaires sont synthétisées par les ribosomes. Ces dernières n'étant pas solubles dans le milieu aqueux du cytoplasme, les cellules ont dû mettre en place une machinerie moléculaire spécialisée dans le ciblage et l'insertion des polypeptides naissants dans la membrane. Ces machineries que l'on appelle les translocons ont pour rôle d'adresser et d'orienter les protéines synthétisées dans les membranes cibles et également de permettre le transfert de protéines à travers la bicouche lipidique (Fig. 1-12) : on connaît actuellement les structures du translocon Sec61 (Beckmann et al., 1997), localisé dans le réticulum endoplasmique chez les eucaryotes, et du translocon SecY localisé dans la membrane interne chez les procaryotes notamment *E. coli* (Breyton et al., 2002; Van den Berg et al., 2004).

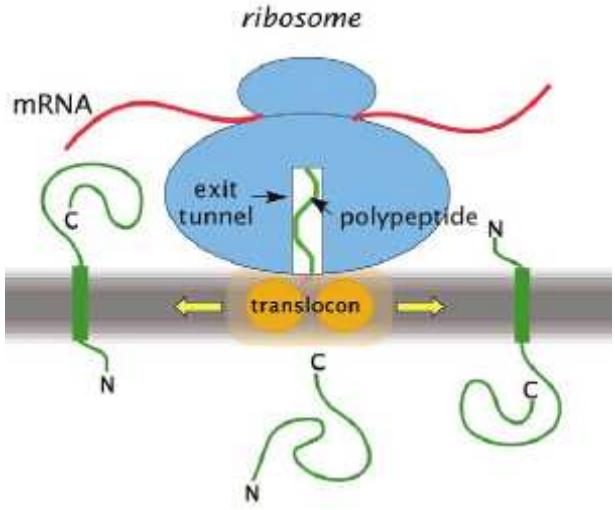


Figure 1-12 : Représentation schématique d'un complexe ribosome-translocon de type Sec : une protéine soluble synthétisée passe la membrane via le complexe, alors que deux segments transmembranaires sont insérés et orientés dans la bicouche lipidique (White and von Heijne, 2005)

L'insertion et l'orientation des segments transmembranaires sont les mécanismes que le translocon Sec doit effectuer avec précision, afin d'éviter le mauvais repliement des protéines membranaires. Les études concernant ces mécanismes ont permis de mettre en évidence le rôle très important de la séquence en acides aminés du polypeptide inséré structuré en hélices. En effet, Hessa *et coll.* (Hessa et al., 2005)ont montré, à l'aide de multiples segments de 19 résidus structurés en hélice α, l'importance du profil d'hydrophobicité de ces polypeptides en tenant compte de l'échelle d'hydropathie des acides aminés proposée par Wimley et White (White and Wimley, 1998; White and Wimley, 1999). L'insertion et l'orientation dans la membrane dépendent fortement de la position des résidus polaires sur les segments polypeptidiques (MacKinnon, 2005) alors qu'on imaginait surtout que c'était l'abondance de résidus hydrophobes qui était le facteur principal au cours de ce processus. A partir de ces informations, il est possible de représenter la membrane biologique divisée en trois régions distinctes et la localisation préférentielle des acides aminés (Fig. 1-13) : une région centrale d'environ 30 Å d'épaisseur correspondant aux chaînes hydrocarbonées des lipides, une région à l'interface d'environ 15 Å où se trouvent les têtes polaires des lipides, et enfin une zone en contact avec le milieu aqueux. Ces trois environnements présentent des propriétés très différentes et ont une grande influence sur l'assemblage des protéines membranaires.

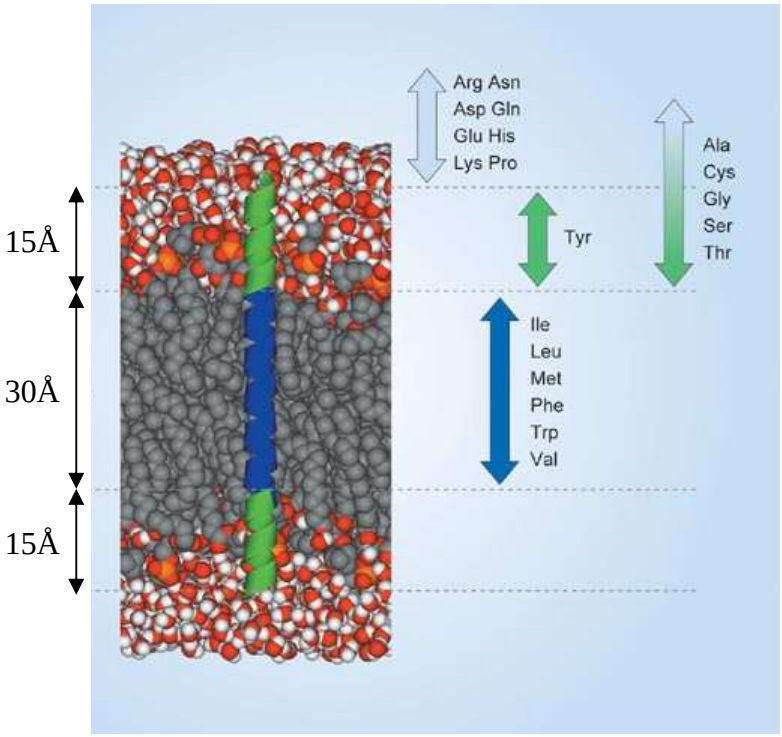


Figure 1-13 : Régions membranaires et localisation préférentielle des acides aminés (en gris : atomes de carbone, en rouge : oxygène, en blanc : hydrogène, en orange : phosphore). Représentation d'une hélice α transmembranaire de 20 résidus (Bowie, 2005)

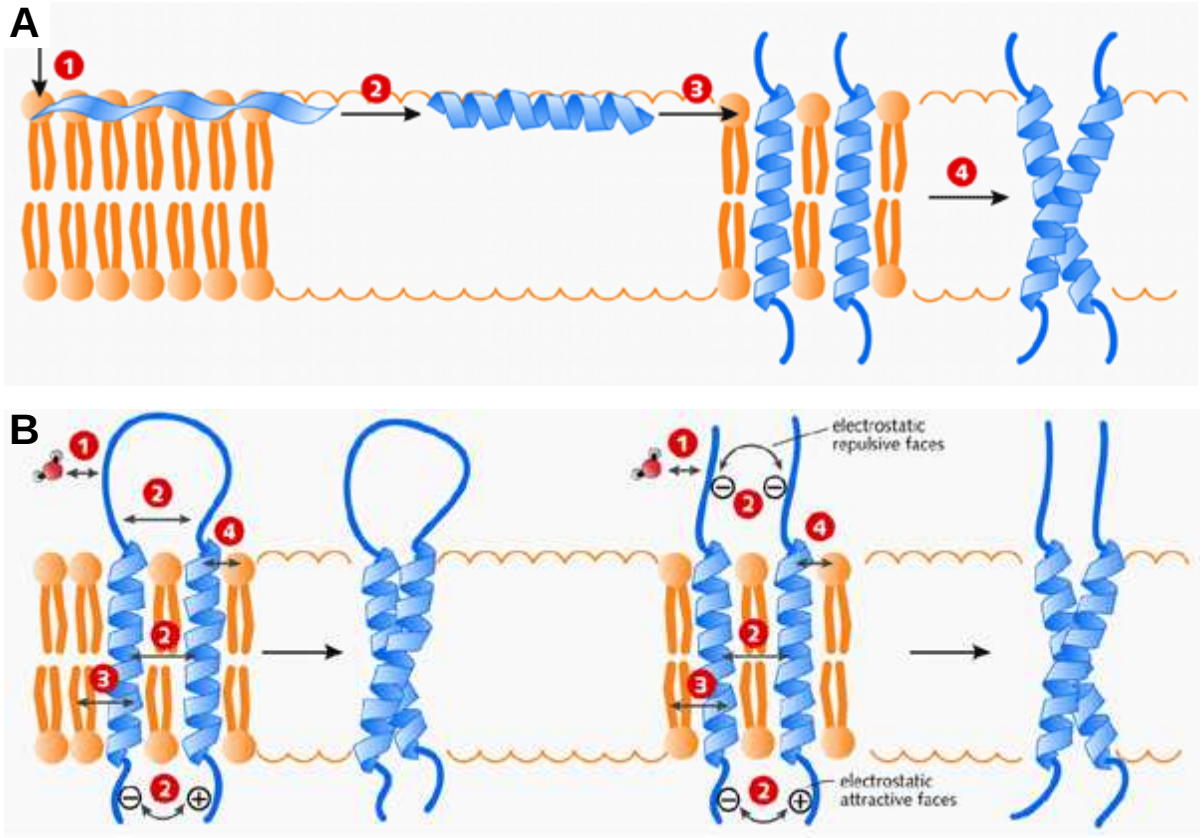
1.1.2.4.2 Schéma de repliement/assemblage et stabilité des protéines membranaires

Une fois insérées dans la bicouche lipidique, les hélices transmembranaires doivent se compacter afin de constituer la structure tridimensionnelle de la protéine, donc assurer son repliement et sa stabilité dans la membrane. L'état natif des protéines membranaires est dirigé par des forces complémentaires de nature différente qui interviennent en particulier entre les hélices naissantes et les lipides environnants.

Si on peut considérer que l'insertion des segments transmembranaires et leur assemblage au sein de la membrane sont des processus très coopératifs, il a été proposé des chemins de repliement par étapes afin de schématiser ce mécanisme très important pour le fonctionnement des protéines membranaires. Popot et Engelman ont proposé un modèle à deux étapes dans lequel on distingue i) la reconnaissance des hélices transmembranaires incorporées dans la membrane et ii) l'assemblage et l'orientation de ces hélices conduisant aux structures tertiaires et quaternaires de la protéine (Popot and Engelman, 1990). Un autre modèle a été proposé et se présente en quatre étapes, comme l'ont suggéré White et Wimley (White and Wimley, 1999), faisant apparaître

successivement la localisation du segment naissant et son repliement à l'interface membranaire, puis l'insertion et l'assemblage dans la bicouche lipidique (Fig. 1-14A)

Les forces qui dirigent le repliement, l'oligomérisation et la stabilité des protéines membranaires sont peu connues à l'heure actuelle et sont souvent la source de débats et controverses (Fig. 1-14B). Il est très difficile de quantifier les énergies mises en jeu au cours de ce mécanisme, notamment en ce qui concerne les interactions entre les hélices et l'eau à l'interface membranaire (Liang et al., 2005). Les auteurs se sont beaucoup intéressés aux interactions entre hélices transmembranaires, ce qui a permis de mettre en évidence le rôle très important des liaisons hydrogènes et de type van der Waals à l'interface entre hélices (White, 2005). Une revue publiée par MacKenzie en 2006 propose un état des connaissances sur les mécanismes de repliement et de stabilisation des hélices α transmembranaires (MacKenzie and Engelman, 1998). Comme nous l'avons vu au cours de ce chapitre, il est important de prendre en compte également les interactions entre protéines et lipides membranaires.



<u>Figure 1-14</u> : Formation des hélices transmembranaires et assemblage dans la membrane.
A : Modèle du repliement en 4 étapes des protéines membranaires structurées en hélices α. 1 : localisation à l'interface ; 2 : structuration en hélices ; 3 : insertion dans la membrane ; 4 : assemblage des hélices. B : illustration schématique des forces impliquées dans l'assemblage et

la stabilité des hélices transmembranaires. 1 : protéine-eau ; 2 : protéine-protéine ; 3 : protéine-lipide (chaînes carbonées) ; 4 : protéine-lipide (têtes polaires) (Helms, 2002)

Le processus de repliement des protéines membranaires est maintenant reconnu comme étant très souvent impliqué dans les pathologies humaines telles que par exemple la mucoviscidose, les maladies de type Parkinson et Alzheimer (Sanders and Nagy, 2000).

1.2 Description de l'appareil photosynthétique bactérien

1.2.1 Photosynthèse bactérienne

La photosynthèse est le processus par lequel des organismes terrestres et marins utilisent l'énergie lumineuse solaire pour la transformer en énergie chimique. C'est un des processus biologiques les plus importants et, d'un point de vue humain, il est très certainement à l'origine du développement et du maintien de la vie sur terre. Chez les plantes, les algues et certaines bactéries (les cyanobactéries), la photosynthèse oxygénique se traduit par la consommation de CO_2 atmosphérique et le relarguage de l'oxygène moléculaire ainsi produit. D'autres espèces bactériennes sont également capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour produire des composés organiques sans production d'oxygène, ce sont les bactéries photosynthétiques anoxygéniques.

1.2.1.1 Les bactéries photosynthétiques

Les bactéries pourpres et vertes ont la particularité commune de pouvoir effectuer la photosynthèse en absence d'air et sans produire d'oxygène. Ces bactéries présentent cependant une très grande diversité morphologique et physiologique, notamment au niveau des structures moléculaires de l'appareil photosynthétique et des pigments qui contribuent à assurer ce processus. Les nombreuses espèces de bactéries photosynthétiques contiennent en effet une importante variété de pigments de type bactériochlorophylles et caroténoïdes, dont la fonction principale est de capturer et transporter l'énergie lumineuse. Ce sont également ces pigments qui confèrent aux cultures bactériennes leur coloration distincte, du vert au pourpre en passant par le marron, le rouge et parfois le bleu-gris chez certains mutants sans caroténoïdes (Fig. 1-15).
Dans cette étude, nous nous intéresserons tout particulièrement au groupe des bactéries pourpres non sulfureuses (*Rhodospirillaceae*) (Pfennig and Truper, 1971; Pfennig and Truper, 1983) de la famille des bactéries pourpres, dans laquelle on retrouve également les chromatiacées et les

bactéries pourpres sulfureuses (*Ectothiorhodospiraceae*). Sur la base de l'analyse comparative de l'ARN 16S ribosomal, il est possible de distinguer deux subdivisions au sein de bactéries pourpres non sulfureuses (Woese, 1987), comprenant les genres suivants :

- Subdivision α: *Rhodospirillum*, *Rhodophila*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodomicrobium* et *Rhodobacter*.
- Subdivision β: *Rhodocyclus*, *Rhodoferax*, *Rurivivax*

Chez les bactéries photosynthétiques, les pigments et l'appareil photosynthétique sont localisés et surexprimés dans des membranes intracytoplasmiques, qui se développent à partir d'invaginations de la membrane cytoplasmique. Selon le genre bactérien, ces membranes adoptent des formes différentes telles que des tubules, des lamelles ou des vésicules (c'est le cas chez *Rhodospirillum rubrum)*.

Le mode de croissance privilégié de ces bactéries est phototrophique (sous anaérobie en présence de lumière). Cependant, ces espèces sont capables également de développer une activité respiratoire, en fonction des conditions de culture et des changements environnementaux imposés.

Ces organismes simples présentent donc un grand intérêt puisqu'ils produisent naturellement un nombre très important de membranes photosynthétiques, et par conséquent de grandes quantités de protéines membranaires liant les pigments photosynthétiques qui sont au cœur même du processus primaire de la photosynthèse bactérienne.



Figure 1-15 : Cultures de bactéries *Rsp. rubrum*. De gauche à droite : souche S1, G9+ et S1S.

1.2.1.2 Biosynthèse et organisation moléculaire des membranes intracytoplasmiques

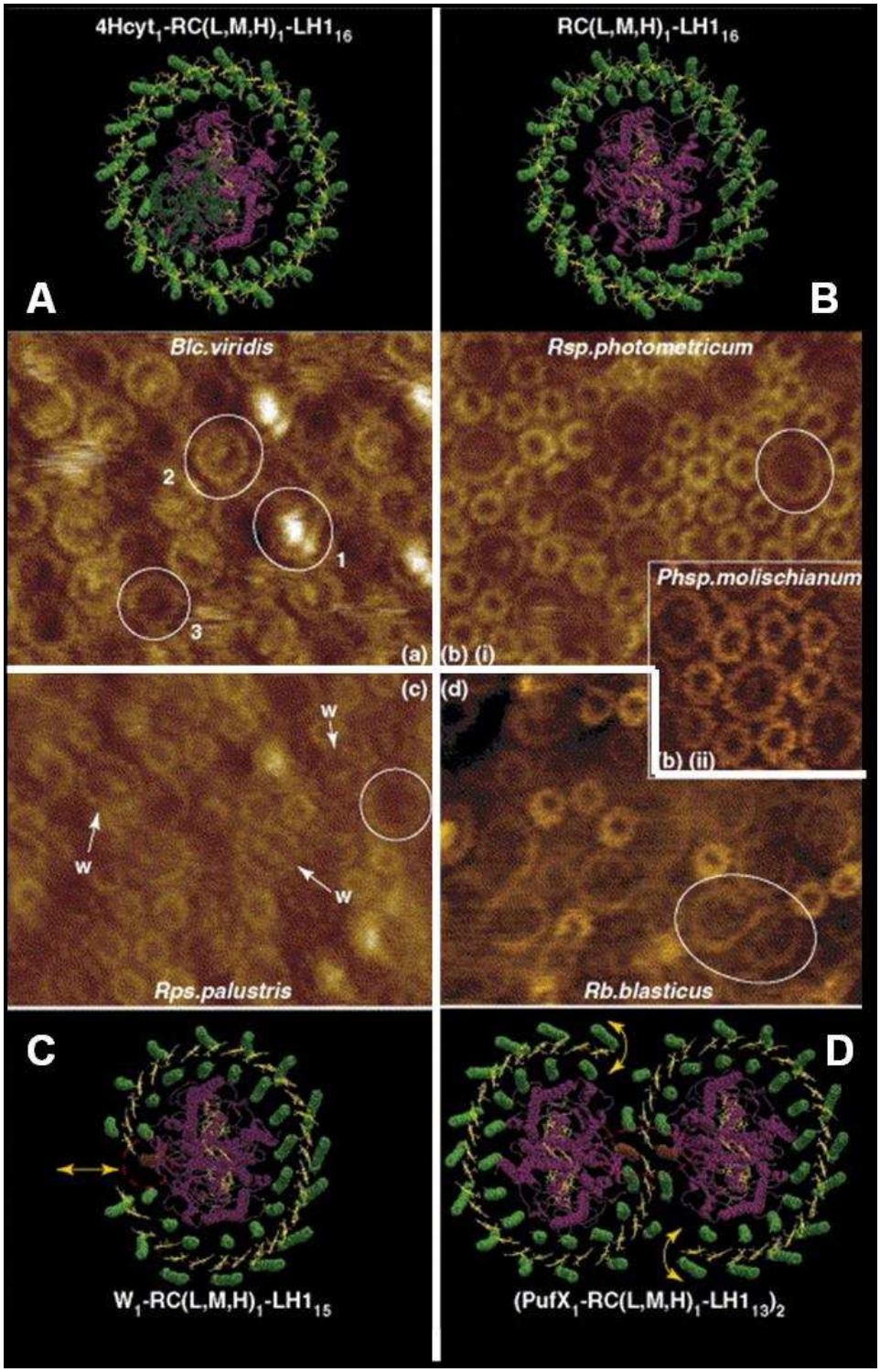
Bien que la découverte des bactéries photosynthétiques remonte au 19^{éme} siècle, les développements de techniques permettant l'étude de la biogenèse des membranes

photosynthétiques sont apparus à partir de 1950. Il devint alors possible d'isoler par fractionnement et d'observer les membranes photosynthétiques bactériennes appelées alors « chromatophores » (Pardee et al., 1952). Plus tard, les observations microscopiques ont permis de montrer que les chromatophores prennent forme à partir d'invaginations de la membrane cytoplasmique (Cohen-Bazire and Kunisawa, 1963; Oelze and Drews, 1972) et que la structure et l'arrangement de ces membranes photosynthétiques différent selon le genre bactérien observé. Les membranes intracytoplasmiques se présentent sous forme de vésicules (*Rs. rubrum*, *Rb. capsulatus*), de thylacoïdes (*Bc. viridis*, *Rp. palustris*) ou de tubules (*Rv. gelatinosus*, *Tc. pfennigii*) (Drews and Pfennig, 1991). La formation et le développement de ces membranes sont influencés par des facteurs extérieurs comme la tension en oxygène et l'intensité lumineuse qui déterminent la différenciation membranaire et la formation de l'appareil photosynthétique (Cohen-Bazire and Kunisawa, 1963). D'autre part, la température et la concentration des substrats influencent la morphogenèse de l'appareil photosynthétique (Kaiser and Oelze, 1980). En fonction de ces conditions de croissance, il a été montré que la formation des membranes intracytoplasmiques coordonne simultanément la biosynthèse des phospholipides (lipides majoritaires) et des protéines et pigments (Fraley et al., 1979; Kaplan et al., 1983). A la fin des années 70, des études ont été menées pour caractériser la structure du photosystème bactérien surexprimé au sein des membranes intracytoplasmiques, notamment par microscopie électronique 2D (Miller, 1979).

1.2.1.3 Observation du photosystème bactérien en membrane native

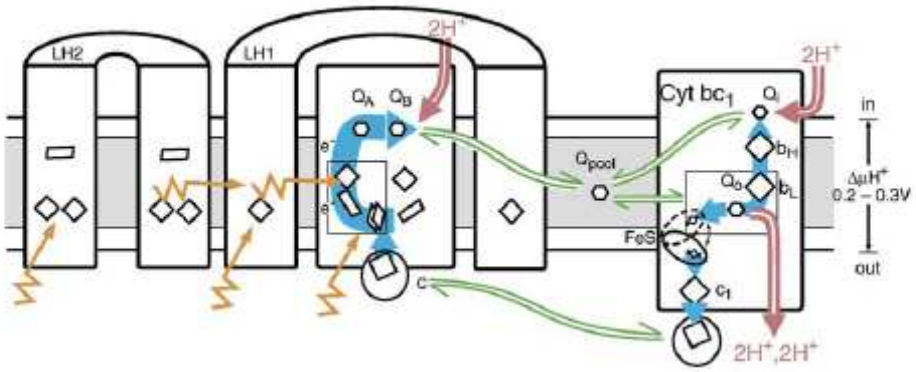
L'extraction et la manipulation des membranes photosynthétiques ont ouvert une nouvelle voie pour étudier la structure et la fonction de complexes protéiques en milieu membranaire. En 1982, Miller a proposé la première structure 3D des membranes thylacoïdales photosynthétiques de la bactérie *Blastochloris viridis* déterminée par microscopie électronique. Cette étude, dont les résultats sont toujours valides, a permis de montrer que cette membrane renferme très majoritairement le photosystème bactérien de manière quasi-cristalline et que celui-ci est composé d'un centre réactionnel entouré d'une antenne collectrice de lumière (Miller, 1982). En parallèle à ce travail, des chercheurs ont étudié le photosystème bactérien par des études de diffraction de neutrons et de rayons X, à partir d'échantillons contenant les protéines purifiées ou reconstituées. Dans ce contexte, la microscopie à force atomique (AFM) a permis de franchir un nouveau palier dans l'exploration de la structure moléculaire des membranes photosynthétiques depuis le début des années 2000. Cette technique permet en effet d'obtenir des topographes à haute résolution d'échantillons biologiques dans des conditions physiologiques. Si de nombreuses données structurales sur les constituants du photosystème bactérien ont été obtenues entre 1980 et 2000

par cristallographie aux rayons X et par microscopie électronique, les images par AFM permettent d'observer l'assemblage supramoléculaire et l'état oligomérique des complexes protéiques au sein des membranes. Ces images confirment qu'il existe une très grande diversité architecturale des complexes photosynthétiques dans différentes espèces bactériennes, comme le montre la Figure 1-16.



<u>Figure 1-16</u> : Différentes architectures de photosystèmes en membranes natives par microscopie à force atomique (AFM), issues de différentes souches bactériennes.
A : *Blc. viridis* ne contient que RC-LH1+ cytochrome; B : *Rsp. photometricum*, *Phs. molischianum*, C : *Rps. palustris* et D : *Rb. blasticus* renferment RC-LH1 et LH2. (Les modèles structuraux de RC-LH1 sont détaillés dans la partie b-ii de ce chapitre (Scheuring, 2006)

Le photosystème bactérien est composé de deux types de complexes photosynthétiques : les antennes collectrices de lumière périphériques LH2 (LH, pour light-harvesting) et les complexes cœur RC-LH1 renfermant le centre réactionnel (RC) entouré de la protéine antenne LH1. Les images de la Figure 1-16 montrent que les membranes photosynthétiques peuvent contenir le complexe RC-LH1 seul ou bien accompagné de la protéine LH2 selon les souches bactériennes. Bien que la protéine LH2 présente une forme circulaire peu variable, il semblerait que la protéine LH1, de forme majoritairement elliptique, soit beaucoup plus flexible, ceci étant dû certainement à la présence du centre réactionnel et à son rôle fonctionnel.
La fonction du photosystème consiste à convertir la lumière en énergie chimique. Les photons sont absorbés par les protéines antennes LH2 et LH1, puis l'énergie d'excitation est transférée au centre réactionnel où s'effectue une séparation de charges électriques (Fig. 1-17).



<u>Figure 1-17</u>: Représentation schématique des transferts d'énergie et d'électrons dans le photosystème bactérien.
Flèches oranges : énergie d'excitation et transfert d'énergie dans les antennes et centre réactionnel; flèches bleues : transport d'électrons ; flèches rouges : flux de protons ; flèches vertes : transport de quinones (Noy et al., 2006)

In vivo, les protéines LH1 sont intimement associées au centre réactionnel avec une stœchiométrie fixe 1 :1 et forment ainsi le complexe cœur RC-LH1. Toutes les souches bactériennes contiennent des complexes RC-LH1, tandis que la protéine LH2 n'est présente que chez certaines espèces. La

concentration de LH2 par rapport au RC-LH1 dans les membranes photosynthétiques est très variable et dépend essentiellement des conditions de culture (Scheuring and Sturgis, 2005). Lorsque les protéines LH2 sont présentes, elles contribuent à augmenter la surface accessible d'absorption de la lumière, et par conséquent à optimiser le rendement de photosynthèse.

1.2.2 Structures et variétés des complexes impliqués dans la photosynthèse bactérienne

Les antennes collectrices de lumière LH1 et LH2 des bactéries pourpres photosynthétiques sont des protéines membranaires intégrales présentant la même architecture moléculaire. L'unité structurale minimale qui compose ces complexes est un hétérodimére de polypeptides appelés α et β (Fig. 1-18), de faible poids moléculaire (4 à 7 kDa). Ces polypeptides sont associés à des pigments, caroténoïdes et bactériochlorophylles, qui confèrent à ces complexes protéiques leurs propriétés d'absorption de la lumière et donc leur fonction.

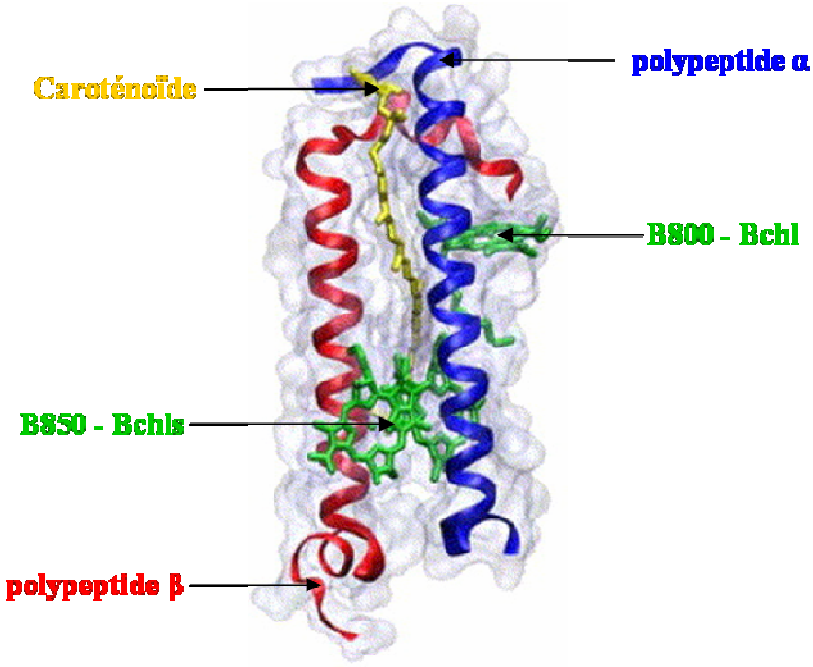


Figure 1-18 : Structure d'un hétérodimére αß du LH2 de *Rps. acidophila*.
En bleu, polypeptide α ; en rouge, polypeptide ß ; en vert, trois Bchl a ; en jaune, caroténoïde. Les régions N-terminales se trouvent en haut de la Figure (Janosi et al., 2006)

Ces polypeptides α et β ont des séquences d'environ 40-70 résidus, et présentent également une structure en 3 régions distinctes : des domaines polaires N et C-terminal et un domaine central hydrophobe structuré en hélice α, qui traverse la membrane. La région N-terminale, localisée du

côté cytoplasmique de la membrane, a une taille variable de 12-14 résidus pour le polypeptide α contre 13-25 résidus pour le polypeptide β. La région C-terminale, localisée du côté périplasmique, est constituée d'environ 16-20 et 5-12 résidus pour les polypeptides α et β respectivement. Le domaine transmembranaire est composé de 21-23 résidus majoritairement apolaires, et présente un résidu histidine très conservé (Zuber, 1985; Zuber and Brunisholz, 1991) qui est responsable de la liaison avec l'atome central de magnésium de la bactériochlorophylle (Robert et al., 1985).

1.2.2.1 LH2 : antennes périphériques

Une avancée importante dans la compréhension de l'organisation moléculaire des protéines antennes a été la détermination de la structure 3D à haute résolution des protéines LH2 par rayons X à partir de 1995 (Koepke et al., 1996; McDermott et al., 1995; McLuskey et al., 2001). L'analyse de la structure du LH2 de *Rps. acidophila* 10050 a révélé que ce complexe forme un anneau de 9 hétérodiméres αβ, liant de manière non covalente des molécules de bactériochlorophylles (Bchls) et de caroténoïdes. Les polypeptides α forment un anneau externe de 68Å de diamètre tandis que les polypeptides β s'organisent en une forme annulaire interne de 36Å de diamètre (Fig. 1-19)

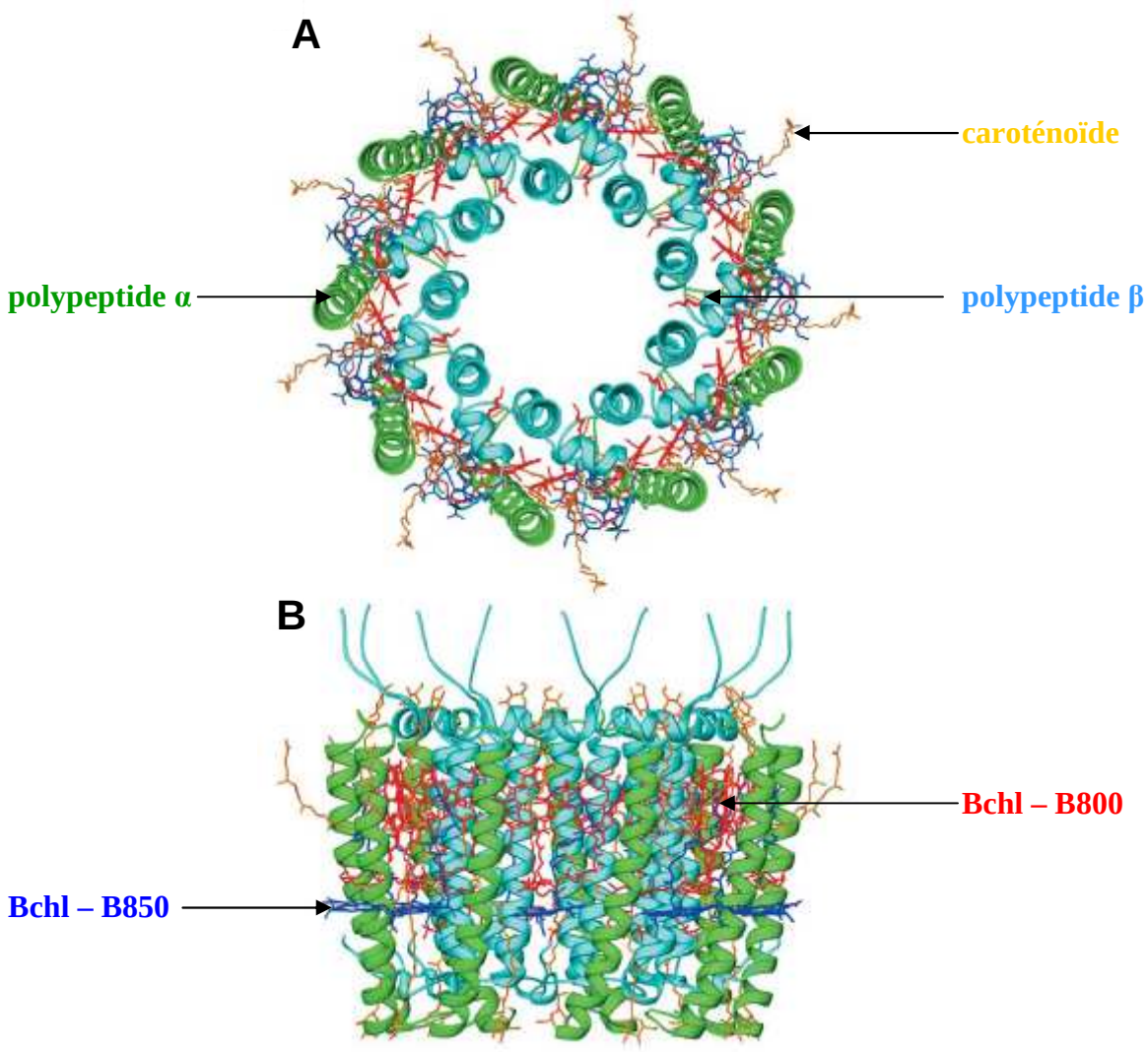


Figure 1-19 : Structure 3D du LH2 de *Rps. acidophila* à 2Å de résolution.
A : vue perpendiculaire au plan de la membrane ; B : vue latérale dans le plan de la membrane. En vert, polypeptide α ; en bleu-vert, polypeptide ß ; en rouge, Bchl a B850 ; en bleu foncé, Bchl a B800 ; en orange, Car rhodopine glucoside (Cogdell et al., 2004).

Chaque dimère αβ lient 3 molécules de Bchl a et 1 molécule de caroténoïde, par conséquent l'anneau de LH2 comporte 27 Bchl a et 9 caroténoïdes. L'arrangement des Bchl a au sein du LH2 peut être divisé en deux groupes distincts :

- à l'extrémité N-terminale du complexe LH2, les polypeptides α et β lient une molécule de Bchl a, dont le cycle bacteriochlorine (cf iii-1, structure des Bchl *a,* Fig. 1-21) est parallèle au plan de la membrane. Puisque chaque hétérodimére αβ lie une Bchl a dans cette configuration, 9 Bchl a sont en interaction avec des distances Mg^{2+} - Mg^{2+} d'environ 21Å et forment un anneau qui donnent naissance à une bande d'absorption à 800 nm, et que l'on appelle B800.

- Dans la région transmembranaire de l'hétérodimére αβ se trouve un dimère de Bchls, dont les cycles bactériochlorines sont perpendiculaires au plan de la membrane. Les 18 Bchls en interaction forment un agrégat circulaire symétrique (en forme d'anneau) dont le maximum d'absorption est à 850 nm, et que l'on appelle B850. La structure du LH2 obtenue par McDermott *et al.* en 1995 a également mis en évidence la présence d'une molécule de caroténoïde par hétérodimére αβ. Ce caroténoïde, rhodopine glucoside, présente une conformation *cis-trans* et traverse la totalité de la protéine. Il interagit principalement avec les résidus polaires à l'extrémité N-terminale du polypeptide α, et joue un rôle très important dans la stabilité du complexe LH2.

1.2.2.2 RC-LH1 : antennes cœur et centre réactionnel

Des études par cristallographie électronique et cryo-EM ont permis d'obtenir pour la première fois une structure à 8,5Å de résolution d'un cristal 2D de RC-LH1 purifié à partir de la bactérie *R. rubrum* (Karrasch et al., 1995). Ces images ont montré que la protéine LH1 présente une structure circulaire composée de 16 hétérodiméres αβ, et proposant en son centre un trou capable de contenir le centre réactionnel. Depuis ce résultat, des études par AFM et cryo-EM ont permis de révéler un nombre important de structures de RC-LH1, adoptant des conformations très variables à l'instar de la protéine LH2, toujours parfaitement circulaire. Le RC-LH1 peut être circulaire (Gerken et al., 2003), sous forme de S (Scheuring et al., 2005a; Scheuring et al., 2004; Siebert et al., 2004), elliptique (Fotiadis et al., 2004; Scheuring et al., 2003) ou bien encore en arc (Bahatyrova et al., 2004). Il semble toutefois qu'il n'existe que deux classes distinctes caractérisant le complexe RC-LH1 *in vivo* : sous forme monomérique comme c'est le cas chez *Rps. palustris* et *Rsp. rubrum* (le centre réactionnel est entouré d'un seul LH1) ou dimérique comme par exemple chez *Rb. sphaeroides* (Fig. 1-16). Une des particularités du complexe RC-LH1 est d'être beaucoup moins stable que la protéine LH2 en présence de détergent, c'est pourquoi il n'existe qu'une seule structure cristallographique de ce complexe (Roszak et al., 2003) et qu'aucune structure à haute résolution de la protéine LH1 seule n'a été obtenue à ce jour. La structure du RC-LH1 de *Rps. palustris* a été obtenue à 4,8Å par le groupe de R. Cogdell en 2003, mais à cette résolution il est impossible de distinguer les détails moléculaires et notamment les interactions pigments-protéines essentielles pour la compréhension de la fonction de ce complexe. Le modèle moléculaire établi par Cogdell *et coll.* est présenté sur la Figure 1-20, montrant notamment l'arrangement des hélices transmembranaires du LH1 en un anneau elliptique de 110Å de diamètre externe, entourant le centre réactionnel dont la taille maximum est de 78Å.

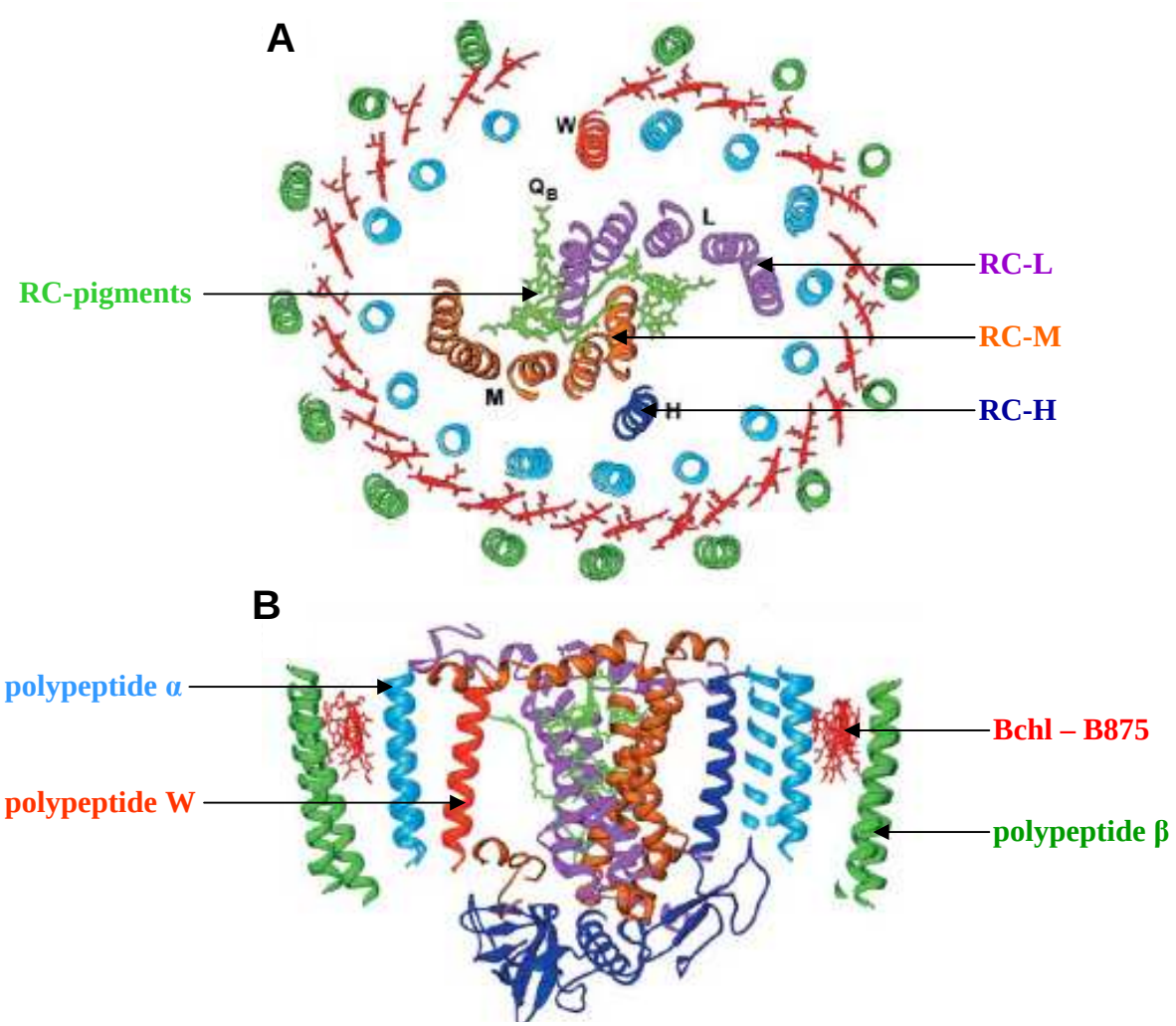


Figure 1-20 : Structure 3D du RC-LH1 de *Rps. acidophila* à 4,8Å de résolution.
A : vue perpendiculaire au plan de la membrane. B : vue partielle parallèle au plan de la membrane. *Protéine LH1* : en vert, polypeptide ß ; en cyan, polypeptide α ; en rouge, B875 Bchl a ; *Centre réactionnel* : en mauve, sous-unité RC-L ; en orange, sous-unité RC-M ; en bleu, sous-unité RC-H ; en vert clair, pigments RC ; en rouge clair, polypeptide W (Cogdell et al., 2004)

Les bactériochlorophylles présentes ont été modélisées selon leur densité électronique, mais leurs positions exactes n'ont pu être définies de manière précise. De plus, les auteurs de ce travail ont observé que l'anneau de LH1 n'est pas complètement refermé et qu'il est composé de 15 hétérodimères αβ au lieu des 16 décrits précédemment dans la littérature. En effet, l'ellipse de LH1 est interrompue par une hélice α transmembranaire appelé W qui se trouve au niveau de l'anneau interne formé par les polypeptides α. La position de ce polypeptide W à proximité du site de fixation de la quinone Q_B du centre réactionnel laisse supposer que ce polypeptide pourrait être impliqué dans le passage de Q_B à travers la protéine LH1 et faciliter ainsi sa diffusion dans la membrane. Le polypeptide W semble être un analogue de la protéine PufX que l'on retrouve

chez les bactéries *Rb. sphaeroïdes* et *Rb. capsulatus*, et dont la localisation (Qian et al., 2005; Scheuring et al., 2005a), la structure (Tunnicliffe et al., 2006; Wang et al., 2007) et la fonction au niveau du complexe RC-LH1 sont toujours au cœur des débats (Scheuring et al., 2004; Siebert et al., 2004).

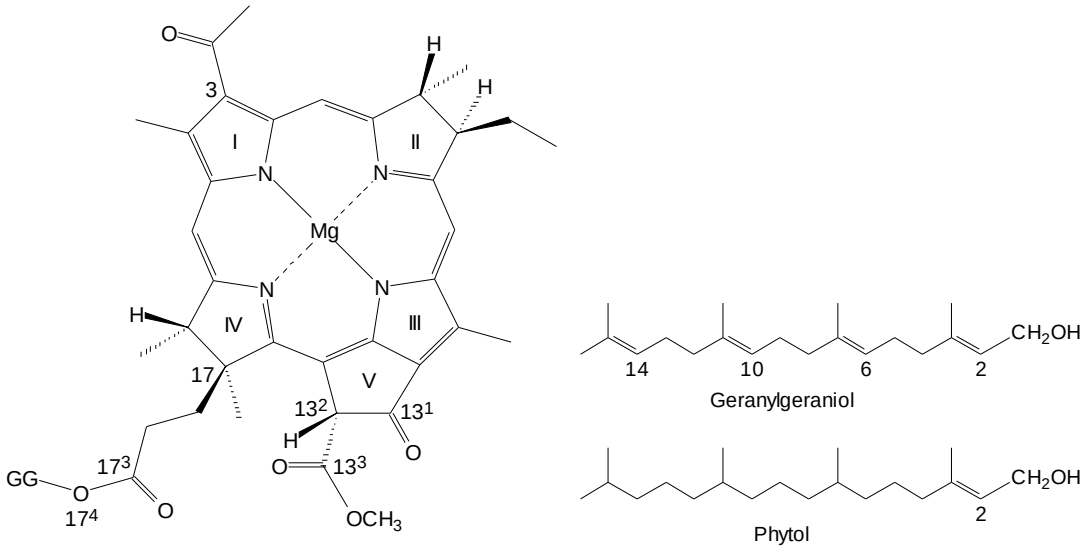
Le centre réactionnel bactérien (RC) de *Rps. viridis* fut la première protéine membranaire dont la structure a été obtenue à haute résolution par radiocristallographie (Deisenhofer et al., 1985). Ce travail a permis à ses auteurs d'obtenir le prix Nobel de Chimie en 1988 (Deisenhofer and Michel, 1989). Le centre réactionnel est une protéine intégrale composée de 3 sous-unités polypeptidiques L, M et H structurées en hélices α. La sous-unité H est constituée d'une seule hélice transmembranaire et d'un domaine globulaire cytoplasmique, tandis que les sous-unités L et M contiennent 5 hélices chacune. Ces dernières lient de façon non covalente des cofacteurs qui assurent sa fonction : un dimère de Bchl a, deux Bchl a accessoires et deux Bpheo a absorbant respectivement à 870, 800 et 750 nm, mais également deux molécules de quinone Q_A et Q_B et un caroténoïde qui complète le spectre d'absorption dans le visible entre 450 et 550 nm.

1.2.2.3 Pigments photosynthétiques

Les antennes photosynthétiques des bactéries pourpres ont pour fonction d'absorber efficacement la lumière, de transférer l'énergie d'excitation aux centres réactionnels avec un rendement maximal, et de dégrader l'excès d'énergie sans dommage pour l'appareil photosynthétique. Deux classes distinctes de pigments sont capables d'assurer conjointement ces fonctions : les bactériochlorophylles et les caroténoïdes.

1.2.2.3.1 Bactériochlorophylle a (Bchla)

Les chlorophylles sont des pigments très abondants sur terre, très répandus chez les eubactéries et ubiquitaires chez les plantes. Les bactériochlorophylles sont des dérivés chimiques des chlorophylles, ces dernières étant classées dans la famille des tétrapyrroles (au même titre que les hèmes et autres porphyrines). Ces molécules présentent une structure de faible symétrie et sont constituées d'un macrocycle bactériochlorine contenant quatre cycles pyrroliques (I à IV) couplés à un atome central de magnésium et un isocycle (V) fusionné sur ce macrocycle (Fig. 1-21)



<u>Figure 1-21</u> : Structure chimique de la bactériochlorophylle a : macrocycle et chaînes carbonées geranylgeraniol et phytol. I, II, III et IV : cycles pyrroliques ; V : isocycle.

On dénombre plusieurs structures chimiques de Bchl (de *a* à *g*) par la présence de différents groupements périphériques substitués sur le macrocycle, et par des états de réduction différents. La molécule de Bchl *a*, la plus commune chez ces bactéries, présente un groupement acétylé substitué en position C_3 du macrocycle, un groupement cétonique en $C_{13}{}^1$ et une chaîne carbonée phytyle (C_{20} chez *Rb. sphaeroides*) ou géranyle-géranyle (C_{20} chez *Rs. rubrum*) en $C_{17}{}^3$. Des études ont montré que ces groupements carbonyles en C_3 et $C_{13}{}^1$ jouent un rôle important dans les interactions intermoléculaires de ces molécules avec leur environnement protéique (Lutz and Kleo, 1979; Robert and Lutz, 1985). Le système d'électron π du cycle bactériochlorine qui coordonne l'ion Mg^{2+} aux quatre atomes N pyrroliques, est responsable des bandes d'absorption des Bchls. Le spectre d'absorption de ces molécules peut en effet être décomposé en trois régions distinctes, correspondant aux transitions électroniques suivantes : B_x et B_y (transitions de plus haute énergie) vers 370 nm, Q_x et Q_y (transitions de plus basse énergie) à 595 et 770 nm respectivement (Fig. 1-22).

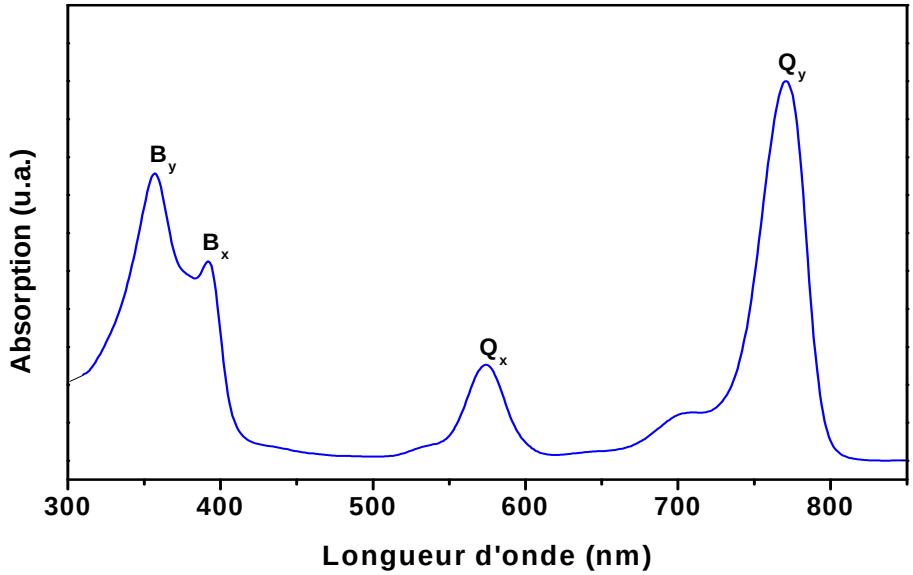


Figure 1-22 : Spectre d'absorption de la Bacteriochlorophylle a en diéthyl ether. Bx, By, Qx et Qy : transitions électroniques.

1.2.2.3.2 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules linéaires qui présentent une diversité structurale bien plus importante que celle des Bchls. En effet, environ 800 caroténoïdes différents ont été isolés dans le monde du vivant, dont une centaine chez les bactéries photosynthétiques. La plupart d'entre eux sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée isoprénique en $C_{40,41}$ contenant des doubles liaisons conjuguées, terminée par deux groupements chimiques très peu polaires, généralement cycliques ou méthyles. Le nombre des doubles liaisons varie de 7 à 13 pour les caroténoïdes que l'on retrouve chez les organismes photosynthétiques (Fig. 1-23). Chez ces organismes, les caroténoïdes ont des fonctions très importantes dans les étapes primaires de la photosynthèse : la collecte de la lumière (en complétant le spectre d'absorption dans le visible des Bchls entre 450 et 570 nm), la photoprotection (en désactivant l'oxygène singulet et les Bchls à l'état triplet) et la stabilité structurale des complexes collecteurs de lumière (Frank and Cogdell, 1996). Sur ce dernier point, les caroténoïdes sont en effet capables de former un grand nombre d'interactions hydrophobes au sein des protéines photosynthétiques (LH et CR) de part leur longue chaîne carbonée (Freer et al., 1996). Ces liaisons ont un effet stabilisant sur la structure globale de ces édifices moléculaires. De plus, il a été montré que la position de la transition Qy des Bchla B850 du LH2 est également sensible à la présence des caroténoïdes (Frank and Cogdell, 1996; Gall et al., 2003a).

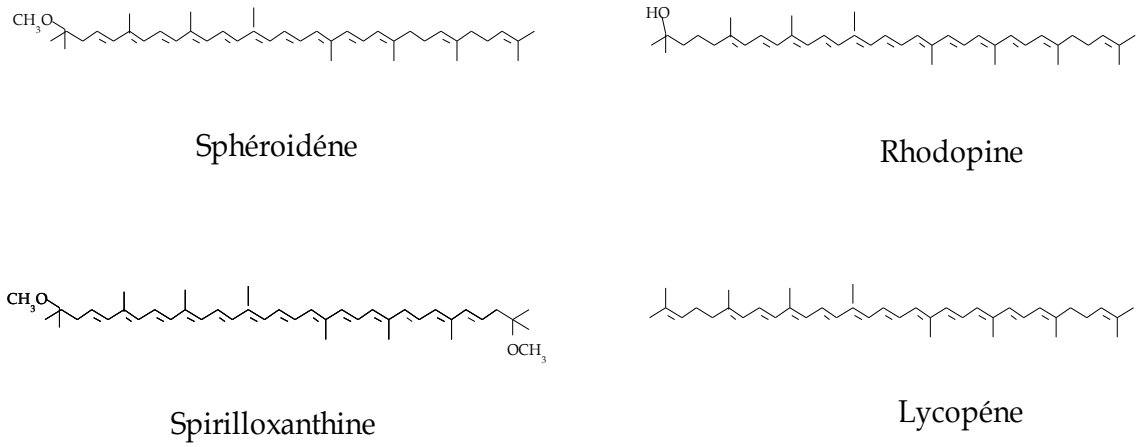


Figure 1-23 : Structures des principaux caroténoïdes synthétisés dans les protéines antennes des bactéries pourpres.

1.2.3 Fonction des protéines collectrices de lumière (protéines antennes)

1.2.3.1 Relation structure/fonction des protéines antennes LH1 et LH2

L'observation du spectre d'absorption des protéines antennes LH1 et LH2 permet d'obtenir des informations sur leur structure et leur fonction. Les pigments présents dans ces complexes sont localisés dans des environnements chimiques différents, capables de modifier les caractéristiques spectrales des protéines antennes. Les protéines LH1 et LH2 ont été définies par la position en nanomètres de la transition Qy des Bchls qu'elles lient (Cogdell et al., 1985). En effet, cette transition de plus basse énergie est plus sensible aux états d'interaction des Bchls au sein des complexes, et peut ainsi subir un déplacement vers le proche-infrarouge de plus de 100 nm. Au contraire, les positions de la transition Qx (à 595 nm) et des bandes de Soret (vers 370 nm) ne sont pas ou peu influencées par leur environnement local. A partir de ces informations, une nomenclature a été proposée, à savoir que les LH2 sont appelées B800-B850 en référence à la transition Qy des 9 Bchls absorbant à 800 nm et des 18 Bchls absorbant à 850 nm, et que les LH1 sont appelés B875 en référence à la transition Qy des 32 Bchls absorbant à 875 nm.
Le déplacement de la transition Qy des Bchls est la résultante des interactions entre les polypeptides et les Bchls mais également des pigments entre eux.

1.2.3.1.1 Les interactions Bchl/polypeptide

L'influence du site protéique de liaison des Bchls sur la position de l'absorption de celles-ci a été déterminée par des expériences en spectroscopie électronique et Raman de résonance, sur des protéines LH1 et LH2 modifiées par mutagenèse dirigée. Il a été possible de mettre en évidence le rôle important de résidus tryptophane et tyrosine impliqués dans les liaisons avec les groupements carbonyle acétyle des Bchls des LH1 (Olsen et al., 1994; Sturgis et al., 1997) et des LH2 (Fowler et al., 1994; Fowler et al., 1992). Ces modifications entraînent la rupture d'une ou de deux liaisons hydrogène et induisent respectivement un déplacement de la transition Qy vers le bleu d'environ 10 et 20 nm. Des études semblables ont été réalisées afin de déterminer le rôle des interactions entre le magnésium central des Bchls et les polypeptides (Olsen et al., 1997), et également entre les carbonyles cétoniques et les résidus impliqués (Braun et al., 2003; Law et al., 2004; Sturgis et al., 1995). Ces expériences ont montré que ces liaisons ont très peu d'impact sur l'absorption et l'assemblage des protéines antennes. Cependant, la coordination du magnésium central avec les histidines entraîne une distorsion du macrocycle bacteriochlorine que l'on retrouve aussi bien chez les LH1 que chez les LH2 (Lapouge et al., 1999; Papiz et al., 2003). Cette distorsion ne semble pas avoir un effet très sensible sur les propriétés d'absorption (faible déplacement) (Gudowska-Nowak et al., 1990) mais plutôt sur le temps de vie de l'état excité des Bchls (Gentemann et al., 1997).

1.2.3.1.2 Rôle des interactions Bchl/Bchl

Les bactériochlorophylles à l'origine de la bande d'absorption à 850 nm (LH2) et 875 nm (LH1) sont en contact de van der Waals les unes avec les autres et forment un agrégat de forme circulaire. Les interactions excitoniques entre ces molécules seraient à l'origine du déplacement de la transition électronique Qy vers le proche-infrarouge (Van Grondelle et al., 1994). Des études ont montré qu'il est possible d'observer un déplacement vers le rouge de la transition Qy des LH1 sous haute pression hydrostatique, mais que ces phénomènes ne sont pas liés à une distorsion des Bchls ni à une perturbation des liaisons hydrogène impliquant les groupes carbonyles de ces molécules. Ces effets observés ont été attribués à une modulation des interactions pigment-pigment induite par la pression exercée (Sturgis et al., 1998). On sait que ces interactions sont sensibles à certains facteurs tels que la taille de l'agrégat, la distance entre les pigments (Fig. 1-24), les angles entre les dipôles et le désordre statique et dynamique (cf paragraphe 3 ci-dessous).

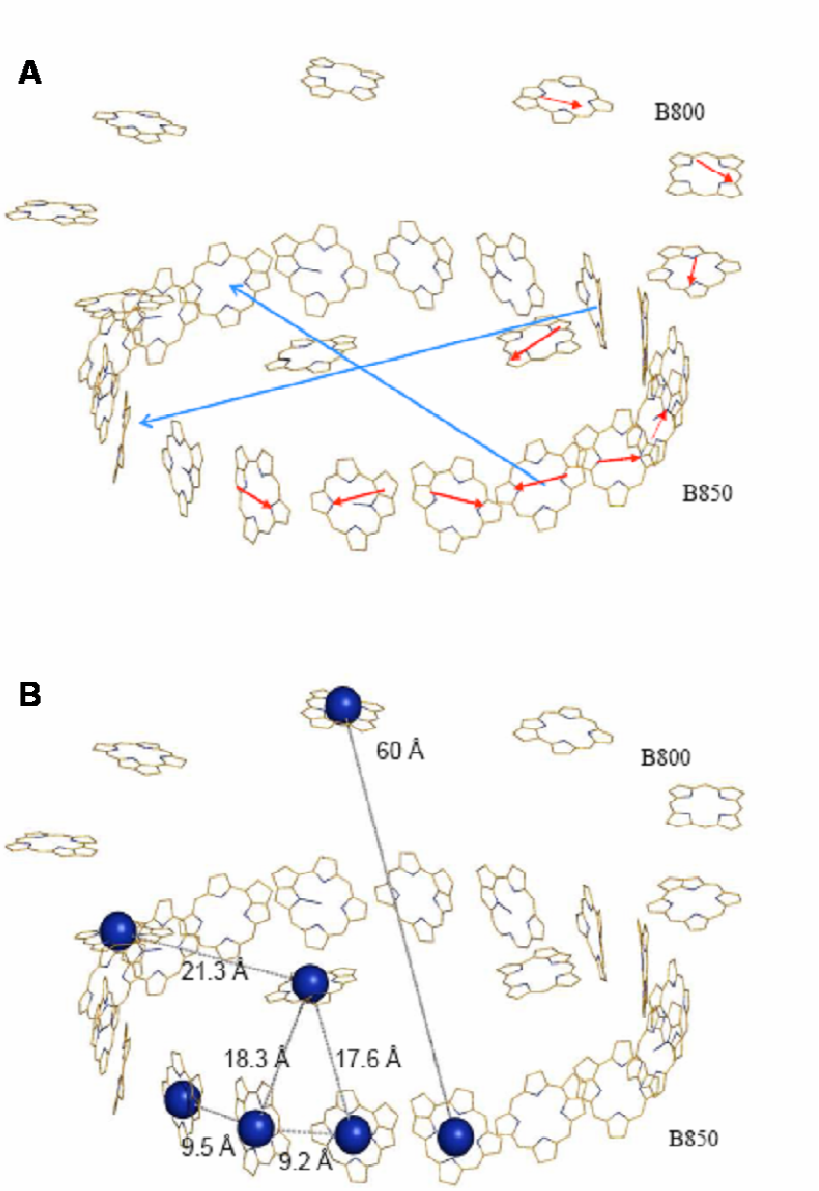


Figure 1-24 : Relation entre les distances Bchl-Bchl et le moment dipolaire dans LH2.
A : les dipôles de quelques Bchls sont représentés par les flèches rouges et les moments dipolaires du B850 par les flèches bleues. B : Distances entre les Bchls individuelles B800 et B850 (Cogdell et al., 2006)

1.2.3.1.3 Absorption des protéines antennes

Pour tenter d'expliquer l'élargissement de la bande d'absorption de la transition Qy, il est essentiel de tenir compte de la force des interactions Bchl-Bchl. Si on considère qu'il y a peu d'interactions entre Bchls ou que ces interactions sont faibles, la transition Qy pourrait être apparentée à la somme des transitions électroniques de toutes les Bchls de l'anneau (les états excités pourraient être localisés sur une ou quelques molécules). Dans le cas contraire, en présence de fortes

interactions, la transition Qy pourrait être représentée par une seule et unique transition électronique provenant de l'ensemble des Bchls qui se comporterait comme un multimére figé et ordonné (où l'excitation serait délocalisée de façon cohérente sur l'ensemble des Bchls). Cependant, les propriétés électroniques de la Qy dépendent également des variations des propriétés individuelles de chaque Bchl de l'anneau induites par le désordre, ce qui pourrait expliquer l'élargissement inhomogène de sa bande d'absorption. En effet, dans ce type d'assemblage entre molécules identiques, les différences physico-chimiques peuvent provenir de différences de conformation des molécules et de différences structurales dans leur environnement proche. Ces différences peuvent être liées au désordre intrinsèque de la structure (désordre statique) et à ses fluctuations dynamiques (désordre dynamique).

En appliquant cette théorie, des modèles de type excitonique ont été obtenus par calcul pour prédire la position de la transition Q_y du LH2 (van Grondelle and Novoderezhkin, 2001). Il est indispensable d'introduire dans ces calculs la notion de désordre, c'est-à-dire considérer qu'à un instant donné, toutes les Bchls n'ont pas les mêmes propriétés optiques. Sur ce principe, le désordre est suffisamment important chez les protéines antennes LH1 et LH2 pour empêcher la délocalisation de l'exciton sur l'ensemble des molécules de Bchls. L'analyse des résultats de différentes méthodes spectroscopiques a révélé que l'excitation dans un anneau de LH2 absorbant à 850 nm est cohérente sur quelques molécules de Bchls (de 2 à 4) (Kuhn and Sundstrom, 1997)

1.2.3.2 Transfert d'énergie au sein des protéines antennes

Le transfert d'énergie au sein du photosystème bactérien, entre les protéines antennes et le centre réactionnel, est basé sur le mécanisme de Förster (Förster, 1948). Lorsqu'une molécule de Bchl absorbe la lumière, le temps de vie de l'état singulet excité est de l'ordre de 1 ns. C'est pourquoi le transfert d'énergie jusqu'au centre réactionnel doit avoir lieu pendant ce laps de temps (Fig. 1-25). Dans le photosystème bactérien, qui se comporte comme un entonnoir, ce transfert d'énergie est orienté vers le CR par un gradient d'énergie créé par la position de la transition électronique Qy. Cette unidirectionnalité confère au photosystème son efficacité, avec un rendement supérieur à 95%. Le gradient d'énergie chemine donc entre les LH2 (B800, B850 et caroténoïdes) et le centre réactionnel (P860, dimère de Bchl) *via* les LH1 (B875 et caroténoïdes). Les caroténoïdes, capables d'absorber la lumière, et qui sont en contact de van der Waals avec les Bchls, peuvent transférer leur énergie aux Bchl avec une efficacité variable (entre 30 et 100% selon les antennes et les espèces bactériennes). Au sein des protéines LH2, l'énergie d'excitation migre entre B800 dans un temps de 0,5 ps (Sundstrom et al., 1999), puis entre B800 et B850 en 1 ps environ (Kennis et al.,

1996). Le transfert d'énergie est ensuite très rapide entre les molécules B850 qui sont en interaction (entre 50 et 150 fs) et se trouve délocaliser sur une partie de l'anneau (cf i-3). Ceci permet en effet à l'énergie d'excitation d'être accessible aux anneaux voisins en contact direct (autres LH2 ou LH1) quelque soit la localisation des Bchls excitées sur l'anneau de LH2. Le passage de l'énergie d'excitation entre les B850 du LH2 et les B875 du LH1 s'effectue en 3-5 ps environ (Sundstrom et al., 1999), et cette énergie migre très rapidement au sein du LH1, entre les B875 en interaction (environ 80 fs, (Visser et al., 1995)). Le transfert d'énergie se termine ensuite entre les B875 et le dimère de Bchls du centre réactionnel dans un temps relativement plus lent (entre 30 et 50 ps) (Van Grondelle et al., 1994). Ceci est certainement dû à la distance importante entre ces pigments (environ 30Å).

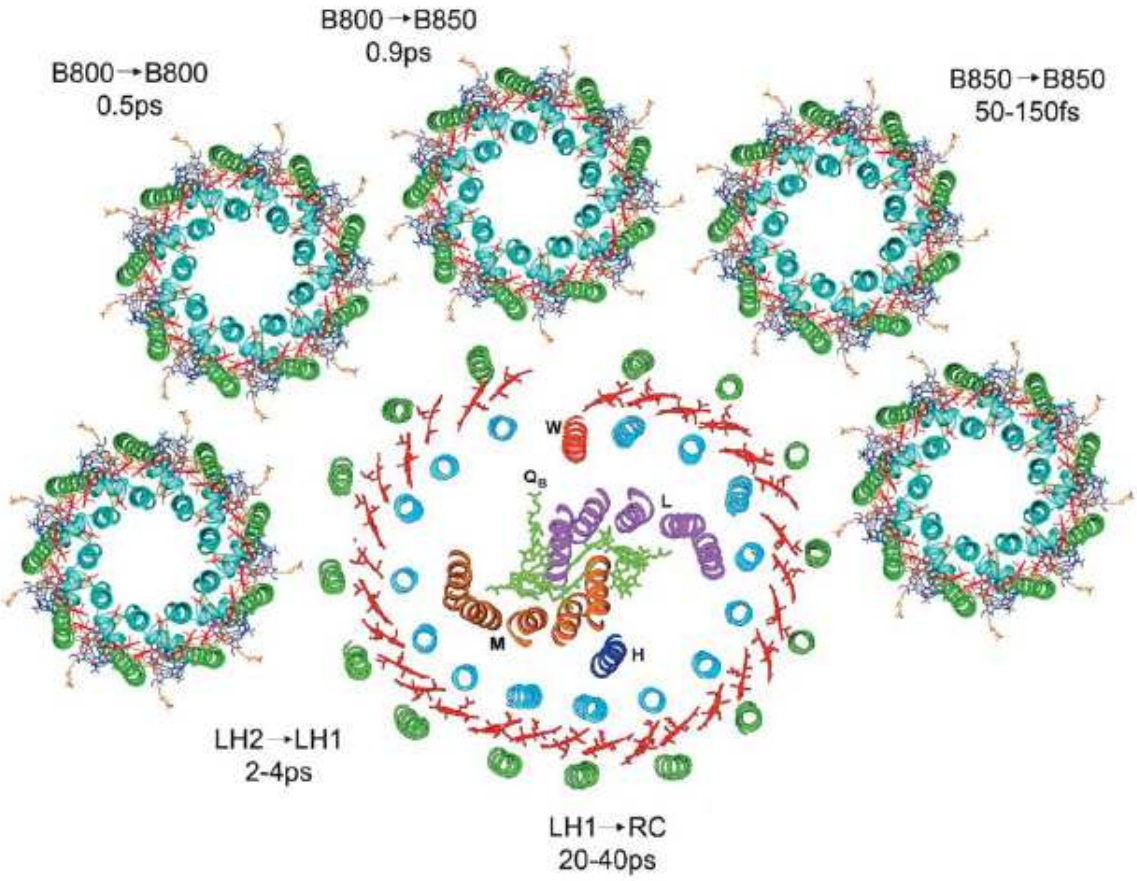


Figure 1-25 : Modèle de photosystème bactérien basé sur les structures de LH2 et RC-LH1 montrant les différents temps de transfert d'énergie (Cogdell et al., 2004)

1.2.4 Biosynthèse et assemblage du photosystème bactérien

La biosynthèse de l'appareil photosynthétique est un processus que l'on peut séparer en deux phases distinctes que sont i) la régulation et ii) l'assemblage des différents polypeptides et pigments qui composent les protéines photosynthétiques LH2 et RC-LH1.

1.2.4.1 Régulation de la biosynthèse

La biosynthèse des antennes collectrices de lumière est généralement décrite par un système de régulation à deux composantes (Swem et al., 2001). Dans un premier temps, la synthèse débute par un contrôle de la tension en oxygène du milieu. Si les bactéries sont exposées à une tension en oxygène de plus en plus faible, des invaginations de la membrane cytoplasmique se créent avec induction de la synthèse des protéines antennes. Dans un second temps, l'extension de la production des polypeptides et pigments est régulée par l'intensité lumineuse (Bauer, 1995). Cependant, plus l'intensité lumineuse est faible, plus le rapport LH2 :LH1 sera élevé. Depuis quelques années, il a été montré que cette régulation pouvait intervenir d'une part par l'intermédiaire de AppA, responsable de la perception de lumière bleue par les bactéries (Braatsch and Klug, 2004), et d'autre part par une famille de protéines photoreceptrices : les bactériophytochromes (BphPs) (Giraud et al., 2002). Chez les bactéries photosynthétiques, les BphPs ont des rôles divers, notamment la régulation de la synthèse des caroténoïdes et la biosynthèse des LH. Pour exemple, le séquençage du génome de *Rps. palustris* a mis en évidence la présence de six BphPs, dont quatre sont essentiels à la régulation de la photosynthèse en étant à proximité du cluster des gènes photosynthétiques (Larimer et al., 2004).
Chez les bactéries photosynthétiques, les gènes impliqués dans la photosynthèse sont inclus dans un unique cluster. Au sein de ce cluster, la plupart des gènes sont organisés en opérons formant ainsi un super opéron, et permettant la coordination de l'expression et de la régulation des gènes de l'appareil photosynthétique (Fig. 1-26).

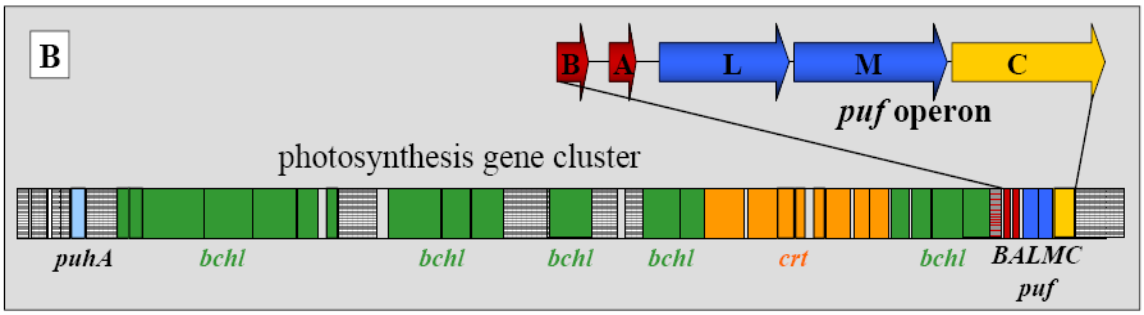


Figure 1-26 : Représentation d'un cluster de gènes photosynthétiques de bactéries pourpres. Les gènes codant pour le centre réactionnel (sous-unités L et M) sont en bleu, en rouge pour LH1 (B et A codent respectivement pour les polypeptides ß et α) et jaune pour le cytochrome

tétrahémique (C). Les gènes codant pour la synthèse de bactériochlorophylles (bchl) et de caroténoïdes (crt) sont en vert et orange.

L'opéron *pufBALM* est conservé chez toutes bactéries pourpres et code pour la synthèse du complexe RC-LH1, tandis que l'opéron *pucBA* code pour la synthèse des protéines LH2 (Beatty, 1995). Dans le cas de la synthèse du RC-LH1, le premier ARN messager polycistronique (issu de *pufBALM*) est hautement instable et est rapidement dégradé en petits fragments beaucoup plus stables. La stabilité de ces fragments est variable et permet d'assurer ainsi la stoechiométrie nécessaire à l'assemblage du complexe RC-LH1 (1 :16). Le fragment *pufBA* a la durée de demi-vie la plus importante (Heck et al., 2000).
Malgré ces connaissances, il est difficile à l'heure actuelle de définir un chemin très précis de repliement et d'assemblage des protéines antennes au sein des membranes photosynthétiques.

1.2.4.2 Assemblage des protéines antennes

La détermination des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus d'assemblage des protéines antennes dans les membranes photosynthétiques a fait l'objet de très nombreuses études *in vivo* et *in vitro*. Il est possible par exemple d'induire des modifications de la séquence primaire des protéines antennes en utilisant les techniques de mutagenèse dirigée et d'observer l'influence de ces mutations sur l'assemblage. L'avantage de cette approche est l'obtention d'informations sur la mise en place de ces complexes dans des conditions quasi-natives, et en particulier dans leurs membranes natives. Une alternative à ce cheminement est la reconstitution de protéines antennes à partir de leurs composants isolés (polypeptides et pigments) afin d'étudier le processus d'assemblage *in vitro* (Ghosh et al., 1988; Parkes-Loach et al., 1988). De nombreux résultats ont été obtenus au début des années 1990 et concernent tout particulièrement la protéine LH1. Ces études sont présentées dans la revue proposée par P. Loach (Loach and Parkes-Loach, 1995).

1.2.4.2.1 LH2

Des études *in vivo* dans *Rb. sphaeroides* ont montré que la réduction partielle des extrémités N-terminales entraîne la formation de LH2 dépourvues de Bchls B800 (Koolhaas et al., 1998), et que l'altération aux extrémités C-terminales conduit à la formation d'anneaux non fonctionnels (Braun et al., 2002). D'autre part, comme c'est le cas chez la protéine LH1, la présence des résidus histidine conservés sont indispensables pour la liaison aux Bchls, et donc

indispensables à l'assemblage du LH2 (Olsen et al., 1997). Par contre, les molécules de caroténoïdes sont essentielles pour l'assemblage du LH2 *in vivo* (Lang and Hunter, 1994), et pas forcément nécessaires pour le LH1. L'équipe de P. Braun s'intéresse de son côté au rôle des résidus présents au niveau de la région centrale hydrophobe des hélices transmembranaires. Ces auteurs ont pu montrer que seulement quelques résidus (ex : α-S27) ont des positions nécessaires et suffisantes pour permettre l'assemblage de protéines LH2 intactes (Braun et al., 2002; Braun et al., 2003; Kwa et al., 2004)

1.2.4.2.2 LH1

Les études *in vivo* sur l'assemblage du LH1 ont été développées chez les bactéries *Rb. capsulatus* et *Rb. sphaeroides*, et ont permis de mettre en évidence le rôle des sites de liaison des Bchls et des extrémités N et C-terminales dans ce processus. On peut citer notamment l'importance des résidus histidine (Olsen et al., 1997) et des tryptophanes (α-W43 et β-W47 ; (Olsen et al., 1994; Sturgis et al., 1997)), responsables du réseau de liaisons hydrogène entre les polypeptides α et β et les Bchls *a*, et important pour l'assemblage *in vivo* des LH1. D'autres études ont mis en évidence le rôle des charges électrostatiques présentes sur les polypeptides aux interfaces membranaires (Drews, 1996), mais également la part importante des interactions hydrophobes dans le processus d'assemblage entre polypeptides α et β (Sturgis and Robert, 1994).

Les protéines LH1 ont une stabilité en présence de détergent beaucoup plus faible que les protéines LH2. C'est pourquoi de nombreuses études de reconstitution des protéines LH1 ont été menées à partir de 1988. En effet, la position de la transition Qy des Bchls a dans un anneau natif de LH1 à 873 nm (chez *R. rubrum* G9, mutant dépourvu de caroténoïdes) dépend fortement des interactions entre hétérodiméres αβ. Une fois purifiée, la protéine peut être dissociée réversiblement en présence de détergent βOG dans une espèce absorbant à 820 nm (B820) correspondant aux dimères αβ isolés. Une augmentation de la concentration en βOG entraîne la dissociation du complexe B820 en une nouvelle espèce absorbant à 777 nm (Ghosh et al., 1988; Parkes-Loach et al., 1988). Cette forme spectrale B777 correspond à un mélange de polypeptides α et β liant chacun une molécule de Bchl a. Lorsque l'on réduit la concentration de βOG, les espèces B777 peuvent se réassocier et former des espèces absorbant à 873 nm.

Des études par protéolyse ménagée ont permis de déterminer les éléments structuraux minimaux pour la formation de B820, en diminuant/modifiant la taille des extrémités C et N-terminales (Kehoe et al., 1998; Meadows et al., 1998). De plus, des études ont montré la contribution importante de la concentration de détergent βOG (Arluison et al., 2002b) dans le maintien des formes intermédiaires en solution, et ont également permis de mettre en évidence la présence

d'homodiméres ββ et l'absence de dimères αα dans les échantillons de B820. Seuls les dimères αβ sont cependant capables de reformer des formes spectrales absorbant à 873 nm (Arluison et al., 2002a). La réversibilité de ce processus de dissociation/réassociation de la protéine LH1 a permis d'estimer les paramètres thermodynamiques associés à la formation de B820 et de révéler la présence d'états oligomériques intermédiaires de taille plus importante (Pandit et al., 2003; Pandit et al., 2001; Sturgis and Robert, 1994; Vegh and Robert, 2002). Enfin, deux études simultanées suggèrent que les régions N-terminales sont aussi très importantes dans l'assemblage des LH1 *in vitro* et dans le processus de dimérisation des polypeptides α et β (Arluison et al., 2004; Parkes-Loach et al., 2004). La notion de « poche hydrophobe » a été proposée pour expliquer le rôle central d'un résidu Trp (α-W45 chez *R. rubrum*) présent à l'interface membranaire (en N-terminal) dans la formation d'un réseau d'interactions hydrophobes impliquant environ 5 résidus apolaires voisins (Arluison et al., 2004).

Bien que toutes ces études aient été capables de mettre en évidence des résidus et des régions polypeptidiques indispensables pour permettre l'assemblage des protéines antennes, il est actuellement difficile de comprendre réellement quels sont les détails moléculaires qui contrôlent ce processus *in situ* dans les membranes photosynthétiques.

1.2.5 Les protéines antennes des bactéries pourpres : un système modèle pour des études en environnement membranaire

Cette introduction a mis en lumière les moyens techniques actuels mis en œuvre pour l'étude de la relation structure/fonction des protéines membranaires mais également les difficultés rencontrées au cours de l'utilisation de ces moyens. De nombreuses informations ont été obtenues à ce jour sur des protéines membranaires extraites de la membrane, et le plus souvent isolées dans une solution contenant des détergents. Une très grande majorité des protéines membranaires est peu exprimée dans leur environnement naturel, c'est pourquoi très peu d'études ont été développées sur ces macromolécules directement insérées dans la bicouche lipidique.

Les protéines membranaires photosynthétiques de type LH2 et RC-LH1, présentées dans la seconde partie de cette introduction, ont été très largement étudiées depuis l'obtention de la structure 3D à haute résolution du centre réactionnel de *Blastochloris viridis* au milieu des années 80. Ces protéines sont des modèles de choix pour l'étude des interactions entre polypeptides transmembranaires et entre les protéines et lipides. De plus, leur manipulation est très avantageuse par rapport aux autres protéines membranaires puisque ces protéines sont, comme la

bactériorhodopsine chez *Halobacterium halobium*, très largement surexprimées dans les membranes intracytoplasmiques des bactéries pourpres photosynthétiques.

1.3 Objectif de l'étude

Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé la capacité de la souche bactérienne *Rhodospirillum rubrum* à surexprimer de manière naturelle (non recombinante) la protéine membranaire LH1. La mise en culture de cette souche est bien maîtrisée dans le laboratoire, et les conditions de culture nous permettent d'assurer la production de la protéine d'intérêt en grande quantité. De plus, nous maîtrisons parfaitement les approches pour extraire et purifier les membranes photosynthétiques dans lesquelles la protéine se retrouve dans sa conformation native.

Ce laboratoire possède également une expérience très importante sur l'étude de ces protéines antennes bactériennes depuis environ 20 ans. Les nombreux résultats obtenus concernent principalement l'assemblage et la stabilité des protéines LH1 et LH2 en présence de détergent. J'ai pu de mon côté développer mes connaissances et apporter mon expérience sur cette thématique, tout particulièrement pour la mise en évidence et la caractérisation d'états intermédiaires d'oligomérisation de la protéine LH1 en présence de détergent octylglucoside.

Cependant, il y a dans la littérature très peu d'études réalisées sur ces processus observées sur des protéines membranaires non solubilisées, dans leur environnement natif. Le but de mon travail a été de développer au laboratoire une approche calorimétrique fonctionnelle en membrane native à l'aide de technique de spectroscopie d'absorption, de dichroïsme circulaire et de Raman de résonance à transformée de Fourier. Nous avons étudié l'effet de la température sur les propriétés spectrales de la protéine LH1 en utilisant les molécules de bactériochlorophylle comme marqueur d'assemblage des polypeptides transmembranaires qui constituent l'anneau de LH1. Trois souches différentes de la bactérie pourpre *Rsp. rubrum* ont été utilisées afin de mettre en évidence l'influence des caroténoïdes et du centre réactionnel dans les processus d'auto-assemblage et de stabilité de la protéine LH1 dans son environnement naturel. Ces études ont été réalisées sans ajout de détergent ou autres agents chaotropes, mais directement sur les membranes natives purifiées contenant la protéine LH1 surexprimée.

Au cours de ce travail, nous avons observé que la variation de température autour de valeurs proches des conditions physiologiques a un effet dynamique sur la protéine. En effet, notre technique qui consiste à effectuer un cycle de chauffe suivi d'un cycle de refroidissement montre l'influence de ce paramètre sur la conformation de la protéine. Lorsque les températures sont plus élevées, nous montrons que ce paramètre favorise la dissociation réversible du LH1 et nous nous

appuyons sur les résultats obtenus en présence de détergent pour caractériser un chemin de dissociation-réassociation en membrane native, ce qui constitue une des premières observations de ce mécanisme pour une protéine membranaire repliée dans son "milieu naturel".

Chapitre 2

Influence de la température sur la dynamique des protéines LH1 et LH2

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats des expériences que nous avons réalisées dans une gamme de température non-dénaturante qui est variable selon la souche de *Rsp. rubrum* étudiée (cf Tableau XX). Nous nous intéressons à l'effet de la température sur les propriétés spectrales de la protéine LH1 exprimée dans sa membrane native. Pour cela, nous avons élaboré au laboratoire un protocole expérimental qui nous permet d'analyser l'évolution du spectre d'absorption de la protéine LH1 pendant une phase de montée en température suivie d'une phase de refroidissement. Nous avons observé que la température entraîne un déplacement spectral réversible que nous avons caractérisé par des méthodes de spectroscopies d'absorption et de dichroïsme circulaire. Nous avons pu montré qu'il existe un équilibre entre deux formes spectrales distinctes que nous avons appelées forme bleue et rouge (du fait de la différence d'environ 10-15 nm entre leur maximum d'absorption de la transition Qy). L'existence de ces deux formes a été mise en évidence par soustractions des spectres successifs et par reconstitution du spectre original. Comme le montre les résultats par dichroïsme circulaire, l'effet de la température n'entraîne pas un changement important de la structure annulaire de la protéine LH1 mais plutôt des fluctuations conformationnelles de l'anneau de 32 bactériochlorophylles, qui sont en interaction de van der Waals les unes avec les autres. Afin d'obtenir des informations sur l'origine moléculaire de ce phénomène observé, nous avons ensuite développé une nouvelle approche par spectroscopie Raman de résonance à transformée de Fourier en température.

2.1 Présentation des trois souches de *Rhodospirillum rubrum* : S1, S1S et G9

Nous possédons au laboratoire 3 souches bactériennes de *Rsp. rubrum* pour cette étude : une souche sauvage S1 et deux souches mutantes G9 et S1S (cette dernière a été construite au laboratoire, cf Matériels et méthodes). Cette bactérie possède la capacité de pouvoir se développer en condition respiratoire ou par photosynthèse. Les conditions de culture en aérobiose/obscurité sont indispensables pour la croissance des souches mutantes et pour le développement de l'appareil photosynthétique. La souche S1S est particulièrement sensible à la lumière, car l'absence du centre réactionnel est létale pour la bactérie. Si les souches S1 et S1S possédant des caroténoïdes ont pu se développer dans des conditions de culture strictement identiques, nous ne sommes pas parvenu à cultiver la souche G9 dans ces mêmes conditions puisque la bactérie ne développait pas ses membranes intracytoplasmiques contenant l'appareil

photosynthétique. Les caractéristiques de chacune des souches étudiées sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Souches *Rhodospirillum rubrum*	**S1**	**S1S**	**G9**
Milieux de culture	M2SF	M2SF	M
Température d'incubation	28°C	28°C	28°C
Morphologie macroscopique (couleur)	Rouge	Rouge pâle	Bleue-gris
Complexes synthétisés	RC-LH1	LH1	RC-LH1
Pigments photosynthétiques			
Bactériochlorophylles	Bchl *a* (Bpheo *a*) *15-cis* et *all-trans*	Bchl *a* *all-trans*	Bchl *a* (Bpheo *a*)
Caroténoïdes	spirilloxanthine	spirilloxanthine	/
Maximum d'absorption du LH1 (nm) à 25°C	880	882	873
Gamme de température	5 à 57°C	5 à 38°C	5 à 47°C



<u>Tableau XX</u> : Présentation des souches de *Rsp. rubrum* S1, S1S et G9. Photo des cultures : de gauche à droite : S1, G9 et S1S.

2.2 Temperature dependence of LH1 spectrum reflects the protein natural flexibility: a study of LH1 in native intracytoplasmic membranes

Jérôme Seguin, Luc Bordes, Bruno Robert and Maïté Paternostre

iBiTecS/SB^{2}SM, URA 2096 CNRS et CEA, CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette F-91191, France

To be submitted to Biophysical Journal

Abbreviations: Bchl, Bacteriochlorophyll; B873, B820 and B777, dissociated forms of light harvesting complex 1 absorbing at 873, 820 and 777 nm, respectively; LH, Light Harvesting Complex; RC, Reaction Center; *Rsp*, *Rhodospirillum*; FWHM, full width at half maximum

Abstract

In photosynthesis, light energy is collected by antenna systems. In purple bacteria, these antenna systems most often comprise two membrane light harvesting proteins, the peripheral LH2 and the core LH1 complexes. The LH1 complex is composed of 32 α-helix, 32 bound Bchl and 16 carotenoids. The Bchl-polypeptide and Bchl-Bchl interactions give to this complex its peculiar light absorption properties. This complex has been extensively studied after its solubilisation and in particular its dissociation-association process has been explored in presence of increasing concentrations of octyl β-D-glucopyranoside. In this work, we studied the effect of temperature on the light absorption properties and structure of LH1 in its native environment, *i.e.* in its intracytoplasmic membranes. Intracytoplasmic membranes purified from three different strains of *Rhodospirillum rubrum* were studied and compared: the wild type S1, the carotenoid-less G9+ and a reaction centre-less S1S strains. Heating the membranes induces a 6 to 4nm blue shift of the Qy absorption transition of the bacteriochlorophyll-bound LH1. This temperature effect is fully reversible upon cooling and has weak and reversible effect on the CD spectra of the LH1 complexes and no effect on the FT-Raman spectra. Moreover, this blue shift comes along with

an iso-absorbing point evidencing a coexistence of 'red' and a 'blue' spectra. During heating, the proportion of the blue component increases at the expense of the red one. The temperature dependence of the absorption, the weak effect on the circular dichroism and the absence of effect on the FT-Raman spectra suggest that small changes in Bchl-Bchl interaction are at the origin of the observed temperature effect. These changes depend on the membranes composition, in particular on the presence of carotenoid molecules bound to LH1, and/or of reaction centers in the membrane. We believe that these temperature effects are a direct consequence of the membrane complexes natural flexibility.

Introduction

Characterization of structure-function relationship in membrane proteins are of essential importance for our knowledge on many vital cellular processes. However, little is still known about the structure and physical properties of membrane proteins (Lacapere et al., 2007; White, 2004). This lack of information reflects the difficulty of producing, purifying and crystallizing these proteins. Although an increasing number of structures have become available, yet major questions remain about membrane protein dynamic and flexibility. It is however well-documented that, in many cases, membrane protein undergo dynamic conformational transition between discrete structural states to carry out their function (for example see *e.g.* (Klingenberg, 2005; Nury et al., 2006; Valadie et al., 2003; Wilson and Brunger, 2000)). For membrane proteins, the membrane environment, which is highly anisotrope, contributes to the complexity of performing membrane protein dynamic studies, relevant for *in vivo* situations, and thus their biological function (Ash et al., 2004; Gumbart et al., 2005). Elucidating the mechanism of membrane proteins thus necessitates a combination of various approaches. X-ray crystallography provides information (although often with limited resolution) on their atomic structure locked in a precise conformational state. Electron or atomic-force microscopies offer approaches to control their oligomeric state under different conditions and environments. From the starting point of these structures, understanding the membrane protein function generally requires a huge amount of functional characterization, and the extensive use of site-selected mutants (see *e.g.* (Lanyi, 2004)).

The photosynthetic light harvesting complexes, and in particular those of purple photosynthetic bacteria are good examples of proteins the crystallographic structure of which does not yield direct clue on their function. Although is well-established that these proteins are responsible for the absorption of the incoming solar photons and the transfer of the resulting excitation energy

towards the reaction centers (RC) or photosystems, the major plant light-harvesting protein was shown to crystallize into a conformation where it efficiently traps the excitation energy (Pascal et al., 2005). Similarly, the structure of the peripheral light-harvesting complex from purple photosynthetic bacteria, if taken as such, does not allow to explain its electronic properties (Monshouwer et al., 1997). Characterisation of the function of these proteins thus required the use of a very wide range of techniques, as well as original theoretical modeling including in particular disorder (van Mourik et al., 2001).

In purple photosynthetic bacteria, the light harvesting system always comprise the so-called core-complex (or LH1), which is tightly associated with the RC, with a fixed stoichiometry. Many bacteria contain another type of LH proteins, the peripheral LH2, which transfer excitation energy to the RC *via* the LH1. LH2 from purple, non-sulfur bacteria such as *Rhodobacter* (*Rb*) s*phaeroides* or *Rhodopseudomonas* (*Rps*) *acidophila* are probably among the best-characterized photosynthetic antenna proteins with regard to structure and function (see e.g. (Isaacs et al., 1995; Law et al., 2004; Olsen and Hunter, 1994; Robert et al., 2003)). Both LH2 and LH1 are constituted of large circular oligomers of a basic subunit comprising an heterodimer of two small integral membrane polypeptides, α and β (Karrasch et al., 1995; McDermott et al., 1995). Although it is clear that the structure of the LH1 is mainly a ring (Walz et al., 1998) and that this ring surrounds the bacterial reaction center (Roszak et al., 2003), remarkable differences between bacterial species were observed (Scheuring, 2006). When isolated LH1 from *Rhodospirillum (Rsp) rubrum,* is a closed ring, composed of 16 αβ heterodimers around the RC (Fotiadis et al., 2004; Jamieson et al., 2002; Karrasch et al., 1995) In *Rps viridis* membranes, when surrounding the RC, the LH1 polypeptides organise as an ellipse, but as a circle when the RC is removed (Scheuring et al., 2003). In *Rb sphaeroides*, the LH1 polypeptides contain an additional polypeptide, termed PufX, and form an S-shaped oligomeric structure around a reaction center dimmer (Aklujkar and Beatty, 2006; Francia et al., 1999; Jungas et al., 1999; Qian et al., 2008; Qian et al., 2005; Scheuring et al., 2005; Scheuring et al., 2004; Siebert et al., 2004; Tunnicliffe et al., 2006). Finally, in *Rps palustris*, the LH1 is also thought to contain an additional polypeptide (W), and organizes around the RC with an ellipsoidal shape, likely comprising 15 αβ heterodimers interrupted by W. (Roszak et al., 2003).

In LH1, each heterodimers αβ binds a molecule of carotenoid, which plays a double role in efficiently harvesting the photons in the blue-green region of the spectrum, and in photoprotecting the complex by quenching the potentially harmful triplet states of the

bacteriochlorophyll (BChl) molecules. Each transmembrane polypeptide of LH1 indeed non covalently binds, in its carboxy-terminus half, one molecule of bacteriochlorophyll (BChl). As a consequence of the polypeptide organization, these molecules thus form rings or ring-like structures, made of closely interacting pigments. This ring is responsible for the intense absorption of the complex in the near infrared at 870-890 nm, which is actually the 'active' transition in these complexes, *i.e.* which accepts the excitation energy from LH2, and ensures its transfer to the reaction centers. In LH1 from *Rsp rubrum*, which is composed of a closed ring of 32 polypeptide (Karrasch et al., 1995), the lowest energy electronic transition (Q_y) of the BChl molecule is located at 890 nm in the WT protein. The absorption of this electronic transition is dramatically red-shifted as compared to that of BChl in most organic solvents (*ca* 770 nm). Although polypeptide/BChl interactions were also shown to play a role in this down-shift, it mostly occurs through BChl/BChl interactions (Olsen et al., 1994). This transition is thus particularly sensitive to the intactness of LH1 structure. This property is particularly useful, and in the past two decades dissociation of LH1 and the stability and properties of the resulting sub-complexes was extensively studied using proteins purified from the carotenoid-less G9+ mutant in the presence of the octyl-glucoside detergent (Arluison et al., 2004; Arluison et al., 2002a; Arluison et al., 2002b; Chang et al., 1990; Ghosh et al., 1988; Pandit et al., 2002; Pandit et al., 2001; Parkes-Loach et al., 2004; Parkes-Loach et al., 1988; Seguin et al., 2008; Vegh and Robert, 2002).

In this work, we have made use of the sensitivity of this transition to investigate the effect of temperature on LH1 while still embedded in its native membrane. Comparing the effect of temperature on these membranes, either isolated from WT cells, or from mutant strains, we determine that the presence of a bound carotenoid molecule, as well as protein-protein interactions with the reaction center, have a clear effect on the flexibility of this protein.

Materials and Methods

-Rsp. rubrum strains

In this work we used both the S1, wild-type strain of *Rsp rubrum*, as well as the G9+ mutant, unable to synthesise carotenoid molecules and which was produced by J.W. Newton in 1960s by UV non-selective mutagenesis. In addition, a reaction centre-less mutant strain was constructed in the laboratory, by inactivating the *pufL* and *pufM* encoding the L and M subunits of the reaction centre genes. The 6.5kb plasmid sequence pE6.5 built by Hessner et al. (Hessner et al.,

1991) has been inserted into the *E. coli* plasmid cloning vector pUC19 DNA. In a second step a $_{\Omega}Sp^{r}$ Sm^{r} cassette has been ligated into the sequences *pufL* and *pufM* encoding for L and M subunits carrying the inactivation of the reaction centre synthesis. This plasmid was further introduced in *R. rubrum* wild-type by electroporation. The bacteria were grown in presence of streptomycin and spectinomycin in dark under aerobic heterotrophic conditions and the mutant called S1S was selected on Petri dishes. S1S mutant exhibits spectroscopic properties fully comparable to the reaction centre-less mutant recently published constructed by Lupo & Ghosh (Lupo and Ghosh, 2004) (data not shown).

- Bacterial Growth

Both *Rsp rubrum* S1 (ATCC 11170) and S1S have been grown in dark at 30°C with shaking at 150 rpm (Infors HT Minitron, Bottmingen, Switzerland) in a modified Sistrom medium (Sistrom, 1960) in semiaerobic conditions according to Ghosh *et al.* (Ghosh et al., 1994). In the case of the S1S mutant, the medium was complemented with 50 µg/µl streptomycine (Sm) and spectinomycine (Sp). The carotenoid-less G9+ strain of *Rsp. rubrum,* for which we could not optimised the growth in similar conditions, was therefore grown at 30°C in the Sistrom's minimal medium (Sistrom, 1960). The growth was realized in two distinct phases: a first phase in semi-aerobic conditions for the bacterial growth and division and a second phase in strict anaerobia and light for the development of the photosynthesis apparatus. The bacteria growth and the formation of the intracytoplasmic membranes was followed by the measuring the absorption at 660 nm (turbidity measurement) and at the maximum of the Qy transition of LH1. The amount of intracytoplasmic membranes, estimated from these measurements, was comparable to those reported in literature (Grammel et al., 2003).

- Membrane preparations

Rsp rubrum membranes were prepares as described in (REF). Briefly, bacterial pellets are re-suspended in phosphate buffer (50 mM potassium phosphate and pH 7,5) containing 0,1 mg/ml of DNAse I and 25 mM of $MgCl_2$. Cells are disrupted by two French press cycles, and the intracytoplasmic membranes are pre-purified by two successive centrifugations, a first one at 12 000g during 10 min to eliminate the unbroken cells and cellular wall fragments, and a one at 200 000g during 60 min. The pellet is re-suspended in the phosphate buffer and loaded onto a sucrose linear gradient 35-5% (w/w) with a sucrose cushion (60%). After a 100 000g centrifugation during 90 min (LE-80 Beckman) the membranes are collected and dialysed for

sucrose elimination against phosphate buffer. Membranes were always used without any prior freezing and long-term storage.

- UV-Visible Absorption spectroscopy

For all the experiments performed in this work, in order to ensure optimal reproducibility, the volume of the membrane suspension in the cuvette was fixed at 3 ml and the optical density of the Qy transition at about 1. Temperature of the sample has first been calibrated according to the setting temperature (Fig1a). Oxidation of the BChl and carotenoid cofactors was avoided by extensive degassing of the sample using argon flush, and by using hermetically closed cuvettes adapted for anaerobic measurements (ref 117.100 QS, 1cm optical path, Hellma France). In addition, as the RC-LH1 complexes, potassium phosphate buffer was systematically used, as it shown minimum variation of pH during the temperature changes (Fig. 1b). In the range of temperature studied in this work (5-45°C), the pH variation between the two extreme temperature does not exceed 0.12 pH unit.

The absorption spectra were recorded on double beam Lambda 35 (Perkin Helmer, Courtabeuf, France) spectrophotometer equipped with Peltier temperature control systems. *Rsp rubrum* membranes were submitted to heating-cooling cycles at a precisely controlled rates, typically 0.17°C/min and 0.08°C/min for the heating and the cooling rates respectively (unless otherwise stated below). Temperature homogeneity in the cuvette was achieved by continuous stirring of the samples during the experiment. Electronic absorption spectra were recorded every 18 min at a speed of 120 nm/min between 350 and 950 nm during the heating and the cooling cycle. The slit widths were settled at 1 nm giving the resolution of the spectra. The temperature difference between the beginning and the end of the spectrum is thus 0.85 and 0.425 °C during heating and cooling cycles respectively. This difference in temperature was taken into account in the analysis of the results.

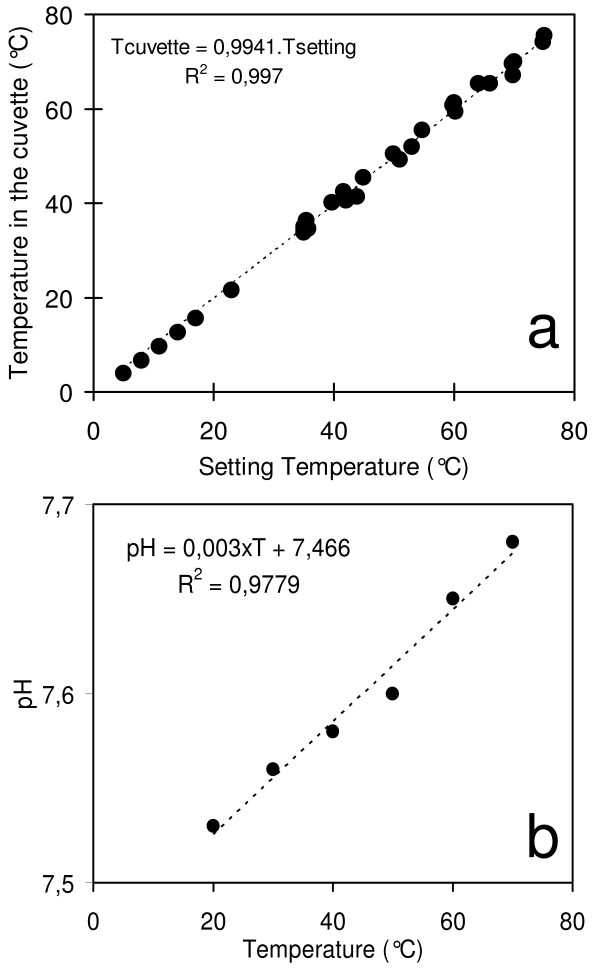


Figure 2-1: Temperature and pH control of the samples using a heating-cooling rate of 0.17°C/min.
(a): relation-ship between the setting temperature and the temperature in the cuvette. (b): sensitivity of the potassium phosphate buffer capacity with temperature.

- Circular dichroism

CD spectra were recorded on a CD6 circular dichrograph (Jobin-Yvon, Longjumeau, France) coupled with a photomultiplier sensitive to near IR. Sample holders are temperature controlled by a thermostated bath. The same cuvettes and membrane concentration as for electronic absorption spectroscopy were used. Circular dichroism spectrum of the cuvette containing the phosphate buffer was recorded prior to measurements, and subtracted from the membrane spectrum. The circular dichroism spectra were recorded between 700 and 980 nm, with an acquisition time 3 s/nm. The sample was stirred for 1 hour at a precise temperature (between 5 and 45°C) before the measurement to optimize the temperature homogeneity in the cuvette. Stirring was however stopped during the measurements.

- Fourier Transformed Raman spectroscopy (FT-Raman)

Fourier-transformed Raman spectra were recorded at 4 cm^{-1} resolution using a Bruker IFS66 interferometer coupled to a Bruker FRA106 Raman module equipped with a continuous Nd:Yag laser providing excitation at 1064 nm as described in Mattioli et al. (Mattioli et al., 1991). All spectra were recorded with backscattering geometry from concentrated membranes (final optical density about 100 cm^{-1}) held in aluminium cups. Spectra were calculated from 12000 co-added interferograms: 12 series of 1000 spectra were taken on the same sample. The different series were added together to increase the signal to noise ratio unless changes are observed indicating a degradation/oxidation of the sample. Temperature control was ensured by a home made system coupled with a thermostated bath. Ascorbic acid was added to the sample to avoid oxidation of the primary electron donor, and to prevent sample oxidation.

Results

Temperature dependence of the absorption spectra of LH1

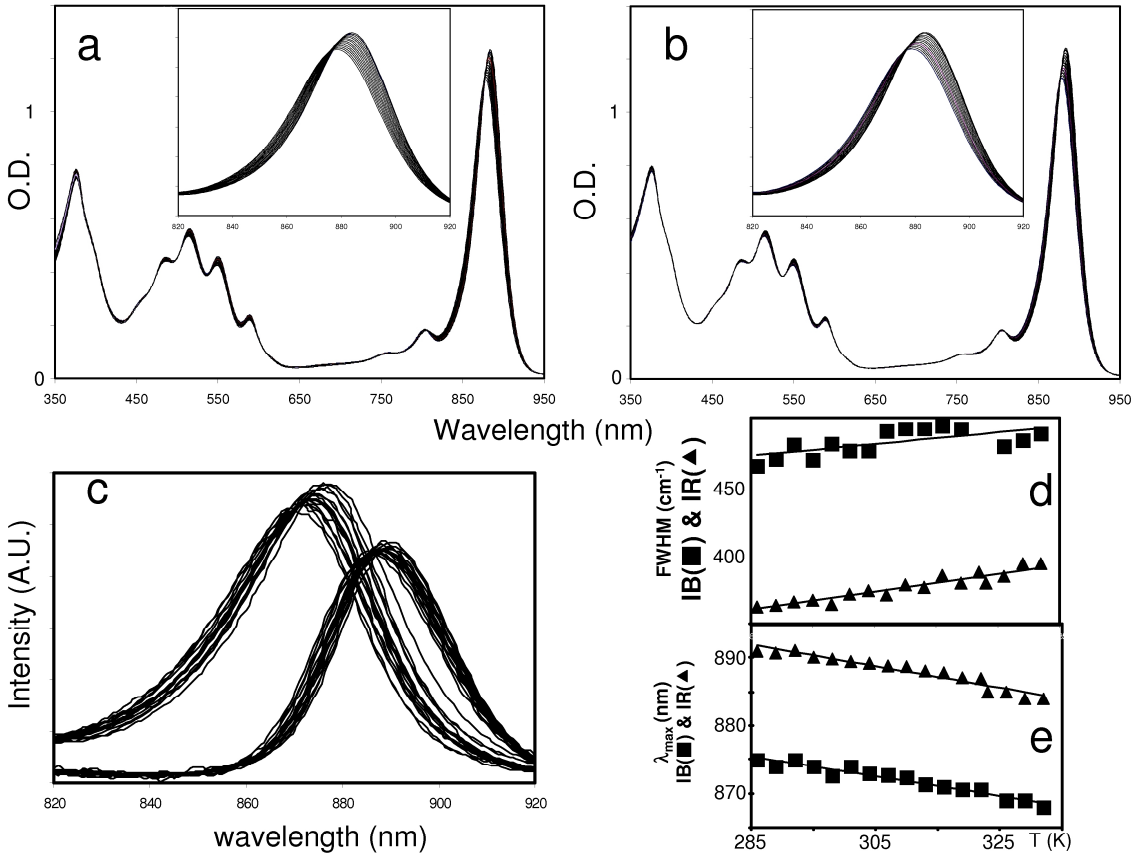


Figure 2-2: Effect of temperature on the absorption spectrum of RC-LH1 complex from S1 wild type *Rsp. rubrum*.
2(a) and (b): superposition of the absorption spectra obtained during the heating from 5 to 57 °C (2a) and the cooling from 57 to 5°C (2b) of the S1 intracytoplasmic membranes. Insert in Figure 2(a) and (b) represent a zoom on the Qy transition of the Bchla during heating and cooling respectively to evidence the slight temperature dependent blue shift of the transition and an apparent iso-absorbing point. 2(c): blue and red spectra obtained by the subtraction of the absorption spectra obtained during the heating and the cooling respectively. 2(d): temperature dependence of the full width at the half maximum (FWHM) of the blue and the red spectra (Figure 2c) expressed in wave numbers. 2(e): temperature dependence of the wavelength at the maximum of the Qy transition of the blue and red spectra (Figure 2c).

The temperature stability of LH1 complexes depends on their composition and on the composition of the membrane they are embedded in. LH1 in S1S mutant membranes denatures at lower temperature than in membranes purified from the S1 and G9+ strains (data not shown). The temperature ranges applied to the different membranes have been chosen to avoid denaturation of the complexes, *i.e.* 5 to 57°C, 5 to 47°C and 5 to 38°C for S1, G9+ and S1S strains respectively.

Figure 2 shows the absorption spectra recorded during heating (Fig. 2a) and cooling (Fig. 2b) of membranes containing RC-LH1 wild-type membranes, in particular in the Qy transition where the largest effects are observed (inserts of Fig 2a and 2b). All the changes in the electronic absorption spectra in the temperature range displayed are fully reversible. Upon heating to 57°C, the Qy electronic transition of the LH1 is blue-shifted by 6 nm and reversibly red-shifted by 6 nm during the cooling (Table 2). An apparent isobestic point at 877 nm is observed during the temperature changes suggesting the coexistence of two populations of LH1 rings (Insert in Fig. 2a an 2b). Spectra of Figure 2a and b were recorded every 3°C during either heating (Fig. 2a) or cooling (Fig. 2b) phases. Considering the heating or cooling speed and the rate of spectra acquisition, the difference in temperature between 820 and 920 nm is 0.14°C at maximum, well below the ΔT between two successive spectra. The blue and red spectra of Figure 2c have been obtained by the subtraction between 820 and 920 nm of two successive spectra (ΔT=3°C): during heating the spectrum recorded at T was subtracted from the spectrum recorded at T+3 and during cooling the spectrum at T+3 was subtracted from the spectrum at T. Two criteria were used for the weighting of the successive subtractions, *i.e.* no negative component and a resulting symmetric spectrum. This procedure reveals a series of blue spectra for the heating and

of red spectra for the cooling phases. These red and blue spectra are slightly dependent on temperature as shown on Figure 2c, d and e: the FWHM and the wavelengths at the maximum of the blue and red spectra are both linearly dependent on temperature as reported on Fig. 2e and 2d respectively. Moreover, the temperature dependences of the blue and red components are similar. This underlines that the isobestic point is only apparent.

		***Rh. rubrum* strains**		
		S1	**G9+**	**S1S**
	Temperature range °C/K	5-57 283-335	5-47 283-325	5-38 283-316
Blue spectrum	**FWHM =f(T) cm^{-1} and K**	0.4*T+351	1.2*T+77	0.7*T.434
	λ_{max}=f(T) Nm and K	-0.1*T+916	-0.1_5*T+911	-0.1*T+901
Red spectrum	**FWHM =f(T) cm^{-1} and K**	0.6*T+182	0.8*T+131	1.0*T+357
	λ_{max}=f(T) Nm and K	-0.1*T+933	-0.2*T+930	-0.1*T+913
Mean blue and red spectra	**$\lambda_{B\text{-}Max}$ (nm)**	873	865	874
	$\lambda_{R\text{-}Max}$ (nm)	889	880	887
	$\lambda_{b\text{-}Max}$–$\lambda_{b\text{-}Max}$ (nm/cm^{-1})	16/206	15/197	13/168
	FWHM cm^{-1} blue/red	493/373	451/373	459/393

Table 2-1: Effect of temperature on the width and on the wavelength at the maximum of the blue and red spectra and characteristics of the mean blue and red spectra. The blue and the red spectra are obtained by successive subtraction between two successive spectra recorded during a heating and a cooling process and reflect the spectral variation for a ΔT=3°C. The mean blue and red spectra have obtained by addition of all the blue and red individual spectra.

Identical behaviour toward temperature has been recorded for the different membranes studied. Reversible shifts of 5 nm and of 4 nm of the Qy electronic transition were recorded for G9+ and S1S membranes respectively showing, similarly to S1 membranes, an apparent isobestic point. The blue and red spectrum were extracted form the absorption spectrum by successive spectral subtraction as described above and the characteristics of the blue and red spectra obtained for the different strains membranes are reported on Table 1 for comparison. Even if the sensitivities to temperature of the blue and the red spectrum are similar for the three types of membranes, the membranes extracted from G9+ strain exhibit a slightly higher temperature dependence compared to the two others.

From these spectra and for each strain, we calculated an average blue and red spectrum by simple addition of the spectra (Table 2). From these averaged spectra, we can compare the characteristics of the blue and red spectra from the different strains. The differences in wavelength between the blue and the red spectra are similar for the S1 and G9+ membranes (16 and 15 nm respectively) and slightly lower for the S1S membranes (13 nm). The blue and red spectra have lower λ_{max} for G9+ membranes compared to the two other membranes in agreement with the bluest λ_{max} of the Qy transition in this mutant due to the absence of carotenoids. The average FWHM values are similar for the different membranes (see Table 1).

Reversibility of the phenomenon tested by circular dichroism

The absorption spectra are reversibly affected in the temperature range studied. However, this is not a formal proof that the structure and oligomerisation state of the LH1 complex before and after the heating-cooling cycle are identical. In this respect, near IR CD spectroscopy can provide a very sensitive indicator of alterations in the aggregation state and orientation of bacterial LH complexes (Cogdell and Scheer, 1985; Koolhaas et al., 1997). Therefore, near IR CD spectra of the membrane-bound mutants and wild-type RC-LH1 complexes from *Rsp. rubrum* recorded before, during and after a heating –cooling cycle are shown on Fig.3.

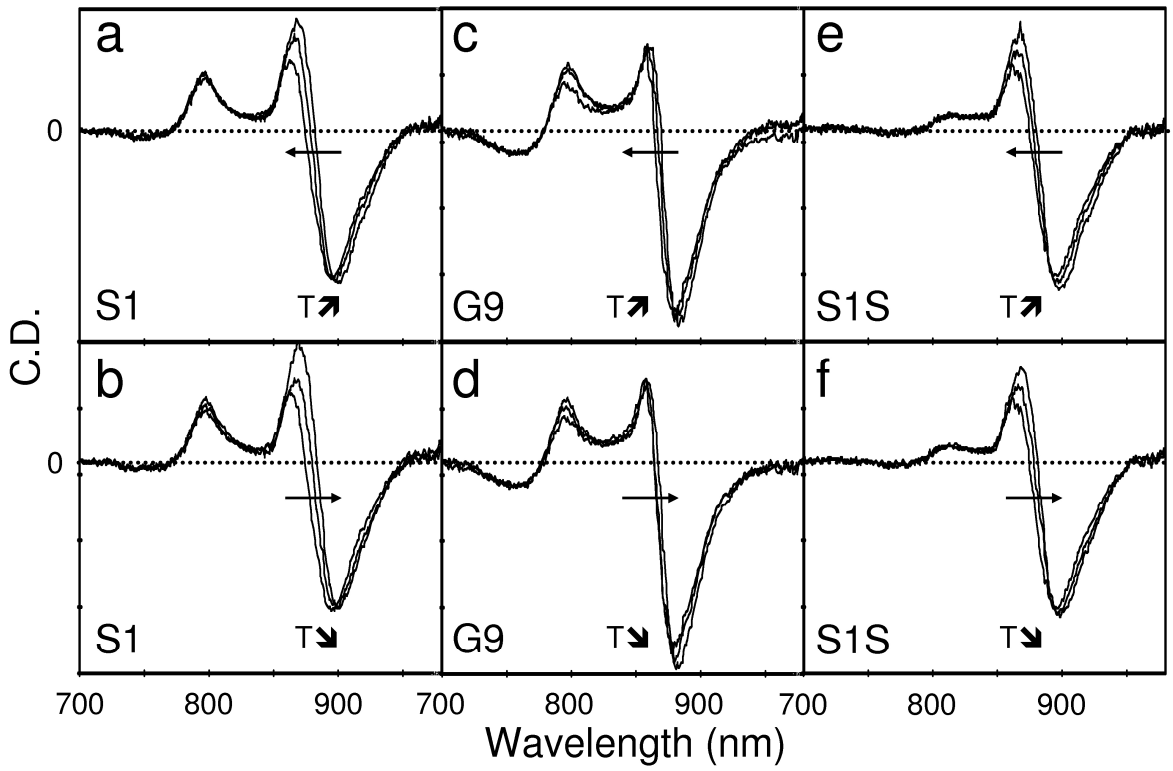


Figure 2-3: Effect of temperature on the CD spectrum of RC-LH1 complex from S1 (3a and 3b), G9+ (3c and 3d) and S1S (3e and 3f) strains of *Rsp. rubrum*.
The spectra on Figure 2-3a, 3c and 3e have been recorded during the heating process whereas the spectra on Figure 2-3b, 3d and 3f during the cooling process. The arrows indicate the direction of the zero crossing wavelength changes during either the heating or the cooling process. The temperature effect on the zero crossing wavelengths and the intensity ratios between the positive and the negative maxima are reported on Table 2-2.

For the three samples, CD spectra were measured during a heating phase at 5, 25 and 45°C for S1 and G9+ and at 5, 20 and 35°C for S1S and a cooling phase at 25 and 5°C for S1 and G9+ and at 20 and 5°C for S1S. CD spectra of membranes containing RC-LH1 wild-type (Fig. 3a and 3b) show a non-conservative spectrum arising mainly from the LH1 Bchls between 850 and 950 nm. The increase of temperature induces blue shift of the zero crossing points and a modification of the peak intensities, but there is no significant change on RC signal observed near 800 nm. The zero crossing point and the peak intensity for the WT complexes are blue shifted by 2-3 nm (from 5°C to 25°C) and 3-4 nm (from 25°C to 45°C). The peak intensity ratios 869/901 at 5°C, 867/898 at 25°C and 863/895 at 45°C decrease from 0.7 to 0.5 upon heating but the shapes of these spectra remain similar. With the same sample and during the cooling phase (Fig. 3b), the zero crossing point and the peak intensity are reversibly red shifted by 4-5 nm (from 45°C to 25°C) and 3-4 nm (from 25°C to 5°C), and the peak intensity ratios is increasing with nearly the same amplitude than during heating phase (0.5 to 0.8) (Table 2).
The CD spectra measured on membrane containing carotenoid-less mutant RC-LH1 are presented on Fig. 3c (heating phase) and 3d (cooling phase). The zero crossing point and the peak intensity are blue shifted by 3-4 nm (5°C to 45°C) and reversibly red shifted by 4-5 nm (45°C to 5°C). We can noticed that there is no significant changes in the peak intensity ratios during this experiment, the values obtained differ only slightly around 0.4 for 860/883, 858/880 and 857/879 (heating), 859/881 and 861/884 (cooling) (Table 2). In addition, for G9+ membranes, the CD spectrum of the reaction centre is slightly and reversibly decreases upon temperature increase-decrease.
The CD spectra measured on membrane containing only-LH1 complexes are shown on Fig. 3e and 3f. The shapes of the spectra are similar to those recorded on *Rb. sphaeroides* only-LH2 membranes by Koolhaas et al. (Koolhaas et al., 1998). The absence of reaction centre is reflected by the absence of CD at 800 nm, and only the non-conservative spectra of the LH1 Bchls between 850 and 950 nm is detected. The 760-840 nm CD signal present a negative feature

around 780 nm and a positive one between 800 and 840 nm. This observation is very similar to the 760-820 nm CD spectra obtained for B800-less LH2 complexes of *Rb. sphaeroides* membranes (Koolhaas et al., 1997) and has been attributed to the high exciton component of the B850 ring. In our case this feature would come from the high exciton component of the unique BChl ring in the LH1 case. The zero crossing point and the peak intensity for the only-LH1 complexes are blue shifted by 2-3 nm (from 5°C to 20°C) and 2-3 nm (from 20°C to 35°C). The peak intensity ratios 867/900 at 5°C, 865/897 at 20°C and 863/895 at 35°C presented decreasing values (0.6 to 0.4) which are totally reversible upon temperature cooling (Table 2).

	S1			G9			S1S		
T (°C)	CD zero cross (nm)	CD peak ratio	abs max (nm)	CD zero cross (nm)	CD peak ratio	abs max (nm)	CD zero cross (nm)	CD peak ratio	abs max (nm)
5	882	I_{869}/I_{901} 0.69	884	867	I_{860}/I_{883} 0.38	876	880	I_{867}/I_{900} 0.58	885
25 (S1S: 20)	879	I_{867}/I_{898} 0.59	881	864	I_{859}/I_{880} 0.41	873	877	I_{865}/I_{897} 0.48	883
45 (S1S: 35)	875	I_{863}/I_{895} 0.49	878	864	I_{857}/I_{879} 0.43	871	874	I_{863}/I_{895} 0.39	881
25 (S1S: 20)	880	I_{867}/I_{899} 0.54	881	866	I_{859}/I_{881} 0.41	873	878	I_{866}/I_{898} 0.49	883
5	884	I_{869}/I_{901} 0.78	884	869	I_{861}/I_{884} 0.41	876	881	I_{868}/I_{900} 0.60	885

Table 2-2: Modification of the CD spectra of S1, G9+ and S1S membranes upon heating and reversibility of the effect after cooling.
The CD zero crossing and the CD intensity peak ratios together with the wavelength at the maximum of the absorption spectra are reported for the three types of membranes at three different temperatures, i.e. the initial low temperature (5°C), the maximal temperature (45°C for S1 and G9+ and 32°C for S1S) and after the cooling back, the same low temperature (5°C).

As the NIR-CD spectrum of the LH complexes is very sensitive to small changes in the angles made by Qy transition moments between paired Bchls, our data indicate that the temperature dependent changes have weak effects on the overall geometry of the Bchls ring (B880) and that these slight effect is fully reversible for the three membranes tested. These experiments suggest that temperature influences the dynamic of the LH1 complexes more than the ring structure of the Bchl. Moreover, these experiments also show that the reaction centre structure and function is unaffected by the temperature in the range studied.

Reconstitution of the absorption spectra by using the blue and the red component

The absorption spectra recorded at different temperatures together with the CD experiment strongly suggest that the Qy transition of the different LH1 complexes studied, result from the superposition of a red and a blue spectrum that arises from Bchl-protein complexes with slightly different spectral properties spectrum and the reconstituted one calculated from the summation of the blue and the red balanced spectrum. As a general rule, the fit was better for intermediate temperature than for extreme ones as averaged blue and red spectra were used for the reconstruction. Nevertheless, whatever the temperature, the difference between the experimental and the reconstructed spectra was lower than 0.01 showing an excellent fit between the experimental and reconstructed spectra.

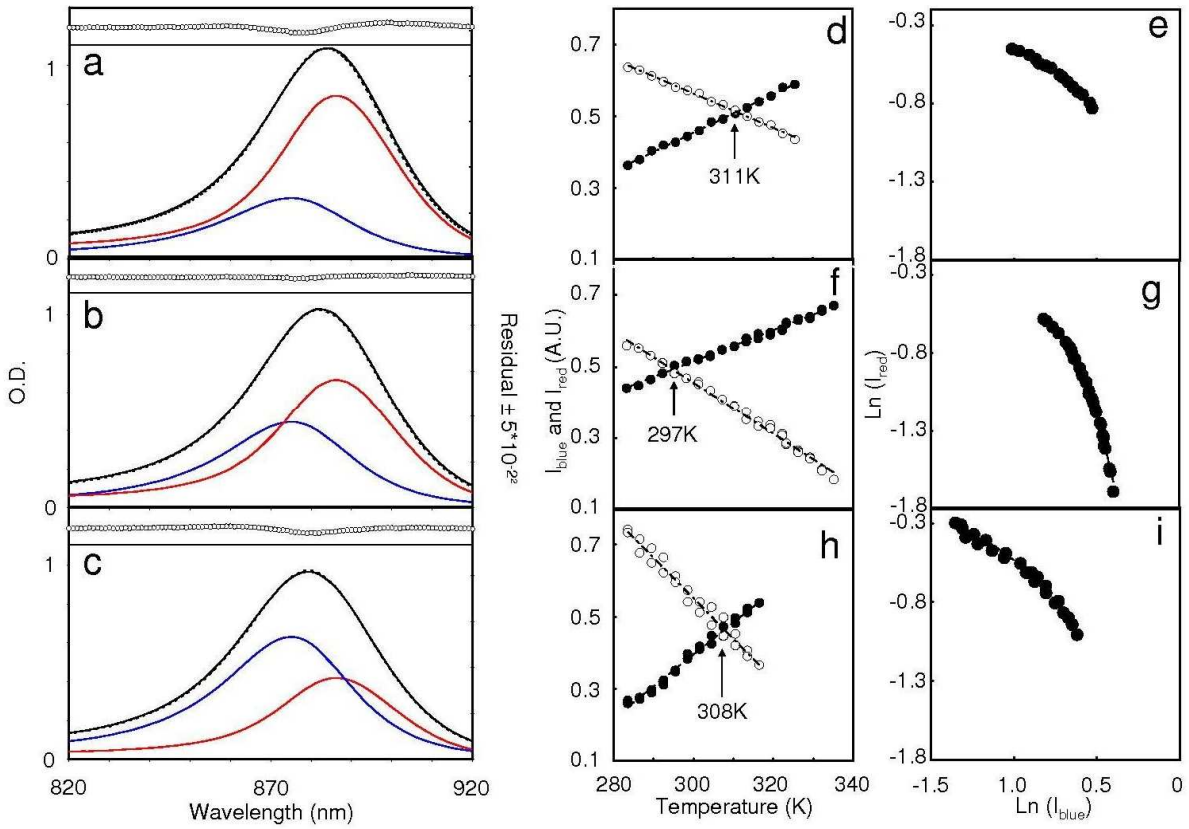


Figure 2-4: Reconstruction of absorption spectra using the blue and the red spectra.
Right panels: example of spectral reconstruction for S1S membranes. The experimental spectra (black line) and the reconstructed one (blackdotted line) are superimposed and the red and blue spectra are represented on the graph. The upper panels represent the difference between the experimental and the reconstructed spectra. The reconstructions for three different temperatures are presented: (a): 5, (b): 20 and (c): 38°C. Left panels: comparison of the reconstruction results for the three strains G9 (d and e), S1 (f and g) and S1S (h and i). Temperature dependence of the maximal intensities of the red and blue spectra of G9 (d), S1 (f) and S1S (h). Log(I_{red})=f(Log(I_{blue})) for G9 (e), S1(g) and S1S (i).

The composition of the experimental absorption spectrum in red and blue components depends on the strains as shown on Fig 4 d, f, & h. At 5°C for example, the red component of the S1S membranes absorption spectra corresponds to about 75% of the global absorption spectra whereas it represents about 65% and 55% for the absorption spectra of G9+ and S1 membranes respectively. This observation indicates that the composition in blue and red components of the Qy absorption spectra is sensitive to the interactions of the LH1 ring with the carotenoïds and the reaction centre. To quantify this temperature dependent equilibrium or pseudo equilibrium between the red and the blue LH1 complexes, all the spectra have been decomposed in its red and blue spectra. As an example the decomposition of the reaction centre less LH1 mutant spectra recorded at 5, 20 and 38°C is shown on Fig.4. The intensities of the blue and red spectra were adjusted to give the best fit between the experimental and the reconstituted spectra.

Thanks to the reconstruction analysis giving the intensities of the blue and red components for each temperature, we could plot the intensity of the red component according to the blue one on a log-log scale (Figure 4 e, g & i for G9, S1 and S1S respectively). In the case of a simple reaction this plot should show a linear behaviour, the slope of the straight line then giving directly access to the reaction order. In none of the samples, this relation is linear, indicating a continuous evolution of the order of the reaction during the transformation of the blue into the red component.

Molecular origin of the BChl spectral species (FT-Raman spectroscopy)

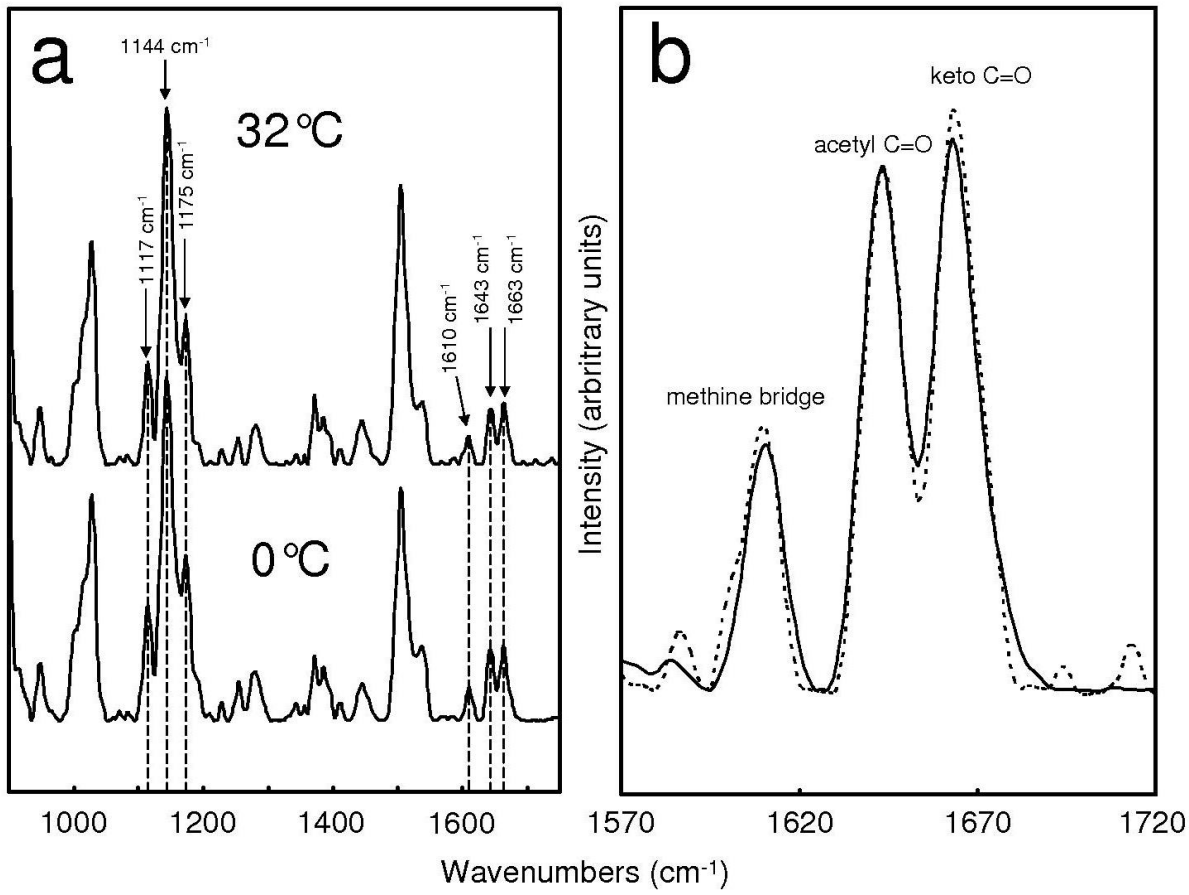


Figure 2-5: FT-Raman spectra of S1S membranes recorded at 0°C and 32°C.
Right panel: FT-Raman spectra of S1S intra-cytoplasmic membranes at 0 and 32°C. The spectral regions identified as fingerprints for Bchl conformation (1117, 1144 and 1175 cm^{-1}) and Bchl-polypeptide interactions (1610, 1643 and 1663 cm^{-1}) are underlined. Left panel: Zoom on the Raman bands corresponding to the methine bridge and to the acetyl and keto carbonyls as fingerprint for the Bchl macrocycle conformation and Bchl-polypeptide interaction respectively.

In order to relate the changes observed in the electronic spectra to the structure of the LH1 complexes, FT-Raman spectroscopy experiments were performed at two extreme temperatures for the three strains (0°C and 45°C for S1 and G9 and 0°C and 32°C for S1S). This vibrational spectroscopy provides a precise probe into the structure of the chromophores and their binding sites (Robert, 1996), in particular it provides information on various pigment-protein interactions believed to be important for the absorption properties of the pigment molecules. In the case of LH1, infrared FT-Raman spectroscopy, with an excitation wavelength of 1064 nm, provides selective signatures of the red-shifted protein-bound Bchl molecules (Robert, 1996). The region of the Raman spectrum between 1600 and 1750 cm^{-1} gives information on the H-bond status of the acetyl carbonyl and keto carbonyl groups as well as methine bridge stretching modes of the

macrocycles (Robert and Lutz, 1985). In the case of LH1, there are two prominent modes arising from the BChl carbonyl groups, at 1643 and 1663 cm^{-1}. The mode at 1641cm^{-1} is degenerate, and arises from the two acetyl carbonyl groups of the two BChl molecules present in the LH1 repetitive unit, H-bonded to the αTrp_{43} and βTrp_{44}, respectively (Fowler et al., 1994; Sturgis et al., 1997). The mode at 1660 cm^{-1} is also degenerate, and arise from the two keto carbonyl groups, which must be H-bonded, probably to the protonated nitrogen of αHis_{32} and βHis_{38} (Olsen et al., 1997). In the same spectral region, the band at 1610 cm^{-1} arises from the methine bridges stretching mode, the frequence of which is primarily dependent of the macrocycle conformation of the 875 nm-absorbing BChl molecules (Näveke et al., 1997). Other modes, in the middle frequency region of FT-Raman spectra obtained in these excitation conditions, may also be used as fingerprints of the BChl macrocycle conformation, at 1117, 1144 and 1175 cm^{-1} (Lapouge et al., 1999). On figure 5A we reported the FT-Raman spectra of S1S membranes at 0°C and 32°C and as a general conclusion no shift of any of these bands is registered upon heating of sample indicating that no temperature modification of the conformation of the Bchl macrocycle is observed. Similar results were observed for S1 and G9+ strains membranes (data not shown). On Figure 5B, we zoomed on the region that gives information on the H-bond status of the acetyl carbonyl and keto carbonyl groups as well as methine bridge stretching modes of the macrocycles. This region is known to be very sensitive to any changes of the Bchl-peptide interactions (Robert and Lutz, 1985). In particular, the relative intensity of the two bands arising from the stretching modes of the acetyl and keto carbonyl groups is sensitive to either changes in carbonyl group geometry or to a loss of H-bond between the Bchl and the polypeptide (Sturgis et al., 1997). The intensity ratios of this two bands for 0 and 32°C, determined from the FT-Raman spectra of the three types of membranes (1,21 and 1,23 for G9+, 1,05 and 1,10 for S1S and 1.18 and 1.10 for S1) indicate an absence of temperature dependent modification. Moreover, these ratios are similar (about 1.15 $\pm$ 0.1) for the three strains indicating that the Bchl-polypeptide H-bonds are identical. These FT-Raman experiments lead to the conclusion that the changes of the absorption spectra are likely related to temperature dependent changes of Bchl-Bchl interaction within the rings rather than Bchl-polypeptides interactions modifications.

Discussion and conclusions

This work is focused on the effect of temperature on the LH1 complexes of *Rhodospirillum rubrum* maintained in their native environment, *i.e.* the intracytoplasmic membranes. LH1 is the core light

harvesting complex and the only antenna as this bacterium does not contain any peripheral light harvesting complex. This complex is composed by 32 α-helices, 32 Bchls and 16 carotenoids forming a ring of about 10 nm in diameter confining the reaction centre. We compare the effect of temperature on membranes purified from different strains of bacteria: S1 wild type containing the RC-LH1 complex, G9+ containing a carotenoid-less RC-LH1 complex and S1S containing a reaction centre-less LH1 complex.

Effects of temperature on the Qy electronic transition of LH1

Our results provide evidences of a temperature dependent heterogeneity of the Qy absorption spectrum of the LH1 complex. Indeed, the heating of the membranes induces a 4 to 6 nm blue shift depending on the type of membranes of the overall absorption spectra. Moreover, this shift occurs with a quasi iso-absorbing point and is totally reversible upon cooling. Similar temperature dependent effect was observed for the three types of membranes studied strongly suggesting that this effect is essentially related to the 32 (polypeptide-Bchl) subunits forming the ring of the LH1 protein. For the three membranes we could extract a red and a blue spectrum by subtraction of two successive spectra corresponding in our experimental condition to a ΔT of 3°C and the temperature dependence was established. The maxima of the red and blue spectra are similar for the S1 and the S1S membranes and slightly lower for the G9+ membrane underlining the contribution of the Bchl-carotenoid interactions in the Qy transition of LH1.

The absorption spectra can be reconstituted by using the blue and red spectra, the weight of each been dependent on temperature. Such reconstitution has been done for the absorption spectra recorded during heating and cooling cycles and for the three types of intracytoplasmic membranes i.e. S1, S1S and G9+ strains. From these three sets of data, the logarithm of the maximal intensity of the red spectra is plotted versus the logarithm of the maximal intensity of the blue spectra. In such a graphic representation and for a simple equilibrium between two species, we should obtain a straight line, the slope of which giving access to the reaction order. In contrast, for the three set of data, the log-log plot is not linear demonstrating that the temperature effect is not related to a simple transformation of a red chlorophyll into blue one within the LH1 ring upon heating.

Molecular origin of the temperature dependent modification of the Qy electronic transition of LH1

The question we therefore asked was the molecular or supramolecular origin of temperature dependent effect. Could they originate for example from a temperature dependent change in the oligomerization state of the ring? Indeed, it has been shown on solubilised LH1 complexes that the monomers, the dimers and the tetramers of Bchl-polypeptide absorbed at 777, 820 and 850 nm respectively in comparison with the native spectrum of the full LH1 complex absorbing at 873 nm (Ghosh et al., 1988; Parkes-Loach et al., 1988; Vegh and Robert, 2002) suggesting that an oligomerization change between 4 and 32 polypeptides would induce only small shifts of the absorption spectra. Therefore, the differences in maximal wavelength of the blue and red components could be due to small change in the oligomerization state of the LH1 complex. For this purpose, we examined the temperature dependent changes of the CD spectra of the LH1 complexes. The CD spectrum of LH1 complex is sensitive to long distance Bchl interaction and therefore very sensitive to any changes of its oligomerization state and ring shape (Cogdell and Scheer, 1985). The temperature increase induces an overall blue shift of the CD spectra of LH1 with a small decrease of the intensity peak ratio fully reversible upon cooling. These changes are however very small and do not support the idea that the temperature induces a modification of the oligimerization state of the complexes.

Moreover, we also used FT-Raman spectroscopy to focus on the Bchl-polypeptide interactions within the LH1 complex. Due the near infrared absorption of chlorophyll, such FT-Raman spectroscopy at 1064 nm enhances selectively the Raman signal of bacteriochlorophylls. We have recorded the FT-Raman spectra of intracytoplasmic membranes at different temperature. For none of the membranes tested in this study, any shift of Raman bands neither appearance of new ones, indicating that the temperature increase does not break the Bchl-polypeptides H-bonds.

These experiments suggest that the temperature dependent heterogeneity of the absorption spectrum of LH1 could originate from small amplitude modifications of the Bchl-Bchl interactions correlated to the natural flexibility of the LH1 complex.

Influence of the complex composition on the temperature dependent modifications of the Qy electronic transition of LH1

If the overall temperature effect is similar for the three different types of intracytoplasmic membranes studied in this work, small but significant differences are observed upon the composition of the complex. Indeed, we tested the temperature effect on the wild-type RC-LH1, the carotenoid less G9+ RC-LH1 and the reaction centre less LH1 ring. In particular, the composition of the experimental absorption spectrum in red and blue components depends on

the strains. At 5°C for example, the red component of the S1S membranes absorption spectra corresponds to about 75% of the global absorption spectra whereas it represents about 65% and 55% for the absorption spectra of G9+ and S1 membranes respectively. This observation indicates that the composition in blue and red components of the Qy absorption spectra is sensitive to the interactions of the LH1 ring with the carotenoids and the reaction center.

2-D crystals of LH1 from *Rhodospirillum (Rsp) rubrum,* observed by electron microscopy show that LH1 is a close ring composed of 16 αβ heterodimers around the RC (Jamieson et al., 2002). However, the shape of the ring is not circular but ellipsoidal. For other bacteria, *i.e. Rps viridis* membranes, Scheuring et al. observed that upon the removal of the RC, the LH1 ring undergoes a change between ellipsoid and circular shape (Scheuring et al., 2003). This type of change surely slightly modifies the Bchl-Bchl interaction with the ring: in circular rings the Bchl-Bchl interaction would be similar all over the complex, whereas for ellipsoidal rings these interactions would vary. The reaction centre less LH1 ring associated with a regular circular shape would have optimized Bchl-Bchl interactions originating a reddest spectrum compared to the RC-LH1 complex adopting an ellipsoidal LH1 ring. Within this frame, the carotenoid less but RC-LH1 complex from G9+ strain shows a red and blue composition intermediate between S1S LH1 and wild type RC-LH1. This may indicate that the absence of carotenoids induces a slightly more circular shape of the LH1 ring around the RC.

Conlusions

This study evidences the temperature dependent organisation of Bchls interaction within LH1 rings from *Rsp. rubrum* in its native environment. The changes in the position of their lower energy absorption must be mostly attributed to changes in the interactions between the Bchl-B880 molecules arising from very small changes in distance between the molecules, instead of Bchl-polypeptide interactions. Theses observations could be associated with the existence of slow dynamics in spectral changes, correlated to structural changes of the protein in particular Bchl-Bchl interactions. Differences between the three strains studied could be associated with slight variations of the overall shape of the LH1 ring with their partners, i.e. carotenoïd molecules and reaction centre.

Acknowledgements:
Andrew Gall is greatly acknowledged for fruitful discussions. We express thanks to Dr. G. Ajlani for providing us with the S1S mutant.

References

Aklujkar, M. and Beatty, J.T. (2006) Investigation of Rhodobacter capsulatus PufX interactions in the core complex of the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res*, **88**, 159-171.

Arluison, V., Seguin, J., Le Caer, J.P., Sturgis, J.N. and Robert, B. (2004) Hydrophobic pockets at the membrane interface: an original mechanism for membrane protein interactions. *Biochemistry*, **43**, 1276-1282.

Arluison, V., Seguin, J. and Robert, B. (2002a) Biochemical characterization of the dissociated forms from the core antenna proteins from purple bacteria. *Biochemistry*, **41**, 11812-11819.

Arluison, V., Seguin, J. and Robert, B. (2002b) The reaction order of the dissociation reaction of the B820 subunit of Rhodospirillum rubrum light-harvesting I complex. *FEBS Lett*, **516**, 40-42.

Ash, W.L., Zlomislic, M.R., Oloo, E.O. and Tieleman, D.P. (2004) Computer simulations of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 158-189.

Chang, M.C., Callahan, P.M., Parkes-Loach, P.S., Cotton, T.M. and Loach, P.A. (1990) Spectroscopic characterization of the light-harvesting complex of Rhodospirillum rubrum and its structural subunit. *Biochemistry*, **29**, 421-429.

Cogdell, R.J. and Scheer, H. (1985) Circular dichroism of light-harvesting complexes from purple photosynthetic bacteria. *Photochem Photobiol*, **42**, 669-678.

Fotiadis, D., Qian, P., Philippsen, A., Bullough, P.A., Engel, A. and Hunter, C.N. (2004) Structural analysis of the reaction center light-harvesting complex I photosynthetic core complex of Rhodospirillum rubrum using atomic force microscopy. *J Biol Chem*, **279**, 2063-2068.

Fowler, G.J., Sockalingum, G.D., Robert, B. and Hunter, C.N. (1994) Blue shifts in bacteriochlorophyll absorbance correlate with changed hydrogen bonding patterns in light-harvesting 2 mutants of Rhodobacter sphaeroides with alterations at alpha-Tyr-44 and alpha-Tyr-45. *Biochem J*, **299 (Pt 3)**, 695-700.

Francia, F., Wang, J., Venturoli, G., Melandri, B.A., Barz, W.P. and Oesterhelt, D. (1999) The reaction center-LH1 antenna complex of Rhodobacter sphaeroides contains one PufX molecule which is involved in dimerization of this complex. *Biochemistry*, **38**, 6834-6845.

Ghosh, R., Hardmeyer, A., Thoenen, I. and Bachofen, R. (1994) Optimization of the Sistrom Culture Medium for Large-Scale Batch Cultivation of Rhodospirillum rubrum under Semiaerobic Conditions with Maximal Yield of Photosynthetic Membranes. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 1698-1700.

Ghosh, R., Hauser, H. and Bachofen, R. (1988) Reversible dissociation of the B873 light-harvesting complex from Rhodospirillum rubrum G9+. *Biochemistry*, **27**, 1004-1014.

Grammel, H., Gilles, E.D. and Ghosh, R. (2003) Microaerophilic cooperation of reductive and oxidative pathways allows maximal photosynthetic membrane biosynthesis in Rhodospirillum rubrum. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 6577-6586.

Gumbart, J., Wang, Y., Aksimentiev, A., Tajkhorshid, E. and Schulten, K. (2005) Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 423-431.

Hessner, M.J., Wejksnora, P.J. and Collins, M.L. (1991) Construction, characterization, and complementation of Rhodospirillum rubrum puf region mutants. *J Bacteriol*, **173**, 5712-5722.

Isaacs, N.W., Cogdell, R.J., Freer, A.A. and Prince, S.M. (1995) Light-harvesting mechanisms in purple photosynthetic bacteria. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 794-797.

Jamieson, S.J., Wang, P., Qian, P., Kirkland, J.Y., Conroy, M.J., Hunter, C.N. and Bullough, P.A. (2002) Projection structure of the photosynthetic reaction centre-antenna complex of Rhodospirillum rubrum at 8.5 A resolution. *Embo J*, **21**, 3927-3935.

Jungas, C., Ranck, J.L., Rigaud, J.L., Joliot, P. and Vermeglio, A. (1999) Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides. *Embo J*, **18**, 534-542.

Karrasch, S., Bullough, P.A. and Ghosh, R. (1995) The 8.5 A projection map of the light-harvesting complex I from Rhodospirillum rubrum reveals a ring composed of 16 subunits. *Embo J*, **14**, 631-638.

Klingenberg, M. (2005) Ligand-protein interaction in biomembrane carriers. The induced transition fit of transport catalysis. *Biochemistry*, **44**, 8563-8570.

Koolhaas, M.H., Frese, R.N., Fowler, G.J., Bibby, T.S., Georgakopoulou, S., van der Zwan, G., Hunter, C.N. and van Grondelle, R. (1998) Identification of the upper exciton component of the B850 bacteriochlorophylls of the LH2 antenna complex, using a B800-free mutant of Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, **37**, 4693-4698.

Koolhaas, M.H., van der Zwan, G., van Mourik, F. and van Grondelle, R. (1997) Spectroscopy and structure of bacteriochlorophyll dimers. I. Structural consequences of nonconservative circular dichroism spectra. *Biophys J*, **72**, 1828-1841.

Lacapere, J.J., Pebay-Peyroula, E., Neumann, J.M. and Etchebest, C. (2007) Determining membrane protein structures: still a challenge! *Trends Biochem Sci*, **32**, 259-270.

Lanyi, J.K. (2004) X-ray diffraction of bacteriorhodopsin photocycle intermediates. *Mol Membr Biol*, **21**, 143-150.

Lapouge, K., Naveke, A., Gall, A., Ivancich, A., Seguin, J., Scheer, H., Sturgis, J.N., Mattioli, T.A. and Robert, B. (1999) Conformation of bacteriochlorophyll molecules in photosynthetic proteins from purple bacteria. *Biochemistry*, **38**, 11115-11121.

Law, C.J., Roszak, A.W., Southall, J., Gardiner, A.T., Isaacs, N.W. and Cogdell, R.J. (2004) The structure and function of bacterial light-harvesting complexes. *Mol Membr Biol*, **21**, 183-191.

Lupo, D. and Ghosh, R. (2004) The reaction center H subunit is not required for high levels of light-harvesting complex 1 in Rhodospirillum rubrum mutants. *J Bacteriol*, **186**, 5585-5595.

Mattioli, T.A., Gray, K.A., Lutz, M., Oesterhelt, D. and Robert, B. (1991) Resonance Raman characterization of Rhodobacter sphaeroides reaction centers bearing site-directed mutations at tyrosine M210. *Biochemistry*, **30**, 1715-1722.

McDermott, G., Prince, S.M., Freer, A.A., Hawthornthwaite-Lawless, A.M., Papiz, M.Z., Cogdell, R.J. and Isaacs, N.W. (1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature*, **374**, 517-521.

Monshouwer, R., Abrahamsson, M., van Mourik, F. and Van Grondelle, R. (1997) Superradiance and Exciton Delocalization in Bacterial Photosynthetic Light-Harvesting Systems. *J Phys Chem B*, **101**, 7241-7248.

Näveke, A., Lapouge, K., Sturgis, J.N., Hartwich, G., Simonin, I., Scheer, H. and Robert, B. (1997) Resonance raman spectroscopy of metal-substituted bacteriochlorophylls: characterization of Raman bands sensitive to bacteriochlorin conformation. *Journal of Raman Spectroscopy*, **28**, 599-604.

Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G.J., Brandolin, G. and Pebay-Peyroula, E. (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu Rev Biochem*, **75**, 713-741.

Olsen, J.D. and Hunter, C.N. (1994) Protein structure modelling of the bacterial light-harvesting complex. *Photochem Photobiol*, **60**, 521-535.

Olsen, J.D., Sockalingum, G.D., Robert, B. and Hunter, C.N. (1994) Modification of a hydrogen bond to a bacteriochlorophyll a molecule in the light-harvesting 1 antenna of Rhodobacter sphaeroides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7124-7128.

Olsen, J.D., Sturgis, J.N., Westerhuis, W.H., Fowler, G.J., Hunter, C.N. and Robert, B. (1997) Site-directed modification of the ligands to the bacteriochlorophylls of the light-

harvesting LH1 and LH2 complexes of Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, **36**, 12625-12632.

Pandit, A., Ma, H., Van Stokkum, I.H., Gruebele, M. and Van Grondelle, R. (2002) Time-resolved dissociation of the light-harvesting 1 complex of Rhodospirillum rubrum, studied by infrared laser temperature jump. *Biochemistry*, **41**, 15115-15120.

Pandit, A., Visschers, R.W., van Stokkum, I.H., Kraayenhof, R. and van Grondelle, R. (2001) Oligomerization of light-harvesting I antenna peptides of Rhodospirillum rubrum. *Biochemistry*, **40**, 12913-12924.

Parkes-Loach, P.S., Majeed, A.P., Law, C.J. and Loach, P.A. (2004) Interactions stabilizing the structure of the core light-harvesting complex (LH1) of photosynthetic bacteria and its subunit (B820). *Biochemistry*, **43**, 7003-7016.

Parkes-Loach, P.S., Sprinkle, J.R. and Loach, P.A. (1988) Reconstitution of the B873 light-harvesting complex of Rhodospirillum rubrum from the separately isolated alpha- and beta-polypeptides and bacteriochlorophyll a. *Biochemistry*, **27**, 2718-2727.

Pascal, A.A., Liu, Z., Broess, K., van Oort, B., van Amerongen, H., Wang, C., Horton, P., Robert, B., Chang, W. and Ruban, A. (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature*, **436**, 134-137.

Qian, P., Bullough, P.A. and Hunter, C.N. (2008) 3-D reconstruction of a membrane-bending complex: the RC-LH1-PufX core dimer of Rhodobacter sphaeroides. *J Biol Chem*.

Qian, P., Hunter, C.N. and Bullough, P.A. (2005) The 8.5A projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of Rhodobacter sphaeroides. *J Mol Biol*, **349**, 948-960.

Robert, B. (1996) Resonance Raman studies in photosynthesis-chlorophyll and carotenoid molecules. In Amesz, J. and Hoff, A.J. (eds.), *Biophysical techniques in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 161-176.

Robert, B., Cogdell, R.J. and Van Grondelle, R. (2003) The light-harvesting system of purple bacteria. In Green, B.R. and Parson, W.W. (eds.), *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 169-194.

Robert, B. and Lutz, M. (1985) Structure of antenna complexes of several Rhodospirillales from their resonance Raman spectra. *Biochim Biophys Acta*, **807**, 10-23.

Roszak, A.W., Howard, T.D., Southall, J., Gardiner, A.T., Law, C.J., Isaacs, N.W. and Cogdell, R.J. (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from Rhodopseudomonas palustris. *Science*, **302**, 1969-1972.

Scheuring, S. (2006) AFM studies of the supramolecular assembly of bacterial photosynthetic core-complexes. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 387-393.

Scheuring, S., Busselez, J. and Levy, D. (2005) Structure of the dimeric PufX-containing core complex of Rhodobacter blasticus by in situ atomic force microscopy. *J Biol Chem*, **280**, 1426-1431.

Scheuring, S., Francia, F., Busselez, J., Melandri, B.A., Rigaud, J.L. and Levy, D. (2004) Structural role of PufX in the dimerization of the photosynthetic core complex of Rhodobacter sphaeroides. *J Biol Chem*, **279**, 3620-3626.

Scheuring, S., Seguin, J., Marco, S., Levy, D., Robert, B. and Rigaud, J.L. (2003) Nanodissection and high-resolution imaging of the Rhodopseudomonas viridis photosynthetic core complex in native membranes by AFM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1690-1693.

Seguin, J., Mayer, C., Robert, B. and Arluison, V. (2008) Thermodynamics of the beta(2) association in light-harvesting complex I of Rhodospirillum rubrum. Implication of peptide identity in dimer stability. *Febs J*, **275**, 1240-1247.

Siebert, C.A., Qian, P., Fotiadis, D., Engel, A., Hunter, C.N. and Bullough, P.A. (2004) Molecular architecture of photosynthetic membranes in Rhodobacter sphaeroides: the role of PufX. *Embo J*, **23**, 690-700.

Sistrom, W.R. (1960) A requirement for sodium in the growth of Rhodopseudomonas spheroides. *J Gen Microbiol*, **22**, 778-785.

Sturgis, J.N., Olsen, J.D., Robert, B. and Hunter, C.N. (1997) Functions of conserved tryptophan residues of the core light-harvesting complex of Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, **36**, 2772-2778.
Tunnicliffe, R.B., Ratcliffe, E.C., Hunter, C.N. and Williamson, M.P. (2006) The solution structure of the PufX polypeptide from Rhodobacter sphaeroides. *FEBS Lett*, **580**, 6967-6971.
Valadie, H., Lacapcre, J.J., Sanejouand, Y.H. and Etchebest, C. (2003) Dynamical properties of the MscL of Escherichia coli: a normal mode analysis. *J Mol Biol*, **332**, 657-674.
van Mourik, F., Chergui, M. and van der Zwan, G. (2001) The Occurrence of Non-Gaussian Spectral Line Shapes of Molecules in Electrostatically Disordered Media. *J Phys Chem B*, **105**, 9715-9718.
Vegh, A.P. and Robert, B. (2002) Spectroscopic characterisation of a tetrameric subunit form of the core antenna protein from Rhodospirillum rubrum. *FEBS Lett*, **528**, 222-226.
Walz, T., Jamieson, S.J., Bowers, C.M., Bullough, P.A. and Hunter, C.N. (1998) Projection structures of three photosynthetic complexes from Rhodobacter sphaeroides: LH2 at 6 A, LH1 and RC-LH1 at 25 A. *J Mol Biol*, **282**, 833-845.
White, S.H. (2004) The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci*, **13**, 1948-1949.
Wilson, M.A. and Brunger, A.T. (2000) The 1.0 A crystal structure of Ca(2+)-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity. *J Mol Biol*, **301**, 1237-1256.

2.3 Résumé de l'article

Dans ce travail nous avons étudié l'effet de la température sur la structure des protéines antennes LH1 et LH2 ancrées dans les membranes intracytoplasmiques des trois souches de *Rhodospirillum rubrum*.

Les gammes de température explorées dépendent des souches étudiées car la stabilité des complexes LH1 est variable: la stabilité thermique des complexes RC-LH1 ($T_{1/2}$ = 34 min) de la souche sauvage est supérieure à celle des complexes RC-LH1 de la souche G9+ ($T_{1/2}$ = 18 min), et la protéine LH1 de la souche S1S présente la stabilité la plus faible ($T_{1/2}$ = 5 min). Les expériences en fonction de la température ont donc été réalisées de 5 à 57°C, de 5 à 47°C et de 5 à 38°C respectivement.

Quelque soit l'origine des membranes intracytoplasmiques, l'augmentation de température dans les gammes indiquées induit un déplacement vers le bleu de la transition Qy des Bchls. Ce déplacement est totalement réversible après refroidissement et s'accompagne d'un point isobeste. Cette observation est en faveur de l'existence de deux formes spectrales (appelées forme « rouge » et « bleue ») que nous sommes parvenus à extraire par soustraction des spectres successifs. L'addition pondérée de ces spectres bleu et rouge permet de reconstituer les spectres d'absorption expérimentaux dans les gammes de température étudiées. La composition en

spectres bleu et rouge des spectres expérimentaux est différente selon les souches : on remarque que les protéines LH1 de la souche mutante sans centre réactionnel (S1S) présentent majoritairement la forme rouge par rapport aux protéines LH1 de la souche G9+ sans caroténoïdes et enfin les protéines LH1 de la souche sauvage.
Des mesures de dichroïsme circulaire de la transition électronique Qy montrent que la structure annulaire des protéines reste intègre sous l'effet de la température. La spectroscopie Raman de résonance permet d'obtenir des informations précises sur la nature des liaisons hydrogène entre les Bchls et les polypeptides transmembranaires. Les mesures réalisées n'indiquent aucune modification importante (telle qu'une rupture) des liaisons hydrogène.
Des études par AFM sur les membranes intracytoplasmiques de *Blastochloris viridis* ont montré que la présence du centre réactionnel induisait une déformation (ellipticité) des anneaux de LH1. Par contre, lorsque le centre réactionnel est retiré par nanodissection les protéines LH1 adoptent une géométrie parfaitement circulaire (Scheuring, 2006). De telles fluctuations de la géométrie de l'anneau de LH1 pourraient générer des inhomogénéités entre les distances Bchl-Bchl et induire les déplacements vers le bleu de la transition électronique Qy des anneaux de LH1.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les déplacements des spectres d'absorption au maximum de la transition Qy induits par les variations de température sont dus à des fluctuations locales et de faible amplitude des interactions Bchl-Bchl au sein des anneaux de LH.

2.4 Effet de la température sur la structure des protéines antennes LH2

Nous avons voulu contrôler si les effets de la température observés sur les protéines antennes de type LH1 étaient également visibles sur les complexes de type LH2. De plus, la structure de la protéine LH2 est connue à haute résolution chez *Rps. acidophila* et *Rsp. molischianum* (Koepke et al., 1996; McDermott et al., 1995) et les expériences de mutagenèse dirigée a permis d'attribuer avec précision les bandes du spectre FT-Raman des Bchls en interaction avec les polypeptides auxquels elles sont liées, et ce au sein de la membrane intracytoplasmique dans laquelle elles sont ancrées (Gall et al., 2003a; Robert and Lutz, 1985; Sturgis et al., 1995).

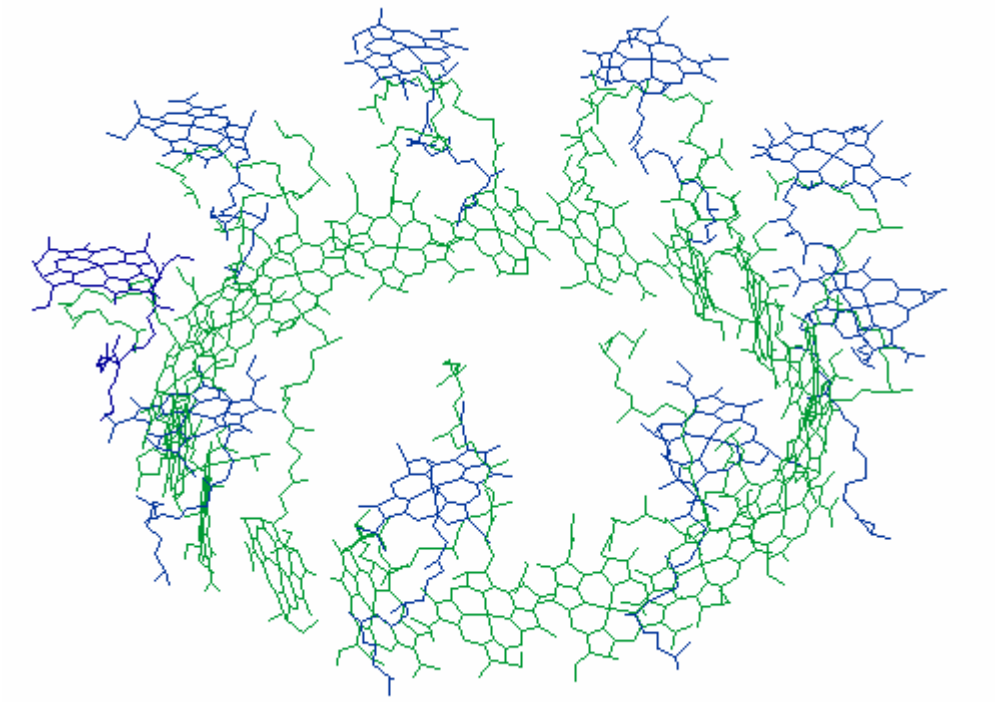


Figure 2-6 : Arrangements structuraux des 9 Bchls-B800 (en bleu) et des 18 Bchls-B850 (en vert) de la protéine LH2 de *Rps. acidophila* (d'après la structure 3D à 2,45Å de résolution, PDB : 2fkw (Cherezov et al., 2006))

Comme nous l'avons présenté dans le paragraphe 1.2.2 en introduction, la protéine LH2 est constituée de 2 agrégats de Bchls bien distincts : B850, correspondant à l'absorption à 850 nm de 18 Bchls formant un agrégat circulaire et B800, correspondant à l'absorption à 800 nm de 9 Bchls en interaction et qui sont perpendiculaires à la structure de l'anneau B850 (Fig. 2-6). On remarque que la distance entre Bchls-B800 (distance Mg-Mg d'environ 21Å) est nettement supérieure à la distance entre Bchls-B850 (distance Mg-Mg de 9,2Å entre Bchls de l'hétérodimére αβ et de 8,9Å entre hétérodiméres voisins). Le couplage excitonique entre Bchls-B800 est par conséquent négligeable par rapport au couplage excitonique fort entre Bchls-B850. Il est important de noter que le couplage des niveaux excités entre molécules de Bchl en contact de van der Waals est directement relié à la capacité à induire la migration d'un état excité.

Une autre différence importante entre ces deux anneaux de Bchls concerne leur environnement proche : les Bchls-B800 sont entourées de résidus majoritairement hydrophiles tandis que les Bchls-B850 sont dans un environnement de nature hydrophobe.

Nous nous sommes intéressés à l'effet de la température entre 5 et 32°C sur la structure de la protéine LH2, et tout particulièrement sur l'arrangement géométrique des agrégats de Bchls B800 et B850.

La Figure 2-7 montre les spectres d'absorption obtenus sur les membranes intracytoplasmiques d'un mutant de la souche *Rb. sphaeroides*. Ce mutant (DD13-wt) ne synthétise que les protéines antennes périphériques de type LH2. Nous avons enregistré des spectres pendant une phase de chauffe (Fig. 2-7A) et pendant une phase de refroidissement (Fig. 2-7B).

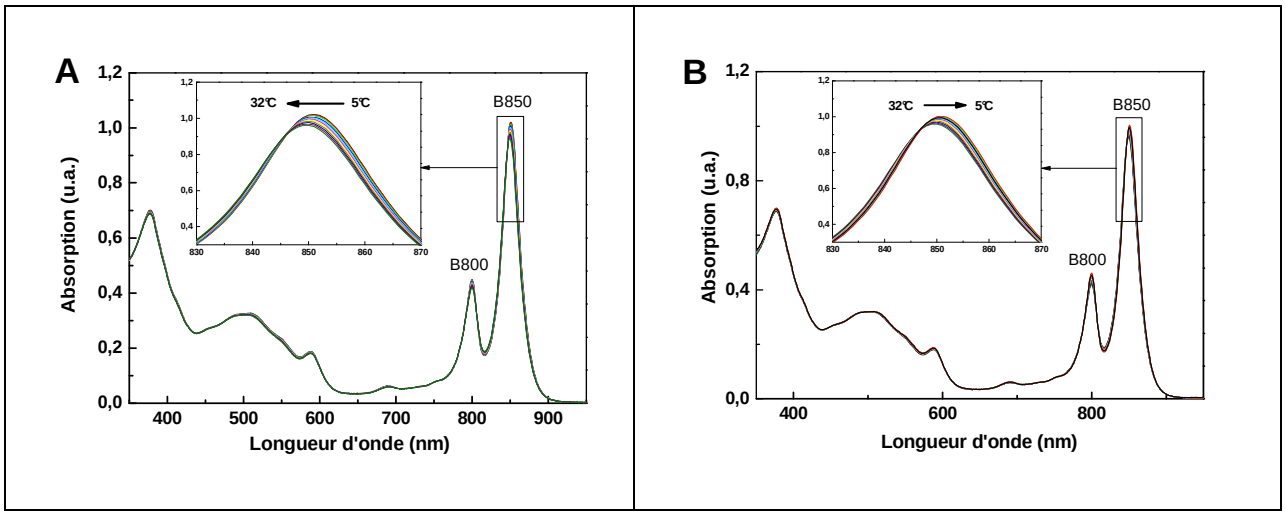


Figure 2-7 : Evolution du spectre d'absorption de la protéine LH2 de *Rb. sphaeroides* DD13-wt en fonction de la température. A : Phase de chauffe : de 5 à 32°C en 180 min ; B : Phase de refroidissement : de 32 à 5°C en 360 min.

Les spectres présentés sur les graphes insérés correspondent à l'absorption des Bchls qui constituent la forme B850. L'agrégat de Bchls B850 de la protéine LH2 présente des caractéristiques géométriques semblables à l'agrégat de Bchls B875 de la protéine LH1. On constate que l'augmentation de la température de 5 à 32°C entraîne un déplacement du maximum d'absorption du B850 d'environ 1-2 nm vers le bleu et une diminution d'intensité de 6%. Lorsque l'on refroidit l'échantillon, on note un déplacement du maximum d'absorption d'environ 1-2 nm vers le rouge et une augmentation de l'intensité de 4,3%. L'effet de la température sur le maximum d'absorption du B850 est réversible, et de même nature que celui que nous avons observé concernant la transition électronique Qy des Bchls B875 du LH1.

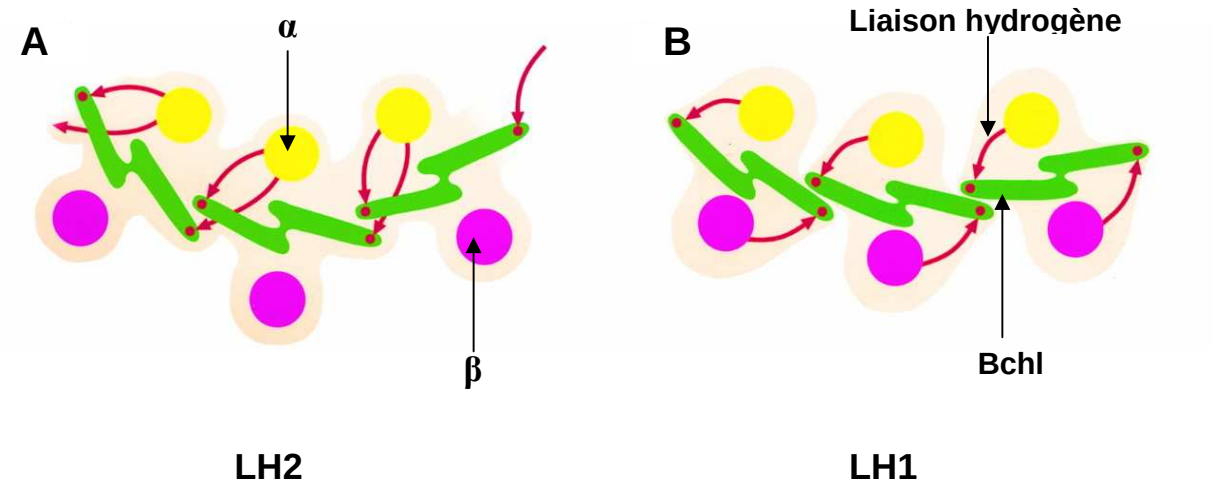


Figure 2-8 : Représentation schématique des réseaux de liaisons hydrogène (flèches rouges) (région C-terminales des protéines LH). A : 3 dimères αß de la protéine LH2 de *Rb. sphaeroides et Rps. acidophila*. B : 3 dimères αß de la protéine LH1 (modèle) (Bahatyrova et al., 2004)

En comparaison, le maximum d'absorption de la transition Qy de la protéine LH1 de *Rsp. rubrum* S1S (mutant sans centre réactionnel) est déplacé vers le bleu d'environ 4-5 nm pour une gamme de température semblable (de 5 à 38°C). Cette observation peut s'expliquer par l'existence de réseaux de liaisons hydrogène différents entre les protéines LH1 (B875) et LH2 (B850), et dont le rôle est de stabiliser les interactions entre les bactériochlorophylles et les polypeptides des LH. Des études par FT-Raman de résonance ont mis en évidence ces différences lors d'études menées sur les protéines LH1 et LH2 de *Rb. sphaeroides* (Olsen et al., 1994; Olsen et al., 1997; Sturgis et al., 1997). En effet, un réseau de liaisons hydrogène en C-terminal stabilise indépendamment chaque dimère αβ-$Bchl_2$ de la protéine LH1, tandis que l'arrangement du réseau de liaisons hydrogène au sein de la protéine LH2 est constitué d'une liaison H interne entre polypeptides α et β d'un dimère mais également d'une liaison H entre ce dimère et le dimère αβ voisin. Ces différences sont présentées sur la Figure 2-8.

Bahatyrova *et coll.* ont montré par AFM que la protéine LH2 est beaucoup plus rigide que la protéine LH1, dont le degré de flexibilité est plus important (Bahatyrova et al., 2004). Il a été proposé que cette différence peut être due à la taille de l'anneau mais également à l'arrangement du réseau de liaisons hydrogène entre les extrémités C-terminales des polypeptides et les groupements carbonyles des Bchls des agrégats circulaires B850 (LH2) et B875 (LH1). La rigidité de la protéine LH2 pourrait expliquer pourquoi le déplacement du maximum d'absorption du B850 est beaucoup moins significatif que celui que nous avons mesuré chez la protéine LH1.

L'effet de la température sur le maximum d'absorption de l'agrégat de Bchls B800 est différent de celui observé pour l'arrangement de Bchls B850. La Figure 2-9 montre l'évolution du spectre d'absorption de la protéine LH2 en fonction de la température (phase de chauffe) dans le proche infrarouge entre 760 et 890 nm. On remarque que le maximum d'absorption du B800 n'est pas déplacé mais que l'intensité diminue de 6,8% entre 5 et 32°C. Le graphe inséré dans cette Figure montre l'évolution du maximum d'absorption du B800 pendant la phase de refroidissement entre 32 et 5°C. Le pic d'absorption n'est pas déplacé mais l'intensité augmente d'environ 9,5%, et est par conséquent supérieure à l'intensité maximum initiale (+2,7%). Une différence majeure entre l'agrégat circulaire de Bchls du B850 et l'agrégat de Bchls du B800 réside dans la distance entre les Bchls voisines : en effet, la distance moyenne Mg^{2+}-Mg^{2+} des Bchls du B850 est de 9Å alors qu'elle est d'environ 21Å en ce qui concerne l'arrangement du B800. Les interactions entre les Bchls du B800 sont donc moins fortes qu'entre les Bchls qui constituent l'agrégat B850.

L'étude de Gall *et coll.* a montré l'effet de la pression sur les propriétés spectrales de la protéine LH2 purifiée en présence de détergent (Gall et al., 2003b). Il a été montré que la région N-terminale de la protéine est beaucoup plus sensible que la région C-terminale à la pression exercée au cours des expériences. Les structures 3D à haute résolution de la protéine LH2 montrent distinctement que la région N-terminale renferme l'agrégat de Bchls B800 tandis que la région C-terminale contient l'agrégat circulaire de Bchls B850. Les molécules Bchls-B800 sont situées à l'interface lipide-solvant et peuvent être en contact avec des molécules d'eau. Cette localisation au sein de la protéine fait que les Bchls-B800 sont plus labiles que les Bchls-B850.

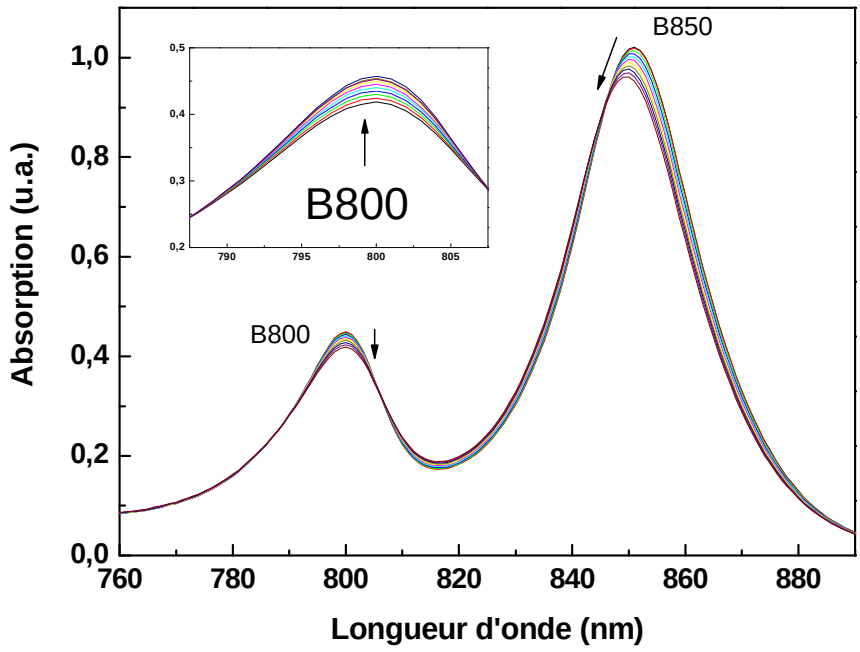


Figure 2-9 : Evolution du spectre d'absorption de la protéine LH2 dans le proche infrarouge en fonction de la température (de 5 à 32°C). Insertion : évolution du maximum d'absorption du B800 en fonction de la température (de 32 à 5°C). Les flèches noires représentent une augmentation ou une diminution des maximums d'absorption.

Le spectre de dichroïsme circulaire de la protéine LH2 dans les membranes de *Rb. sphaeroides* DD13-WT présente un signal conservatif intense avec un point de croisement à zéro à 856 nm. On remarque également un maximum positif à 845 nm et un maximum négatif à 864 nm. Il existe également un autre point de croisement à zéro à 798 nm. Ce spectre de DC a une allure générale qui ressemble parfaitement aux spectres de DC obtenus par Olsen *et coll*. (Olsen et al., 2003)

Nous avons mesuré l'évolution du spectre de dichroïsme circulaire de la protéine LH2 en augmentant la température entre 15 et 35°C. Ces résultats sont présentés sur la Figure 2-10. On remarque que l'allure du spectre est très peu modifiée dans son ensemble, mais qu'il existe tout de même une légère diminution du signal négatif vers 864 nm. Le point de croissement à zéro vers 856 nm n'est pas déplacé entre 20 et 35°C et il n'y a aucune différence entre les spectres dans la région 700-845 nm.

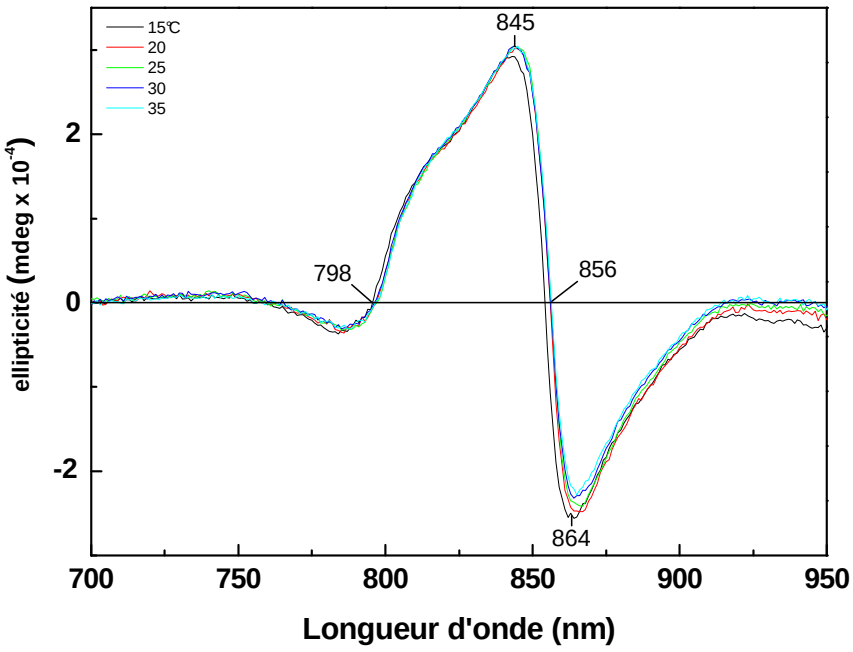


Figure 2-10 : Evolution du spectre de dichroïsme circulaire de la protéine LH2 de *Rb. sphaeroides* DD13 en fonction de la température (de 15 à 35°C).

Les spectres de dichroïsme circulaire dans le proche infrarouge des protéines LH sont très sensibles aux changements d'orientation des moments dipolaires des transitions Qy entre Bchls. L'effet de la température sur la géométrie des anneaux de Bchls-B850 et B800 est très faible, ce qui signifie que la structure globale de la protéine LH2 est peu modifiée par l'augmentation de la température.

Des spectres FT-Raman des membranes intracytoplasmiques de *Rb. sphaeroides* DD13-WT contenant la protéine LH2 ont été enregistrés à 0°C et 30°C (12000 interférogrammes coaditionnés pour chaque spectre) (Fig. 2.11). Cette technique de spectroscopie vibrationnelle permet d'obtenir des informations sur la conformation et les interactions moléculaires des Bchls liées aux protéines LH. Une longueur d'onde d'excitation à 1064 nm permet d'être en préresonance avec les transitions électroniques Qy des Bchls-B850 et présente l'avantage de pouvoir mesurer le signal Raman à toutes températures (pas de photodégradation de l'échantillon et de fluorescence qui empêche l'observation des signaux Raman de résonance).

Lorsque l'on applique cette technique aux molécules de bactériochlorophylles, la spectroscopie Raman de résonance apporte principalement des informations structurales sur i) la conformation du macrocycle des molécules dans l'échantillon (Näveke et al., 1997) et ii) la force des interactions intermoléculaires dans lesquelles ces molécules sont engagées *via* leurs groupements carbonyles conjugués acétyles et cétoniques (Lutz and Robert, 1988)

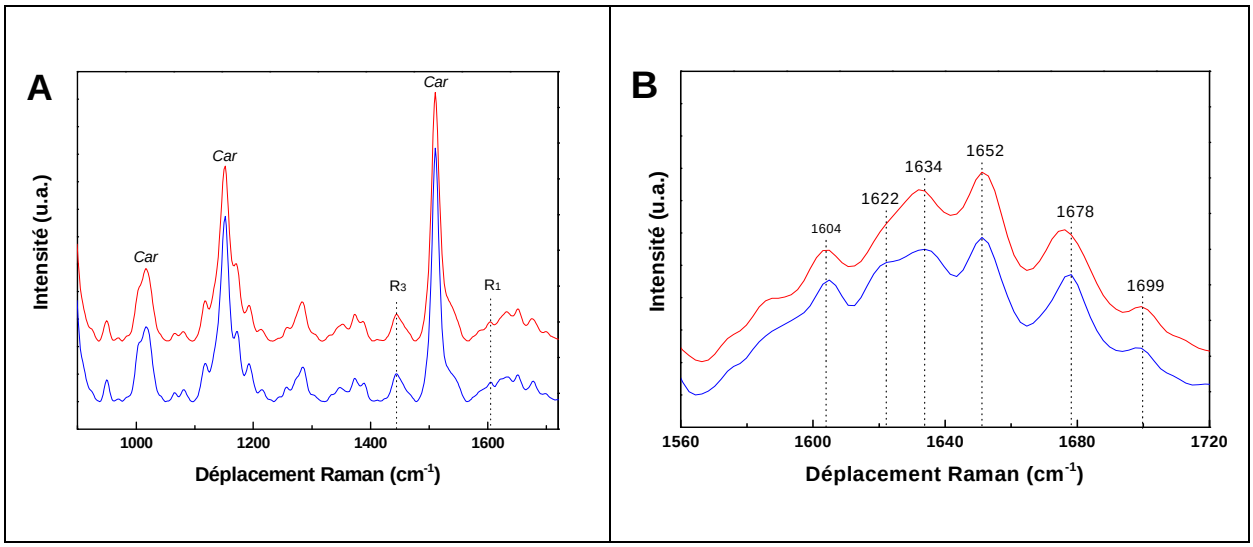
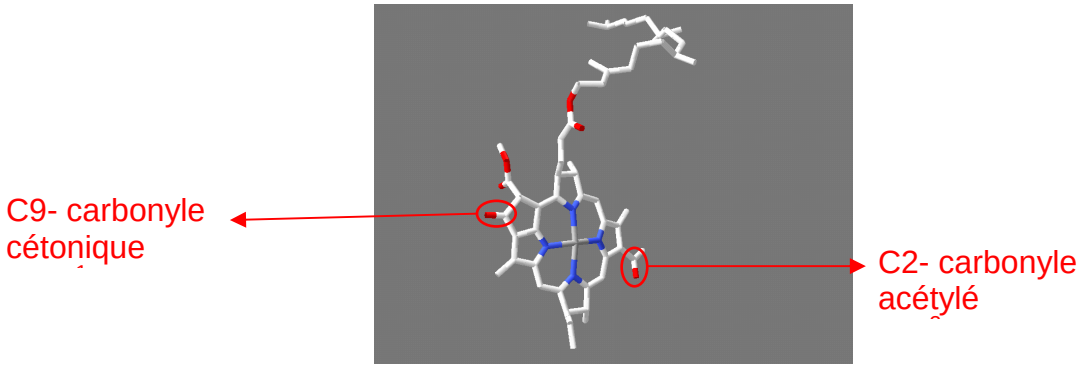


Figure 2-11 : Spectres FT-Raman de résonance de la protéine LH2 dans les membranes de *Rb. sphaeroides* DD13-wt. A : à 0°C (—) et 30°C (—) entre 900 et 1720 cm-1. B : zoom à 0°C (—) et 30°C (—) entre 1560 et 1720 cm-1 (région des groupements carbonyles des Bchls).

La Figure 2-11A montre l'effet de la température sur le spectre FT-Raman des Bchls et des caroténoïdes de la protéine LH2 entre 900 et 1720 cm^{-1}. La distorsion du macrocycle des Bchls peut être évaluée par cette mesure en observant les changements de fréquence des modes R_1 à R_6, respectivement à 1605, 1530, 1445, 1174, 1140 et 1017 cm^{-1} (Näveke et al., 1997). Pour notre étude, seuls les modes R_1 (à 1605 cm^{-1}) et R_3 (1445 cm^{-1}) ne sont pas perturbés par la contribution des caroténoïdes. Ces deux bandes ne présentent pas de déplacement de fréquence entre 0 et 30°C, ce qui suggère donc que les macrocycles des Bchls-B850 ne changent pas de conformation dans cette gamme de température. De plus, l'allure générale des spectres FT-Raman entre 900 et 1720 cm^{-1} est de même nature que ceux obtenus par Lapouge *et coll.* sur la protéine LH2 de *Rb. sphaeroides* souche 2.4.1 à température ambiante (Lapouge et al., 1999). Cette observation nous permet d'affirmer que la protéine LH2 conserve sa conformation native au cours de nos mesures. La Figure 2-11B représente la région des spectres FT-Raman à 0 et 30°C entre 1560 et 1720 cm^{-1}. Les bandes observées dans cette région correspondent aux modes d'élongation (variation de la longueur d'une liaison chimique) des carbonyles acétyles et cétoniques des Bchls. Dans les

protéines LH2, les Bchls-B850 ont des contributions aux fréquences à 1627, 1632, 1651 et 1678 cm^{-1}, tandis que les Bchls-B800 ont des contributions localisées à 1628 et 1699 cm^{-1}. D'après des études par mutagenèse dirigée, les bandes observées vers 1628 et 1635 cm^{-1} proviennent des liaisons hydrogène formées par les groupements carbonyles acétyles en C2 ($C3^2$) des Bchls (cf groupements sur la Fig. 2.12) avec des résidus voisins qui participent à la formation du site d'ancrage de ces molécules. D'autre part, les bandes à 1678 et 1699 cm^{-1} sont attribuées aux liaisons hydrogène formées par les groupements carbonyles cétoniques en C9 ($C13^1$) des Bchls (Fig. 2.12) avec les résidus environnants (Fowler et al., 1994).



<u>Figure 2.12</u> : Structure moléculaire de la bactériochlorophylle a. Les groupements carbonyles cétonique (C9, nomenclature de Fischer ou $C13^1$, nomenclature de IUPAC-IUB depuis 1988) et acétylé (C2 ou $C3^2$) sont entourés en rouge.

Lorsque l'on compare les spectres FT-Raman à 0 et 30°C dans cette région, on remarque que les bandes à 1699, 1652 et 1634 cm^{-1} ne sont pas déplacées. Les différences observables concernent d'une part la bande à 1678 cm^{-1} à 0°C qui présente un déplacement de 2 cm^{-1} (1676 cm^{-1}) à 30°C et d'autre part, la région du spectre entre 1620 et 1635 cm^{-1} dans laquelle on retrouve les bandes attribuées aux liaisons hydrogène formées entre les résidus Tyr 44 et Tyr 45 du polypeptide α avec respectivement les Bchl-B850-β et Bchl-B850-α. (notations basées sur les interactions His-Mg entre les polypeptides α et β et les Bchls-B850). La modification observée en fonction de la température dans cette région de fréquences est cependant faible par rapport aux modifications entraînées par des mutations des résidus Tyr. La mutation d'un ou des deux résidus Tyr entraîne un déplacement du maximum d'absorption à 850 nm d'environ 11 et 24 nm. Les spectres FT-Raman des protéines LH2 mutées sont modifiés par rapport au spectre de la protéine LH2 sauvage, et ces changements sont dû essentiellement à la rupture des liaisons hydrogène entre les résidus Tyr et les Bchls-B850 (Fowler et al., 1994; Fowler et al., 1992).

Ce changement du spectre FT-Raman entre 1620 et 1635 cm^{-1} peut être par conséquent attribué à une faible variation de la force des liaisons hydrogène des résidus Tyr avec les Bchls-B850 induite par l'augmentation de la température. Bien qu'étant difficile à quantifier, il semble que cette variation puisse être induite par la dynamique des interactions entre Bchls de l'anneau circulaire de B850.

Nous pouvons conclure de ces mesures par FT-Raman que ni la conformation de l'anneau de Bchls-B850, ni les interactions des Bchls-B850 avec la protéine LH2 ne sont modifiées en fonction de la température (entre 0 et 30°C). Il existe cependant de faibles réarrangements structuraux au niveau des sites d'ancrages des Bchls liés à la dynamique intrinsèque de la protéine LH2 dans les membranes intracytoplasmiques.

En conclusion à ce travail, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'intensité d'absorption de l'anneau B800 observée après les phases de chauffe et de refroidissement peut s'expliquer par une réorganisation locale des Bchls isolées dans leur environnement proche. D'autre part, on peut considérer que le changement de position de l'absorption de plus basse énergie à 850 nm peut être attribué majoritairement aux interactions entre molécules Bchls-B850, et donc provenir de variations de distance entre les Bchls. Enfin, les effets de la température sur les complexes LH2 sont comparables à ceux observés sur les complexes LH1. La seule différence réside dans l'amplitude des effets et pourrait être reliée à la plus grande stabilité/rigidité des anneaux de type LH2 en comparaison avec les anneaux de type LH1.

Perspectives de cette étude :

Des calculs théoriques ont été développés par les auteurs en utilisant les structures à haute résolution des protéines LH2 dans le but de relier les structures des protéines antennes LH à leurs propriétés spectroscopiques. Ces calculs permettent de « modéliser » les spectres d'absorption et de fluorescence obtenus expérimentalement.
Un modèle simplifié de désordre énergétique de l'anneau de Bchls-B850 a été proposé par Valkunas *et al.* (Institut de Physique à Vilnius, Lituanie), pour lequel les auteurs considèrent que chaque molécule de Bchl de l'anneau peut se trouver dans deux états énergétiques distincts. Dans le modèle, ces deux états énergétiques sont associés à deux sous-états conformationnels de la protéine *via* les interactions polypeptides-pigments. En raison du couplage excitonique dans

l'anneau B850 composé de 18 Bchls, cette hypothèse de deux états conformationnels possibles pour les Bchls génère un grand nombre de spectres distincts (environ 15 000), pouvant expliquer l'origine de l'élargissement inhomogène des spectres d'absorption et de fluorescence de la transition électronique à 850 nm (Janusonis et al., 2008; Valkunas et al., 2007).
Récemment, ce modèle de calcul a été utilisé pour interpréter la dynamique de changement spectral observé sur la protéine LH2 par spectroscopie de fluorescence en molécule unique. Des mesures réalisées sur des protéines de type LH2 ont montré une grande dynamique des protéines sur une échelle de temps de plusieurs minutes : la fluorescence est la plupart du temps stable, mais parfois de larges déplacements des spectres de fluorescence vers le rouge ou vers le bleu sont enregistrés (Rutkauskas et al., 2006a; Rutkauskas et al., 2006b). Pour expliquer cette dynamique de changement spectral, il a été proposé que chaque Bchl des anneaux peut se trouver dans deux sous-états conformationnels auxquels sont associé deux énergies d'excitation. Ces expériences montrent qu'il est possible d'utiliser le modèle proposé par Valkunas *et al.* afin de comprendre l'origine des modifications spectrales des protéines LH2 engendrées par les fluctuations conformationnelles du squelette polypeptidique.

A la suite de nos expériences par spectroscopie d'absorption, nous nous sommes demandé si les déplacements de spectre d'absorption dépendant de la température que nous avons observés aussi bien sur la protéine LH1 que sur la protéine LH2 ne pouvaient pas être la résultante de la dynamique des protéines. Nous avons donc contacté le groupe de Leonas Valkunas à l'origine de cette modélisation afin de débuter une collaboration sur ce sujet. Le but est d'utiliser le modèle proposé par ce groupe à partir de la structure connue de la protéine LH2 et de l'appliquer à la structure de la protéine LH1 que nous étudions. Les calculs théoriques sont en cours et les premiers résultats montrent qu'il est effectivement possible de modéliser nos spectres d'absorption par la même approche théorique. Ce serait ainsi la première fois que des observations sur molécule unique et sur une grande population de molécules sont reliées entre elles par la même théorie.

Chapitre 3

Dissociation des protéines LH1 de *Rhodospirillum rubrum* dans leurs membranes natives

3.1 Introduction

3.1.1 Enoncé de la problématique

Afin d'élargir le champ de nos connaissances sur l'assemblage des complexes protéines-pigments de type protéines antennes bactériennes LH1 et LH2, il est nécessaire de comprendre le rôle de chacun des composants moléculaires qui, de part leurs interactions, conduisent à la formation de sous-unités polypeptidiques puis à l'oligomérisation de l'anneau entier. Les structures tridimensionnelles de la protéine LH2 et la caractérisation de la forme B820, suggèrent que cette forme dimérique représente l'unité structurale de base pour l'assemblage des protéines antennes. La forme spectrale B820 a été très largement obtenue à partir du LH1 mutant ne possédant pas de molécule de caroténoïdes et très souvent en présence de détergent en concentration dénaturante. Il a été montré qu'au cours du processus de dissociation-réassociation *in vitro*, la forme B820 pouvait soit se dissocier en une forme monomérique absorbant à 777 nm lorsque la concentration de détergent augmente, soit en une forme oligomérique de plus grande taille lorsque celle-ci diminue. Il a été également montré que lorsque la protéine LH1 contient des caroténoïdes, la dissociation de la protéine entraîne l'apparition de la forme B820 sans caroténoïdes liés. L'interaction des caroténoïdes avec la protéine LH1 est alors rompue de manière irréversible. Cependant, des études de reconstitution *in vitro* ont montré qu'il était possible de mettre en évidence des intermédiaires de réassociation liant des molécules de caroténoïdes à partir de B820 purifiée (Davis et al., 1995; Fiedor et al., 2004; Fiedor and Scheer, 2005). Il est difficile par ces études de déterminer si les caroténoïdes sont bien liés aux polypeptides ou s'ils sont solubilisés en présence du détergent.

Il n'y a donc à l'heure actuelle aucune certitude concernant l'existence dans les membranes natives de formes oligomériques de type B820 pouvant lier des molécules de caroténoïdes et capables ensuite de s'autoassembler pour former une protéine LH1 fonctionnelle. C'est pourquoi nous envisageons d'étudier le processus de dissociation-réassociation de la protéine LH1 avec ou sans caroténoïdes dans son environnement naturel, les membranes intracytoplasmiques. Ces études seront menées sans détergent ou autres agents chaotropes mais uniquement par effet de la température.

3.1.2 Synthèse des études de dissociation en présence de détergent : la protéine LH1 de *Rsp. rubrum* G9

La protéine LH1 des bactéries pourpres *Rsp. rubrum*, *Rsp. marina*, *Bc. viridis* et *Rb. sphaeroides* peut être dissociée en sous-unités structurales absorbant à 820 nm (appelées B820), par un traitement avec des détergents et par extraction des caroténoïdes.

Une souche mutante de *Rsp. rubrum*, appelée G9+ (la souche G9 a été isolée par J.W. Newton dans les années 60), présente la particularité de synthétiser le complexe RC-LH1 sans caroténoïdes, ce qui confère à la culture bactérienne une teinte bleu-gris. La protéine LH1 chez cette bactérie est un excellent modèle pour l'étude *in vitro* de l'oligomérisation des protéines membranaires. La position du maximum d'absorption de la transition Qy des Bchls a dans la protéine LH1 de G9+ est à 873 nm, et dépend fortement des interactions entre les hétérodiméres αβ pour former l'anneau. Après purification du complexe RC-LH1, les protéines natives LH1 peuvent être dissociées en présence de détergent βOG (octylglucoside). L'addition de détergent entraîne l'apparition d'une forme dimérique absorbant à 820 nm (hétérodiméres αβ majoritairement) (Loach and Parkes-Loach, 1995; Sturgis and Robert, 1994). Lorsqu'on augmente la concentration en détergent βOG, la forme B820 peut être également dissociée en une forme absorbant à 777 nm (Ghosh et al., 1988; Parkes-Loach et al., 1988). La forme spectrale B777 est composée d'un mélange de polypeptides α et β qui lient chacun de façon non covalente une molécule de Bchla. Lorsque l'on diminue la concentration du détergent, ce processus de dissociation est totalement réversible.

De nombreuses études ont été menées sur ce sujet depuis 1988 dans le but de déterminer quels sont les éléments structuraux impliqués dans l'assemblage et la stabilité des protéines antennes LH1 :

- les molécules de bactériochlorophylles contribuent à la stabilité de l'anneau mais également de la forme dimérique. Les acteurs centraux de cette contribution sont l'atome central de magnésium des Bchls a et les groupements imidazole des histidines (Olsen et al., 1997; Robert and Lutz, 1985; Scherz and Rosenbach-Belkin, 1989), des résidus localisés dans la région transmembranaire des polypeptides et qui sont très conservés chez les bactéries pourpres ;
- les caroténoïdes ont un rôle de stabilisateur de structure, notamment pour préserver la structure annulaire des protéines LH1. Lorsque la protéine LH1 est dépourvue de caroténoïdes, il est beaucoup plus simple de dissocier l'anneau en sous-unités (Loach and Parkes-Loach, 1995), mais également de reconstituer la structure de cet anneau à partir de polypeptides isolés ;

- les résidus chargés qui sont localisés préférentiellement aux extrémités N et C-terminales des polypeptides et les résidus hydrophobes présents majoritairement dans la région transmembranaire. Ces informations ont été obtenues, pour le premier motif, par des expériences de modification de la longueur des polypeptides α et β où les régions N et C-terminales ont été coupées par protéolyse ménagée ou remplacées par des séquences terminales non natives (Davis et al., 1995; Davis et al., 1996; Kehoe et al., 1998; Meadows et al., 1998). Dans le second cas, il a été montré que les résidus hydrophobes interagissent entre eux pour former un réseau de liaison hydrophobe qui contribue à stabiliser les sous-unités et la protéine LH1 entière (Sturgis and Robert, 1994).

Afin de mettre en évidence et de quantifier les forces qui dirigent le repliement et l'oligomérisation des protéines LH1, des études ont été menées dans le but d'en déterminer les paramètres thermodynamiques. Peu d'informations existent pour les protéines membranaires en comparaison aux protéines solubles. L'environnement des protéines membranaires, qu'il s'agisse de lipides ou de détergents, doit être pris en compte et tend à compliquer les études de cinétique et d'énergétique de l'assemblage de ces protéines.

Au sein du laboratoire ainsi que dans le groupe dirigé par R. van Grondelle aux Pays-Bas, nous avons utilisé le processus de dissociation/réassociation de la protéine LH1 de G9 pour déterminer les paramètres thermodynamiques associés à l'apparition de la forme spectrale B820 puis à la forme monomérique absorbant à 777 nm. Ces études ont mis en évidence la présence d'états intermédiaires de taille supérieure au B820, et notamment l'existence d'une forme tétramérique stable donc susceptible d'être caractérisée. Il a été montré que l'état intermédiaire de cette forme tétramérique absorbe vers 850 nm (Fig. 3-1) (Pandit et al., 2003; Pandit et al., 2001; Vegh and Robert, 2002).

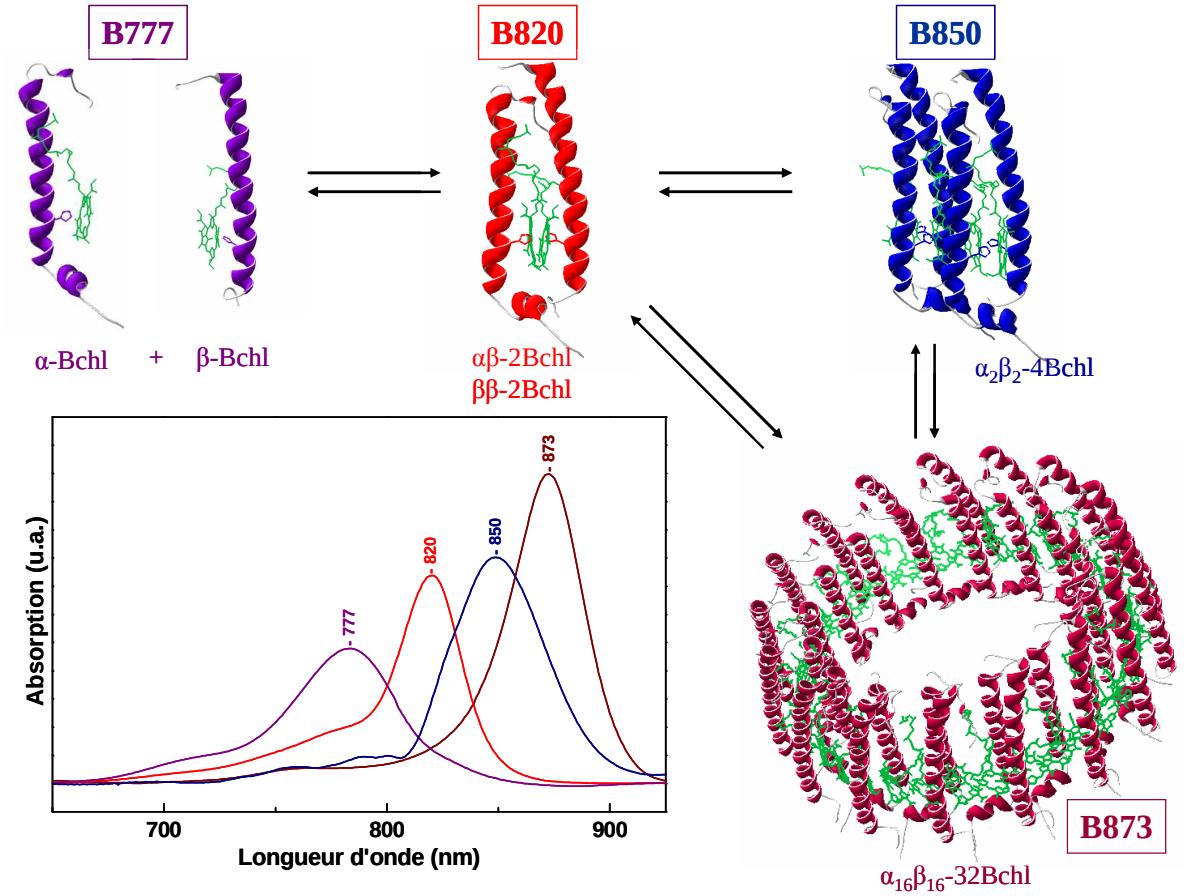


Figure 3-1 : Schéma de réversibilité du processus de dissociation de la protéine LH1 de G9+ (B873) en présence de détergent BOG, mettant en évidence les formes intermédiaires monomérique B777, dimérique B820 et tétramérique B850.
Insertion : spectres d'absorption correspondants aux différents états d'oligomérisation.

Nous avons au cours de travaux dirigés par V. Arluison en stage post-doctoral au laboratoire, montré que les extensions N-terminales des polypeptides α et β jouent un rôle prépondérant dans le processus de dimérisation en utilisant les propriétés de dissociation réversible du B820 en B777 en présence de βOG (Arluison et al., 2004; Parkes-Loach et al., 2004). Dans ce travail, nous avons montré comment les paramètres thermodynamiques de la réaction d'association de B777 en B820 sont modifiés par le clivage de très courtes extensions N-terminales des polypeptides α et β, en utilisant les protéases GluC et trypsine. Il s'agit d'une des premières quantifications des interactions entre protéines et/ou polypeptides membranaires. Nous avons également démontré que le dimère αβ-B820 est stabilisé par des interactions de nature hydrophobe localisées à l'interface membranaire (N-terminale). Nous avons introduit la notion originale de « poche hydrophobe » pour expliquer le rôle du résidu α-Trp5 (très conservé chez les bactéries pourpres), élément central dans la formation d'un réseau d'interactions hydrophobes avec un nombre important de résidus environnants présent sur les deux polypeptides (α-Ile4, α-Pro10, α-Leu14, β-

Leu8 et β-Ala16). Ce réseau inclut également le résidu β-His20 que l'on retrouve sur tous les polypeptides β (Zuber and Cogdell, 1995) et qui est capable d'interagir avec le tryptophane α5 par la formation d'une liaison hydrogène (Arluison et al., 2004).

Il existait également de nombreuses incertitudes quant à la nature exacte de la forme spectrale absorbant à 820 nm. En effet, des études spectroscopiques ont établi que le spectre d'absorption de cette espèce correspond à un dimère composé des deux polypeptides α et β liant chacun une bactériochlorophylle (van Mourik et al., 1991; Visschers et al., 1991). Au contraire, des mesures de la taille hydrodynamique de cette espèce ont suggéré qu'il s'agissait d'une forme tétramérique (Ghosh et al., 1988; Miller et al., 1987). A partir de la forme B820 purifiée, nous avons déterminé l'ordre de réaction de dissociation de B820 en B777 et montré que la structure quaternaire du B820 est fortement dépendante de la concentration de détergent βOG (Arluison et al., 2002b). De plus, nous avons entrepris de caractériser la forme spectrale B820 par des approches biochimiques. Pour cela, nous avons élaboré une expérience originale basée sur la migration des espèces présentes dans l'échantillon sur un gel natif contenant 2% de détergent βOG. Nous avons pu extraire de ce mélange les formes spectrales α-B777 and β-B777 et déterminé la co-existence de deux formes spectrales absorbant à 820 nm. Il s'agit d'une part de l'hétérodimére αβ qui compose majoritairement cette forme spectrale mais, d'autre part le polypeptide β est capable de s'autoassocier pour former un homodimére ββ stable dont les propriétés spectroscopiques sont semblables à celles de l'hétérodimére αβ. Cependant, le dimère ββ n'est pas capable de s'associer pour former des structures oligomériques de plus grande taille. Par cette technique, nous n'avons pas mis en évidence la présence d'un homodimére αα (Arluison et al., 2002a).

Nous avons ensuite optimiser la production d'homodimére stable ββ afin de pouvoir caractériser ses propriétés spectrales et contrôler sa stabilité en comparaison avec l'hétérodimére αβ. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans FEBS Journal parue au début de l'année 2008 (Seguin et al., 2008) (Annexe 4).

La possibilité de dissocier la forme B820 en B777 par augmentation de la température a été utilisée afin de déterminer les propriétés thermodynamiques pour la formation et la stabilité des dimères αβ et ββ. Ce résultat est d'une importance particulière pour mettre en évidence les facteurs qui dirigent l'association entre polypeptides membranaires. En effet, l'existence de ces dimères tend à montrer que l'organisation locale des dimères de Bchls est principalement coordonnée par des interactions entre ces mêmes Bchls (Shelly et al., 2008), alors que la

formation des dimères est dépendante de la nature chimique des polypeptides sur lesquels les Bchls sont liées (Seguin et al., 2008).

3.2 Dissociation/réassociation de la protéine LH1 en présence de détergent

3.2.1 Dissociation de la protéine LH1 dans les membranes intracytoplasmiques chez *Rsp. rubrum* G9: effet du détergent βOG

Les résultats présentés dans le paragraphe 3.1.2 montrent l'importance des interactions entre les détergents et les polypeptides pour les études sur l'assemblage des protéines membranaires. Nous avons alors réalisé au laboratoire une analyse quantitative du phénomène de dissociation de la protéine LH1 de *Rsp. rubrum* G9+ et étudié sa dépendance en fonction de la concentration en détergent βOG. Pour cela nous avons préparé un échantillon de membranes de G9+ de DO = 1 (au maximum de la transition Qy) dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH 8.0, et déposé cet échantillon dans une cuve en quartz reliée à un pousse-seringue contenant une solution de 1M βOG. Des spectres d'absorption ont été collectés à intervalle de temps régulier comme le montre la Figure 3-2.

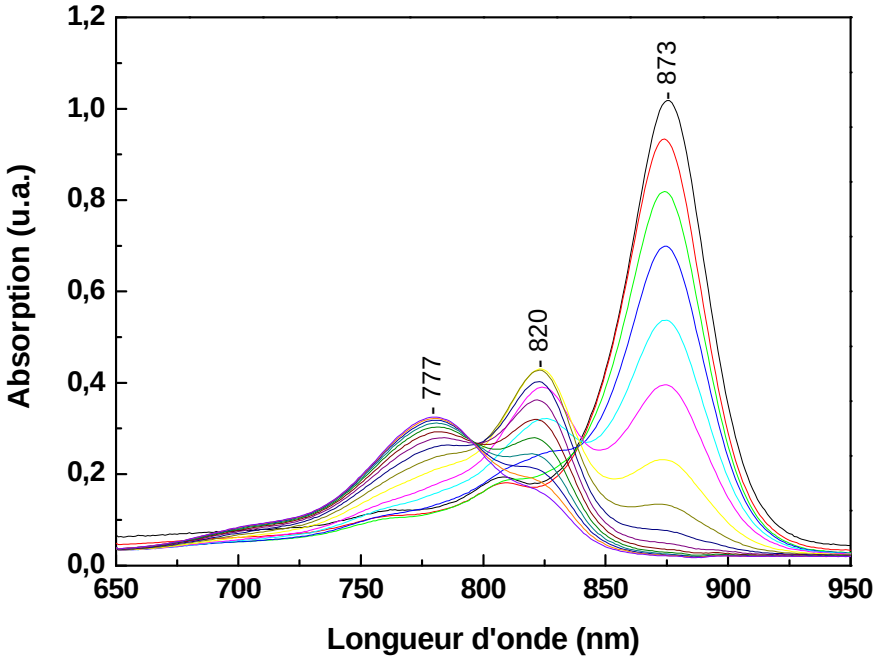


Figure 3-2 : Evolution des spectres d'absorption entre 650 et 950 nm des membranes de *Rsp. rubrum* G9+ au cours de l'ajout progressif de détergent βOG.

Cette Figure montre très clairement qu'il est possible de mettre en évidence grâce à la spectroscopie d'absorption l'existence de formes spectrales intermédiaires et de suivre leur évolution en fonction de la concentration de détergent. La diminution de l'absorption à 873 nm (anneau de LH1) entraîne l'apparition d'un maximum d'absorption à 820 nm puis à 777 nm. Les molécules de Bchls se comportent comme des sondes naturelles pour l'observation des états oligomériques de la protéine LH1.

La Figure 3-3 montre l'évolution des formes spectrales B873, B820 et B777 en fonction de la concentration de βOG. La dissociation de l'anneau absorbant à 873 nm présente une cinétique rapide à partir d'une concentration de 25 mM de βOG et ce jusqu'à environ 40 mM. Entre 17 et 25 mM, on remarque une diminution de l'absorption à 873 nm et de légères augmentations des absorptions à 820 et 777 nm. Ce changement dans la cinétique de dissociation, présent à des concentrations inférieures à la CMC (CMC du βOG égale à 25 mM dans l'eau pure d'après Paternostre et al. (Paternostre et al., 1997)), peut correspondre à la partition des molécules de détergent dans la membrane (Fig. 1-9A) et à son interaction avec les régions transmembranaires des polypeptides du LH1. A une concentration égale à la CMC, il y a une très forte diminution de l'absorption à 873 nm et une augmentation importante de la forme spectrale B820 (avec un maximum à 36 mM βOG) ainsi qu'une légère augmentation d'absorption à 777 nm (maximum vers 80 mM βOG). On remarque la coexistence de ces 3 espèces entre 25 mM et 50 mM de βOG, car à partir de cette concentration l'anneau de LH1 est totalement dissocié. Par contre, nous n'avons pas mis en évidence par cette méthode la présence d'un état oligomérique intermédiaire de type B850. La courbe de l'évolution de l'absorption à 650 nm correspond à la mesure de la turbidité de l'échantillon. Cette valeur d'absorption diminue entre les concentrations 0 et 25 mM, puis n'évolue plus après 25 mM, confirmant ainsi que les membranes sont totalement solubilisées.

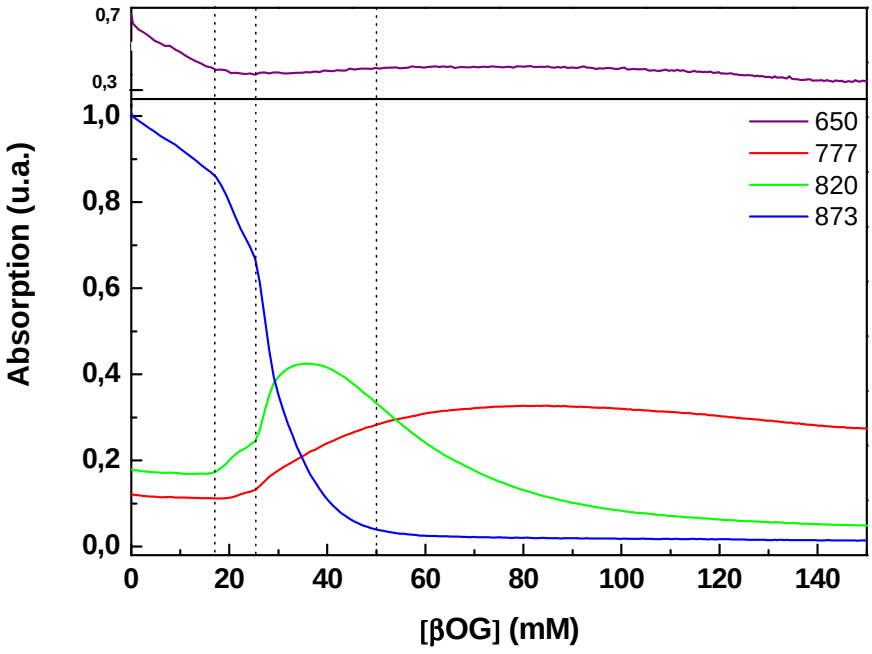


Figure 3-3 : Evolution du maximum d'absorption des formes spectrales B873, B820 et B777 en fonction de la concentration de détergent βOG (mesure de la turbidité à 650 nm). En pointillé, concentrations d'OG égale à 17, 25 et 50 mM.

3.2.2 Dissociation de la protéine RC-LH1 purifiée (G9 et S1) en DDM : effet de la température

Ces résultats en présence de βOG montrent l'importance des interactions protéine/détergent pour mettre en évidence des états oligomériques du LH1. Il s'agit pourtant du seul exemple pour lequel il est possible de purifier des formes oligomériques stables pour des études ultérieures, comme le montre notre travail publié récemment (Seguin et al., 2008). A la fin des années 90, de nombreuses études ont été menées afin d'imager la structure du complexe RC-LH1 de *Rsp. rubrum* à basse résolution à partir de cristaux 2D obtenus par l'utilisation de détergent de type lipidique comme les DHPC et DOPC. Des cartes de projection du complexe RC-LH1 ont été obtenues à partir de la souche mutante G9 (Ghosh et al., 1993), et surtout à partir de complexes purifiés de la souche sauvage (Jamieson et al., 2002; Karrasch et al., 1995; Stahlberg et al., 1998; Walz and Ghosh, 1997). L'extraction et la purification de RC-LH1 ont permis des études structurales par AFM (Fotiadis et al., 2004) et par modification chimique des bactériochlorophylles (Qian et al., 2003).

Il est également possible d'extraire, de purifier et de maintenir en solution les complexes RC-LH1 de S1 et G9 en présence de détergent n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM). Le DDM est un détergent « doux » qui se révèle être un très bon outil pour la manipulation des protéines membranaires, de par ses propriétés permettant de maintenir la structure et la fonction de ces protéines en solution (VanAken et al., 1986).

Les études en détergent βOG ont prouvé que l'apparition de formes oligomériques est dépendante de la concentration du détergent et que l'existence d'un équilibre entre ces formes est dépendant de la température, comme le montrent sur ce dernier point les études thermodynamiques de dissociation du B820 (Seguin et al., 2008). C'est pourquoi nous avons voulu analyser le processus de dissociation des RC-LH1 purifiés de G9+ et S1 en fonction de la température, dans un tampon contenant le DDM, afin de mettre en évidence de nouveaux états oligomériques de la protéine LH1, ou bien alors de confirmer l'existence des formes décrites en utilisant le βOG. Pour cela, les complexes RC-LH1 de G9 et de S1 sont respectivement étudiés entre 32 et 50°C et entre 42 et 60°C. Le choix de cette gamme de température tient compte de l'expérience de stabilité thermique des protéines LH1 dans leur membrane native qui montre que le complexe RC-LH1 contenant des molécules de caroténoïdes (S1) présente une stabilité supérieure à celui du mutant G9+ à température élevée (120 min à 75°C) (Annexe 2).

3.2.2.1 RC-LH1 de G9 purifié en DDM

Les résultats concernant le RC-LH1 de G9+ entre 32 et 50°C présentés sur la Figure 3-4 montrent l'évolution du spectre d'absorption dans la région 350-950 nm. Le maximum d'absorption de la transition Qy à 872 nm diminue d'environ 70% entre 32 et 50°C, alors que l'on remarque l'apparition dés 35°C d'une absorption à 786 nm, suivie vers 44°C d'un pic absorption vers 820 nm. A une température de 50°C, 3 formes spectrales coexistent ; elles pourraient correspondre aux espèces monomériques, dimériques et oligomériques de la protéine LH1 (B777, B820 et B873 respectivement). Seule la transition électronique Qx à 590 nm n'est pas influencée par la température. Lorsque l'on refroidit l'échantillon après la phase de chauffe (Figure 3-4, insertion), on observe une diminution de l'absorption à 786 nm, mais aussi une augmentation vers 820 nm, qui est l'espèce majoritaire en fin d'expérience (825 nm). On note également une faible augmentation vers 869 nm et non vers 873 nm comme l'a décrit Ghosh et al. (Ghosh et al., 1988). Il semble donc que la dissociation du LH1 de G9 soit partiellement réversible en présence de DDM et en fonction de la température (entre 32 et 50°C)

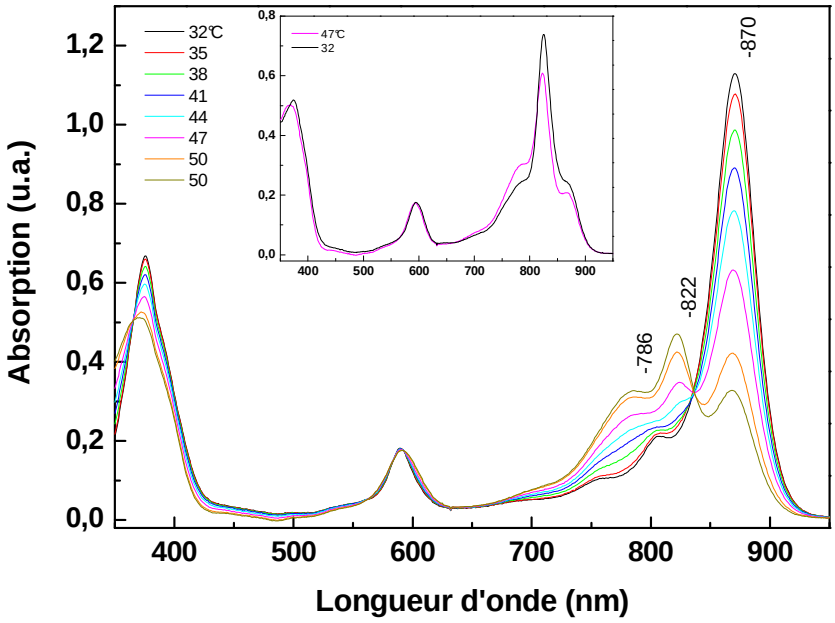


Figure 3-4 : Effet de la température sur le spectre d'absorption du complexe RC-LH1 de G9+ purifié en détergent DDM (32< T >50°C et 650< λ >950 nm)
Insertion : spectres d'absorption au début et à la fin du cycle de refroidissement.

3.2.2.2 RC-LH1 de S1 purifié en DDM

Une expérience identique a été menée sur le complexe RC-LH1 de la souche sauvage S1 (Fig. 3-5). Si les caroténoïdes sont essentiels pour l'assemblage des protéines LH2 (Gall et al., 2003a; Lang and Hunter, 1994), il semble que ces molécules ne soient pas indispensable à la formation des protéines LH1 comme le montrent les résultats décrits précédemment. Cependant, la présence des caroténoïdes et leur interaction avec les bactériochlorophylles sont susceptibles de renforcer la stabilité et d'optimiser la fonction du LH1 (Fiedor et al., 2004). De plus, une étude a montré qu'il était possible de reconstituer la protéine LH1 de *Rsp. rubrum* en présence de βOG à partir d'un échantillon contenant l'espèce B820 et des caroténoïdes. Les auteurs ont montré que les dimères B820 sont capables d'interagir avec les caroténoïdes et de promouvoir la formation d'agrégats de plus grande taille dont les propriétés spectrales sont très proches de celle de la protéine LH1. Au cours de ce processus, un intermédiaire (iB873) a pu être mis en évidence (Fiedor and Scheer, 2005).

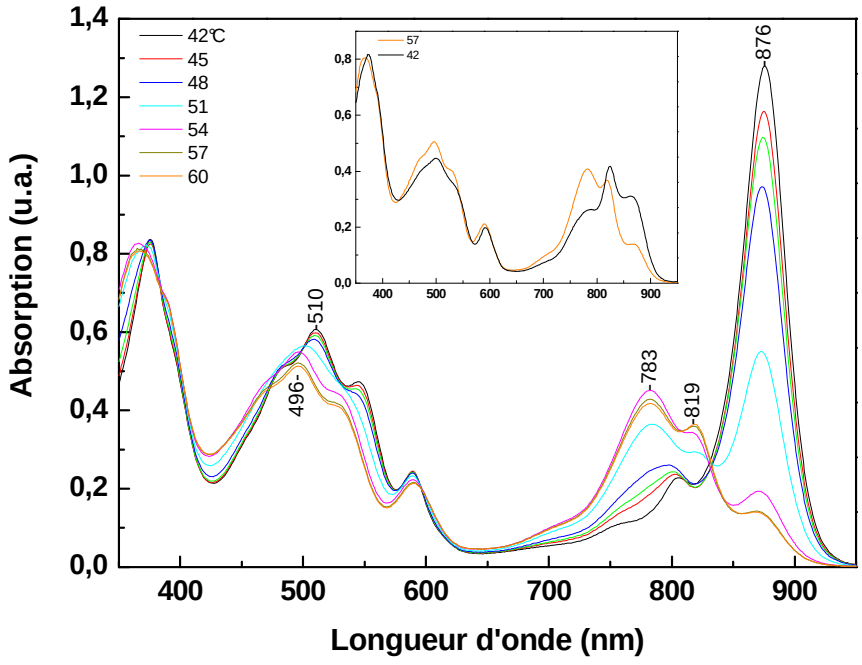


Figure 3-5 : Effet de la température sur le spectre d'absorption du complexe RC-LH1 de S1 purifié en détergent DDM (42< T >60°C et 650< λ >950 nm)
Insertion : spectres d'absorption au début et à la fin du cycle de refroidissement.

La Figure 3.5 présente les spectres d'absorption en fonction de la température sur le RC-LH1 de S1 entre 42 et 60°C. Le maximum d'absorption de la transition Qy à 876 nm diminue d'environ 90% entre 42 et 60°C, alors que l'on remarque l'apparition dés 45°C d'une absorption à 783 nm, suivie vers 51°C d'un pic absorption vers 820 nm. Comme cela a été montré sur le RC-LH1 de G9, 3 formes spectrales coexistent pour des températures supérieures à 50°C et la forme absorbant à 783 nm est dominante. En effet, l'analyse du spectre obtenu en début de phase de refroidissement à 57°C (Fig. 3-6) met en évidence l'existence de 4 pics d'absorption dont trois sont susceptibles de correspondre aux formes spectrales B777 (à 781 nm), B820 (à 821 nm) et B873 (à 872 nm : B881 sans caroténoïdes), et un pic à 749 nm : ce dernier peut correspondre à l'absorption des Bpheo du CR mais également aux Bchla démétalisées à forte température (Hughes et al., 2006). Différentes études ont montré que le maximum d'absorption vers 820 nm (chez *Rsp. rubrum*) de la forme dimérique isolée en présence de détergent βOG pouvait être déplacé à 816 nm chez *Rb. capsulatus* (Heller and Loach, 1990) et à 825 nm chez *Rb. sphaeroides* (Chang et al., 1990). Ces résultats montrent que le maximum d'absorption de la transition Qy des espèces isolées est dépendant de la nature de la protéine LH1 étudiée. Nos résultats obtenus en présence de DDM montrent également que ce déplacement spectral peut être induit par la nature

du détergent utilisé et de la température, et que les intermédiaires structuraux mis en évidence correspondent bien aux espèces monomériques B777 et dimériques B820.

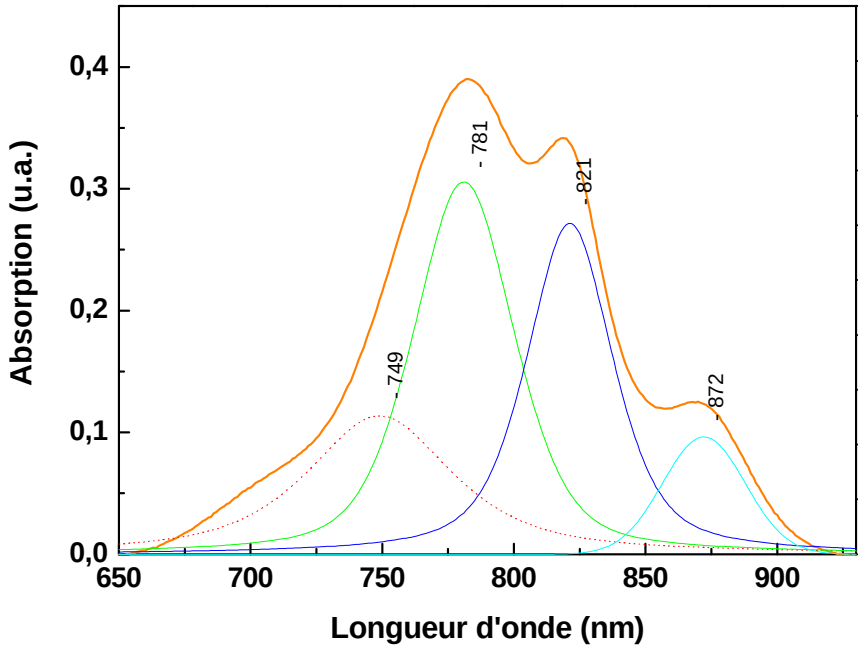


Figure 3-6 : Analyse du spectre d'absorption (S1) à 60°C et en présence de DDM par le logiciel PeakFit v4.12 (le spectre est analysé entre 650 et 930 nm avec un minimum de fonctions Gaussienne/Lorentzienne après correction de la ligne de base ; R^2 = 0,99949)

La Figure 3-7 présente l'analyse du spectre obtenu à 42°C en fin de phase de refroidissement et met en évidence l'existence de 5 pics d'absorption entre 650 et 930 nm, caractérisant la réassociation de la protéine LH1 seulement car le centre réactionnel se dénature lorsque la température est supérieure à 40°C (Tandori et al., 2005). On remarque que le pic d'absorption vers 750 nm (754 nm) évolue très peu, mais surtout que la forme monomérique B777 (à 784 nm) diminue fortement (environ 50%) entraînant la formation de l'espèce dimérique B820 (à 824 nm, augmentation de 18%) et d'une forme oligomérique absorbant à 863 nm pouvant correspondre à l'intermédiaire B869 décrit par Ghosh et al. (Ghosh et al., 1988). La présence du pic d'absorption à 884 nm est proche de la forme native de la protéine LH1 dont le maximum d'absorption est à 881 nm.

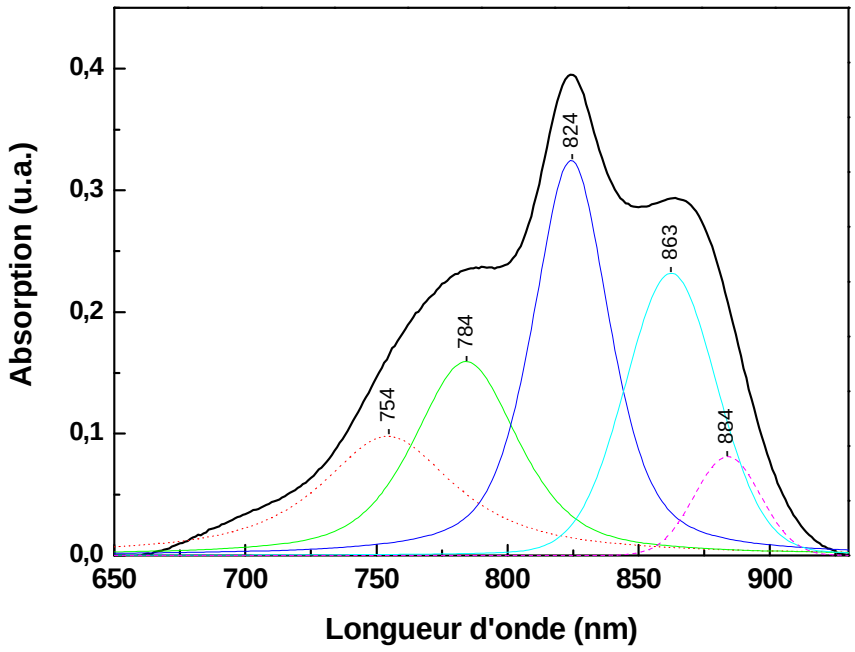


Figure 3-7 : Analyse du spectre d'absorption (S1) à 42°C et en présence de DDM par le logiciel PeakFit v4.12 (le spectre est analysé entre 650 et 930 nm avec un minimum de fonctions Gaussienne/Lorentzienne après correction de la ligne de base ; R^2 = 0,99907)

Il est également intéressant d'observer l'évolution de l'absorption des caroténoïdes dans la région 450-550 nm (Figure 3-8). En effet, les molécules de spirilloxanthine présentent dans cette région un spectre caractéristique composé de 3 pics distincts. Chacun de ces pics correspond à une transition entre l'état fondamental et différents états vibrationnels S2. Lorsque les caroténoïdes sont liés aux complexes LH, le spectre d'absorption des états excités S2 présente un déplacement vers le rouge d'environ 20 nm par rapport au spectre obtenu lorsque ces molécules sont isolées en solvant organique (cf. Annexe 3) (Koyama et al., 1990). Au cours de cette expérience, le spectre d'absorption des caroténoïdes reste inchangé entre 42 et 48°C, avec des pics à 484, 510 et 545 nm qui sont caractéristiques de l'état natif de la protéine LH1 (les caroténoïdes restent liés aux polypeptides). A partir de 51°C, on observe une diminution de l'absorption et un déplacement vers le bleu d'environ 15 nm puisque les pics d'absorption sont alors à 469, 496 et 530 nm. Ces valeurs correspondent très exactement à celle déterminées à partir des membranes traitées par solvant organique, et semblent indiquer que les molécules de caroténoïdes ne sont plus en interaction avec la protéine LH1 et le centre réactionnel. On remarque également un déplacement vers le bleu d'environ 9 nm de la bande à 375 nm (366 nm), qui confirme que les molécules de spirilloxanthine sont dans un environnement semblable à celui d'un solvant

organique, et ne sont donc pas liées à des polypeptides. Cette bande d'absorption présente un élargissement vers 390 nm qui correspond à la transition électronique Bx de la Bchla (à 391 nm) lorsque la Bchla est isolée en solvant organique. Ces observations sont différentes de celle obtenues par Agalidis *et al.* (Agalidis et al., 1999) sur la formation d'agrégats de spirilloxanthine induite par le traitement du centre réactionnel de *Rubrivivax gelatinosus* par le détergent LDAO. Il a été montré qu'après ce traitement, le spectre d'absorption des caroténoïdes dans le visible disparaît et laisse place à un spectre d'absorption dans l'UV contenant deux bandes à 370 et 300 nm. La conclusion de cette étude est en faveur de l'isomérisation et de l'association des spirilloxanthines (dissociées du centre réactionnel) dans des micelles de détergent.

Lorsque la température diminue, les pics d'absorption du spectre des caroténoïdes entre 450 et 550 nm à 42°C (Fig. 3-8) sont déplacés vers le rouge d'environ 3-4 nm, à 472, 500 et 534 nm, ainsi que la bande vers 370 nm (déplacement de 366 à 374 nm).

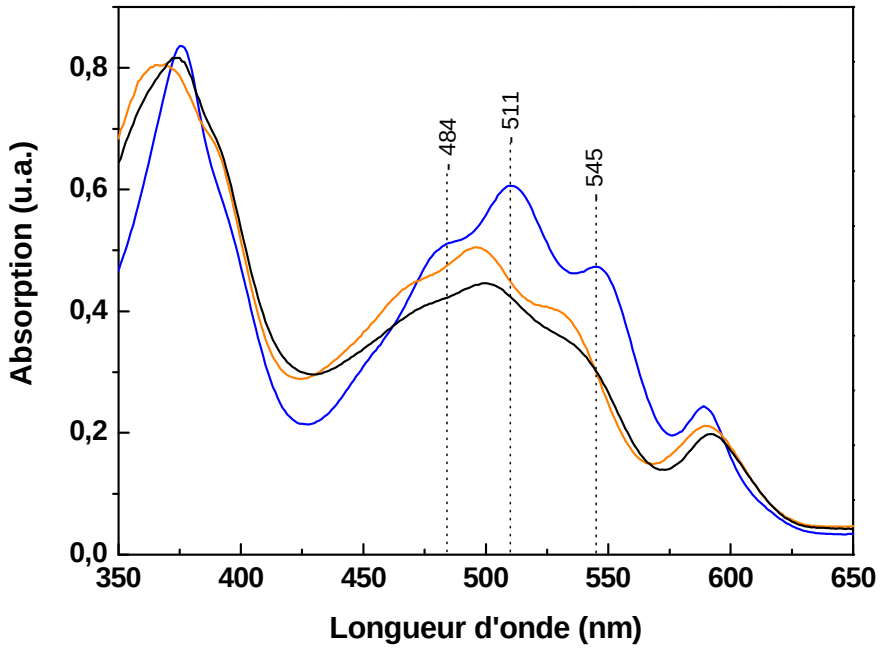


Figure 3-8 : Evolution du spectre d'absorption des caroténoïdes (450-550 nm) dans les membranes de S1 en présence de DDM et en fonction de la température : à 42°C (——), spectre initial ; à 60°C (——), en fin de phase de chauffe ; et à 42°C (——), en fin de phase de refroidissement.

Ces résultats tendent à montrer que la protéine LH1 de S1 se dissocie en présence de DDM et à température élevée. Nous avons mis en évidence l'existence des états monomériques et dimériques absorbant vers 777 et 820 nm respectivement. Il est de plus possible de réassocier

partiellement la protéine LH1 pour former un oligomère de taille proche de celui du LH1 absorbant vers 865 nm, en diminuant la température (la concentration de détergent reste inchangée au cours de l'expérience). L'évolution des spectres d'absorption des molécules de spirilloxanthine montrent que celles-ci sont sensibles à la température et se dissocient des polypeptides auxquels elles sont liées dans la forme native. La diminution et le déplacement des maximums d'absorption au cours de la phase de chauffe semblent montrer que les caroténoïdes s'agrégent et forment des micelles mixtes avec le DDM, tout en conservant leur structure fonctionnelle puisqu'ils présentent un spectre d'absorption semblable à celui obtenu en acétone/méthanol. Au cours de la phase de refroidissement, il est possible qu'une faible concentration de caroténoïdes soit capable de se réassocier avec les polypeptides pour former un oligomère possédant une structure proche du LH1, comme semble le confirmer la présence d'une bande d'absorption à 884 nm en fin d'expérience à 42°C. Cependant, la présence d'une bande d'absorption très majoritaire entre 860 et 870 nm indique que le processus de réassociation ressemble beaucoup à celui observé chez le mutant G9+ en présence de βOG, à savoir que les polypeptides sont capables de s'auto associer en conservant les liaisons avec les Bchls, mais sans interagir avec les caroténoïdes.

Les résultats obtenus en présence de détergent, DDM et βOG, montrent clairement que ces molécules ont une influence sur la formation d'états oligomériques intermédiaires au cours du processus de dissocation-réassociation de la protéine LH1. Si on retrouve un chemin d'auto-assemblage similaire à celui observé sur la protéine LH1 de G9 en présence d'OG, il semble toutefois que la dissociation des molécules de caroténoïdes de la protéine LH1 soit irréversible. En effet, l'ajout de détergent DDM favorise la perte d'interaction entre les dimères αβ et les molécules de caroténoïdes.

3.3 Influence de la température sur le processus de dissociation-réassociation des protéines LH1 de S1, G9 et S1S en membranes natives

La température constitue un facteur qui peut permettre d'obtenir des informations sur le processus de dissociation-association des protéines LH1 en membranes natives. Nous avons en effet montré qu'en augmentant la température (paragraphe 3.2.2), il était possible de mettre en

évidence l'existence de sous-unités oligomériques de la protéine LH1 en présence d'un détergent (DDM), alors que celui-ci a un comportement non dissociant et non dénaturant à température ambiante à forte concentration.
Le facteur température est utilisé dans ces expériences dans le but de rompre progressivement les interactions entre polypeptides membranaires, et ce de manière réversible. Nous chercherons cependant à limiter l'effet de la température sur les interactions entre les polypeptides et les pigments photosynthétiques (bactériochlorophylles et caroténoïdes) qui sont essentiels pour préserver la structure native de la protéine.

Les molécules de (bactério)chlorophylles peuvent subir de nombreuses dégradations chimiques ou enzymatiques. L'action simultanée d'enzymes, d'acides, oxygène, de lumière et de chaleur peut être à l'origine d'un nombre important de modifications chimiques aboutissant à des produits de dégradation comme la phéophytinisation, l'épimérisation mais également d'hydroxylation, d'oxydation ou photooxidation (en présence de lumière). Il est admis également que la conversion de la bactériochlorophylle en bactériophéophytine est influencée par le pH (Hynninen, 1991). En effet, au cours de cette réaction les ions hydrogène peuvent transformer la Bchla en Bpheoa par substitution de l'atome central de magnésium dans le cycle de porphyrine. Chez une grande majorité de bactéries pourpres, l'ion métal Mg^{2+} complexé au centre du macrocycle bactériochlorine est en interaction avec les résidus histidine des polypeptides α et β. L'état de protonation des histidines est un facteur essentiel pour assurer la coordination du magnésium au cycle imidazole de ces résidus, et cet état est fortement dépendant du pH (Fig. 3-9).

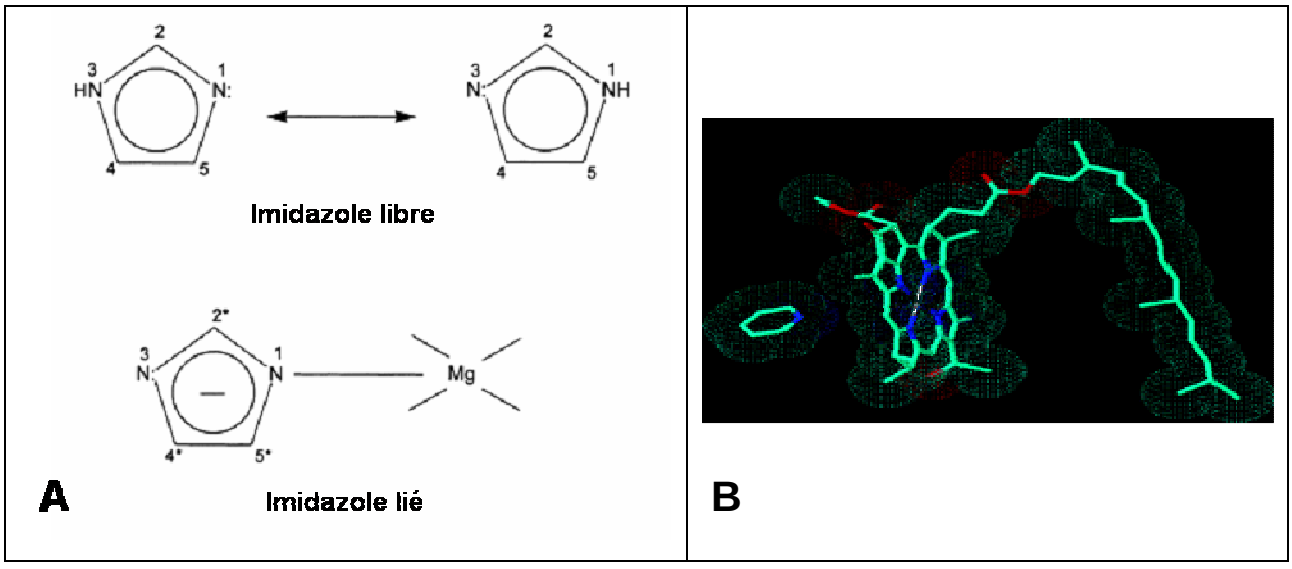


Figure 3-9 : A : Etats de protonation du cycle imidazole : libre et lié au magnésium.
B : représentation 3D de la coordination His-Bchla (d'après Kania and Fiedor (2006), J. Am. Chem. Soc.)

Des études à pH acide sur l'antenne collectrice de lumière B875 dans les membranes de Rb. *sphaeroides* ont montré que la coordination His-Mg peut être rompue et entraîner la libération de l'ion métal. Ce phénomène aboutit à la dénaturation de la protéine causée par la formation de Bchla libre absorbant à 770 nm puis à la dégradation chimique non réversible en Bpheoa absorbant vers 760 nm (Sturgis and Niederman, 1990).

Afin de minimiser les modifications chimiques des Bchla pouvant être induites par l'augmentation de la température au cours de nos études de dissociation de la protéine LH1, nous avons contrôlé différents paramètres susceptibles de favoriser la rupture de la liaison His-Bchla tels que le pH ou la concentration en oxygène. Pour les mesures de spectroscopie, les membranes intracytoplasmiques purifiées sont mises en solution dans un tampon dégazé à l'argon et contenant de l'acide ascorbique afin de prévenir la photooxidation des bactériochlorophylles caractérisée par des absorptions vers 435 et 680 nm (Lindsay Smith and Calvin, 1966) et des caroténoïdes. Nous avons travaillé dans un tampon 50 mM phosphate de potassium à des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 8,5. Le pH de ce tampon est très peu sensible aux variations de température.

3.3.1 Effet de la température sur l'oligomérisation des protéines LH1 : étude par spectroscopie d'absorption

Nous avons montré dans le chapitre 2 que la température génère un effet dynamique sur la protéine LH1 lorsque les membranes intracytoplasmiques sont étudiées dans une gamme de température non dénaturante, proche de la température physiologique à laquelle les bactéries vivent. A des températures élevées, la stabilité des protéines LH1 exprimées chez les bactéries S1, S1S et G9 est variable selon la souche étudiée. Nous avons montré que le complexe RC-LH1 de S1 présente une stabilité thermique supérieure au RC-LH1 de G9, puis au LH1 de S1S (Annexe 2). La température est donc un facteur physique qui peut favoriser des changements de conformation, la dissociation ou la dénaturation de la protéine LH1.

En tenant compte de ces informations et des paramètres importants présentés en introduction, il est primordial de définir une gamme de température pour laquelle ce facteur va entraîner la dissociation de la protéine LH1 sans la dénaturer.

3.3.1.1 Evolution du spectre d'absorption du RC-LH1 de S1 en fonction de la température

L'exemple présenté dans la Figure 3-10 montre l'évolution du spectre d'absorption du RC-LH1 de S1 au cours des phases de chauffe et de refroidissement dans une gamme de température comprise entre 45 et 75°C.

Au cours de la phase de chauffe (A), on note une diminution d'environ 60% et un déplacement de 8 nm (à 872) du maximum d'absorption de la transition Qy des Bchla (LH1-Bchl Q_y λ_{max}) à 880 nm. Cet effet est également observé sur l'absorption des caroténoïdes à 506 nm avec une diminution d'environ 0,2 unité DO et un déplacement du maximum de 7 nm (à 499 nm). D'autre part, on remarque une augmentation de l'absorption au niveau de la bande de Soret des Bchla vers 375 nm et l'apparition d'une bande d'absorption entre 700 et 800 nm avec pour maximum 777 nm (+0,16 unité DO).

Au cours de la phase de refroidissement (B), on remarque que l'absorption vers 375 nm continue d'augmenter. L'absorption des caroténoïdes augmente également de 0,04 unité de DO et le maximum d'absorption est déplacé de 7 nm (à 506 nm). Il est intéressant de noter que la bande d'absorption entre 700 et 800 nm diminue de 0,1 unité DO et que le maximum d'absorption est déplacé vers le bleu de 11 nm (à 766 nm). En parallèle à cette diminution, l'absorption de la LH1-Bchl Q_y λ_{max} augmente de 25% et se déplace vers le rouge de 8 nm.

Cette expérience montre qu'il est possible de dissocier puis de réassocier partiellement la protéine LH1 de S1 dans cette gamme de température.

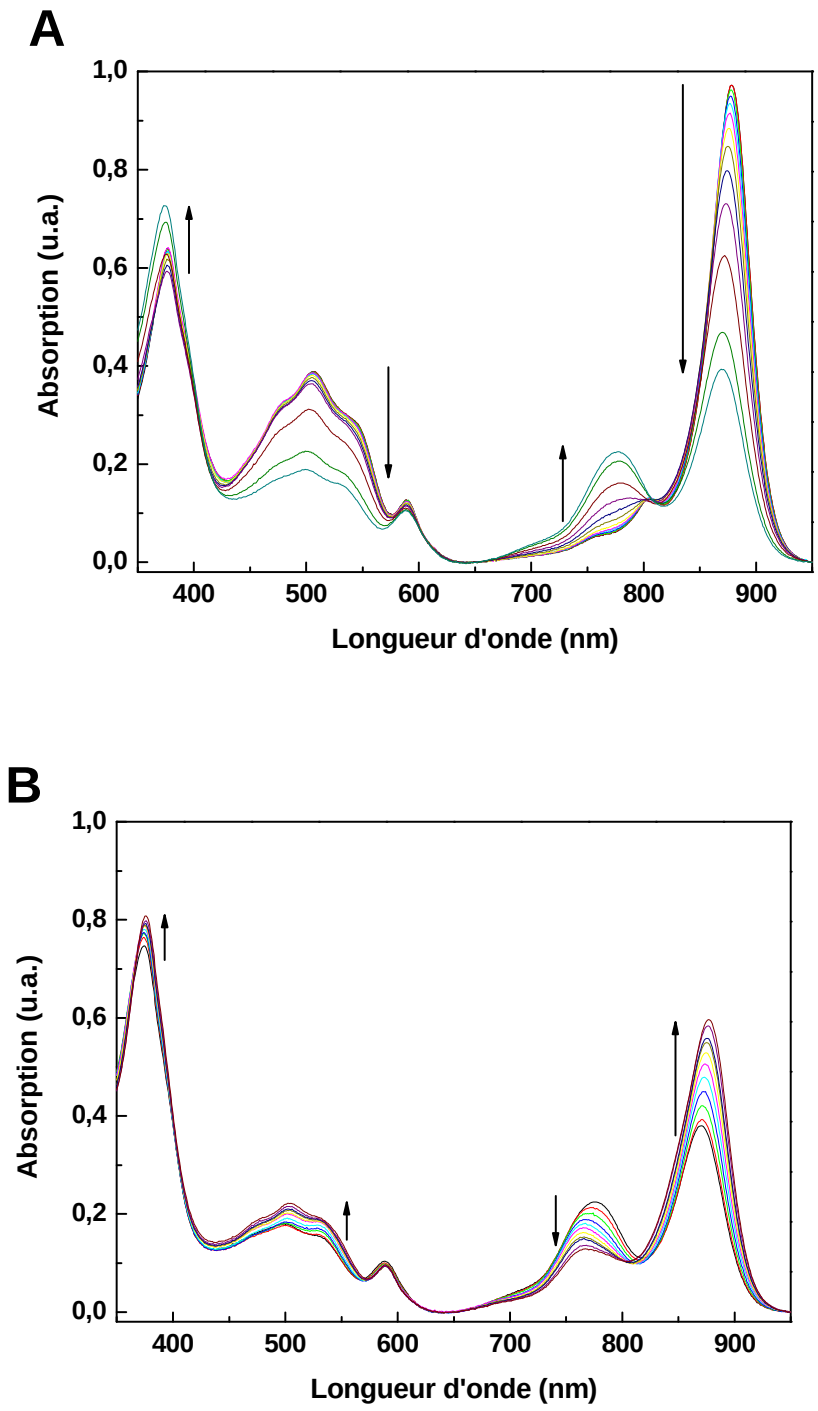


Figure 3-10 : Evolution du spectre d'absorption du RC-LH1 de *Rsp. rubrum* S1 entre 350 et 950 nm en fonction de la température. A) Phase de chauffe : de 45 à 75°C en 216 min; B) Phase de refroidissement : de 75 à 45°C en 378 min. Les flèches indiquent une augmentation ou une diminution de l'absorption.

3.3.1.2 Comparaison de l'évolution des spectres d'absorption des protéines LH1 de S1, G9 et S1S

Nous avons mené des expériences similaires à partir de membranes purifiées issues des souches mutantes S1S et G9. Le tableau XX ci-dessous présente les résultats que nous avons observés sur l'évolution des spectres d'absorption entre 350 et 950 nm de la protéine LH1 en fonction de la température.

			LH1 Bchl Qy (1)			Car (2)		Abs 777 nm
			Variation DO (3)	Δ DO (%)	Variation λmax (nm) (4)	Variation DO	Variation λmax (nm)	Variation DO
S1	45-57-45 (5)	PC (6)	-0,057	-5,7	-2	-0,027	-1	0,013
		PR	0,056	5,6	2	0,0004	1	-0,006
		Δ	0,001	-0,1	0	-0,027	0	0,007
	45-66-45	PC	-0,11	-11	-5	-0,021	-2	0,022
		PR	0,10	10	5	0,014	2	-0,014
		Δ	-0,01	-1	0	-0,07	0	0,08
	45-75-45	**PC**	**-0,59**	**-59**	**-8**	**-0,21**	**-7**	**0,16**
		PR	**0,25**	**25**	**8**	**0,04**	**7**	**-0,10**
		Δ	**-0,34**	**-34**	**0**	**-0,17**	**0**	**0,06**
S1S	45-57-45	PC	-0,15	-15	-3	-0,056	-1	0,031
		PR	0,07	7	3	-0,0094	1	-0,011
		Δ	-0,08	-8	0	-0,065	0	0,02
	45-66-45	PC	-0,66	-66	-8	-0,37	-2	0,17
		PR	0,22	22	6	0,06	3	-0,10
		Δ	-0,44	-44	-2	-0,31	1	0,07
	45-75-45	PC	-0,90	-90	-11	-0,38	-3	0,23
		PR	0,21	21	5	ND	ND	-0,14
		Δ	-0,70	-69	-6	ND	ND	0,09
	40-67-40	**PC**	**-0,51**	**-51**	**-9**	**-0,24**	**-3**	**0,12**
		PR	**0,20**	**20**	**9**	**0,03**	**3**	**-0,07**
		Δ	**-0,31**	**-31**	**0**	**-0,21**	**0**	**0,05**
G9	45-57-45	PC	-0,15	-15	-2			0,033
		PR	0,10	10	2			-0,02
		Δ	-0,05	-5	0			0,013
	45-66-45	PC	-0,34	-34	-2			0,09
		PR	0,11	11	4			-0,036
		Δ	-0,25	-25	2			0,054
	45-75-45	PC	-0,84	-84	-3			0,29
		PR	0,08	8	3			-0,04
		Δ	-0,76	-76	0			0,25
	40-61-40	**PC**	**-0,54**	**-54**	**-4**			**0,15**
		PR	**0,19**	**19**	**4**			**-0,05**
		Δ	**-0,35**	**-35**	**0**			**0,1**

(1) Transition électronique Qy des bactériochlorophylles du LH1
(2) Caroténoïdes (maximum d'absorption à 506 nm pour S1 et 513 nm pour S1S)
(3) Evolution de l'absorption (par rapport à une DO initiale de 1)
(4) Evolution de la longueur d'onde au maximum d'absorption de la Qy
(5) 45-57-45 correspond à l'expérience de montée et descente en température entre 45 et 57°C (cf. Matériels et Méthodes p. XX)
(6) PC : phase de chauffe ; PR : phase de refroidissement ; Δ : différence entre PC et PR
ND : non déterminé

Tableau 3-1 : Bilan des expériences de dissociation-réassociation de la protéine LH1 en fonction de la température. Evolution de l'absorption de la transition Qy des Bchls, des caroténoïdes de la protéine LH1 et à 777 nm.

Les 3 expériences réalisées, et récapitulées dans ce tableau, sur le complexe RC-LH1 de S1 montrent qu'il est difficile de dissocier la protéine LH1 à des températures inférieures à 66°C. En ce qui concerne les 2 souches mutantes, cette observation est également valable pour des températures inférieures à 57°C. Les expériences entre 45 et 75°C montrent un effet très important de la température sur la protéine LH1 de S1S et G9 puisque l'absorption de la LH1-Bchl Q_y λ_{max} diminue de 90% et 84% respectivement, avec un déplacement vers le bleu de 11 nm pour S1S et de 3 nm pour G9. Cette différence de déplacement entre les deux souches est liée à l'absence des caroténoïdes chez G9. Il est tout de même intéressant de remarquer que le maximum d'absorption de la transition Qy du LH1 des 3 souches étudiées n'est jamais déplacé en dessous d'une valeur proche de 869 nm.
Les résultats notés en bleu dans le tableau montrent des similitudes lorsque l'on s'intéresse au processus de dissociation-réassociation de la protéine LH1. En effet, les expériences menées entre 40 et 67°C pour S1S, et 40 et 61°C pour G9 présentent des amplitudes dans l'évolution du spectre d'absorption du LH1 semblables à celles observées sur la protéine LH1 de S1 entre 45 et 75°C. Dans les 3 expériences, le maximum d'absorption de la LH1-Bchl Q_y λ_{max} diminue d'environ 50-60% au cours de la phase de chauffe (dissociation) pour une augmentation d'environ 30-35% au cours de la phase de refroidissement (réassociation). Le déplacement du maximum d'absorption est totalement réversible, ce qui tend à démontrer qu'une partie des protéines LH1 est capable de se réassocier en conservant leurs structures natives.

3.3.2 Analyse du processus de dissociation-réassociation du LH1 de S1, G9 et S1S

La Figure 3-11 présente le bilan de l'expérience réalisée entre 45 et 75°C à pH 7,5 concernant le complexe RC-LH1 de S1. Les 3 spectres d'absorption de la Figure 3-11A correspondent à la température initiale à 45°C, en fin de phase de chauffe à 75°C et en fin de phase de refroidissement à 45°C. Lorsque l'on s'intéresse à l'absorption de la transition Qy en début et fin d'expérience, on s'aperçoit que la bande d'absorption du spectre final présente un élargissement plus important que celle obtenue pour le spectre initial. Bien que le maximum d'absorption soit à 879 nm pour les deux spectres, la largeur à mi-hauteur (FWHM : full width at half maximum) du spectre initial est égale à 545 cm^{-1} tandis qu'elle est égale à 701 cm^{-1} pour le spectre final. La différence de 156 cm^{-1} entre les deux formes spectrales montre que les transitions électroniques de plus basse énergie sont affectées au cours du processus de dissociation-réassociation. Le spectre intermédiaire (à 75°C) présente une bande d'absorption dont la largeur à mi-hauteur est égale à 675 cm^{-1}. Sur la Figure 3-11B sont représentées les soustractions de spectre permettant d'obtenir des informations sur l'évolution des formes spectrales en présence, tout particulièrement dans la région du proche infrarouge. La soustraction entre le spectre initial et celui obtenu en fin de phase de chauffe met en évidence la diminution et le déplacement du maximum d'absorption de la transition Qy, mais aussi l'apparition d'un pic d'absorption dont le maximum est à 774 nm.

La soustraction entre le spectre final et le spectre en fin de phase de chauffe montre clairement une augmentation de l'absorption de la Qy et la diminution d'une bande d'absorption dont le maximum est à 777 nm. Cette opération suggère également l'apparition d'une absorption vers 850 nm. Enfin, la soustraction entre le spectre initial et le spectre final montre l'existence d'une bande d'absorption vers 767 nm.

Les Figures 3-11C et D montrent respectivement l'évolution des maximums d'absorption des Bchls et de caroténoïdes ainsi que l'absorption à 777 nm. Ces évolutions reflètent d'une part la dissociation de la protéine LH1 liée à l'augmentation de la température entre 45 et 75°C, et d'autre part sa réassociation partielle par le refroidissement entre 75 et 45°C.

L'évolution de l'absorption des caroténoïdes (Fig. 3.11C) est sensiblement différente de celle des Bchls aussi bien pendant la dissociation que la réassociation de l'antenne. Cette différence peut être induite par la présence des pigments liés au centre réactionnel.

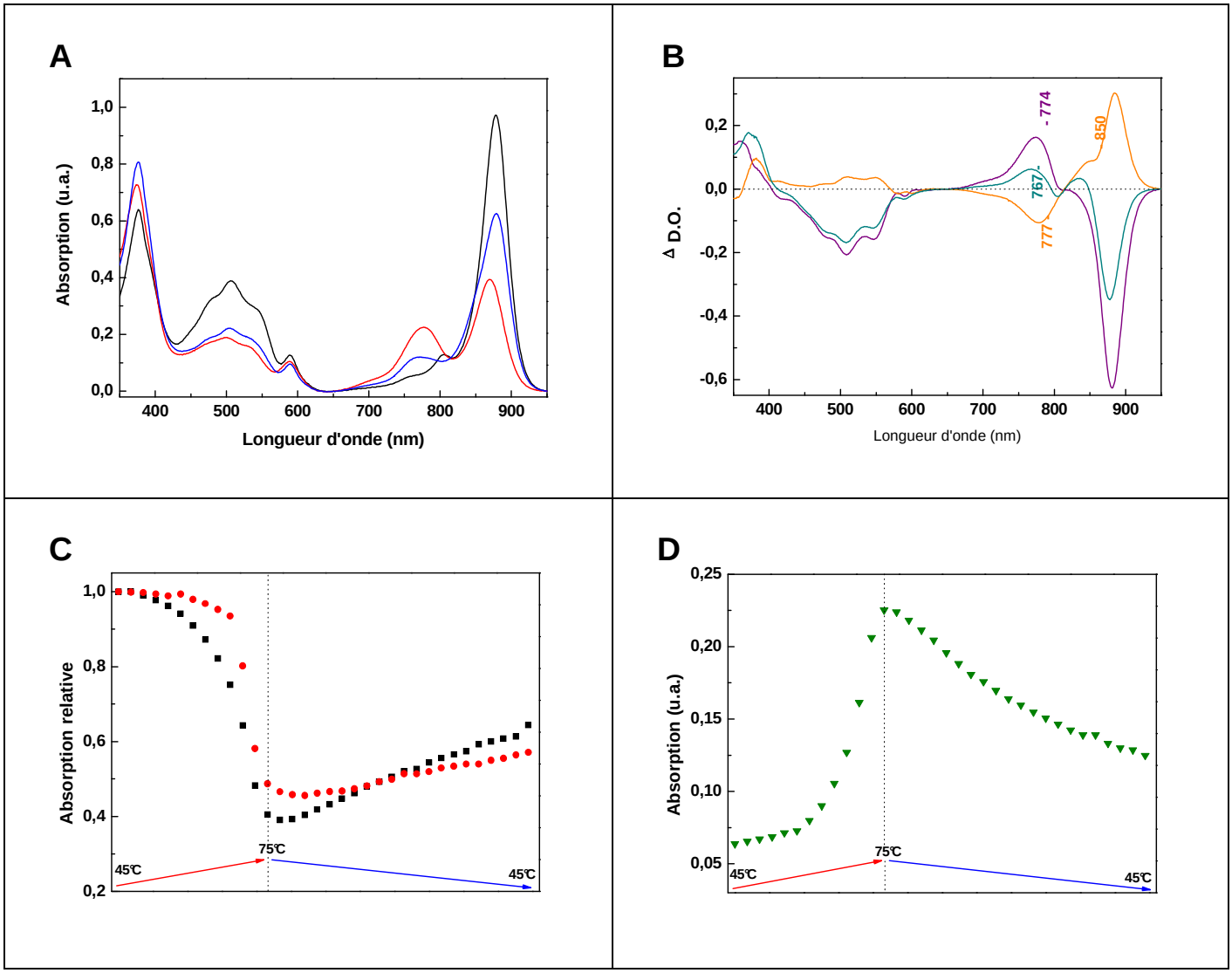
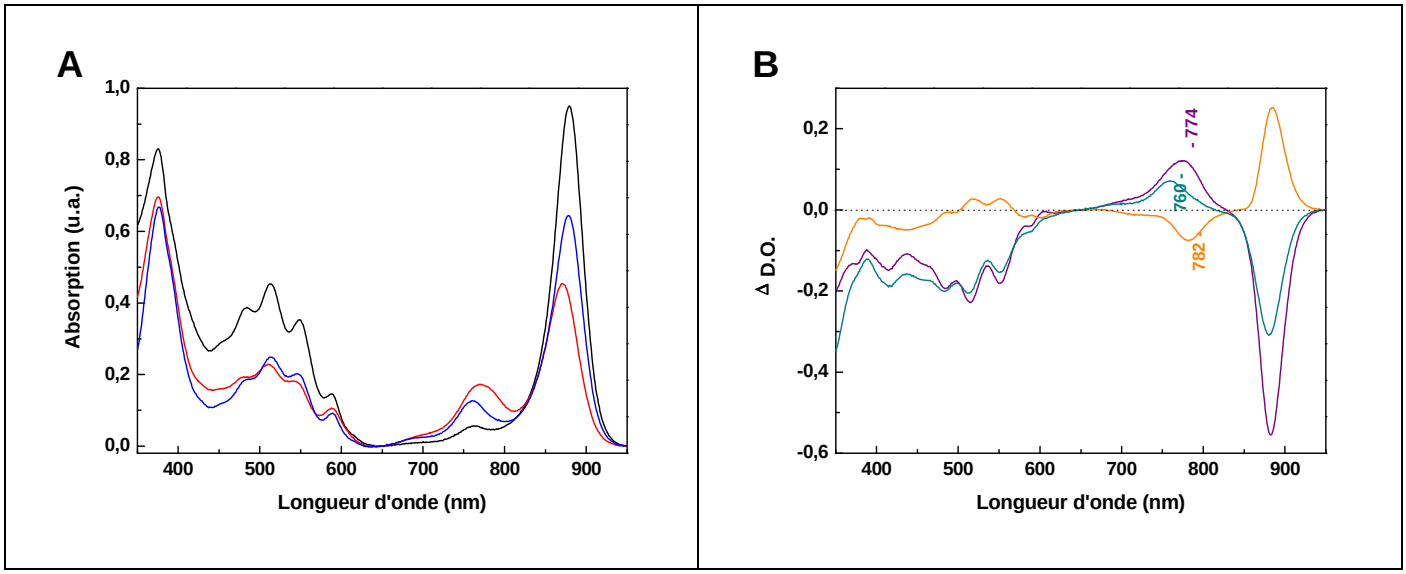


Figure 3-11 : Dissociation-réassociation de la protéine LH1 chez Rsp. rubrum S1 entre 45 et 75°C à pH 7,5. A) Spectres d'absorption à 45°C (——), température initiale ; à 75°C (——), fin de phase de chauffe ; et à 45°C (——), fin de phase de refroidissement. B) Soustractions des spectres d'absorption : (——) : 45°C initial - 75°C ; (——) : 45°C fin - 75°C ; (——) : 45°C initial - 45°C fin. C) Evolution des maximums d'absorption de la transition Qy des Bchls (—■—) et des caroténoïdes à 513 nm (—●—). D) Evolution de l'absorption à 777 nm (—▼—)

La Figure 3-12 présente le bilan de l'expérience réalisée entre 40 et 67°C à pH 7,5 concernant la protéine LH1 de S1S. Les spectres d'absorption présentés montrent en particulier l'évolution des transitions de plus basse énergie des molécules de Bchls liées à la protéine LH1 en début d'expérience à 40°C, en fin de phase de chauffe à 67°C et en fin de phase de refroidissement à 40°C. La bande d'absorption de la transition Qy présente un élargissement entre les spectres initial (FWHM= 545 cm^{-1}) et final (584 cm^{-1}), caractérisé par une différence de la largeur à mi-hauteur de 39 cm^{-1}. Le spectre obtenu à 67°C présente une bande

d'absorption de la Qy dont la valeur FWHM est égale à 636 cm^{-1}. Les soustractions des spectres présentées sur la Figure 3-12B mettent en évidence la diminution du maximum d'absorption de la Qy et l'apparition d'une bande d'absorption dont le maximum est à 774 nm pendant la phase de chauffe. On remarque au cours de la phase de refroidissement une diminution d'une bande d'absorption vers 782 nm et l'augmentation de l'absorption vers 880 nm, sans épaulement vers 850 nm. Enfin, la différence entre le spectre initial et final montre qu'une bande d'absorption dont le maximum est à 760 nm apparaît au cours de la dissociation et reste majoritaire à la fin de la phase de refroidissement. La Figure 3-12C montre l'évolution des maximums d'absorption des Bchls et des caroténoïdes au cours du cycle de chauffe et de refroidissement. La diminution de ces absorptions au cours de la phase de chauffe semble être en adéquation puisqu'elles sont de même amplitude. On observe par contre des cinétiques très différentes pendant la phase de refroidissement. La Figure 3-12D, qui met en évidence l'évolution de l'absorption à 777 nm qui montre qu'il apparaît une forme spectrale pendant la phase de chauffe, capable de disparaître partiellement pendant le refroidissement de l'échantillon.



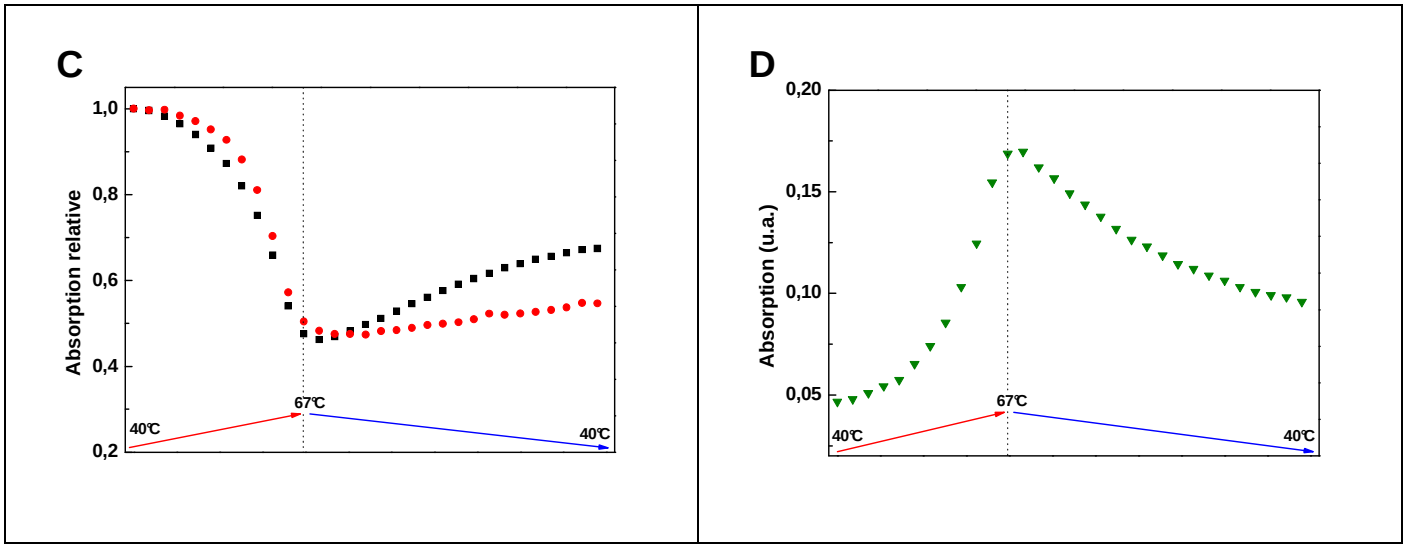


Figure 3-12 : Dissociation-réassociation de la protéine LH1 chez Rsp. rubrum S1S entre 40 et 67°C à pH 7,5. A) Spectres d'absorption à 40°C (——), température initiale ; à 67°C (——), fin de phase de chauffe ; et à 40°C (——), fin de phase de refroidissement. B) Soustractions des spectres d'absorption : (——) : 40°C initial - 67°C ; (——) : 40°C fin - 67°C ; (——) : 40°C initial - 40°C fin. C) Evolution des maximums d'absorption de la transition Qy des Bchls (—■—) et des caroténoïdes à 506 nm (—●—). D) Evolution de l'absorption à 777 nm (—▼—)

La Figure 3-13 présente le bilan de l'expérience réalisée entre 40 et 61°C à pH 8,5 concernant le complexe RC-LH1 de G9. La Figure 3-13A représente les 3 spectres obtenus en début d'expérience à 40°C, en fin de phase de chauffe et en fin de phase de refroidissement. Comme nous l'avons observé au cours des expériences sur le complexe RC-LH1 de S1 et la protéine LH1 de S1, la bande d'absorption de la transition Qy du spectre final à 40°C présente un élargissement par rapport au spectre initial à 40°C. La largeur à mi-hauteur est égale à 532 cm^{-1} en début d'expérience alors qu'elle est égale à 610 cm^{-1} à la fin de l'expérience, soit une différence de 78 cm^{-1}. La valeur obtenue pour le spectre intermédiaire à 61°C est de 662 cm^{-1}. La Figure 3-13B représente les différences entre ces 3 spectres : on remarque que la soustraction entre le spectre initial à 40°C et en fin de phase de chauffe à 61°C montre l'apparition d'une bande d'absorption ayant pour maximum 776 nm. La soustraction entre le spectre final et le spectre intermédiaire à 61°C montre une augmentation de l'absorption de la Qy et une diminution d'une bande d'absorption dont le maximum est à 781 nm. La différence spectrale entre le début et la fin de l'expérience montre clairement la présence d'une bande d'absorption à 776 nm. Les Figures 3-13C et D représentent respectivement l'évolution des maximums d'absorption de la Qy et du pic à 777 nm.

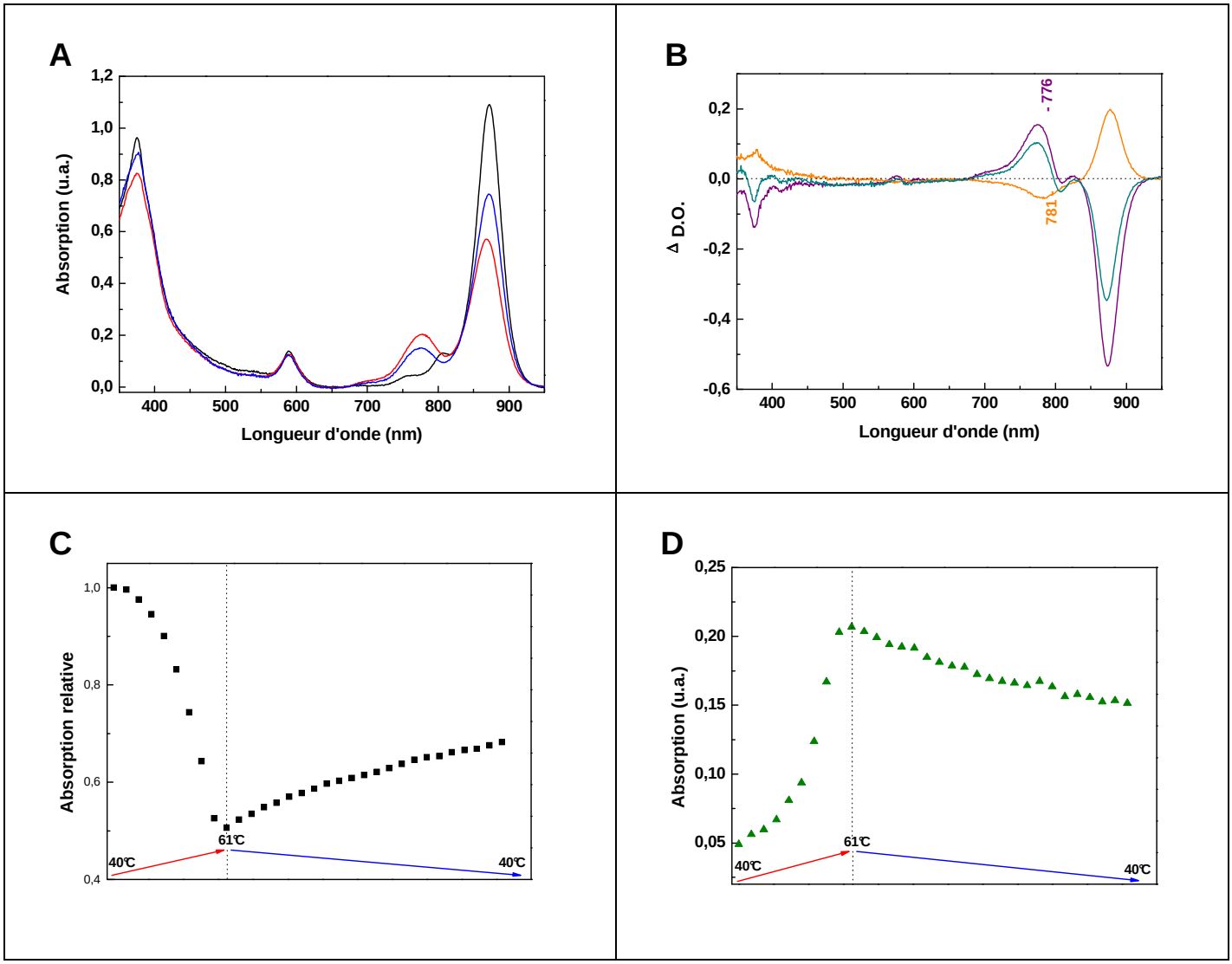


Figure 3-13 : Dissociation-réassociation de la protéine LH1 chez Rsp. rubrum G9 entre 40 et 61°C à pH 8,5. A) Spectres d'absorption à 40°C (——), température initiale ; à 61°C (——), fin de phase de chauffe ; et à 40°C (——), fin de phase de refroidissement. B) Soustractions des spectres d'absorption : (——) : 40°C initial - 67°C ; (——) : 40°C fin - 67°C ; (——) : 40°C initial - 40°C fin. C) Evolution des maximums d'absorption de la transition Qy des Bchls (—■—) D) Evolution de l'absorption à 777 nm (—▼—)

3.3.2.1 Bilan de l'effet de la température sur l'oligomérisation des protéines LH1

Les différentes analyses qui viennent d'être présentées, montrant l'évolution des spectres d'absorption des protéines LH1 dans les membranes de *Rsp. rubrum* S1, S1S et G9 à des

températures élevées, permettent d'obtenir des informations importantes sur le processus de dissociation-réassociation de cette protéine dans son environnement quasi-naturel.
Nous avons tout d'abord montré i) qu'il est possible de définir des gammes de températures pour lesquelles est induite la dissociation de la protéine LH1 sans entraîner sa dénaturation totale, et ii) qu'il est possible de réassocier partiellement la protéine LH1.

Pendant la phase de chauffe, l'évolution de l'absorption de la transition Qy des Bchls liées au LH1 montre que le maximum d'absorption diminue d'environ 50-60% et se déplace vers le bleu de 4 à 9 nm suivant la souche étudiée. D'après nos résultats, il est impossible que ce déplacement évolue lorsque le maximum d'absorption est à 868-869 nm. Dans le même temps, on note l'apparition d'une bande d'absorption entre 730 et 800 nm ayant pour maximum 774 ou 776 nm. L'élargissement de cette bande d'absorption autour de ces maximums est en faveur de la présence de la forme monomérique B777 et de la Bchla libre (absorbant à 770 nm).

Pendant la phase de refroidissement, le maximum d'absorption de la Qy est déplacé vers le rouge avec la même amplitude que lors de la phase de chauffe (4 à 9 nm), mais l'augmentation de son intensité n'est que de 30-35%. Cet effet est du à la contribution de la bande d'absorption qui diminue en intensité et dont le maximum est à 777, 781 et 782 nm (pour S1, G9 et S1S respectivement) et correspond donc principalement à l'espèce monomérique B777 capable de s'autoassocier. Dans le même temps, les soustractions entre le spectre initial et le spectre final mettent en évidence en fin d'expérience la présence d'une bande d'absorption dont les maximums sont à 767, 760 et 776 nm pour S1, S1S et G9. Les espèces moléculaires qui présentent ces absorptions ne participent pas au processus de réassociation. D'après la littérature et les effets de la température sur la nature chimique des pigments photosynthétiques présentés en introduction, il est possible d'observer la formation de Bpheo à partir de Bchl dans les chromatophores ou les liposomes. En effet, des études ont montré que l'absorption de Bchla libre à 770 nm est transformée en Bpheoa absorbant entre 750 et 760 nm, cette dernière pouvant être convertie en Bpheo absorbant vers 850 nm (Fujimori, 1969; Kobayashi et al., 2005). De plus, l'existence d'oligomères de Bchl et d'agrégats de Bpheo a été démontrée lors du travail publié par Scherz et al. (Scherz and Parson, 1984). Cette étude montre qu'il est possible de former des agrégats de Bchl et de Bpheo dans des solutions mixtes solvant/eau ou bien détergent/eau possédant des maximums d'absorption très proches de ceux observés chez les protéines photosynthétiques

bactériennes (Annexe 5). Les monomères de Bchl absorbant à 770 nm et de Bpheo absorbant vers 760 nm peuvent s'agréger pour former des oligomères de Bchl absorbant à 852 nm et de Bpheo absorbant à 849 nm. Au cours de la formation de ces oligomères, les transitions électroniques Qx, Bx et By sont, comme la transition Qy, également déplacées vers le rouge. Dans nos expériences, il semble que la démétalisation des Bchls soit effective à partir de 65°C, c'est pourquoi la modification chimique des Bchls notamment est plus importante pendant les expériences sur les membranes de S1 entre 45°C et 75°C ; ceci est mis en évidence par la présence d'un pic d'absorption à 767 nm en fin d'expérience et l'apparition d'une absorption vers 850 nm pendant le phase de refroidissement. La cinétique de dégradation des Bchl en Bpheo, et l'agrégation de ces molécules, débutent à des températures supérieures à 65°C est n'est pas arrêté par le refroidissement.

Pour les expériences sur les membranes de S1S jusqu'à 67°C et de G9 jusqu'à 61°C, cet effet de la température sur la nature chimique des Bchls est moins important. Cependant, on retrouve une bande d'absorption dont le maximum est à 760 nm pour S1S en fin d'expérience à 40°C, mais du fait de la faible stabilité thermique de la protéine LH1 de S1S, le spectre initial à 40°C présente également un épaulement vers 760 nm. En ce qui concerne l'expérience réalisée sur les membranes de G9 jusqu'à 61°C, le maximum de la bande d'absorption à 776 nm observé en fin de phase de chauffe est également présent en fin de phase de refroidissement, mais avec une DO moins importante. La Bchla ne semble pas transformée en Bpheo au cours de cette expérience, mais l'existence de la bande d'absorption à 776 nm est en faveur de la coexistence de la forme monomérique B777 et de Bchls libres. Le mécanisme de démétalisation de la Bchla est donc minimisé à pH 8,5 par rapport à l'effet observé sur les membranes de S1 et S1S à pH 7,5. Cette observation est en corrélation avec les études réalisées sur l'effet du pH sur la dénaturation des protéines photosynthétiques (cf. Introduction).

Si l'on s'intéresse aux spectres d'absorption du LH1 de S1S et du RC-LH1 de S1 obtenus en fin de phase de refroidissement, on remarque une augmentation simultanée de l'absorption de la transition Qy et de la bande d'absorption des caroténoïdes. Etant donné que le déplacement du maximum d'absorption de la Qy est totalement réversible pendant le traitement en fonction de la température, les caroténoïdes semblent liés aux polypeptides capables de se réassocier (environ 30%) pour former un oligomère de plus grande taille.

Nous n'avons pas observé au cours de nos expériences l'existence de formes spectrales intermédiaires entre l'anneau (absorbant vers 875 nm) et le monomère (absorbant vers 780

nm). En effet, la présence de l'espèce dimérique B820, décrite dans la littérature en présence d'βOG et que nous avons mise en évidence par les expériences en DDM et par effet de la température, n'a pas été révélée au cours de nos expériences en membranes natives. Hors, comme nous l'avons décrit en début de Chapitre, la forme B820 composée des deux polypeptides α et β liant chacun une molécule de Bchl a été décrite comme étant l'unité de base structurale à l'origine de l'oligomérisation de la protéine LH1.

Nous avons également observé un élargissement de la bande d'absorption de la Qy entre le spectre initial et le spectre final pour les 3 types de membranes étudiées. Cet élargissement, déterminé par la largeur à mi-hauteur du pic (FWHM), est caractéristique de l'organisation de l'agrégat circulaire de Bchl de l'anneau de LH1. Pour les spectres initiaux, cette valeur est proche de 540 cm^{-1} pour S1, S1S et G9, alors qu'après les cycles de chauffe et de refroidissement cette valeur est égale à 600 cm^{-1} si on ne tient pas compte de la valeur obtenue (701 cm^{-1}) pour laquelle la protéine LH1 de S1 semble partiellement dénaturé à 75°C (présence d'une absorption vers 850 nm). De toute évidence, la différence d'environ 60 cm^{-1} entre la Qy de la protéine LH1 native et celle de la protéine LH1 réassociée indique que cette dernière présente un agrégat circulaire de Bchls plus désordonné.

L'amplitude du désordre de l'anneau de Bchls au sein de ces protéines peut être contrôlé par dichroïsme circulaire, une technique qui permet d'avoir des informations sur le "rayon de courbure" des anneaux. L'allure générale du spectre de dichroïsme circulaire peut ainsi nous être utile pour déterminer le type d'anneau formé au cours de la réassociation ou éventuellement des perturbations engendrées par l'effet de la température.

3.3.2.2 Interactions électroniques des Bchls du LH1 par dichroïsme circulaire

Dans le Chapitre 2, nous avons montré que les pigments photosynthétiques liés aux complexes RC-LH1 présentaient, du fait de leur capacité d'absorption de la lumière, un signal très particulier en dichroïsme circulaire (DC). Cette technique permet d'évaluer le changement de polarisation de la lumière induit par l'échantillon, par la mesure de sa capacité à absorber une lumière polarisée circulairement gauche ou droite.

Les spectres de dichroïsme circulaire dans le proche infrarouge peuvent donc représenter un indicateur très sensible de l'état d'agrégation et d'orientation des Bchls liés aux polypeptides membranaires et des altérations des anneaux de protéines antennes bactériennes de type LH (Cogdell and Scheer, 1985; Koolhaas et al., 1997). Il a été proposé en particulier, pour les

protéines LH2 des bactéries pourpres non sulfureuses, que l'intense signal de DC en forme de S observé pour la transition électronique de plus basse énergie, soit issu des interactions entre Bchls non voisines. La forme de l'agrégat circulaire de Bchls de l'anneau correspond en réalité à une somme de dimères de Bchls en interaction les uns avec les autres. Cette organisation fait que chaque dimère "isolé" ne présente pas de signal en DC caractéristique.

La Figure 3-14A représente les spectres d'absorption du RC-LH1 dans les membranes de S1 à une température initiale de 40°C, en fin de phase de chauffe à 75°C et en fin de phase de refroidissement à 40°C. La Figure 3-14B montre les spectres de dichroïsme circulaire correspondant à l'échantillon en début d'expérience (à 40°C, avant dissociation) et en fin d'expérience (à 40°C, après réassociation). Les spectres d'absorption et de DC du RC-LH1 en début d'expérience à 40°C sont caractéristiques du complexe natif que nous avons observé dans le Chapitre 2. Le spectre d'absorption a pour maximum 879 nm, correspondant au signal de la transition Qy, tandis que le spectre de DC est composé du signal du centre réactionnel à 796 nm et du signal non conservatif en forme de S de la protéine LH1 : un pic positif à 865 nm, un pic négatif à 897 nm et un point de croissement à zéro vers 876 nm.

Les spectres d'absorption et de DC en fin d'expérience à 40°C sont différents de ceux observés au début de l'expérience. Le pic d'absorption de la transition Qy du LH1 a pour maximum 877 nm, mais présente un élargissement important avec notamment un épaulement vers 850 nm. Le spectre de DC est inversé et plus intense par rapport à celui du RC-LH1 en début d'expérience, avec la perte du signal du centre réactionnel qui est dénaturé pendant la phase de chauffe. Le signal obtenu est composé d'un pic négatif avec deux épaulements vers 800 et 845 nm, d'un pic positif très intense et très large avec pour maximum 870-875 nm et d'un point de croissement à zéro à 853 nm. Nous avons montré précédemment que la contribution de l'absorption vers 850 nm pouvait être due à la formation d'agrégats de Bchls et de Bpheos à partir de la dissociation des Bchls monomériques liées à la protéine LH1 au cours de la montée en température. Des études montrent que ces larges oligomères, observables en microscopie électronique, présentent un spectre de dichroïsme circulaire très intense et dont l'allure générale ressemble beaucoup au spectre de DC que nous avons obtenu : un pic négatif de faible intensité entre 750 et 850 et un pic positif très intense entre 850 et 900 nm (Scherz and Parson, 1984; Scherz et al., 1991).

Le spectre de DC que nous avons obtenu pourrait être la résultante du spectre non conservatif du LH1 réassocié partiellement et du spectre des oligoméres de Bchl et Bpheo. Ce dernier étant beaucoup plus intense, il pourrait "masquer" le signal du LH1 réassocié.

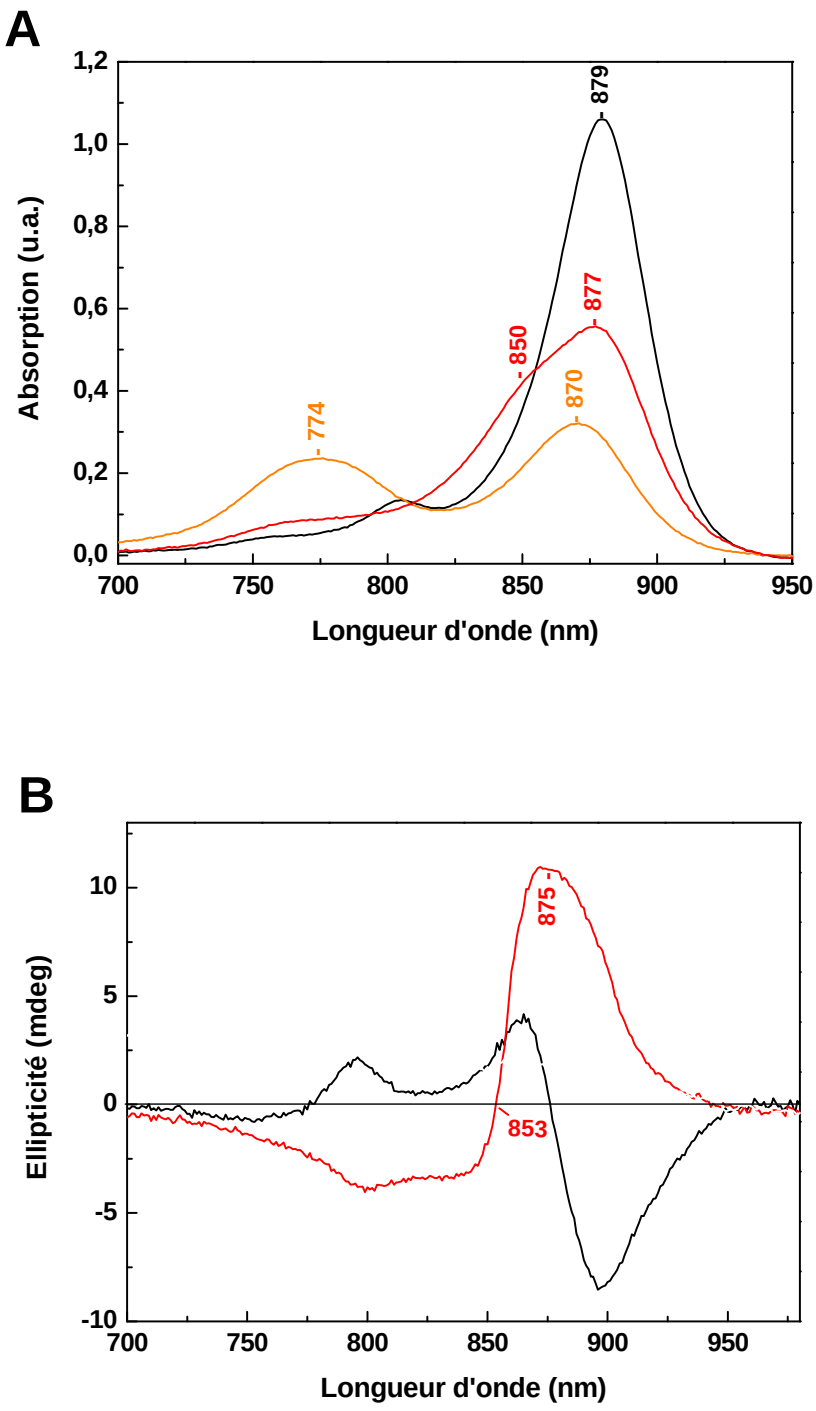
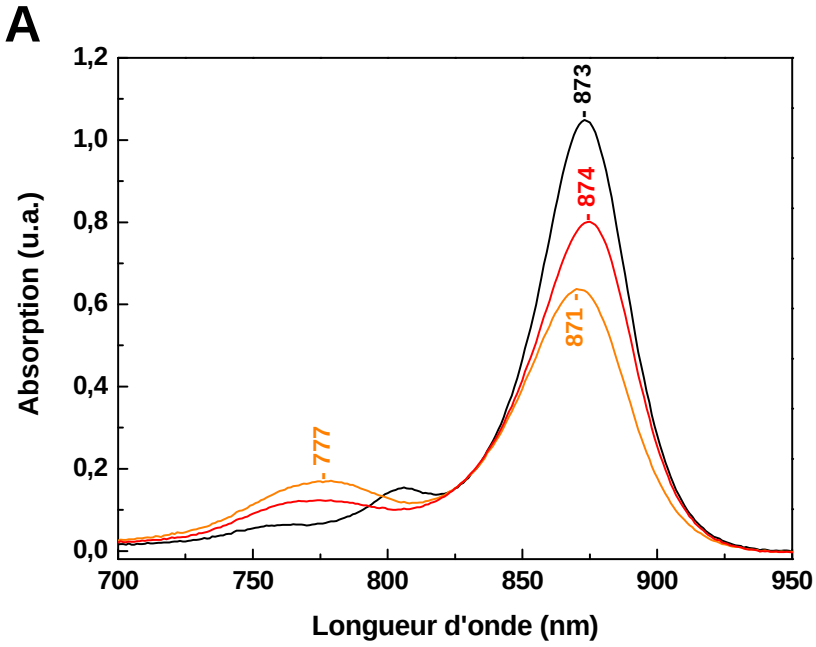


Figure 3-14: Effet de la température sur le complexe RC-LH1 de S1. A) par spectroscopie d'absorption : à 40°C (——), température initiale ; à 75°C (——), fin de phase de chauffe ; et à 40°C (——), fin de phase de refroidissement. B) par dichroïsme circulaire : à 40°C (——) à la température initiale et à 40°C (——) en fin de phase de refroidissement.

Les spectres d'absorption dans la région du proche infrarouge du RC-LH1 dans les membranes de G9 sont présentés sur la Figure 3-15A. Trois spectres ont été mesurés à la

température initiale de 30°C, en fin de phase de chauffe à 61°C et en fin de phase de refroidissement à 30°C. Les deux spectres de dichroïsme circulaire de la Figure 3-15B correspondent aux échantillons dont les spectres d'absorption ont été mesurés en début (30°C) et fin d'expérience (30°C). Les spectres d'absorption et de DC à la température initiale sont caractéristiques du complexe RC-LH1 natif. Le spectre d'absorption est composé des pics d'absorption à 752 et 805 nm caractéristique des Bpheo et Bchl liés au centre réactionnel et d'un pic d'absorption majoritaire correspondant à la transition Qy des Bchls du LH1. Le spectre DC est composé d'un signal à 796 nm du centre réactionnel et d'un signal non conservatif caractéristique du LH1 avec un pic positif à 858 nm, un pic négatif plus intense à 880 nm et un point de croissement à zéro vers 865 nm. Au cours du traitement en fonction de la température, l'évolution du spectre d'absorption montre la perte des pics du centre réactionnel et un équilibre entre un pic vers 777 nm et un pic 871-874 nm. On observe distinctement la dissociation de la protéine LH1 par la formation de la bande à 777 nm et la diminution de l'intensité du maximum d'absorption de la Qy (avec un déplacement de 2 nm). La réassociation partielle du LH1 est avérée par la diminution de la bande d'absorption vers 777 nm et par l'augmentation du maximum d'absorption de la Qy et son déplacement vers le rouge de 3 nm (à 874 nm). Nous n'observons pas au cours de cette expérience la présence d'une bande vers 850 nm, prouvant ainsi que la formation de Bchl et Bpheo libres est négligeable. Le spectre de DC de la protéine LH1 reconstituée est inversé par rapport à celui observé pour la protéine LH1 native. En effet, ce spectre est composé d'un signal négatif entre 750 et 862 m avec une bande vers 815 nm et un pic à 853 nm, et d'un signal positif plus intense avec un pic à 880 nm. Le point de croissement à zéro est localisé à 862 nm. Ce signal DC obtenu sur la protéine LH1 reconstituée en membrane (donc en présence de lipides) possède une allure générale qui ressemble beaucoup au spectre de DC obtenus sur la protéine LH1 de G9 reconstituée à partir de l'espèce B820 en présence de détergent βOG, et dont le maximum d'absorption de la Qy est à 869 nm (Lapouge, 1999; Pandit et al., 2003). Des spectres de DC obtenus sur des membranes de la souche GT9 exprimant la protéine LH1 seule et sans caroténoïdes présentent le même signal. Cependant, dans ce cas présent, la stabilité de la protéine semble très faible et on note la présence par spectroscopie d'absorption de Bpheo libre (Lapouge, 1999). Dans notre expérience, le spectre d'absorption du LH1 reconstitué en présence de lipides présente un maximum d'absorption à 874 nm dans la région proche infrarouge alors que ce maximum est toujours à 868-869 nm pour la protéine LH1 reconstitué en présence de βOG. Les spectres de DC identiques dans ces 2 cas laissent supposer que la protéine LH1 se réassocie en adoptant une conformation oligomérique

semblable. Nous avons en effet déjà montré le rôle important du détergent sur le déplacement du maximum d'absorption de la Qy des Bchls du LH1. Nous ne pouvons pas exclure non plus la possibilité de formation d'agrégats de Bchl et Bpheo absorbant vers 850 nm en fin de phase de refroidissement, ce qui pourrait expliquer pourquoi nous observons une inversion du signal DC comme montré sur la protéine LH1 reconstituée de S1. De plus, le spectre d'absorption final présente un élargissement de la bande de la Qy caractéristique d'un agrégat circulaire de Bchls fortement désordonné. Cette information tend à prouver que l'organisation des Bchls dans l'anneau de LH1 reconstitué est différente de celle des Bchls du LH1 natif *via* les interactions polypeptide/Bchl mais surtout Bchl/Bchl, puisque c'est par dichroïsme circulaire que nous observons les différences les plus importantes.



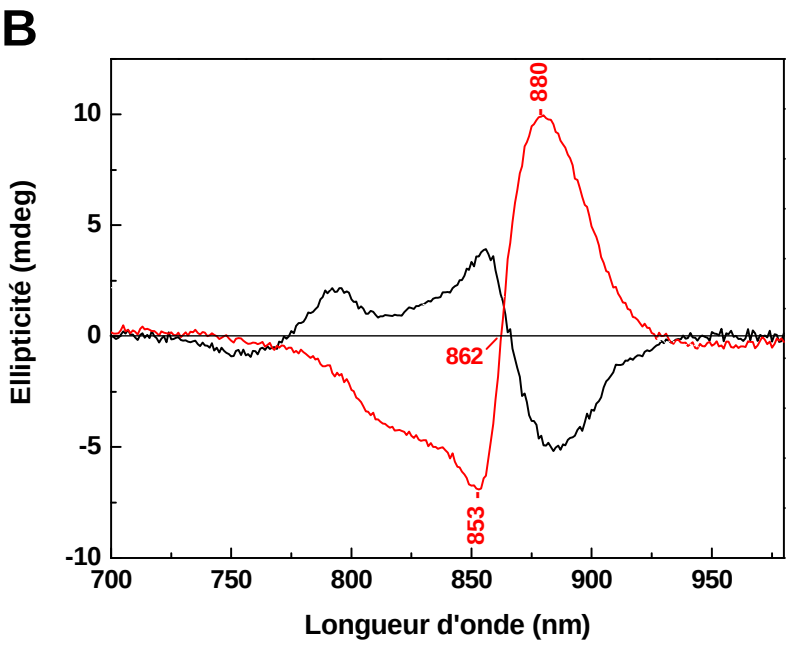


Figure 3-15 : Effet de la température sur le complexe RC-LH1 de G9. A) par spectroscopie d'absorption : à 40°C (——), température initiale ; à 61°C (——), fin de phase de chauffe ; et à 40°C (——), fin de phase de refroidissement. B) par dichroïsme circulaire : à 40°C (——) à la température initiale et à 40°C (——) en fin de phase de refroidissement.

3.4 Conclusion : chemin de dissociation et réassociation de la protéine LH1 en membrane native

Dans ce Chapitre, nous avons étudié l'effet de la température sur le processus de dissociation-réassociation de la protéine LH1 dans son environnement natif. Nous avons pu montrer qu'il était possible de reconstituer partiellement la protéine sous l'effet de la température, mais que l'organisation de l'anneau de Bchls de cette protéine est très sensiblement plus désordonné que dans l'anneau de Bchls de la protéine LH1 native.

Au cours du processus de dissociation-réassociation de la protéine LH1 en membrane native, nous avons pu mettre en évidence l'absence d'états oligomériques intermédiaires de type B820 comme ceux que nous avons pu déterminés en présence de détergent DDM et en fonction de la température. L'oligomérisation de la protéine LH1 en membrane native emprunte donc un chemin différent (cf. Fig. 3-16, voie A), entre la forme monomérique (B777) et la forme annulaire

(B875), montrant ainsi une coopérativité supérieure en milieu lipidique par rapport à ce qui se produit en présence de molécules de détergent.

Nous avons également pu montrer que la dissociation de la protéine LH1 à des températures élevées entraîne la libération et la possible modification chimique des pigments photosynthétiques (Bchl, Bpheo, Car) (Fig. 3.16, voie B), capables de s'auto associer de manière irréversible au cours de la phase de refroidissement pour former des agrégats de taille importante (Fig. 3.16, voie C). L'expérience proposée en Annexe 5 tend à montrer que les Bchls en présence de détergent peuvent former des agrégats absorbant vers 850 nm.

L'équilibre entre l'auto agrégation des molécules de Bchls et leurs interactions avec les polypeptides qui composent la protéine semble être un élément central concernant la formation de l'anneau de LH1. On remarque d'une part que l'auto agrégation des pigments est un processus compétitif pour l'assemblage du LH1 mais que, d'autre part, ce processus est utile pour assister l'oligomérisation des polypeptides entre eux et participer à la stabilité du complexe LH1 ainsi formé.

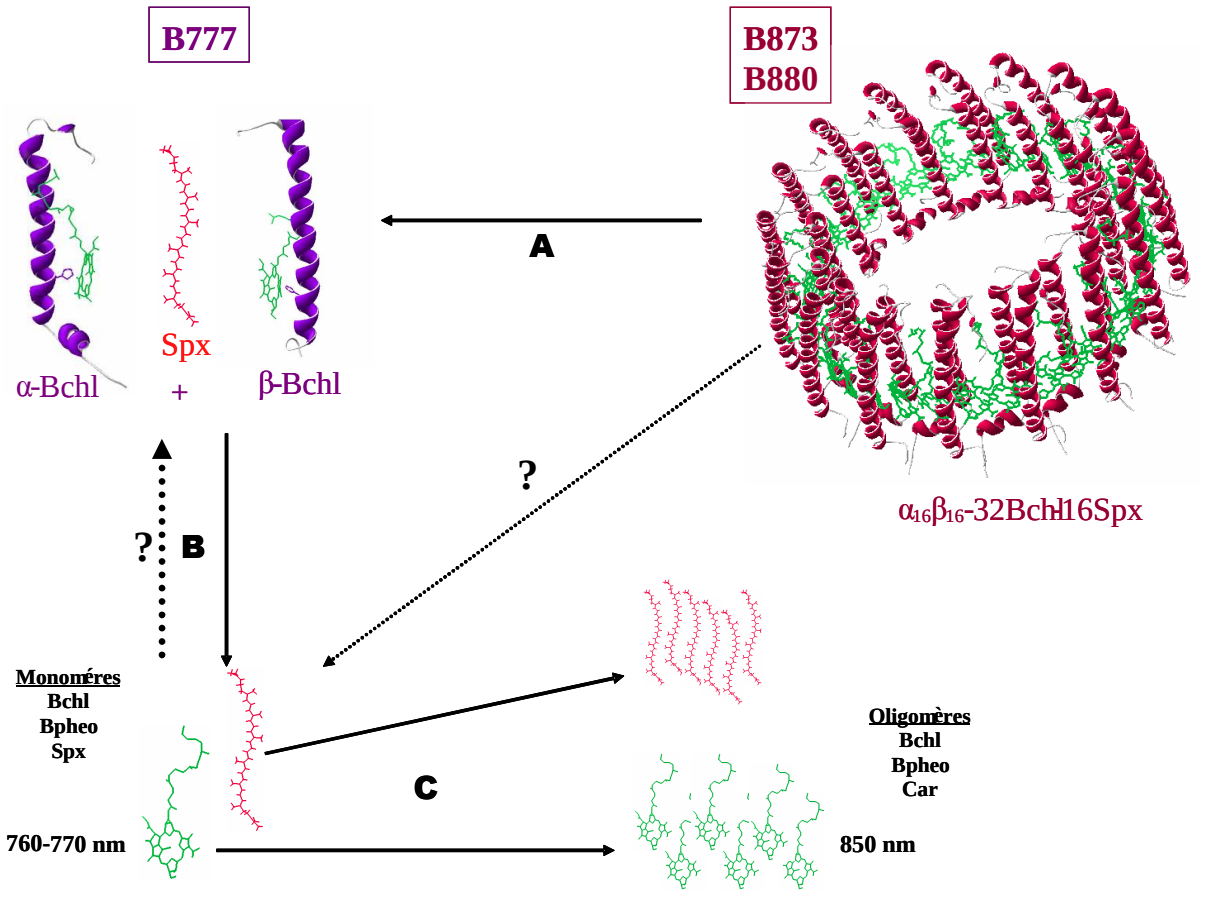


Figure 3-16 : Chemin proposé de dissociation-réassociation de la protéine LH1 dans les membranes intracytoplasmiques.

Dans le cas présent, le rôle de la structure protéique ne serait pas de conduire l'assemblage du LH1 mais d'imposer des restrictions stériques pour limiter ou interdire le processus d'agrégation des Bchls, un processus que l'on retrouve *in vivo* par exemple dans la structure des chlorosomes, les antennes collectrices de lumière des bactéries vertes photosynthétiques (Egawa et al., 2007; Psencik et al., 2004).

Chapitre 4

Conclusions et perspectives

Ce manuscrit porte sur l'étude de la relation structure-fonction des protéines collectrices de lumière LH1 et LH2 chez les bactéries pourpres photosynthétiques. Ces complexes protéiques membranaires ont pour fonction d'absorber la lumière grâce aux pigments qui leur sont liés et de transférer efficacement l'énergie absorbée au centre réactionnel qui effectue le transfert d'électron et la séparation de charge à travers la membrane. Les propriétés d'absorption de la lumière et de transfert d'excitation de ces complexes sont attribuées aux pigments liés aux polypeptides transmembranaires et en particulier aux bactériochlorophylles a. Ces propriétés sont régulées par les interactions pigments-polypeptides transmembranaires, et par les contacts moléculaires des pigments entre eux. Ces fonctions d'absorption de la lumière et de transfert de l'énergie comptent parmi les plus rapides du monde vivant et sont sensibles à la dynamique et à la flexibilité de la structure de ces complexes, en particulier *via* les interactions Bchl-Bchl. Nous ne possédons à l'heure actuelle que très peu d'informations sur la dynamique de ces complexes, en particulier dans leur environnement natif, puisque la plupart des informations sur ces protéines proviennent d'études réalisées sur les protéines solubilisées en présence de détergent. De plus, il n'existe pas de structure à haute résolution de la protéine LH1 ni du complexe RC-LH1, et les structures des protéines LH2 qui ont été obtenues donnent une image figée de la structure.

Les protéines collectrices de lumière des bactéries pourpres, et en particulier la protéine LH1, sont des protéines membranaires dont la structure permet d'aborder des questions clés telles que la reconnaissance et l'interaction des hélices α transmembranaires. La protéine LH1 est en effet constituée de 32 hélices α liant chacune une molécule de Bchl. La structure de la protéine repose sur l'assemblage non covalent de 16 hétérodimères $\alpha\beta$ formant un anneau autour du centre réactionnel. Dans la littérature, les processus de dissociation-réassociation de la protéine LH1 ont été étudiés sur la protéine solubilisée et ont permis de quantifier les énergies de formation de l'anneau entier ainsi que des espèces oligomériques intermédiaires. Cependant, ces informations uniques dans ce domaine n'ont pour l'instant jamais été obtenues sur la protéine dans son environnement natif.

Forts de ces enseignements, nous avons développé au laboratoire une approche basée sur l'utilisation de la température comme facteur dénaturant, de façon à affaiblir progressivement les interactions non covalentes maintenant la structure du complexe natif et éviter d'utiliser des détergents pouvant modifier les interactions entre polypeptides membranaires. Pour exemple, il est en effet connu dans la littérature que les détergents, selon leur nature, peuvent favoriser

l'association ou la dissociation du dimère de la glycophorine A en interagissant avec les hélices transmembranaires (Fisher et al., 1999; Fisher et al., 2003).
Nous avons donc étudié l'évolution des propriétés d'absorption de la lumière, du signal de dichroïsme circulaire dans le proche infrarouge des protéines antennes, et du spectre Raman de résonance des Bchls liées à ces protéines pendant les phases de chauffe et de refroidissement. Un cycle d'augmentation et de diminution de la température permet de tester la réversibilité des phénomènes observés et de faire le lien entre l'évolution de la structure de l'anneau et celle de sa fonction. De plus, ces expériences ont été menées sur les protéines dans les membranes intracytoplasmiques obtenues après lyse des bactéries et purification sur gradient de sucrose. Nous avons systématiquement comparé le comportement des protéines antennes dans les membranes intracytoplasmiques provenant de différentes souches de bactéries : la souche sauvage contenant le complexe RC-LH1 avec 16 caroténoïdes associés à l'anneau de LH1, la souche G9+ contenant le complexe RC-LH1 mais pour lequel les caroténoïdes sont absent, et la souche S1S contenant le complexe LH1 constitué de tous ses pigments (Bchls et caroténoïdes) mais pour lequel le centre réactionnel est absent.

Nous avons distingué deux effets différents de la température sur les protéines LH1 et LH2 selon la gamme de température étudiée. Les premiers essais en température nous ont permis de remarquer qu'il était possible de mesurer une évolution du spectre d'absorption de la protéine LH1, tout en veillant à ce que la protéine conserve sa structure native. Cette modification des propriétés spectrales de l'anneau de LH1 qui est très sensible au niveau de la transition électronique Qy de plus basse énergie, nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un déplacement réversible du maximum d'absorption vers le bleu. Les mesures de dichroïsme circulaire dans le proche infrarouge sont très sensibles à l'état d'agrégation des bactériochlorophylles, et nous ont donc permis de constater que l'anneau LH1 ne subit pas de changement important en ce qui concerne sa forme et son rayon de courbure. Ces observations démontrent que l'anneau circulaire LH1 n'est pas perturbé par l'effet de la température, ce que nous avons confirmé par spectroscopie Raman de résonance car nous avons pu montrer que les liaisons hydrogène entre les bactériochlorophylles et les polypeptides ne sont pas rompues ou altérées. Il semble donc à la vue de ces résultats que la variation de température, proche des conditions physiologiques, a une influence principalement sur les interactions entre molécules de bactériochlorophylles en contact de van der Waals. La coexistence de bactériochlorophylles "rouges" et "bleues" et l'évolution de leur proportion en fonction de la température sont également influencées par, d'une part, la présence du centre réactionnel, lequel impose des

contraintes structurales à l'anneau LH1 et, d'autre part, par les molécules de caroténoïdes qui interagissent avec les bactériochlorophylles. L'observation de l'effet de la température sur la structure de l'anneau LH1 est une conséquence directe de la flexibilité conformationnelle naturelle de la protéine. En effet, de récentes études ont montré que la dynamique des protéines membranaires est modulée par celle des lipides contrairement à ce qui a été observé pour les protéines solubles, pour lesquelles l'eau d'hydratation dicte la dynamique (Wood et al., 2008; Wood et al., 2007). Des variations des spectres d'absorption similaires ont aussi été observées pour les protéines antennes LH2. Cependant, la structure des protéines antennes LH2 étant plus rigide que celle des LH1, ces effets dus à la température sont de plus faible amplitude sur LH2 que sur LH1.

Cette étude est une des premières à démontrer l'existence de fluctuations locales de la structure d'une protéine membranaire dans son environnement naturel. Il serait à présent intéressant de caractériser l'influence de ces fluctuations sur les vitesses de transfert d'énergie entre Bchls au sein des anneaux mais aussi entre l'anneau et le centre réactionnel. Il faudrait pour cela pouvoir figer à très basse température la conformation que les protéines adoptent à 5 et à 50 °C par exemple dans le cas de la protéine LH1 de la souche S1. Ceci impliquerait de vitrifier les échantillons pour figer le complexe dans sa conformation à température élevée. Les premiers essais que nous avons menés ne nous ont pas permis de réaliser une vitrification suffisamment rapide des échantillons.
Dans les perspectives à court terme, nous avons débuté une collaboration avec le groupe de théoriciens dirigé par Leonas Valkunas à l'Institut de Physique de Vilnius (Lituanie) portant sur la modélisation des effets de la température sur les complexes de type LH2. Cette modélisation, reprenant une théorie développée pour expliquer l'inhomogénéité des spectres de fluorescence en molécule unique, permettrait pour la première fois de relier des mesures sur molécules uniques à celle faites sur une grande population de molécules. Un article portant sur cette étude est en cours de préparation.

Dans une deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à la reconnaissance entre polypeptides membranaires, en utilisant également le facteur température pour cette étude. Le processus de dissociation et réassociation de la protéine LH1 en présence de détergent a été très largement étudié dans la littérature, mais il n'y a cependant aucune information détaillée sur le processus d'assemblage du LH1 *in vivo*. Nous avons donc entrepris l'étude de l'influence de la température sur l'état d'oligomérisation du complexe LH1 dans les membranes

intracytoplasmiques de la bactérie *Rhodospirillum rubrum*. L'avantage majeur de cette approche est d'avoir accès aux interactions entre polypeptides membranaires lorsque ceux-ci se retrouvent dans leur environnement naturel composé de lipides. La densité très importante des protéines dans les membranes intracytoplasmiques peut avoir un impact important sur le fonctionnement même de l'anneau LH1, mais également sur la relation entre les protéines LH1 qui est tributaire du transfert d'excitons au sein de ces membranes.

Nous avons pu mettre en évidence par cette approche qu'il est possible de dissocier puis réassocier partiellement la protéine LH1, et montré pour la première fois que les caroténoïdes peuvent participer à ce processus dans des conditions quasi-natives. Nous avons également montré que les lipides augmentent la coopérativité entre les polypeptides par rapport aux molécules de détergents. En effet, en présence de détergent, le chemin de dissociation-réassociation des anneaux passe par un intermédiaire dimérique (un intermédiaire tétramérique a aussi été mis en évidence dans certaines conditions). Dans notre cas, le chemin de dissociation et de réassociation ne montre aucun intermédiaire entre la structure oligomérique de la protéine LH1 (anneau complet) et les polypeptides isolés. Nous avons aussi observé, lors de la dissociation générée par l'augmentation de la température, la formation d'agrégats non réversibles de bactériochlorophylles, de bactériophéophytines et de spirilloxanthines. Cette observation tend à prouver que ces molécules ont une affinité entre elles supérieure à celle imposée par les polypeptides. Il existe dans le monde du vivant des structures fonctionnelles formées par l'agrégation de (bactério)chlorophylles. Dans les protéines antennes de type LH, les polypeptides pourraient donc jouer le rôle d'échafaudage moléculaire afin, d'une part, d'empêcher l'auto-association des pigments photosynthétiques et, d'autre part, de contrôler très précisément la géométrie de l'anneau de bactériochlorophylles.

Il serait à présent tout à fait intéressant de pouvoir déterminer et quantifier les énergies mises en jeu pour les interactions polypeptide-polypeptide, bactériochlorophylle-bactériochlorophylle et polypeptide-bactériochlorophylle dans leur environnement quasi-natif et de les comparer avec celles déterminées à partir des protéines solubilisées. Un des points importants pour effectuer ce type de détermination est le contrôle de la concentration membranaire des protéines antennes. Pour cela, l'approche la plus simple est la reconstitution de ces protéines dans des membranes lipidiques, système pour lequel le rapport protéine/lipide peut être contrôlé. Nous pourrions alors réaliser en parallèle des expériences de « calorimétrie fonctionnelle » (technique que nous avons développée au laboratoire) et des expériences de calorimétrie différentielles (DSC), permettant de déterminer les températures de dénaturation des protéines insérées dans la

membrane. Ces mesures pourraient être corrélées à des mesures en dichroïsme circulaire dans l'UV (sur rayonnement synchrotron) pour caractériser les changements structuraux des hélices α transmembranaires.

Une question devra cependant être résolue avant de pouvoir mener ces expériences. En effet, l'observation par AFM de membranes intracytoplasmiques de différentes bactéries pourpres a mis en évidence une distribution non homogène des protéines antennes dans le plan de la membrane (Scheuring, 2006). Au sein de la membrane coexistent des zones très riches en lipides au sein desquelles les protéines antennes sont exclues, et des zones très riches en protéines antennes dans lesquelles ne peuvent coexister que peu de lipides. Pour répondre à cette question concernant les différences d'homogénéité dans la distribution protéines antennes, il sera donc nécessaire de caractériser les systèmes membranaires modèles par microscopie électronique afin d'observer l'arrangement des protéines au sein des membranes. En effet, une étude de l'influence de la concentration des protéines sur l'évolution des propriétés spectrales pendant des cycles de chauffe et de refroidissement, nécessite une répartition homogène des protéines dans le plan de la membrane.

Nous avons réalisé des expériences préliminaires de reconstitution des protéines dans les membranes lipidiques. Ces expériences tendent à montrer que la température de dissociation de ces complexes dépend effectivement de la concentration des protéines dans la membrane puisqu'une diminution de la densité globale de la membrane provoque une diminution de la température de dissociation. Ce travail est toujours en cours et sera poursuivi par la caractérisation en microscopie électronique des systèmes reconstitués.

Chapitre 5

Matériels et méthodes

5.1 Souches et cultures bactériennes

5.1.1 *Rhodospirillum rubrum* S1, S1S et G9+

La mise en culture des souches sauvage S1 (ATCC 11170) et mutante S1S (dépourvu de centre réactionnel) de *Rsp. rubrum* est réalisée dans le milieu liquide M2SF riche en succinate et en fructose comme sources de carbone (Ghosh et al., 1994). Le milieu de culture nécessaire à la croissance du mutant S1S contient en outre 50 µg/µl de streptomycine (Sm) et de spectinomycine (Sp).

Après inoculation d'un volume de préculture (5%), les cultures sont placées dans un incubateur à 30°C sous agitation (150 rpm) en semi-aérobie et à l'obscurité. La croissance des bactéries S1 et S1S et la formation des membranes intracytoplasmiques sont déterminées respectivement par la mesure de l'absorption à 660 nm (A_{660}) et à 880 nm (A_{880}) avec le Novaspec II (Amersham Biosciences). L'absorption à 880 nm correspond à la transition électronique Q_y des bactériochlorophylles liées à la protéine LH1, alors que celle à 660 nm est une mesure de la turbidité qui reflète la densité de bactéries en suspension. Le taux de formation des membranes photosynthétiques est estimé en utilisant le rapport A_{880}/A_{660}. Une valeur de 1,2 est connue comme étant le taux optimal de formation des membranes dans des conditions de culture photohétérotrophes (Grammel et al., 2003).

La souche de bactéries G9+ de *Rsp. rubrum* (dépourvue de caroténoïdes) est cultivée en deux phases distinctes sous agitation à 30°C, dans le milieu de culture M de Sistrom (Sistrom, 1960). Une première phase est réalisée en semi-aérobie/obscurité (pendant une nuit) afin que les bactéries se divisent (métabolisme respiratoire) ; cette phase est suivie d'une phase en anaérobie stricte/ lumière, permettant le développement de l'appareil photosynthétique. La culture de la souche G9+ dans le milieu M2SF utilisé pour les souches S1 et S1S n'a pas pu être optimisée. En effet, il est possible dans le milieu M2SF d'obtenir un taux de croissance bactérienne important mais les bactéries ne développent pas de membranes photosynthétiques.

5.1.2 *Rhodobacter sphaeroides* DD13-LH2

La souche bactérienne *Rb. sphaeroides* DD13-LH2, développée et cultivée dans le laboratoire de Neil Hunter à l'Université de Sheffield, est un mutant qui ne synthétise que la protéine LH2. Ce mutant est cultivé en semi-aérobie/obscurité dans le milieu de culture liquide M22+ (Hunter and

Turner, 1988), avec ajout de 0,1% de caséine acide. Des antibiotiques sont additionnés aux concentrations suivantes : kanamycine, 20 µg/ml ; tetracycline, 1 µg/ml ; streptomycine, 5 µg/ml.

5.2 Microscopie électronique

Après fixation pendant une nuit dans un tampon phosphate contenant 2% de glutaraldéhyde, les culots renfermant les bactéries S1 et S1S sont rincées 3 fois (pendant 5 min chacune). Après 24h dans un tampon phosphate pur, les bactéries sont lavées deux fois en présence d'eau et incubées 15 min dans une solution de métaperiodate de sodium 1%. Elles sont ensuite fixées pendant 1h avec un mélange de tétroxyde de sodium 1% et de ferrocyanide de potassium 1,5% dans l'eau (Karnovski, 1971). Après déshydratation avec des concentrations croissantes d'éthanol, les cellules sont inclues dans une résine synthétique de type Epon. Des coupes ultrafines sont alors réalisées par un ultramicrotome Leica et collectées sur des grilles de cuivre pour être observées en microscopie électronique à transmission (Philips EM 400 à 80kV). Ces expériences ont été réalisées par Renée Gobin et Jean-Marc Verbavatz dans l'équipe d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire (SB^2SM, CEA Saclay)

5.3 Préparation des membranes

Les trois cultures bactériennes *Rsp. rubrum* S1, S1S et G9+ sont stoppées en fin de phase exponentielle de croissance. De nombreux travaux ont montré l'utilisation de deux tampons pour la manipulation des membranes : le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,0 et le tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5. Pour nos études, le choix s'est porté sur le second tampon car il est beaucoup moins sensible aux variations de température : entre 20 et 70°C, le ΔpH est de 0,49 pour le tampon Tris et de 0,15 pour le tampon phosphate (Fig. 5-1).

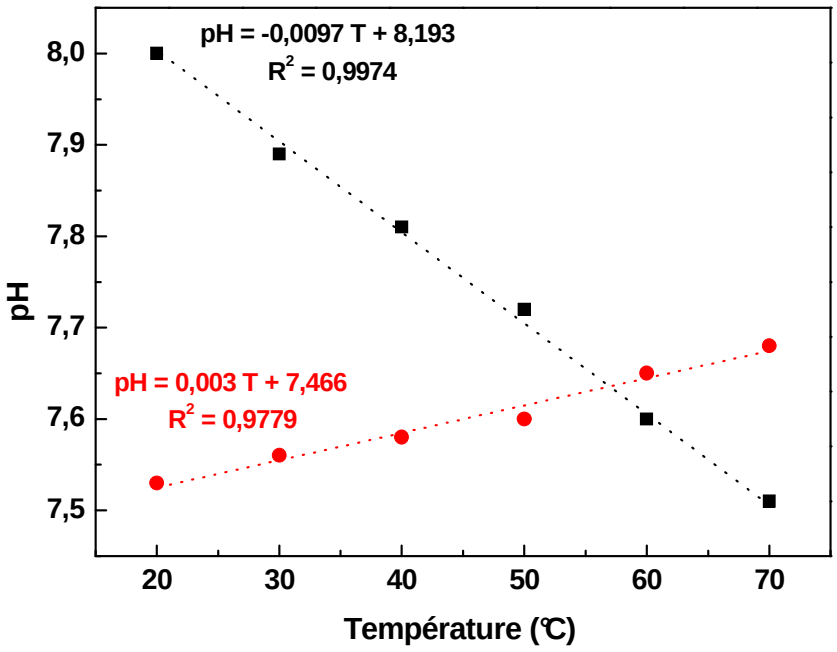


Figure 5-1 : Evolution du pH des tampons Tris-HCl 20 mM (-■-) et phosphate de potassium 50 mM (-●-) en focntion de la température. La régression linéaire indique que le pH du tampon phosphate change d'environ 0,003 unité de pH/°C, valeur négligeable pour les expériences.

Les culots de bactéries obtenus après centrifugation (10 000g, 5 min, Avanti J-25 Beckman) sont resuspendus dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5. Après ajout de DNAse I (0,1 mg/ml) et de $MgCl_2$ (25 mM), les bactéries sont lysées par passage à la presse de French (2 cycles, 900 psi). Les membranes intracytoplasmiques sont obtenues après centrifugation (12 000g, 10 min, Avanti J-25 Beckman), afin d'éliminer les débris cellulaires, puis ultracentrifugation (200 000g, 60 min, LE-80 Beckman). Une fois remis en solution, les échantillons de membranes (2 ml) sont déposés sur un gradient linéaire de saccharose 5-35% (20 ml) reposant au fond du tube sur un coussin de saccharose 60% (3 ml), puis centrifugés à 100 000g pendant 90 min (LE-80 Beckman). Avant leur utilisation, les membranes sont dialysées contre un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5 pour éliminer le saccharose.

Les membranes sont utilisées sans étape préalable de congélation car ces manipulations peuvent induire la fusion et/ou l'agrégation des vésicules.

5.4 Extraction et purification des complexes LH1 et RC-LH1

Les complexes RC-LH1 de S1 et G9+ et la protéine LH1 de S1S sont extraits en diluant les membranes à une absorption proche de 30 à 880 nm (873 nm pour G9) avec du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5, et par solubilisation en présence de 0,5% n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM, Biomol). Cette dernière étape est réalisée sous agitation et à température ambiante pendant 30 min. Les échantillons sont centrifugés (200 000g, 30 min, TL-100 Beckman) afin d'éliminer le matériel non solubilisé. La fraction soluble est chargée sur une colonne échangeuse d'ions (Resource Q, 6 ml, GE Healthcare) pilotée par le système FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl (0 à 1 M) composé également de 0,1% DDM et phosphate de potassium 50 mM pH 7,5. Afin d'affiner la purification des protéines, une dernière étape de filtration sur gel (Superose 12, 25 ml, GE Healthcare) est effectuée, avec un tampon contenant 50 mM NaCl (ainsi que du DDM 0,1%). L'ensemble des fractions collectées est analysé par SDS-PAGE 12% et 15%, et la composition en polypeptides est révélée par coloration au bleu de Coomassie.

5.5 Spectroscopie d'absorption Visible-IR en fonction de la température

Les spectres d'absorption sont obtenus avec un spectrophotomètre double faisceau Lambda 35 (Perkin Elmer) UV-Visible. Les deux porte-cuves sont thermostatés grâce à deux contrôleurs de température (Système à effet Peltier PTP-1, ± 0,1°C). Les cuvettes en quartz de 10 mm de trajet optique de modèle 117.100 QS (Hellma, volume maximum 3500 µl) sont hermétiquement fermées à l'aide d'un joint en silicone (septum, 011.650) et d'un bouchon (011.600). La cuvette de référence contient 3 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5 et d'acide ascorbique 10 mM, préalablement dégazées avec de l'argon, ceci afin de supprimer l'oxydation des bactériochlorophylles et des caroténoïdes favorisée à des températures élevées. Dans la cuvette échantillon, la concentration des membranes photosynthétiques est ajustée de manière à ce que le volume soit de 3 ml et la densité optique au maximum de la transition Qy soit égale à 1. L'échantillon est une nouvelle fois dégazé dans la cuvette avec de l'argon pendant 1 min.

Les mesures sont réalisées sous agitation et les spectres collectés entre 350 et 950 nm. Chaque expérience comprend une phase d'équilibration de la température (pendant 18 min), suivie d'une phase de montée en température (vitesse = 1°C/6 min). Une nouvelle phase d'équilibration est

effectuée au maximum de température et est suivie d'une phase de descente en température d'une durée variable suivant les expériences réalisées (1°C/12 min < vitesse > 1°C/18 min). Pour terminer, l'échantillon est équilibré en température pendant 18 min.

Afin de contrôler la température dans la cuvette par rapport au cycle de température programmé comme décrit ci-dessus, nous avons effectué une série de mesures comme indiqué sur la Figure 5-2. Ces mesures ont été réalisées à une vitesse de 1°C/6 min pour la phase de montée en température et à 0,5°C/6 min pour la phase de descente en température. Ce résultat nous permet de considérer que la température dans la cuvette est identique à la température programmée.

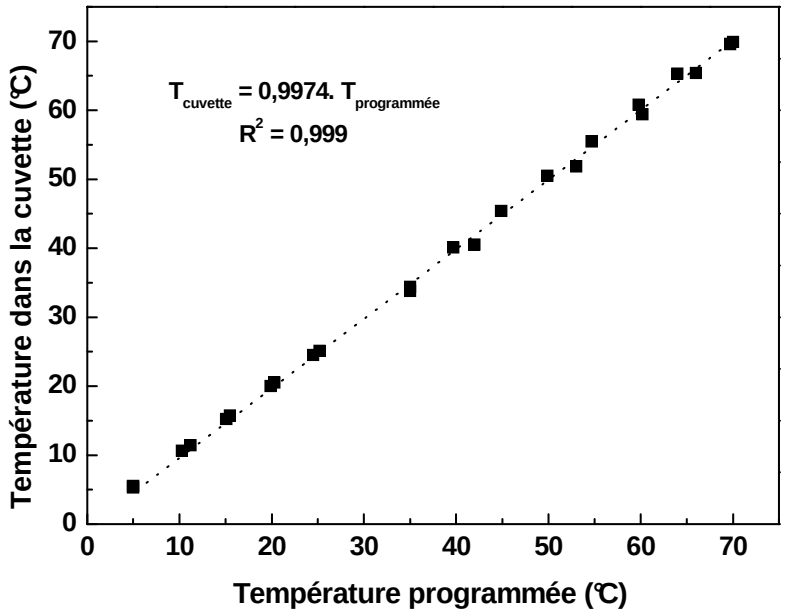


Figure 5-2 : Relation entre la température programmée et la température dans la cuvette mesurée à l'aide d'un thermocouple plongée dans l'échantillon. Le bon facteur de corrélation de 0,999 obtenu pour l'équation de régression linéaire $T_{cuvette}$ = 0,9974. $T_{programmée}$, indique que la température dans la cuvette est identique à la température programmée (entre 5 et 70°C).

5.6 Spectroscopie Raman de résonance

Les spectres de Raman de résonance (Annexe 1) à transformée de Fourier sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotométre FTIR-Raman (Bruker IFS66) équipé d'un module Raman (Bruker FRA 106) et d'un laser Nd3+ :YAG (Néodynium : Yttrium Aluminium Garnet) qui délivre une excitation à la longueur d'onde 1064 nm. La lumière diffusée produite par l'échantillon éclairé par

le faisceau monochromatique illumine l'interféromètre. Après filtrage des photons diffusés élastiquement, un interférogramme est enregistré comme fonction de la différence de chemin optique δd (cm) produit par la translation de miroirs mouvants. La transformée de Fourier de l'interférogramme donne des spectres en unité de nombre d'onde.

Les chromatophores sont concentrés par centrifugation (200 000g, 20 min, Beckman TL-100) afin de former un culot et atteindre une densité optique maximale pour la transition Q_y. Le culot obtenu est directement déposé dans des cuvettes en aluminium d'1 cm de diamètre (le puit central dans lequel est déposé le culot a un volume d'environ 8 µl) qui sont placées sur un porte échantillon en cuivre (Fig. 5-2). Ce montage permet ainsi d'optimiser le contrôle de la température des échantillons. L'aluminium présente la particularité d'agir comme un miroir et de pouvoir réorienter une partie du signal Raman obtenu vers l'objectif du spectromètre, et d'être un bon conducteur thermique. Le rapport signal sur bruit est optimisé en accumulant les données (environ 12 séries de 1000 interférogrammes coadditionnés pour chaque cuvette).

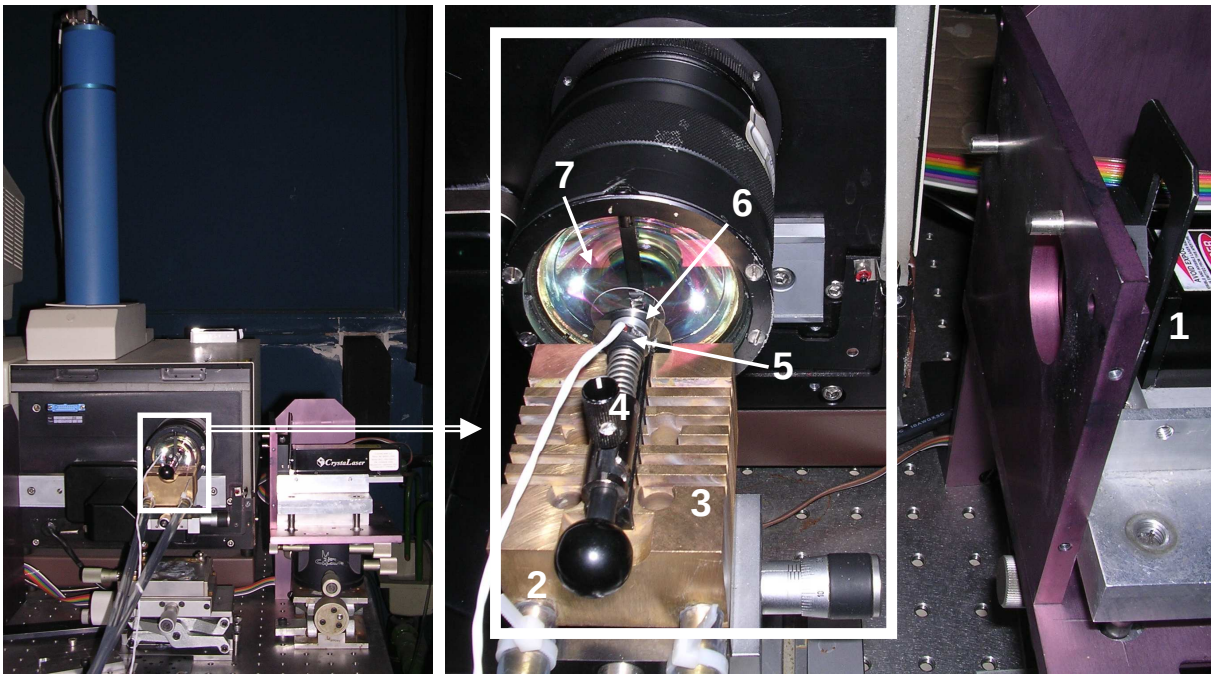


Figure 5-2 : Montage expérimental du spectrophotomètre FTIR-Raman pour les mesures en fonction de la température.

1 : laser Nd3+: YAG (Néodymium : Yttrium Aluminium Garnet)
2 : raccord du bain thermostaté
3 : bloc de cuivre thermostaté
4 : porte échantillon sur le support de cuivre.
5 : sonde de température
6 : cuvette en aluminium (contenant l'échantillon) + lamelle de verre circulaire
7 : objectif du spectrophotomètre

5.7 Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire (DC) sont enregistrés avec un spectrophotomètre dichrographe CD6 (Jobin-Yvon) couplé avec un photomultiplicateur sensible dans le proche infrarouge. Le porte-échantillon est thermostaté grâce à bain-marie chauffant et refroidissant. Les cuvettes utilisées sont les mêmes que pour les mesures d'absorption avec un trajet optique de 1 cm. Les échantillons sont préparés de manière à obtenir une DO de 1 au maximum de la transition électronique Q_y. Les spectres sont collectés à différentes températures entre 700 et 980 nm avec un temps d'acquisition de 3s par nanomètre.

5.8 Caractérisation du mutant Rsp. rubrum S1S

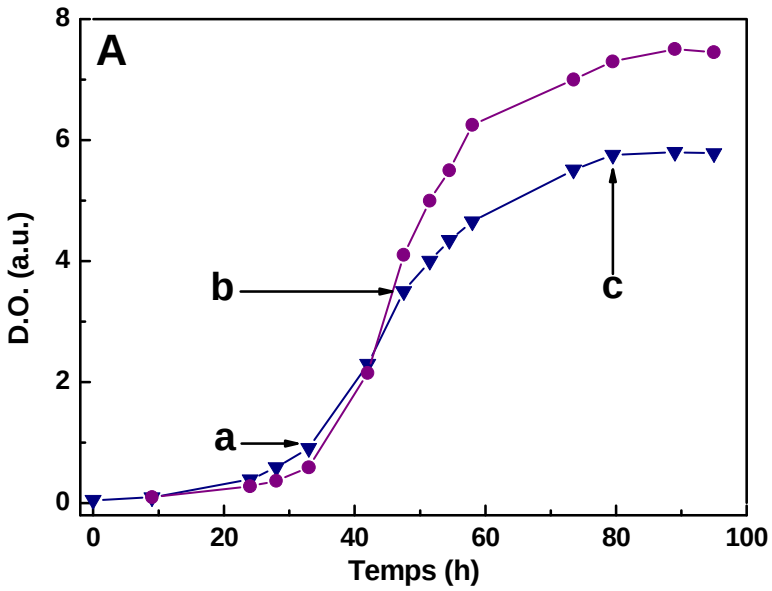
5.8.1 Construction du mutant

Les gènes *pufL* et *pufM* de l'opéron *pufBALM* codant pour la synthèse des sous unités polypeptidiques L et M du centre réactionnel ont été inactivés par mutagenèse dirigée. Cette inactivation est réalisée par insertion d'une cassette $_{\Omega}Sp^r$ Sm^r dans la région *pufLM* du plasmide pE6.5 de 6.5 kb (Hessner et al., 1991). La sous-unité H du centre réactionnel, qui est issue du gène *puhA* indépendant de l'opéron *pufBALM*, n'a pas été inactivée dans notre mutant. Le plasmide ainsi construit est inséré dans la bactérie *Rsp. rubrum* S1 par électroporation (2 pulses à 2,5 V). Cette nouvelle souche mutante a été appelée « S1S » du fait de sa double résistance Streptomycine-Spectinomycine. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Ghada Ajlani qui dirige l'équipe de Biologie Moléculaire au laboratoire au CEA Saclay (SB^2SM/LBMS).

5.8.2 Cinétique de croissance et morphologie des bactéries

Des colonies de *Rsp. rubrum* S1 et S1S qui ont été sélectionnées sur un milieu M2SF gélosé sont inoculées dans 3 ml de milieu M2SF liquide et incubées 12h à 30°C sous agitation. Un volume de 5% de ces précultures est ensuite transféré dans des erlenmeyers de 250 ml remplis avec 100 ml de milieu M2SF contenant du NH_4-succinate 40 mM et du fructose 18 mM . Les courbes de croissance sont présentées sur la Figure 5-3. Les valeurs des mesures en absorption sont comprises entre 0,3 et 0,7 à partir de prélèvements de culture bactérienne préalablement dilués avec du milieu M2SF.

Les deux souches S1 et S1S présentent une phase de latence similaire de 15h, suivie d'une phase d'accélération d'environ 18h (Fig. 5-3A et B). Les temps de génération déterminés par analyse graphique pendant la phase exponentielle de croissance sont de 7,5h pour la souche sauvage S1 et de 8h pour la souche mutante S1S. Le taux de développement des membranes intracytoplasmiques après 60h de croissance (en fin de phase exponentielle) est plus élevé pour S1 (1,3) par rapport à S1S (1,0). Cette différence entre les deux souches persiste également au début de la phase stationnaire. On peut cependant remarquer que la croissance et le développement des membranes intracytoplasmiques chez le mutant S1S s'arrêtent dés la fin de la phase exponentielle. Des résultats similaires ont été présentés par Grammel *et al.* chez des mutants de *Rsp. rubrum* (Grammel et al., 2003).



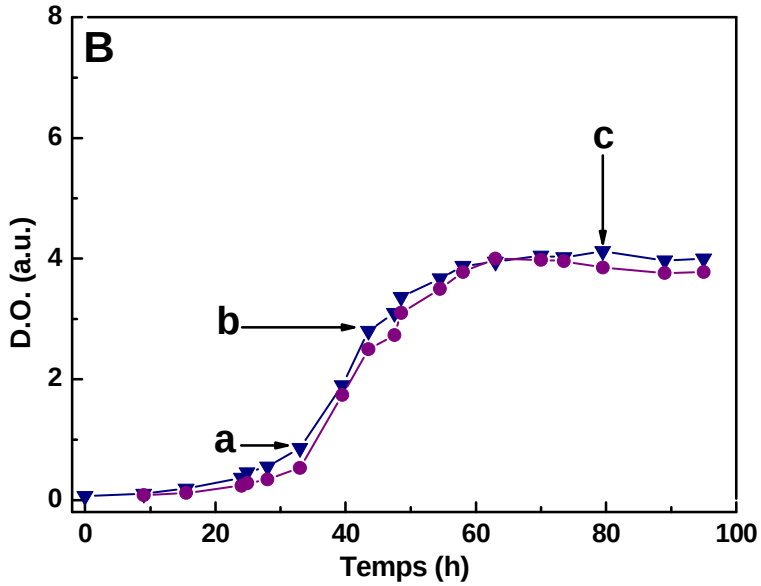


Figure 5-3 : Courbes de croissance bactériennes de *Rsp. rubrum* S1 (A) et S1S (B) : absorption à 660 nm (—▼—) et à 880 nm (—●—) ; a, b et c : prélèvements pour imagerie en microscopie électronique.

Des coupes ultrafines des bactéries S1 et S1S ont été observées en microscopie électronique à transmission et les images obtenues (Fig. 5-4) montrent que la formation des membranes intracytoplasmiques (MIC) est en parfaite corrélation avec les valeurs d'absorption mesurées à 880 nm. A la fin de la phase d'accélération (a : t = 33h), lorsque l'absorption à 880 nm est minimale, la membrane cytoplasmique (MC) est maintenue à proximité de la membrane externe et ne présente pas d'invagination cytoplasmique. Le cytoplasme, dans les deux souches, contient une quantité importante de granules de glycogène et d'inclusions de stockage de PHB (acide poly-β-hydroxybutirique), sources de carbone (Fig. 5-4A & B). Au milieu de la phase exponentielle (b : t = 47,5h pour S1 et 43,5 h pour S1S) lorsque A_{880} augmente significativement, la formation de chromatophores est observable (Fig. 5-4C & D). En phase stationnaire (c : t = 80h), le cytoplasme des bactéries S1 (Fig. 5-4E) renferme une concentration de vésicules photosynthétiques très importante, plus élevée que chez les bactéries mutantes S1S (Fig. 5-4F). On peut noter cependant à la fin de la phase exponentielle que la membrane externe d'une majorité des bactéries mutantes S1S présente des déformations (ondulations) entraînant une fragilité bien supérieure à celle observée chez la souche sauvage. Les bactéries sont donc toujours récoltées avant le début de la phase stationnaire en vue de l'extraction des membranes intracytoplasmiques.

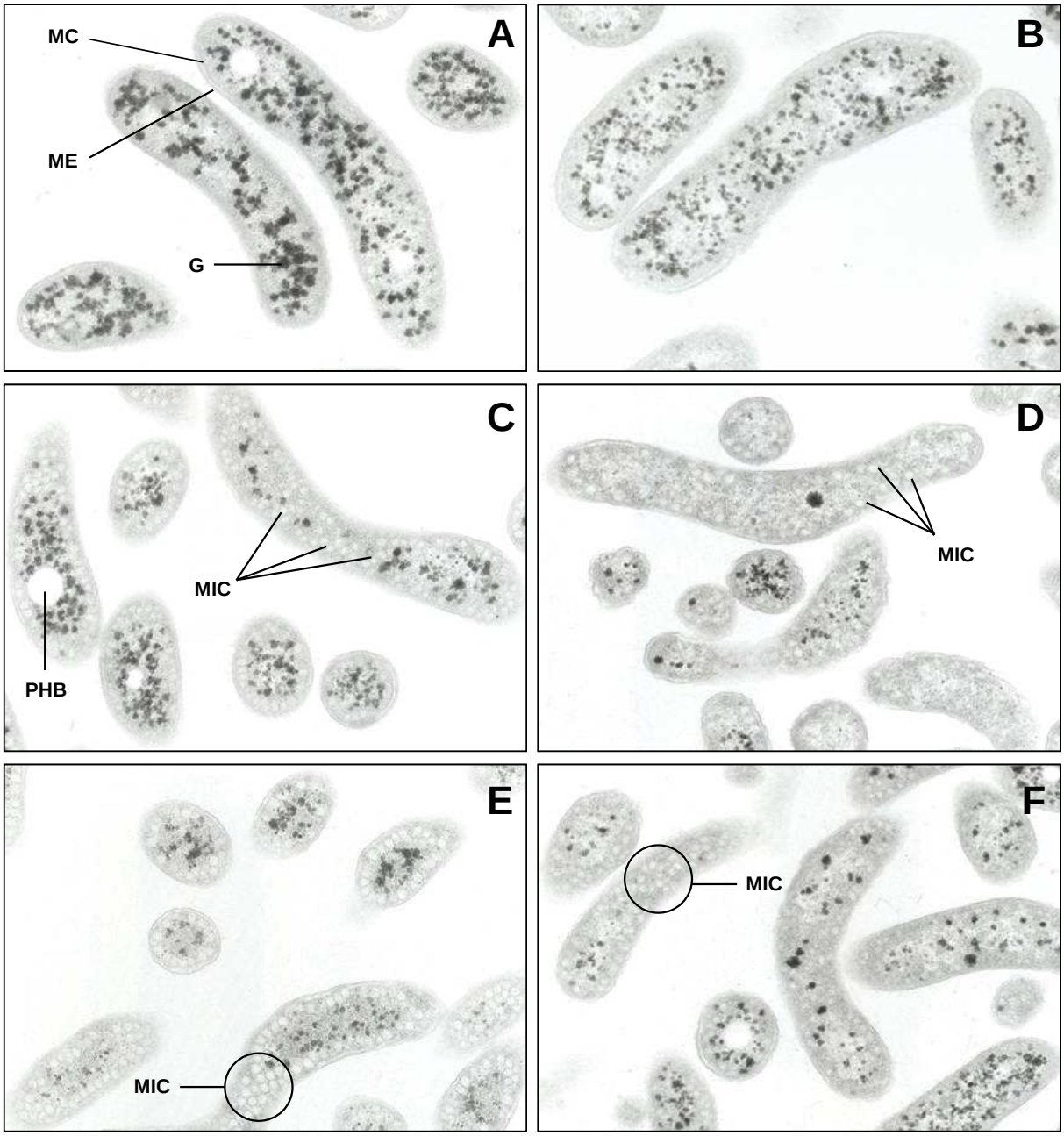
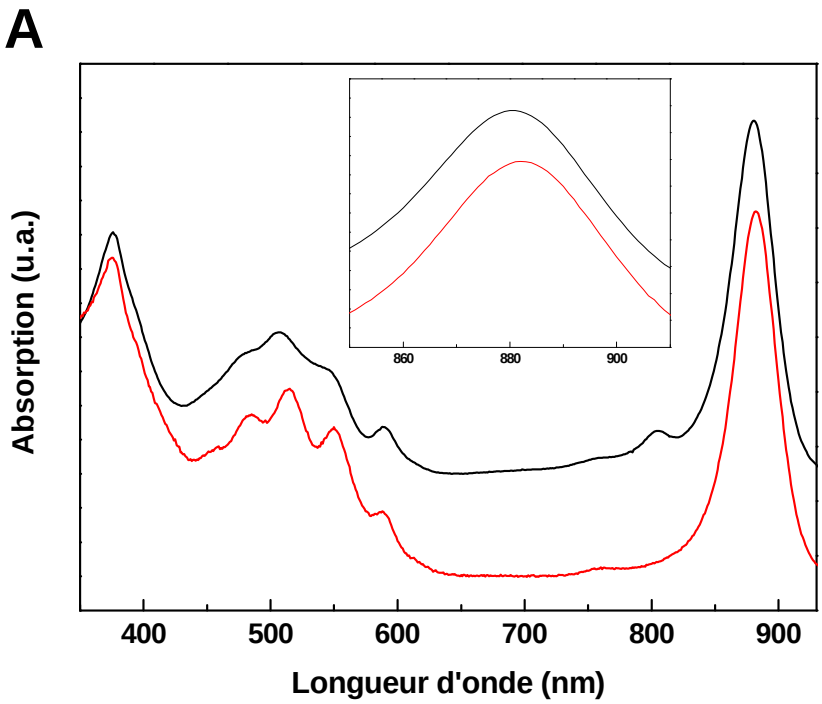


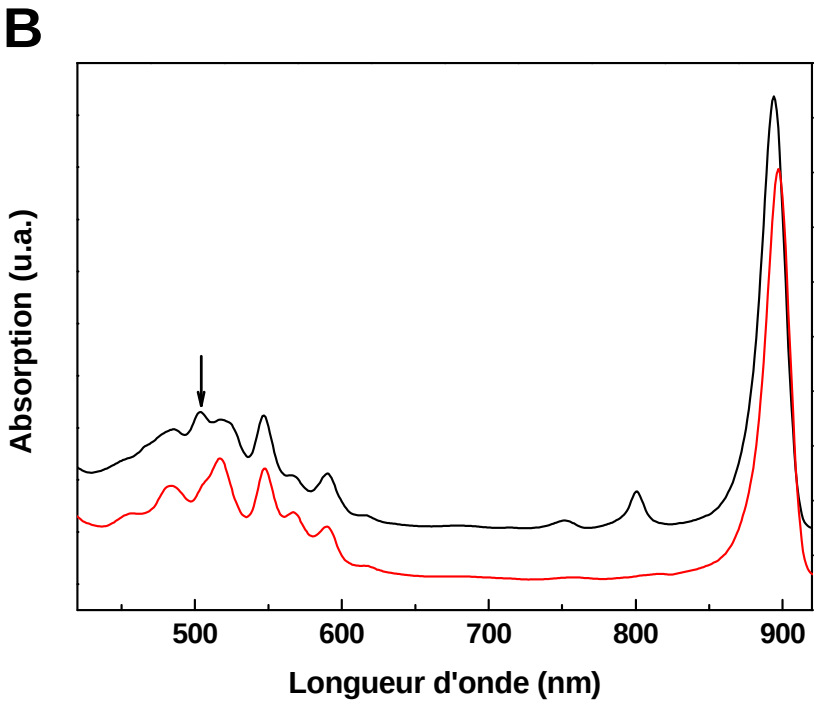
Figure 5-4 : Images en microscopie électronique à transmission (x 8000) de coupes ultrafines des bactéries photosynthétiques S1 (A, C et E) et S1S (B, D, F), récoltées pendant leur croissance en milieu M2SF: en fin de phase d'accélération (A et B, t = 33h : flèche a sur la Fig. 48), en milieu de phase exponentielle (C et D, t ≈ 45h : flèche b sur la Fig. 48) et en phase stationnaire (E et F, t = 80h : flèche c sur la Fig. 48)

5.8.3 Caractérisation spectroscopique des membranes intracytoplasmiques

La Figure 5-5 montre les spectres d'absorption des membranes intracytoplasmiques de S1 et S1S obtenus à température ambiante. L'absence de transition électronique à 800 nm dans le spectre de S1S par rapport à celui de S1 confirme l'absence du centre réactionnel dans ces membranes. La bande d'absorption dans le proche infrarouge, qui correspond à la transition Qy de la protéine LH1, présente un pic maximum à 882 nm, c'est-à-dire qu'il existe un déplacement spectral d'environ 2 nm vers le rouge comparée au même pic chez la souche sauvage S1 (Fig. 5-5A, insertion). Dans la région d'absorption des caroténoïdes (entre 450 et 550 nm), les transitions électroniques sont mieux résolues dans le spectre du mutant S1S, indiquant une composition plus homogène en caroténoïdes. Cette observation est certainement due à l'absence des molécules de spirilloxanthine liées au centre réactionnel et qui présentent une conformation 15-*cis* différente de l'isomère de forme all-*trans* que l'on retrouve liées aux protéines LH1 (Fraser et al., 2001; Koyama et al., 1990). Les spectres d'absorption à 4K (Fig. 5-5 B) confirment ces observations puisqu'on observe des pics à 894 nm (Qy de Bchl a liée au LH1), à 800 et 752 nm (Bchl a monomérique et Bpheo a du centre réactionnel) et à 590 nm (Qx de Bchl a) dans les membranes de S1, tandis qu'on observe des pics à 897 et 590 nm chez le mutant S1S. D'autre part, ces spectres renseignent aussi sur la nature des caroténoïdes présents, et on peut noter que l'absence du pic à 505 nm (Fig. 5-5B : flèche noire) chez S1S est en faveur de l'absence de l'isomère 15-cis-spirilloxanthine lié au centre réactionnel (Koyama et al., 1990).

Les spectres de dichroïsme circulaire nous permettent d'avoir des informations sur la courbure des anneaux de LH1 et ainsi savoir si celle-ci est perturbée par l'absence du centre réactionnel engendrée par l'étape de mutagenèse. La comparaison des deux spectres (Fig. 5-5C) montre essentiellement l'absence de signal vers 800 nm (attribué au centre réactionnel chez S1). En ce qui concerne les signaux attribués aux protéines LH1, on peut noter que les points de croissement des abscisses entre S1 et S1S sont quasiment semblables (moins d'1 nm) et que les rapports d'intensité des pics 868/898 ont pour valeur 0,7 et 0,6 pour S1 et S1S respectivement et sont donc de même amplitude.


A
Absorption (u.a.)
400
500
600
700
800
900
Longueur d'onde (nm)
860
880
900


B
Absorption (u.a.)
500
600
700
800
900
Longueur d'onde (nm)

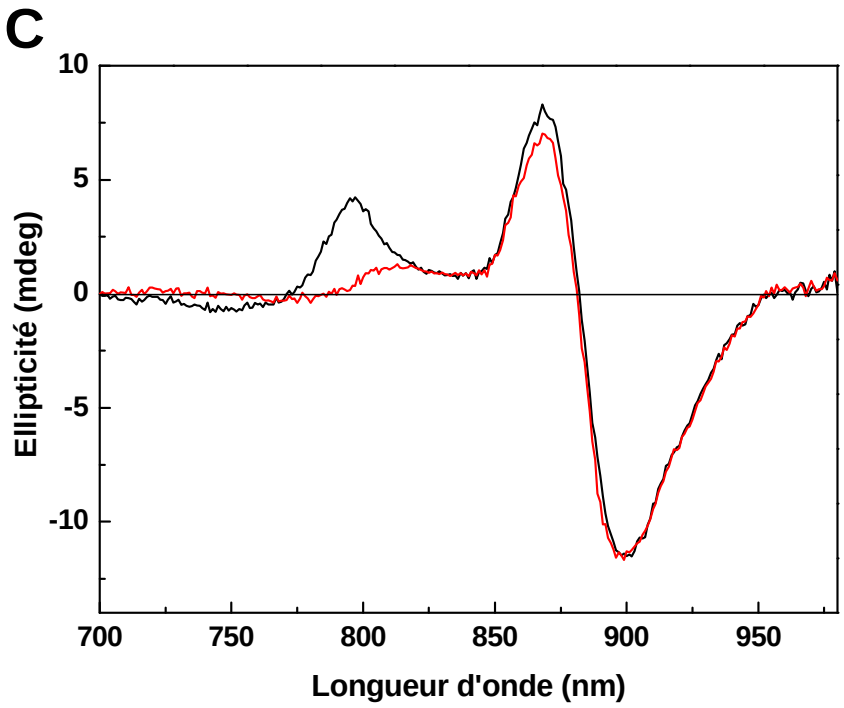


Figure 5-5: Comparaison des propriétés spectroscopiques des membranes intracytoplasmiques des souches Rps. rubrum S1 (——) et S1S (——). A : Spectres d'absorption à température ambiante ; Insertion : zoom sur la région 850-910 nm. B : Spectres d'absorption à basse température (T = 4K) ; la flèche correspond à l'absorption de la 15-cis spirilloxanthine du centre réactionnel. C : Spectres de dichroïsme circulaire à température ambiante.

En conclusion, la caractérisation par des approches spectroscopiques de la protéine LH1 synthétisée par le mutant S1S montre que celle-ci est fonctionnelle et que son insertion dans la membrane n'est pas perturbée par l'absence du centre réactionnel. La protéine LH1 possède des propriétés spectroscopiques comparables à la protéine LH1 dans le complexe RC-LH1 de S1. Des résultats semblables ont été publiés par Lupo et Ghosh (Lupo and Ghosh, 2004).

Annexes

ANNEXE 1

L'effet Raman

L'effet Raman résulte de l'interaction des photons d'une source de lumière monochromatique avec les molécules de l'échantillon. Environ un photon sur 10 000 sera diffusé élastiquement par les molécules (sans changement d'énergie) : il s'agit de la diffusion Rayleigh. Lorsqu'un photon est diffusé inélastiquement avec une légère perte en énergie (diffusion Raman), ceci correspond à une transition vibrationnelle. Comme il s'agit d'un processus très faible, des sources de lumière intense telles que les lasers sont nécessaires.

Raman de Résonance

La spectroscopie Raman de résonance présente un intérêt tout particulier pour déterminer quels sont les résidus qui interagissent avec les Bchls au niveau du site de liaison, notamment en absence de données structurales à haute résolution obtenues par cristallographie.
L'application de la spectroscopie Raman de résonance aux membranes biologiques et/ou aux biomolécules présente deux inconvénients majeurs que sont la dégradation thermique et la luminescence. Dans notre étude, la photosensibilité des chromophores (Bchls) est spécifique à l'utilisation des membranes photosynthétiques.

Spectres des bactériochlorophylles a

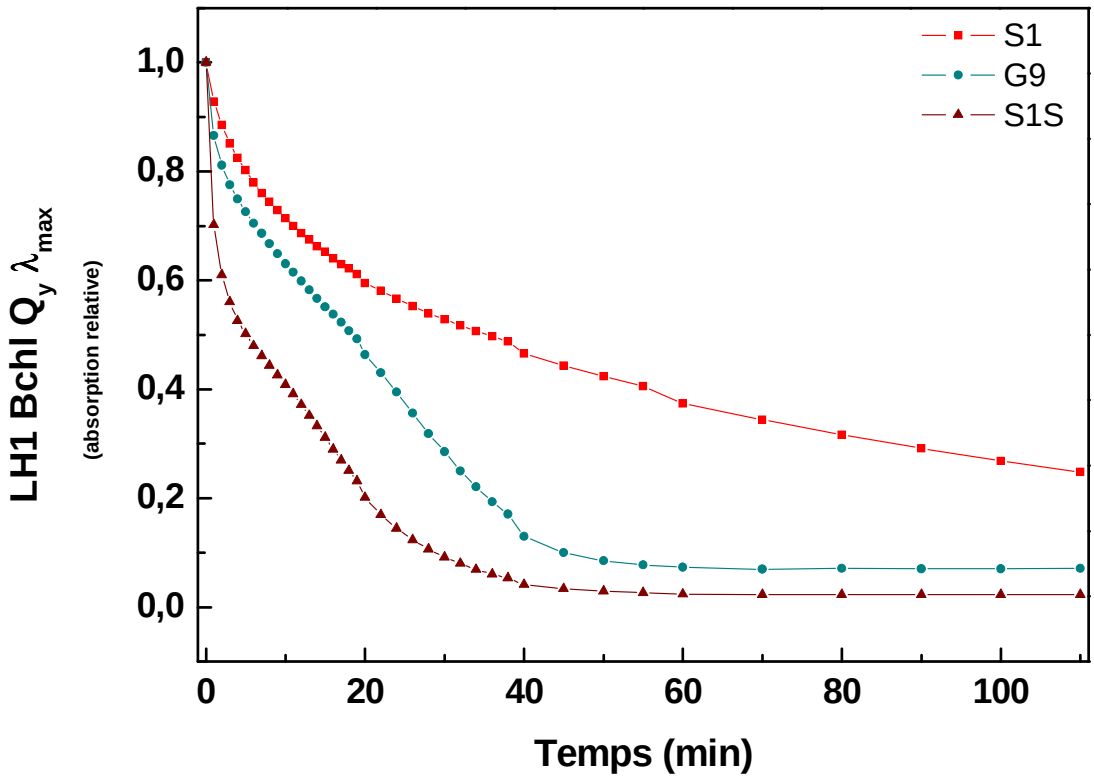
Le spectre Raman des Bchls *in vitro* contient environ 50 modes actifs dans la région 300-1750 cm-1, et présente trois régions distinctes (Lutz 1983):

- La région des basses fréquences (50-300 cm-1) donne des informations sur les modes de déformation du cycle bactériochlorine et de ses substituants. Il est possible également de déterminer l'état de coordination de l'atome de Mg ;
- La région des moyennes fréquences (300-1500 cm-1) permet d'identifier la nature des pigments diffusants et la conformation des Bchls (Lapouge et al., 1999) ;

- La région des hautes fréquences (1500-1750 cm-1) donne des informations sur les fréquences d'élongation des ponts méthines qui relient les différents cycles pyrroliques ainsi que sur les modes d'élongation des groupements cétoniques, acétyles et vinyles.

La fréquence de ces derniers modes est sensible aux interactions intermoléculaires dans lesquels les Bchls sont impliquées, ceci se manifeste par des déplacements des bandes selon la nature des interactions. Il est en effet connu que les ponts méthines d'une Bchl coordonée 5 vibre à 1609 cm-1. Un groupement carbonyle cétonique vibre à environ 1700 cm-1 lorsqu'il est libre (à 1696 cm-1 dans le diéthyl-ether) et sa fréquence peut se déplacer jusqu'à 1640 cm-1 lorsqu'il est lié. Le groupement carbonyle acétyle vibre à environ 1660 cm-1 lorsqu'il est libre (1663 cm-1 dans le diéthyl-ether) et sa fréquence peut se déplacer jusqu'à 1625 cm-1 lorsqu'il est engagé dans des liaisons intermoléculaires (ex : à 1643 cm-1 lorsqu'il est lié au tryptophane dans le LH1)

ANNEXE 2



Stabilité thermique des protéines LH1 de S1, G9 et S1S.

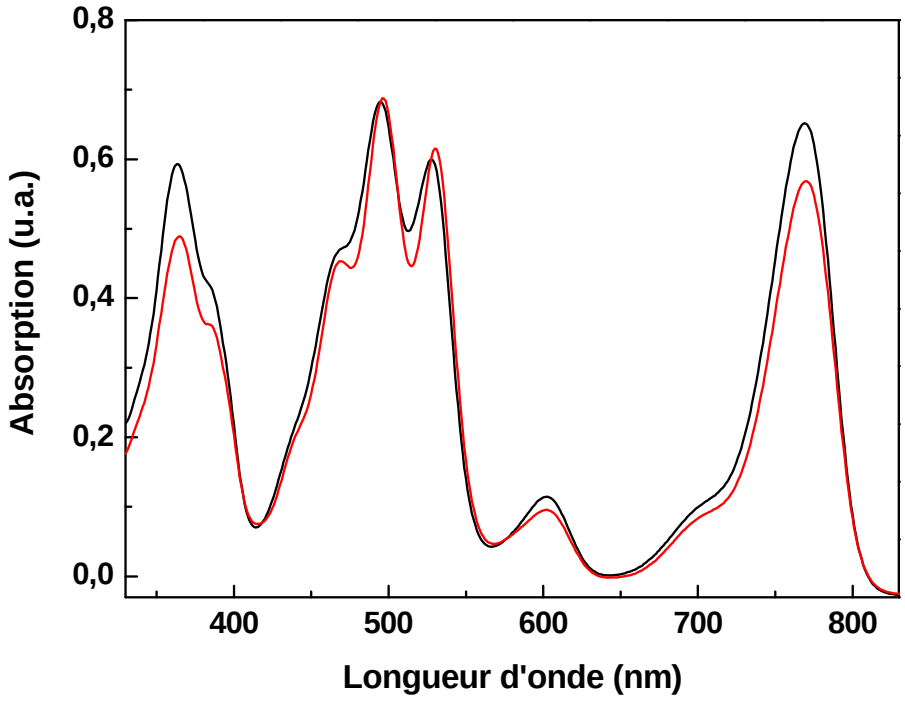
La Figure çi-dessus représente l'évolution du maximum d'absorption de la transition Qy du LH1 dans les membranes des souches de *Rsp. rubrum* S1, G9 et S1S à 75°C en fonction du temps.

Afin de comparer la stabilité des protéines LH1, nous avons déterminé le temps pour lequel l'absorption de la Qy diminue de 50% ($T_{1/2}$).

Les valeurs $T_{1/2}$ déterminées sont respectivement de 5 min, 18 min et 34 min pour les protéines LH1 de S1S, G9 et S1.

A 75°C, la protéine LH1 de S1 (sauvage) présente une stabilité thermique supérieure au LH1 de G9 (mutant dépourvu de caroténoïdes) , puis de S1S (mutant sans centre réactionnel).

ANNEXE 3



Spectres d'absorption des pigments extraits des membranes de Rsp. rubrum S1 (——) et S1S (——) par un mélange acétone : méthanol (7 : 2)

Les spectres d'absorption des caroténoïdes extraits des membranes de S1 et S1S différent légèrement et sont en accord avec les résultats décrit par Koyama et al. (Koyama et al., 1990). En effet, le massif de pics présente des maximums d'absorption à 468, 494 et 528 nm chez S1 (qui contient les isomères *15-cis* et *all-trans* spirilloxanthine) et à 469, 496 et 530 nm chez S1S (contenant uniquement la forme *all-trans* spirilloxanthine). Le travail de Koyama concernant l'étude des configurations des caroténoïdes présent chez *Rsp. rubrum* montre clairement que le spectre d'absorption de la forme *15-cis* spirilloxanthine (liée au centre réactionnel) est déplacé vers le bleu d'environ 2 nm par rapport à l'isomére *all-trans* spirilloxanthine (lié aux protéines LH1). Une telle observation a également été suggérée par E. Papagiannakis (Papagiannakis, 2004).

ANNEXE 4



Thermodynamics of the β_2 association in light-harvesting complex I of *Rhodospirillum rubrum*
Implication of peptide identity in dimer stability

Jérôme Seguin, Claudine Mayer, Bruno Robert and Véronique Arluison

FEBS Journal **275** (2008) 1240-1247

the FEBS Journal

Thermodynamics of the β_2 association in light-harvesting complex I of *Rhodospirillum rubrum*

Implication of peptide identity in dimer stability

Jérôme Seguin[1], Claudine Mayer[2], Bruno Robert[1] and Véronique Arluison[3]

1 CEA, iBiTecS, URA 2096 CNRS, SB^{2}SM, Gif/Yvette, France
2 LRMA/Université Paris 6, France
3 IBPC, CNRS UPR 9073 conventionnée avec l'université Paris VII, France

Keywords
bacteriochlorophyll; light harvesting complex; membrane protein; purple photosynthetic bacteria; transmembrane α helix

Correspondence
V. Arluison, IBPC, CNRS UPR 9073 conventionnée avec l'université Paris VII, 13 rue P. et M. Curie, 75005 Paris, France
Fax: +33 1 58 41 50 20
Tel: +33 1 58 41 51 39
E-mail: veronique.arluison@ibpc.fr

(Received 9 October 2007, revised 16 December 2007, accepted 9 January 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06283.x

The core light-harvesting LH1 protein from *Rhodospirillum rubrum* can dissociate reversibly in the presence of *n*-octyl-β-D-glucopyranoside into smaller subunit forms, exhibiting a dramatic blue-shift in absorption. During this process, two main species are observed: a dimer that absorbs at 820 nm (B820) and a monomer absorbing at 777 nm (B777). In the presence of *n*-octyl-β-D-glucopyranoside, we have previously shown that the B820 form is not only constituted by the αβ heterodimer alone, but that it exists in an equilibrium between the αβ heterodimer and β_2 homodimer states. We investigated the dissociation equilibrium for both oligomeric B820 forms. Using a theoritical model for αβ and β_2, we conclude that the B820 homodimer is stabilized by both hydrophobic effects (entropy) and non-covalent bonds (enthalpy). We discuss a possible interpretation of the energy changes.

The primary step in the photosynthetic process in purple bacteria consists of photon absorption by light-harvesting (LH) pigment–protein complexes. LH ensures the rapid and efficient transfer of excitation energy towards the photosynthetic reaction centre (RC) where the primary charge separation takes place. In most nonsulfur purple bacteria, the photosynthetic system contains two types of LH complexes, namely core (LH1) and peripheral (LH2) antenna. Both LH1 and LH2 are oligomers of a minimal unit containing two small transmembrane polypeptides, α and β. These polypeptides bind the pigment cofactors, bacteriochlorophyll (BChl) and carotenoid. Each polypeptide is composed of ~ 50 residues, with the N- and C-terminal regions separated by a hydrophobic α helix, which contains histidyl residues important for the interaction with BChl.

Both LH complexes are circular oligomers composed of associated heterodimers αβ. Structures of the LH2 complex from *Rhodopseudomonas acidophila* [1] and *Rhodospirillum molischianum* [2] have been solved using atomic resolution, detailing an annular structure of eight and nine heterodimers, respectively, with the β polypeptides forming an external ring that encircles the internal α polypeptide ring. Low-resolution structures are also available for LH1 and RC–LH1 of different purple bacteria [3–8] and demonstrate at least two distinct classes of RC–LH1: a monomeric structure which consists of one RC surrounded by one LH1 complex and a dimer characterized by two RCs in a S-shaped LH1 structure, as reported in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter blasticus* [9,10]. Recently, the resolution has been improved to 4.8 Å for the RC–LH1 complex of *Rhodopseudomonas palustris* [8].

Abbreviations
B873, B820 and B777, dissociated forms of light harvesting complex 1 absorbing at 873, 820 and 777 nm, respectively; Bchl, bacteriochlorophyll; CMC, critical micellar concentration; K_d, equilibrium dissociation constant; LH, light harvesting complex; RC, reaction centre; Rsp, Rhodospirillum; βOG, *n*-octyl-β-D-glucopyranoside.

All of these structures indicate that the protein forms rings larger than the peripheral antenna, sufficiently large to contain the RC. LH1 generally contains 16 heterodimeric subunits, and also 16 carotenoids and 32 intercalated Bchl molecules. These BChl moieties form an array of excitonically coupled molecules, implying that the electronic properties of LH1 depend strongly on interactions among the constituent polypeptides [11–15]. For example, the intact LH1 protein from the carotenoidless strain G_9^+ of *Rsp. rubrum* absorbs at 873 nm and can reversibly dissociate into monomers in the presence of the detergent *n*-octyl-β-D-glucopyranoside (βOG). Dissociation occurs in a two-step process; first, forming a species aborbing at 820 nm and subsequently one absorbing at 777 nm [16–18]. The latter corresponds to monomeric α and β polypeptides bound to BChl. The 820 nm absorbance peak is due mainly to isolated αβ heterodimers [13,19–22]. However, even if B820 exhibits the spectroscopic properties of a dimer [23–25], it may also display a tetrameric form depending on the detergent concentration [21]. In addition, by using Native-PAGE in the presence of βOG, characterization of the B820 form showed additional bands other than the expected αβ dimers. An equilibrium was observed between αβ-containing oligomers and β_2 dimers, all displaying very similar electronic absorption properties [22]. Local organization of the BChl dimers appears to be driven predominantly via interactions between these BChls, whereas dimer formation is dependent on the chemical nature of the polypeptide to which the BChls are bound.

The reversible dissociation of LH1 was monitored to determine the thermodynamic properties of homo- and heterodimer formation. Indeed, this question is of primary importance for understanding the factors that drive the polypeptide association. Here, we evaluate the contribution of peptide identity in the stability of the dimer.

Results

Large-scale purification of αβ and β_2 dimers

Large amounts of αβ and β_2 dimers were prepared using Native-PAGE in the presence of βOG. Figure 1A shows the Native-PAGE obtained for a B820 sample loaded onto the gel with a 20 mM polypeptide concentration. Six milligrams of B820 were loaded onto Native-PAGE. After Native-PAGE migration, the bands corresponding to αβ and β_2 were cut out and passively eluted overnight at 4 °C from the gel against 20 mM Tris/HCl (pH 8) containing 100 mM NaCl and 0.8% βOG. A low concentration of βOG was choosen to preserve the integrity of B820. Indeed, elution from the gel into a large volume of 2% βOG results in dilution of the sample and dissociation of the dimer into B777. Note that if the concentration of octylglucoside is very close to its critical micellar concentration (CMC) in water, as discussed previously [21], the ionic strength decreases the CMC and we can thus conclude that in our experiment, the CMC should be < 0.8%, allowing us to work in saturating conditions. The yields of αβ and β_2 recovery from total B820 were 50 and 15%, respectively.

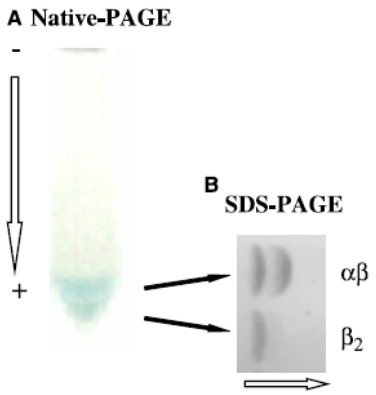


Fig. 1. Purification of αβ and β_2 dimers. Large-scale purification was performed using Native-PAGE as described in Experimental procedures. (A) Native-PAGE. (B) Second dimension indicating the polypeptide composition of the species separated by Native-PAGE.

In order to evaluate the polypeptide composition and the protein species present in the Native-PAGE experiments, aliquots of the proteins eluted were dialysed against water, concentrated, heat-denatured in the presence of 4% SDS and analysed by Tris–tricine–SDS/PAGE. Figure 1B displays the polypeptide composition of the two bands of the Native-PAGE. This experiment confirms that the upper and lower bands in the Native-PAGE gel correspond to the αβ heterodimer and the β_2 homodimer, respectively, as described previously [22].

Reaction order during dissociation of B820

The B820 forms of the LH1 antenna dissociate reversibly into monomeric forms that each absorb at 777 nm. The dissociation is achieved at 25 °C by diluting the sample in 20 mM Tris/HCl (pH 8) containing 100 mM NaCl and 0.8% βOG. Figure 2 shows the effects of dilution on B820/B777 equilibrium. The logB820–logB777 relationship is linear and the slope is

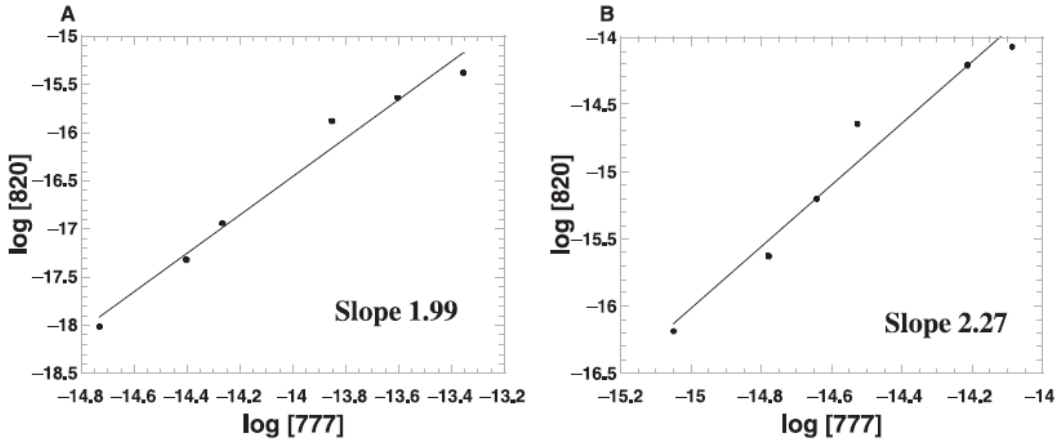


Fig. 2. Reaction order determination. Sample containing B820 was serially diluted with buffer 20 mM Tris/HCl buffer (pH 8) containing 100 mM NaCl and 0.8% βOG. (A) αβ heterodimer. (B) β_2 homodimer.

~ 2. This indicates that both B820 species dissociate into two components (i.e. dimer), as previously described for B820 heterodimer at this concentration of βOG [21].

Thermodynamics of B777 association into B820 for homo- and heterodimers

The dissociation of B820 into B777 is strongly temperature dependent: increasing temperatures favouring dissociation. Figure 3A shows the temperature dependence on spectra for αβ and β_2 dimers between 20 and 42 °C. Initial concentrations were chosen to observe pure B820 species at 20 °C. From the spectra, the concentrations of monomers and dimers were evaluated as described in Experimental procedures. Using these concentrations, the thermodynamic parameters of dimer dissociation were calculated. Figure 3B shows the plot of ln$K$ versus T for homo- and heterodimers, respectively. From these plots, thermodynamic parameters ΔH^0 and ΔS^0 were calculated as described in Experimental procedures. ΔH^0 and ΔS^0 were determined as -166 ± 5 and -135 ± 5 kJ·mol^{-1} and -0.455 ± 0.017 and -0.356 ± 0.015 kJ·mol^{-1}·K^{-1} for αβ and β_2 dimers, respectively.

Discussion

Thermodynamic study of the dimerization of LH1 subunits αβ and β_2

In accordance with our previous results for heterodimer αβ [21], we show that only dimers are present under our experimental conditions at 0.8% βOG (Fig. 2). Thus, in this study, the enthalpy and entropy changes (ΔH^0 and ΔS^0) observed are those of the dimerization process. In this way, our results differ from that of Sturgis *et al.* [19], where enthalpy and entropy changes were measured for tetramers (βOG concentration 2%). Our ΔH^0 and ΔS^0 values are -166 ± 5 and -135 ± 5 kJ·mol^{-1} and -0.455 ± 0.017 and 0.356 ± 0.015 kJ·mol^{-1}·K^{-1} for αβ and β_2 dimers, respectively. Our result shows that the stability of the β_2 dimer is slightly lower than that of αβ. They also demonstrate the energy decrease ($\sim 20\%$) associated with dimerization in both entropic and enthalpic terms. This result suggests that both noncovalent bonds (enthalpy) and hydrophobic interactions (entropy) are disrupted.

What drives the association of the β_2 dimer?

Several studies have shown that Bchl contributes to the stabilization of the dimer. Indeed, the central Mg^{2+} ion of BChl serves to coordinate a conserved histidine in the transmembrane α helices, and it has been proposed that α- and β-bound BChl interact with the other polypeptides [26]. In this study, we show that peptide identity is also important for the stability of the complex.

We previously demonstrated [27] that electrostatic interactions do not seem to play a major role in this dimerization process. We also demonstrated that the extending N-termini play an important role in promoting the dimerization of the two membrane polypeptides [27,28]. The most striking feature in αβ heterodimer is $W_{\alpha 5}$, which lies at the interface

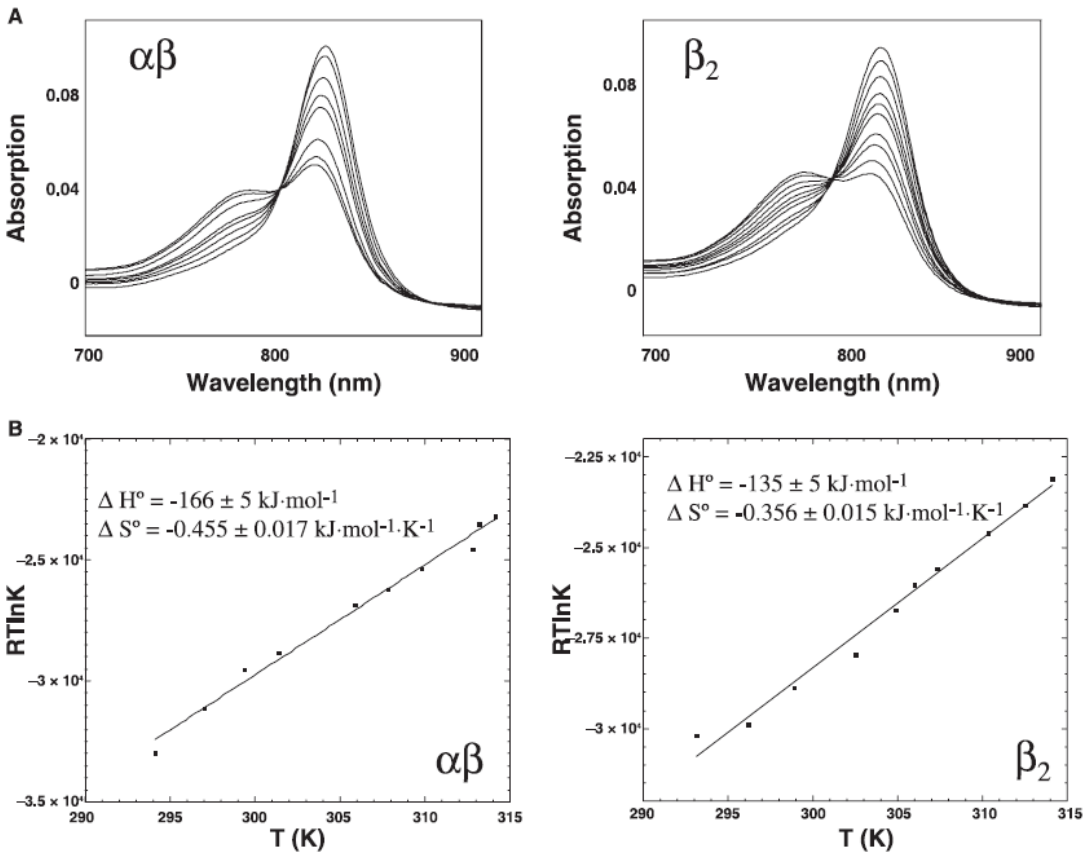


Fig. 3. (A) Effect of temperature on B820/B777 equilibrium. Spectra were measured as described in Experimental procedures for temperatures increasing from 20 to 42 °C and for αβ and β_2 dimers. Note a slight shift of < 3 nm in the isobestic point of β_2 titration compare to αβ. (B) Determination of thermodynamic parameters ΔH^0 and ΔS^0 for B820 dissociation using plot of $-\ln(K)$ versus T. Equilibrium constant K was calculated from spectra shown in (A).

between the polypeptides and is engaged by a number of hydrophobic interactions (namely with $I_{\alpha4}$, $P_{\alpha10}$, $L_{\alpha14}$, $A_{\beta16}$ and $H_{\beta20}$), thus forming an hydrophobic pocket at the membrane interface (supplementary Fig. S2) [27]. Thus, because the change in entropy is generally proportional to the surface area of the nonpolar side chain, our hypothesis is that the difference observed between αβ and β_2 is probably due to an alteration in the C-terminal hydrophobic cluster [29] and to the loss of $W_{\alpha5}$, which plays a major role in the αβ hydrophobic cluster. Note, however, that there is a predicted equivalent hydrophobic cluster that can play a similar role in β_2, centred on $F_{\beta19}$ in interaction with $F_{\beta23}$ (Fig. 4). This cluster may act as the force driving the interaction between the β monomers. Alternatively, it has been suggested that $W_{\alpha5}$ also participates in hydrophobic interactions with the GXXXG (X, any amino acids) motif in the β polypeptide [30,31] (even if we cannot observe this interaction in our model due to significant flexibility in the extramembrane domains). With regards to β_2, we speculate that a slight shift in one β peptide relative to the other (of < 2 Å) might allow GXXXG to find a complement in the other β peptide, as is the case for the glycophorin A dimer [32], and thus may partially compensate the loss of $W_{\alpha5}$ (Fig. 4).

Our results further indicate that noncovalent bonds are also broken (enthalpy change). As described previously [2], a H-bond between the carbonyl of $W_{\alpha10}$ and hydroxyl of $Ser_{\beta6}$ of 1LGH is observed and probably exists in *Rsp. rubrum* LH1 (between equivalent positions $W_{\alpha5}$ and $Ser_{\beta8}$). Similarly, $H_{\beta16}$ of 1LGH (equivalent to $H_{\beta19}$ in *Rsp. rubrum*) lies more closely to this tryptophan (2.3 Å), such that a H-bond could be formed between the NH group of the indole ring and

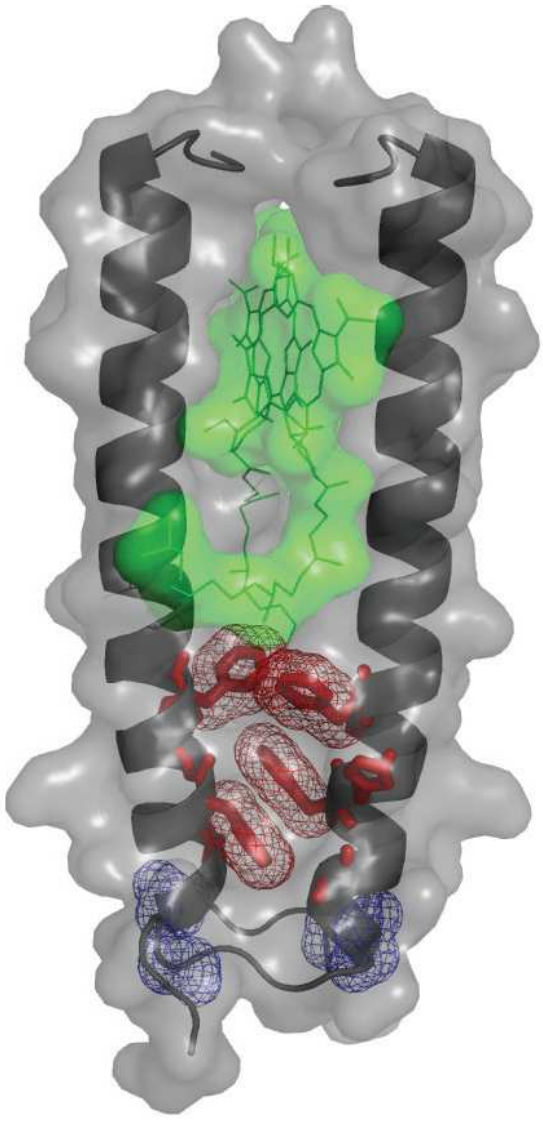


Fig. 4. Structural modelling of β_2 homodimer. The β polypeptides C^{α}-backbones are illustrated as a grey ribbon; Bchl are coloured green. Amino acids of the hydrophobic cluster are coloured red and the putative 'Phe zipper' is represented by a red mesh. Note that Phe–Phe distances are < 5 Å. Glycines of the GXXXG motives are represented with blue mesh. PYMOL (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA; http://www.pymol.org) was used to generate the figure.

the imidazole ring provided by the nitrogen atom facing the deprotonated tryptophan side chain. Thus, the observed change in enthalpy could be attributed to the loss of this H-bond.

Why does β exhibit greater self-association than α?

The β_2 homodimer may be more stable than α_2 because of the complementary hydrophobic Phe rings, which form a sort of 'Phe zipper' (analogous to a Leu zipper) in the dimer [33] (Fig. 4). It is worth mentioning that a slight movement of the Trp residues could accomodate the Bchl tails. In the β_2 dimer, the Bchl tails fall alongside the phenylalanine core. By contrast, our model suggests that the α_2 dimer has the phenylalanine residues out in solution, buries the most polar sections of large stretches of the helices (the carbonyl groups), and offers only a loose packing of numerous residues at each end. Thus, it may explain why the stability of the α_2 dimer may be thermodynamically inferior to that of β_2. However, the possibility of α_2 dimer formation cannot be completely excluded at this stage.

Experimental procedures

Unless otherwise specified, all chemicals were from Sigma (St Louis, MO, USA) or Merck-Biochemicals (Darmstadt, Germany).

Purification of B820 subunits

Rhodospirillum rubrum B820 was purified from the carotenoidless strain G_9^+ [34,35]. The purification procedure has been described previously [21,22]. B820 subunits were first solubilized by treating chromatophores with 2% βOG and loaded on a DEAE Sepharose ion-exchange chromatography column. Then, pure LH1–RC complexes were titrated with 2% βOG (Biomol, Hamburg, Germany) and loaded onto a Resource Q FPLC anion-exchange column. The quality of the fractions collected was monitored by SDS/PAGE, followed by Coomassie Brilliant Blue staining. The whole purification procedure was performed in dim light. Protein concentrations were determined either from the absorption at 280 nm (absorption coefficient at 280 nm calculated from the amino acid composition $\varepsilon_{280}{}^{1\ mg \cdot mL^{-1}} = 2.9$) or from the absorption at 777 or 820 nm ($\varepsilon_{777} = 55\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$; $\varepsilon_{820} = 86\ mM^{-1} \cdot cm^{-1}$) [36].

Native-PAGE electrophoresis

For Native-PAGE electrophoresis, B820 was concentrated and added to loading buffer consisting of 125 mM Tris (pH 8.0) containing 20% glycerol and 2% βOG. Electrophoresis was carried out at room temperature as described previously [37], except that SDS was replaced by 2% βOG. The concentration of 2% was kept constant during purification and Native-PAGE. The acrylamide concentration was 6%. Migration was followed by the green colour of the

native sample. Note that the experiments were carried out at lower and higher temperatures (4 and 37 °C) and that the results of these experiments were not fulfilled for the separation of various species (for example, increasing temperature leads to denaturation of the Bchl-peptides with a characteristic absorption at 770 and 685 nm).

Elution from Native-PAGE and second-dimension migration

B820 protein species separated by Native-PAGE were eluted passively from Native-PAGE overnight at 4 °C in 20 mM Tris buffer (pH 8.0) containing 100 mM NaCl and 0.8% βOG in dim light. As mentioned for PAGE separation, the elution conditions were optimized in order to keep fully native Bchl-peptides and to avoid loss of Bchl. The concentration of 0.8% βOG was choosen in order to observe dimer formation, whereas higher βOG concentration results in tetramer formation [21]. In addition, this low concentration allows the integrity of the diluted sample to be preserved during passive elution. After elution, characterization of the polypeptide content of the different bands in Native-PAGE was achieved by subjection to a second-dimension migration. A tricine–SDS/PAGE was performed to improve the resolution and separate the small LH1 polypeptides. Discontinuous electrophoresis of a 16.5% acrylamide tricine/SDS gel was carried out as described previously [38], without a 'spacer' gel.

Reaction order determination

For reaction order determination, B820 was serially diluted, at a constant detergent concentration of 0.8% in 20 mM Tris buffer (pH 8) containing 100 mM NaCl. Absorption spectra of the B820/B777 equilibrium were recorded at 20 °C with Cary 5 spectrophotometer (Varian plc, Sydney, NSW, Australia). Absorption of the B777 and B820 forms were extracted from these spectra by curve fitting, using the GRAMS software (Galactic, Salem, NH, USA). An example of deconvolution is presented in supplementary Fig. S1. Reaction order for B820 dissociation was determined from the plot log([B820]) versus log([B777]).

Thermodynamics of B820 dissociation into B777

Effect of temperature on the B820/B777 equilibrium

Spectra of B820 and B777 at equilibrium were recorded for various temperatures between 20 and 42 °C. Temperatures were measured precisely in the quartz cells before measurement of the spectra.

Determination of thermodynamic parameters

The data derived from spectra were used to plot $\ln K$ versus T.

K_d was calculated as follows:

For the heterodimer, the model $\alpha + \beta \Leftrightarrow \alpha\beta$ was applied and the K_d was calculated as $[820]/([777]/2)^2$.

For the homodimer, $2\ \beta \Leftrightarrow \beta_2$. Model was applied and K_d was calculated as $[820]/[777]^2$. ΔH^0 and ΔS^0 of B820 dissociation were determined from the plots for both species.

Structural modelling of the β_2 dimer

The crystal structures from two LH1 complexes which share homolog with *Rsp. rubrum* are known, e.g. *Rhodopseudomonas palustris* RC–LH1 (PDB code 1PYH) [8] and *Rsp. molischianum* LH2 (PDB code 1LGH) [2]. The fact that only the Cα trace of 1PYH is available together with a higher sequence similarity between *Rsp. molischianum* LH2 and *Rsp. rubrum* LH1 (45%) led us to use 1LGH as a template for modelling *Rsp. rubrum* LH1 [27]. The LH1 α and β structures were also determined in organic solvent by NMR [31]. However, because these structures were obtained in organic solvent and not as dimers in the membrane, the 1LGH structure was used as a template. The coordinates of the resulting model for the *Rsp. rubrum* B820 structure have been deposited in the Protein Data Bank under accession number 1NW0. It should be noted that this *Rsp. rubrum* B820 structure superimposes well with the Cα trace of the *Rhodopseudomonas palustris* LH1 dimer (r.m.s.d. 0.7 Å for α and 0.6 Å for β) [8] and with that of isolated peptides out of the membrane (r.m.s.d. 2.36 Å for α and 1.94 Å for β) [31].

The β_2 structure was modelled using the position of the bacteriochlorophyll molecules from the *Rsp. rubrum* B820 model as an anchor for the superimposition of the central core of a second β monomer over the α monomer leading to a β–β duplex. Superimposed polypeptide regions are residues 13–35 for the α polypeptide and 21–43 for the β polypeptide, leading to a conserved spatial position of the corresponding histidines (H29 in α and H37 in β). The complex was energy minimized in 100 steps with a dielectric constant of 1 using the CNS program [39].

Acknowledgements

We are very grateful to Pierre Poulain, Alexandre Dawid, Rahul Roy, Mike Brenner and Karen Sukhodolets for their critical comments on the manuscript. We are also grateful to Pierre Poulain for his help with PYMOL figures. This study was supported by CEA and CNRS. VA was supported by a fellowship from the CEA and by University Paris VII.

References

1 McDermott G, Prince SM, Freer AA, Hawthornthwaite-Lawless AM, Papiz MZ, Cogdell RJ & Isaacs NW

(1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* **374**, 517–521.
2 Koepke J, Hu X, Muenke C, Schulten K & Michel H (1996) The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800–850) from *Rhodospirillum molischianum*. *Structure* **4**, 581–597.
3 Karrasch S, Bullough PA & Ghosh R (1995) The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *EMBO J* **14**, 631–638.
4 Walz T & Ghosh R (1997) Two-dimensional crystallization of the light-harvesting I-reaction centre photounit from *Rhodospirillum rubrum*. *J Mol Biol* **265**, 107–111.
5 Walz T, Jamieson SJ, Bowers CM, Bullough PA & Hunter CN (1998) Projection structures of three photosynthetic complexes from *Rhodobacter sphaeroides*: LH2 at 6 Å, LH1 and RC–LH1 at 25 Å. *J Mol Biol* **282**, 833–845.
6 Jamieson SJ, Wang P, Qian P, Kirkland JY, Conroy MJ, Hunter CN & Bullough PA (2002) Projection structure of the photosynthetic reaction centre–antenna complex of *Rhodospirillum rubrum* at 8.5 Å resolution. *EMBO J* **21**, 3927–3935.
7 Scheuring S, Seguin J, Marco S, Levy D, Robert B & Rigaud JL (2003) Nanodissection and high-resolution imaging of the *Rhodopseudomonas viridis* photosynthetic core complex in native membranes by AFM. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1690–1693.
8 Roszak AW, Howard TD, Southall J, Gardiner AT, Law CJ, Isaacs NW & Cogdell RJ (2003) Crystal structure of the RC–LH1 core complex from *Rhodopseudomonas palustris*. *Science* **302**, 1969–1972.
9 Scheuring S, Busselez J & Levy D (2005) Structure of the dimeric PufX-containing core complex of *Rhodobacter blasticus* by *in situ* atomic force microscopy. *J Biol Chem* **280**, 1426–1431.
10 Qian P, Hunter CN & Bullough PA (2005) The 8.5 Å projection structure of the core RC–LH1-PufX dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Mol Biol* **349**, 948–960.
11 van Grondelle R (1985) Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems. *Biochim Biophys Acta Rev* **811**, 147–195.
12 Westerhuis WH, Hunter CN, van Grondelle R & Niederman RA (1999) Modeling of oligomeric-state dependent spectral heterogeneity in the B875 light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides* by numerical simulation. *J Phys Chem B* **103**, 7733–7742.
13 Loach PA & Parkes-Loach PS (1995) Structure–function relationships in core-light-harvesting complexes (LH1) as determined by characterization of the structural subunit and by reconstitution experiments. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship RE, Madigan MT & Bauer CE, eds), pp. 437–471. Kluwer, Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
14 Sturgis JN, Olsen JD, Robert B & Hunter CN (1997) Functions of conserved tryptophan residues of the core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **36**, 2772–2778.
15 van Grondelle R & Novoderezhkin VI (2006) Energy transfer in photosynthesis: experimental insights and quantitative models. *Phys Chem Chem Phys* **8**, 793–807.
16 Ghosh R, Hauser H & Bachofen R (1988) Reversible dissociation of the B873 light-harvesting complex from *Rhodospirillum rubrum* G9+. *Biochemistry* **27**, 1004–1014.
17 Parkes-Loach PS, Sprinkle JR & Loach PA (1988) Reconstitution of the B873 light-harvesting complex of *Rhodospirillum rubrum* from the separately isolated alpha- and beta-polypeptides and bacteriochlorophyll a. *Biochemistry* **27**, 2718–2727.
18 Vegh AP & Robert B (2002) Spectroscopic characterisation of a tetrameric subunit form of the core antenna protein from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett* **528**, 222–226.
19 Sturgis JN & Robert B (1994) Thermodynamics of membrane polypeptide oligomerization in light-harvesting complexes and associated structural changes. *J Mol Biol* **238**, 445–454.
20 Pandit A, Visschers RW, van Stokkum IH, Kraayenhof R & van Grondelle R (2001) Oligomerization of light-harvesting I antenna peptides of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **40**, 12913–12924.
21 Arluison V, Seguin J & Robert B (2002) The reaction order of the dissociation reaction of the B820 subunit of *Rhodospirillum rubrum* light-harvesting I complex. *FEBS Lett* **516**, 40–42.
22 Arluison V, Seguin J & Robert B (2002) Biochemical characterization of the dissociated forms from the core antenna proteins from purple bacteria. *Biochemistry* **41**, 11812–11819.
23 van Mourik F, van der Oord JR, Visscher KJ, Parkes-Loach PS, Loach PA, Visschers RW & van Grondelle R (1991) Exciton interactions in the light-harvesting antenna of photosynthetic bacteria studied with triplet-singlet spectroscopy and singlet-triplet annhilation in the B820 subunit form of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* **1059**, 111–119.
24 Visschers RW, Chang MC, van Mourik F, Parkes-Loach PS, Heller BA, Loach PA & van Grondelle R (1991) Fluorescence polarization and low-temperature absorption spectroscopy of a subunit form of light-harvesting complex I from purple photosynthetic bacteria. *Biochemistry* **30**, 5734–5742.
25 Visschers RW, van Mourik F, Monshouwer R & van Grondelle R (1993) Inhomogeneous spectral broadening of B820 subunit forms of LH1. *Biochem Biophys Acta* **1141**, 238–244.
26 Olsen JD, Sturgis JN, Westerhuis WH, Fowler GJ, Hunter CN & Robert B (1997) Site-directed

modification of the ligands to the bacteriochlorophylls of the light-harvesting LH1 and LH2 complexes of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **36**, 12625–12632.
27 Arluison V, Seguin J, Le Caer JP, Sturgis JN & Robert B (2004) Hydrophobic pockets at the membrane interface: an original mechanism for membrane protein interactions. *Biochemistry* **43**, 1276–1282.
28 Parkes-Loach PS, Majeed AP, Law CJ & Loach PA (2004) Interactions stabilizing the structure of the core light-harvesting complex (LH1) of photosynthetic bacteria and its subunit (B820). *Biochemistry* **43**, 7003–7016.
29 Dunitz JD (1994) The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules. *Science* **264**, 670.
30 Russ WP & Engelman DM (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix–helix association. *J Mol Biol* **296**, 911–919.
31 Wang ZY, Gokan K, Kobayashi M & Nozawa T (2005) Solution structures of the core light-harvesting alpha and beta polypeptides from *Rhodospirillum rubrum*: implications for the pigment–protein and protein–protein interactions. *J Mol Biol* **347**, 465–477.
32 Senes A, Gerstein M & Engelman DM (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* **296**, 921–936.
33 Hunter CA, Singh J & Thornton JM (1991) Pi–pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine–phenylalanine interactions in proteins. *J Mol Biol* **218**, 837–846.
34 Brunisholz RA, Suter F & Zuber H (1984) The light-harvesting polypeptides of *Rhodospirillum rubrum*. I. The amino-acid sequence of the second light-harvestng polypeptide B880-beta (B870-beta) of *Rhodospirillum rubrum* S1 and the carotenoidless mutant G-9+. Carotenoidless mutant G-9+. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **365**, 675–688.
35 Brunisholz RA, Wiemken V, Suter F, Bachofen R & Zuber H (1984) The light-harvesting polypeptides of *Rhodospirillum rubrum*. II. Localisation of the amino-terminal regions of the light-harvesting polypeptides B870-alpha and B870-beta and the reaction-centre subunit L at the cytoplasmic side of the photosynthetic membrane of *Rhodospirillum rubrum* G-9+. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **365**, 689–701.
36 Chang MC, Callahan PM, Parkes-Loach PS, Cotton TM & Loach PA (1990) Spectroscopic characterization of the light-harvesting complex of *Rhodospirillum rubrum* and its structural subunit. *Biochemistry* **29**, 421–429.
37 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
38 Schagger H & von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368–379.
39 Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS *et al.* (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 905–921.

Supplementary material

The following supplementary material is available online:

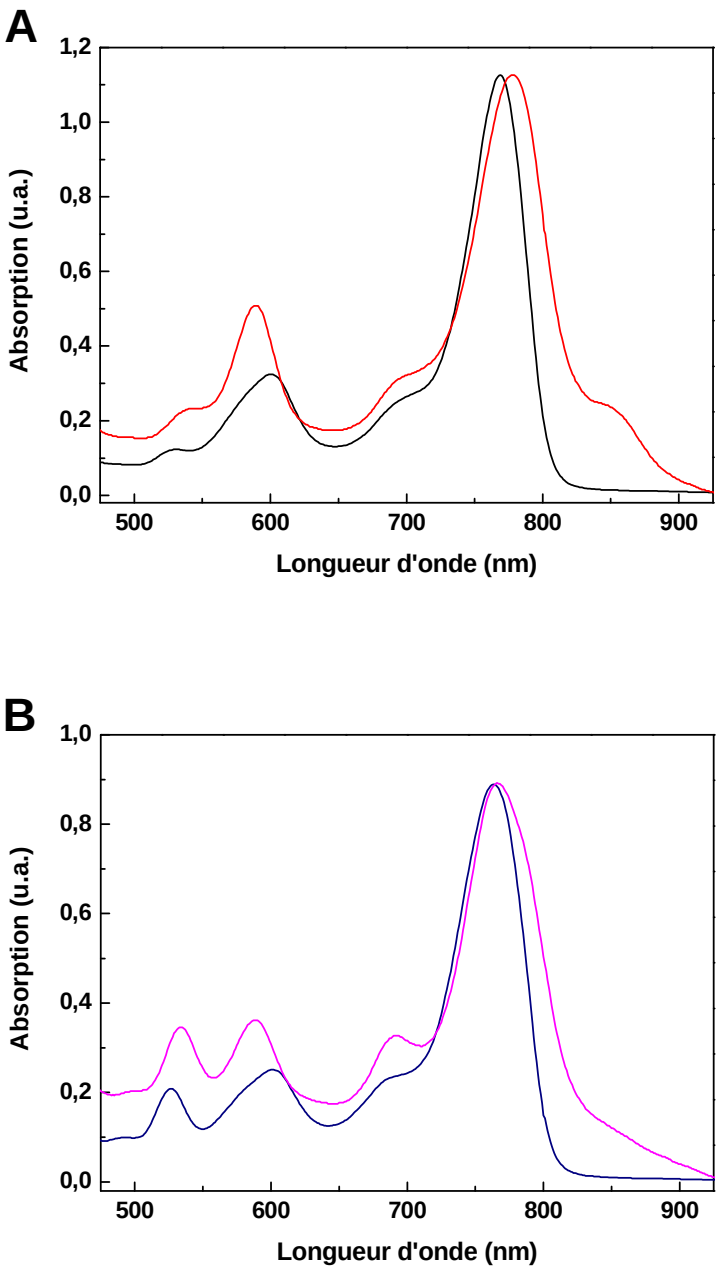
Fig. S1. Deconvolution of these mixed spectra into the two components B820 (dashed line) and B777 (dotted line). (A) $\alpha\beta$ heterodimer, (B) β_2 homodimer.

Fig. S2. Structural modelling of $\alpha\beta$ heterodimer for comparison with β_2. The polypeptides C^{α} backbones are illustrated as a grey ribbon; Bchl are coloured green. Amino acids of the hydrophobic cluster (centred on $W_{\alpha 5}$ in $\alpha\beta$) are coloured red.

This material is available as part of the online article from http://www.blackwell-synergy.com

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

ANNEXE 5



Spectres d'absorption des pigments extraits des membranes de *Rsp. rubrum* G9 au cours d'un expérience entre 45 et 75°C : A) en début de cycle à 45°C et B) en fin de cycle à 45°C

(——) (——) Bchls extraites par un mélange acétone : méthanol (7 : 2)

(——) (——) Bchls extraites par un mélange acétone : méthanol (7 : 2), puis repris dans un tampon phosphate contenant 0,1% DDM

Cette expérience montre que les Bchls et Bpheos peuvent former des agrégats en présence de détergent, caractérisés par l'apparition d'une bande d'absorption vers 850 nm.

Bibliographie

Agalidis, I., Mattioli, T.A. and Reiss-Husson, F. (1999) Spirilloxanthin is released by detergent from Rubrivivax gelatinosus reaction center as an aggregate with unusual spectral properties. *Photosynth Res*, 62, 31-42.

Arluison, V., Seguin, J., Le Caer, J.P., Sturgis, J.N. and Robert, B. (2004) Hydrophobic pockets at the membrane interface: an original mechanism for membrane protein interactions. *Biochemistry*, 43, 1276-1282.

Arluison, V., Seguin, J. and Robert, B. (2002a) Biochemical characterization of the dissociated forms from the core antenna proteins from purple bacteria. *Biochemistry*, 41, 11812-11819.

Arluison, V., Seguin, J. and Robert, B. (2002b) The reaction order of the dissociation reaction of the B820 subunit of Rhodospirillum rubrum light-harvesting I complex. *FEBS Lett*, 516, 40-42.

Ash, W.L., Zlomislic, M.R., Oloo, E.O. and Tieleman, D.P. (2004) Computer simulations of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 158-189.

Bahatyrova, S., Frese, R.N., van der Werf, K.O., Otto, C., Hunter, C.N. and Olsen, J.D. (2004) Flexibility and size heterogeneity of the LH1 light harvesting complex revealed by atomic force microscopy: functional significance for bacterial photosynthesis. *J Biol Chem*, 279, 21327-21333.

Bannwarth, M. and Schulz, G.E. (2003) The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochim Biophys Acta*, 1610, 37-45.

Bauer, C.E. (1995) Regulation of photosynthetic gene expression. In Blankenship, R.E., Madigan, M.T. and Bauer, C.E. (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1221-1234.

Beatty, J.T. (1995) Organisation of photosynthesis gene transcripts. In Blankenship, R.E., Madigan, M.T. and Bauer, C.E. (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1209-1219.

Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. and Frank, J. (1997) Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, 278, 2123-2126.

Berrier, C., Park, K.H., Abes, S., Bibonne, A., Betton, J.M. and Ghazi, A. (2004) Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. *Biochemistry*, 43, 12585-12591.

Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56, 930-933.

Bond, P.J., Cuthbertson, J. and Sansom, M.S. (2005) Simulation studies of the interactions between membrane proteins and detergents. *Biochem Soc Trans*, 33, 910-912.

Bond, P.J. and Sansom, M.S. (2006) Insertion and assembly of membrane proteins via simulation. *J Am Chem Soc*, 128, 2697-2704.

Bowie, J.U. (2005) Cell biology: border crossing. *Nature*, 433, 367-369.

Braatsch, S. and Klug, G. (2004) Blue light perception in bacteria. *Photosynth Res*, 79, 45-57.

Braun, P., Olsen, J.D., Strohmann, B., Hunter, C.N. and Scheer, H. (2002) Assembly of light-harvesting bacteriochlorophyll in a model transmembrane helix in its natural environment. *J Mol Biol*, 318, 1085-1095.

Braun, P., Vegh, A.P., von Jan, M., Strohmann, B., Hunter, C.N., Robert, B. and Scheer, H. (2003) Identification of intramembrane hydrogen bonding between 13(1) keto group of bacteriochlorophyll and serine residue alpha27 in the LH2 light-harvesting complex. *Biochim Biophys Acta*, 1607, 19-26.

Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T.A., Kuhlbrandt, W. and Collinson, I. (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature*, 418, 662-665.

Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of Gpi-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains During Transport to the Apical Cell-Surface. *Cell*, 68, 533-544.

Camara-Artigas, A., Brune, D. and Allen, J.P. (2002) Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11055-11060.

Chabre, M., Cone, R. and Saibil, H. (2003) Biophysics: is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature*, 426, 30-31; discussion 31.

Chang, M.C., Meyer, L. and Loach, P.A. (1990) Isolation and characterization of a structural subunit from the core light-harvesting complex of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 and puc705-BA. *Photochem Photobiol*, 52, 873-881.

Cherezov, V., Clogston, J., Papiz, M.Z. and Caffrey, M. (2006) Room to move: crystallizing membrane proteins in swollen lipidic mesophases. *J Mol Biol*, 357, 1605-1618.

Cogdell, R.J., Gall, A. and Kohler, J. (2006) The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. *Q Rev Biophys*, 39, 227-324.

Cogdell, R.J., Gardiner, A.T., Roszak, A.W., Law, C.J., Southall, J. and Isaacs, N.W. (2004) Rings, ellipses and horseshoes: how purple bacteria harvest solar energy. *Photosynth Res*, 81, 207-214.

Cogdell, R.J. and Scheer, H. (1985) Circular dichroism of light-harvesting complexes from purple photosynthetic bacteria. *Photochem Photobiol*, 42, 669-678.

Cogdell, R.J., Zuber, H., Thornber, J.P., Drews, G., Gingras, G., Niederman, R.A., Parson, W.W. and Feher, G. (1985) Recommendations for the naming of photochemical reaction centers and light-harvesting pigment-protein complexes from purple photosynthetic bacteria. *Biochem. Biophys. Acta*, 806, 185-186.

Cohen-Bazire, G. and Kunisawa, R. (1963) The fine structure of Rhodospirillum rubrum. *J Cell Biol*, 16, 401-419.

Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R. and Stanier, R.Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Physiol*, 49, 25-68.

Danielli, J.H. and Davson, H. (1935) A contributio n to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cell and Comparative Physiology*, 5, 495-508.

Davis, C.M., Bustamante, P.L. and Loach, P.A. (1995) Reconstitution of the bacterial core light-harvesting complexes of Rhodobacter sphaeroides and Rhodospirillum rubrum with isolated alpha- and beta-polypeptides, bacteriochlorophyll alpha, and carotenoid. *J Biol Chem*, 270, 5793-5804.

Davis, C.M., Parkes-Loach, P.S., Cook, C.K., Meadows, K.A., Bandilla, M., Scheer, H. and Loach, P.A. (1996) Comparison of the structural requirements for bacteriochlorophyll binding in the core light-harvesting complexes of Rhodospirillum rubrum and Rhodospirillum sphaeroides using reconstitution methodology with bacteriochlorophyll analogs. *Biochemistry*, 35, 3072-3084.

De Rosier, D.J. and Klug, A. (1968) Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature*, 217, 130-134.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodopseudomonas viridis at 3 A resolution. *Nature*, 318, 618-624.

Deisenhofer, J. and Michel, H. (1989) Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium Rhodopseudomonas viridis. *Embo J*, 8, 2149-2170.

Drews, G. (1996) Formation of the light-harvesting complex I (B870) of anoxygenic phototrophic purple bacteria. *Arch Microbiol*, 166, 151-159.

Drews, G. and Pfennig, N. (1991) Phototrophic purple bacteria. In Shively, J.M. and Barton, L.L. (eds.), *Variations in Autotrophic Life*. Academic Press, London, pp. 51-97.

Egawa, A., Fujiwara, T., Mizoguchi, T., Kakitani, Y., Koyama, Y. and Akutsu, H. (2007) Structure of the light-harvesting bacteriochlorophyll c assembly in chlorosomes from Chlorobium limicola determined by solid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 790-795.

Engel, A. and Muller, D.J. (2000) Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Biol*, 7, 715-718.

Engelman, D.M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438, 578-580.

Faham, S. and Bowie, J.U. (2002) Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J Mol Biol*, 316, 1-6.

Fernandez, C. and Wuthrich, K. (2003) NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles. *FEBS Lett*, 555, 144-150.

Fiaux, J., Bertelsen, E.B., Horwich, A.L. and Wuthrich, K. (2002) NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature*, 418, 207-211.

Fiedor, L., Akahane, J. and Koyama, Y. (2004) Carotenoid-induced cooperative formation of bacterial photosynthetic LH1 complex. *Biochemistry*, 43, 16487-16496.

Fiedor, L. and Scheer, H. (2005) Trapping of an assembly intermediate of photosynthetic LH1 antenna beyond B820 subunit. Significance for the assembly of photosynthetic LH1 antenna. *J Biol Chem*, 280, 20921-20926.

Fisher, L.E., Engelman, D.M. and Sturgis, J.N. (1999) Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycophorin A transmembrane domain. *J Mol Biol*, 293, 639-651.

Fisher, L.E., Engelman, D.M. and Sturgis, J.N. (2003) Effect of detergents on the association of the glycophorin a transmembrane helix. *Biophys J*, 85, 3097-3105.

Förster, T. (1948) Intermolecular energy transfer and fluorescence. *Ann. Phys.*, 2, 55-75.

Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A. and Palczewski, K. (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*, 421, 127-128.

Fotiadis, D., Qian, P., Philippsen, A., Bullough, P.A., Engel, A. and Hunter, C.N. (2004) Structural analysis of the reaction center light-harvesting complex I photosynthetic core complex of Rhodospirillum rubrum using atomic force microscopy. *J Biol Chem*, 279, 2063-2068.

Fowler, G.J., Sockalingum, G.D., Robert, B. and Hunter, C.N. (1994) Blue shifts in bacteriochlorophyll absorbance correlate with changed hydrogen bonding patterns in light-harvesting 2 mutants of Rhodobacter sphaeroides with alterations at alpha-Tyr-44 and alpha-Tyr-45. *Biochem J*, 299 (Pt 3), 695-700.

Fowler, G.J., Visschers, R.W., Grief, G.G., van Grondelle, R. and Hunter, C.N. (1992) Genetically modified photosynthetic antenna complexes with blueshifted absorbance bands. *Nature*, 355, 848-850.

Fraley, R.T., Lueking, D.R. and Kaplan, S. (1979) The relationship of intracytoplasmic membrane assembly to the cell division cycle in Rhodopseudomonas sphaeroides. *J Biol Chem*, 254, 1980-1986.

Frank, H.A. and Cogdell, R.J. (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol*, 63, 257-264.

Fraser, N.J., Hashimoto, H. and Cogdell, R.J. (2001) Carotenoids and bacterial photosynthesis: The story so far. *Photosynth Res*, 70, 249-256.

Freer, A., Prince, S., Sauer, K., Papiz, M., Hawthornthwaite-Lawless, A., McDermott, G., Cogdell, R. and Isaacs, N.W. (1996) Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas acidophila. *Structure*, 4, 449-462.

Freites, J.A., Tobias, D.J., von Heijne, G. and White, S.H. (2005) Interface connections of a transmembrane voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15059-15064.

Fujimori, E. (1969) Bacteriochlorophyll pheophytinization in chromatophores and subchromatophores from Rhodospirillum rubrum. *Biochim Biophys Acta*, 180, 360-367.

Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A. (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *Journal of Cell Biology*, 157, 1071-1081.

Gall, A., Cogdell, R.J. and Robert, B. (2003a) Influence of carotenoid molecules on the structure of the bacteriochlorophyll binding site in peripheral light-harvesting proteins from Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, 42, 7252-7258.

Gall, A., Ellervee, A., Sturgis, J.N., Fraser, N.J., Cogdell, R.J., Freiberg, A. and Robert, B. (2003b) Membrane protein stability: high pressure effects on the structure and chromophore-binding properties of the light-harvesting complex LH2. *Biochemistry*, 42, 13019-13026.

Gentemann, S., Nelson, N.Y., Jaquinod, L., Nurco, D.J., Leung, S.H., Medforth, C.J., Smith, K.M., Fajer, J. and Holten, D. (1997) Variations and temperature dependence of the excited state properties of conformationally ans electronically perturbed zinc and free base porphyrins. *J Phys Chem B*, 101, 1247-1254.

Gerken, U., Lupo, D., Tietz, C., Wrachtrup, J. and Ghosh, R. (2003) Circular symmetry of the light-harvesting 1 complex from Rhodospirillum rubrum is not perturbed by interaction with the reaction center. *Biochemistry*, 42, 10354-10360.

Ghosh, R., Hardmeyer, A., Thoenen, I. and Bachofen, R. (1994) Optimization of the Sistrom Culture Medium for Large-Scale Batch Cultivation of Rhodospirillum rubrum under Semiaerobic Conditions with Maximal Yield of Photosynthetic Membranes. *Appl Environ Microbiol*, 60, 1698-1700.

Ghosh, R., Hauser, H. and Bachofen, R. (1988) Reversible dissociation of the B873 light-harvesting complex from Rhodospirillum rubrum G9+. *Biochemistry*, 27, 1004-1014.

Ghosh, R., Hoenger, A., Hardmeyer, A., Mihailescu, D., Bachofen, R., Engel, A. and Rosenbusch, J.P. (1993) Two-dimensional crystallization of the light-harvesting complex from Rhodospirillum rubrum. *J Mol Biol*, 231, 501-504.

Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B. and Vermeglio, A. (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature*, 417, 202-205.

Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S.C. and Walz, T. (2005) Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature*, 438, 633-638.

Gonen, T., Sliz, P., Kistler, J., Cheng, Y. and Walz, T. (2004) Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature*, 429, 193-197.

Gorter, E. and Grendel, J. (1925) On bimolecular layers o lipoids on the chromocytes of blood. *J. Exp. Med.*, 41, 439-443.

Grammel, H., Gilles, E.D. and Ghosh, R. (2003) Microaerophilic cooperation of reductive and oxidative pathways allows maximal photosynthetic membrane biosynthesis in Rhodospirillum rubrum. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6577-6586.

Gudowska-Nowak, E., Newton, M.D. and Fajer, J. (1990) Conformational and environmental-effects on bacteriochlorophyll optical spectra - correlations of calculated spectra with structural results. *J Phys Chem*, 94, 5795-5701.

Gumbart, J., Wang, Y., Aksimentiev, A., Tajkhorshid, E. and Schulten, K. (2005) Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 423-431.

Heck, C., Balzer, A., Fuhrmann, O. and Klug, G. (2000) Initial events in the degradation of the polycistronic puf mRNA in Rhodobacter capsulatus and consequences for further processing steps. *Mol Microbiol*, 35, 90-100.

Helenius, A. and Simons, K. (1972) The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J Biol Chem*, 247, 3656-3661.

Helenius, A. and Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*, 415, 29-79.

Heller, B.A. and Loach, P.A. (1990) Isolation and characterization of a subunit form of the B875 light-harvesting complex from Rhodobacter capsulatus. *Photochem Photobiol*, 51, 621-627.
Helms, V. (2002) Attraction within the membrane. Forces behind transmembrane protein folding and supramolecular complex assembly. *EMBO Rep*, 3, 1133-1138.
Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, 213, 899-929.
Henderson, R. and Unwin, P.N. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257, 28-32.
Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S.H. and von Heijne, G. (2005) Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, 433, 377-381.
Hessner, M.J., Wejksnora, P.J. and Collins, M.L. (1991) Construction, characterization, and complementation of Rhodospirillum rubrum puf region mutants. *J Bacteriol*, 173, 5712-5722.
Hong, M. (2006) Oligomeric structure, dynamics, and orientation of membrane proteins from solid-state NMR. *Structure*, 14, 1731-1740.
Hughes, A.V., Rees, P., Heathcote, P. and Jones, M.R. (2006) Kinetic analysis of the thermal stability of the photosynthetic reaction center from Rhodobacter sphaeroides. *Biophys J*, 90, 4155-4166.
Hunte, C. (2005) Specific protein-lipid interactions in membrane proteins. *Biochem Soc Trans*, 33, 938-942.
Hunter, C.N. and Turner, G. (1988) Transfer of genes coding for apoproteins of reaction center and light-harvesting LH1 complexes to Rhodobacter sphaeroides. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1471-1480.
Hynninen, P.H. (1991) Chemistry of chlorophylls: modifications. In Scheer, H. (ed.), *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 145-209.
Israelachvili, J.N. (1992) *Intermolcular and surface forces*. academic press.
Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. and Ninham, B.W. (1976) Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions Ii*, 72, 1525-1568.
Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. and Ninham, B.W. (1977) Theory of Self-Assembly of Lipid Bilayers and Vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 470, 185-201.
Jacobson, K., Sheets, E.D. and Simson, R. (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, 268, 1441-1442.
Jamieson, S.J., Wang, P., Qian, P., Kirkland, J.Y., Conroy, M.J., Hunter, C.N. and Bullough, P.A. (2002) Projection structure of the photosynthetic reaction centre-antenna complex of Rhodospirillum rubrum at 8.5 A resolution. *Embo J*, 21, 3927-3935.
Janosi, L., Keer, H., Kosztin, I. and Ritz, T. (2006) Influence of subunit structure on the oligomerization state of light-harvesting complexes: a free energy calculation study. *Chemical Physics*, 323, 117-128.
Janusonis, J., Valkunas, L., Rutkauskas, D. and van Grondelle, R. (2008) Spectral dynamics of individual bacterial light-harvesting complexes: alternative disorder model. *Biophys J*, 94, 1348-1358.
Jungas, C., Ranck, J.L., Rigaud, J.L., Joliot, P. and Vermeglio, A. (1999) Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides. *Embo J*, 18, 534-542.
Kaiser, I. and Oelze, J. (1980) Growth and adaptation to phototrophic conditions of Rhodospirillum rubrum and Rhodopseudomonas sphaeroides at differents temperatures. *Arch. Microbiol.*, 126, 187-194.

Kaplan, S., Cain, B.D., Donohue, T.J., Shepherd, W.D. and Yen, G.S. (1983) Biosynthesis of the photosynthetic membranes of Rhodopseudomonas sphaeroides. *J Cell Biochem*, 22, 15-29.

Karnovski, M.J. (1971) Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *J Cell Biol*, 51, 146A.

Karrasch, S., Bullough, P.A. and Ghosh, R. (1995) The 8.5 A projection map of the light-harvesting complex I from Rhodospirillum rubrum reveals a ring composed of 16 subunits. *Embo J*, 14, 631-638.

Kehoe, J.W., Meadows, K.A., Parkes-Loach, P.S. and Loach, P.A. (1998) Reconstitution of core light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria using chemically synthesized polypeptides. 2. Determination of structural features that stabilize complex formation and their implications for the structure of the subunit complex. *Biochemistry*, 37, 3418-3428.

Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G. and Davies, D.R. (1960) Structure of myoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 2 A resolution. *Nature*, 185, 422-427.

Kennis, J.T., Streltsov, A.M., Aartsma, T.J., Nozawa, T. and Amesz, J. (1996) Energy transfer and exciton coupling in isolated B800-850 complexes of the photosynthetic purple sulfur bacterium Chromatium tepidum. The effect of structural symmetry on bacteriochlorophyll excited states. *J. Phys. Chem. B*, 100, 2438-2442.

Ketelaars, M., Hofmann, C., Kohler, J., Howard, T.D., Cogdell, R.J., Schmidt, J. and Aartsma, T.J. (2002) Spectroscopy on individual light-harvesting 1 complexes of Rhodopseudomonas acidophila. *Biophys J*, 83, 1701-1715.

Kiefer, H. (2003) In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1610, 57-62.

Killian, J.A. (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1376, 401-415.

Klammt, C., Schwarz, D., Lohr, F., Schneider, B., Dotsch, V. and Bernhard, F. (2006) Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *Febs J*, 273, 4141-4153.

Kobayashi, M., Fujioka, Y., Mori, T., Terashima, M., Suzuki, H., Shimada, Y., Saito, T., Wang, Z.Y. and Nozawa, T. (2005) Reconstitution of photosynthetic reaction centers and core antenna-reaction center complexes in liposomes and their thermal stability. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69, 1130-1136.

Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K. and Michel, H. (1996) The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from Rhodospirillum molischianum. *Structure*, 4, 581-597.

Koolhaas, M.H., Frese, R.N., Fowler, G.J., Bibby, T.S., Georgakopoulou, S., van der Zwan, G., Hunter, C.N. and van Grondelle, R. (1998) Identification of the upper exciton component of the B850 bacteriochlorophylls of the LH2 antenna complex, using a B800-free mutant of Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, 37, 4693-4698.

Koolhaas, M.H., van der Zwan, G., van Mourik, F. and van Grondelle, R. (1997) Spectroscopy and structure of bacteriochlorophyll dimers. I. Structural consequences of nonconservative circular dichroism spectra. *Biophys J*, 72, 1828-1841.

Koyama, Y., Takatsuka, I., Kanaji, M., Tomimoto, K., Kito, M., Shimamura, T., Yamashita, J., Saiki, K. and Tsukida, K. (1990) Configurations of carotenoids in the reaction center and the light-harvesting complexes of Rhodospirillum rubrum. Natural selection of carotenoid configurations by pigment protein complexes. *Photochem Photobiol*, 51, 119-128.

Kuhlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367, 614-621.

Kuhn, O. and Sundstrom, V. (1997) Pump-probe spectroscopy of dissipative energy transfer dynamics in photosynthetic antenna complexes: A density matrix approach. *J. Chem. Phys.*, 107, 4154-4164.

Kwa, L.G., Garcia-Martin, A., Vegh, A.P., Strohmann, B., Robert, B. and Braun, P. (2004) Hydrogen bonding in a model bacteriochlorophyll-binding site drives assembly of light harvesting complex. *J Biol Chem*, 279, 15067-15075.

Landau, E.M. and Rosenbusch, J.P. (1996) Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14532-14535.

Lang, H.P. and Hunter, C.N. (1994) The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in Rhodobacter sphaeroides. *Biochem J*, 298 (Pt 1), 197-205.

Langmuir, I. (1917) The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of American Chemical Society*.

Lapouge, K. (1999) Influence de la nature chimique des cofacteurs chlorophylliens sur la structure et la fonction des protéines collectrices de lumiére des bactéries pourpres. *Biophysique*. Paris XI, Orsay, p. 139.

Lapouge, K., Naveke, A., Gall, A., Ivancich, A., Seguin, J., Scheer, H., Sturgis, J.N., Mattioli, T.A. and Robert, B. (1999) Conformation of bacteriochlorophyll molecules in photosynthetic proteins from purple bacteria. *Biochemistry*, 38, 11115-11121.

Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M.L., Pelletier, D.A., Beatty, J.T., Lang, A.S., Tabita, F.R., Gibson, J.L., Hanson, T.E., Bobst, C., Torres, J.L., Peres, C., Harrison, F.H., Gibson, J. and Harwood, C.S. (2004) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas palustris. *Nat Biotechnol*, 22, 55-61.

Law, C.J., Roszak, A.W., Southall, J., Gardiner, A.T., Isaacs, N.W. and Cogdell, R.J. (2004) The structure and function of bacterial light-harvesting complexes. *Mol Membr Biol*, 21, 183-191.

le Maire, M., Champeil, P. and Moller, J.V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta*, 1508, 86-111.

Lee, A. (2001) Membrane structure. *Curr Biol*, 11, R811-814.

Lee, A.G. (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta*, 1612, 1-40.

Liang, J., Adamian, L. and Jackups, R., Jr. (2005) The membrane-water interface region of membrane proteins: structural bias and the anti-snorkeling effect. *Trends Biochem Sci*, 30, 355-357.

Lichtenberg, D. (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim Biophys Acta*, 821, 470-478.

Lindsay Smith, J.R. and Calvin, M. (1966) Studies on the chemical and photochemical oxidation of bacteriochlorophyll. *J Am Chem Soc*, 88, 4500-4506.

Loach, P.A. and Parkes-Loach, P.S. (1995) Structure-function relationships in core light-harvesting complexes (LH1) as determined by characterization of the structural subunit and by reconstitution experiments. In Blankenship, R.E., Madigan, M.T. and Bauer, C.E. (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 437-471.

Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. and Lanyi, J.K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 A resolution. *J Mol Biol*, 291, 899-911.

Lupo, D. and Ghosh, R. (2004) The reaction center H subunit is not required for high levels of light-harvesting complex 1 in Rhodospirillum rubrum mutants. *J Bacteriol*, 186, 5585-5595.

Lutz, M. and Kleo, J. (1979) Bacteriocholorophyll a cation radical in solution and in reaction centers of Rhodopseudomonas sphaeroides. Resonance Raman scattering. *Biochim Biophys Acta*, 546, 365-369.

Lutz, M. and Robert, B. (1988) Chlorophylls and the photosynthetic membrane. In Spiro, T.G. (ed.), *Biological applications of Raman spectroscopy*. John Wiley and Sons, pp. 347-411.

MacKenzie, K.R. and Engelman, D.M. (1998) Structure-based prediction of the stability of transmembrane helix-helix interactions: the sequence dependence of glycophorin A dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3583-3590.

MacKenzie, K.R., Prestegard, J.H. and Engelman, D.M. (1997) A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science*, 276, 131-133.

MacKinnon, R. (2005) Structural biology. Membrane protein insertion and stability. *Science*, 307, 1425-1426.

Mattioli, T.A., Gray, K.A., Lutz, M., Oesterhelt, D. and Robert, B. (1991) Resonance Raman characterization of Rhodobacter sphaeroides reaction centers bearing site-directed mutations at tyrosine M210. *Biochemistry*, 30, 1715-1722.

McAuley, K.E., Fyfe, P.K., Ridge, J.P., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J. and Jones, M.R. (1999) Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14706-14711.

McDermott, G., Prince, S.M., Freer, A.A., Hawthornthwaite-Lawless, A.M., Papiz, M.Z., Cogdell, R.J. and Isaacs, N.W. (1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature*, 374, 517-521.

McGregor, C.L., Chen, L., Pomroy, N.C., Hwang, P., Go, S., Chakrabartty, A. and Prive, G.G. (2003) Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane proteins. *Nat Biotechnol*, 21, 171-176.

McLuskey, K., Prince, S.M., Cogdell, R.J. and Isaacs, N.W. (2001) The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria Rhodopseudomonas acidophila strain 7050. *Biochemistry*, 40, 8783-8789.

McMahon, H.T. and Gallop, J.L. (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438, 590-596.

Meadows, K.A., Parkes-Loach, P.S., Kehoe, J.W. and Loach, P.A. (1998) Reconstitution of core light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria using chemically synthesized polypeptides. 1. Minimal requirements for subunit formation. *Biochemistry*, 37, 3411-3417.

Melkonian, K.A., Chu, T., Tortorella, L.B. and Brown, D.A. (1995) Characterization of proteins in detergent-resistant membrane complexes from Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Biochemistry*, 34, 16161-16170.

Miller, J.F., Hinchigeri, S.B., Parkes-Loach, P.S., Callahan, P.M., Sprinkle, J.R., Riccobono, J.R. and Loach, P.A. (1987) Isolation and characterization of a subunit form of the light-harvesting complex of Rhodospirillum rubrum. *Biochemistry*, 26, 5055-5062.

Miller, K.R. (1979) Structure of a bacterial photosynthetic membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 6415-6419.

Miller, K.R. (1982) Three-dimensional structure of a photosynthetic membrane. *Nature*, 300, 53-55.

Mohanty, A.K. and Wiener, M.C. (2004) Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position. *Protein Expr Purif*, 33, 311-325.

Muller, D.J., Sapra, K.T., Scheuring, S., Kedrov, A., Frederix, P.L., Fotiadis, D. and Engel, A. (2006) Single-molecule studies of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 16, 489-495.

Näveke, A., Lapouge, K., Sturgis, J.N., Hartwich, G., Simonin, I., Scheer, H. and Robert, B. (1997) Resonance raman spectroscopy of metal-substituted bacteriochlorophylls: characterization of Raman bands sensitive to bacteriochlorin conformation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 28, 599-604.

Newman, R. (1996) Crystallization and structure analysis of membrane proteins. *Methods Mol Biol*, 56, 365-387.

Nollert, P. (2005) Membrane protein crystallization in amphiphile phases: practical and theoretical considerations. *Prog Biophys Mol Biol*, 88, 339-357.

Noy, D., Moser, C.C. and Dutton, P.L. (2006) Design and engineering of photosynthetic light-harvesting and electron transfer using length, time, and energy scales. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 90-105.

Oelze, J. and Drews, G. (1972) Membranes of photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 265, 209-239.

Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C. and Paternostre, M. (2000) Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochim Biophys Acta*, 1508, 34-50.

Olsen, J.D., Robert, B., Siebert, C.A., Bullough, P.A. and Hunter, C.N. (2003) Role of the C-terminal extrinsic region of the alpha polypeptide of the light-harvesting 2 complex of Rhodobacter sphaeroides: a domain swap study. *Biochemistry*, 42, 15114-15123.

Olsen, J.D., Sockalingum, G.D., Robert, B. and Hunter, C.N. (1994) Modification of a hydrogen bond to a bacteriochlorophyll a molecule in the light-harvesting 1 antenna of Rhodobacter sphaeroides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7124-7128.

Olsen, J.D., Sturgis, J.N., Westerhuis, W.H., Fowler, G.J., Hunter, C.N. and Robert, B. (1997) Site-directed modification of the ligands to the bacteriochlorophylls of the light-harvesting LH1 and LH2 complexes of Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, 36, 12625-12632.

Overton, E. (1899) The probable origin and physiological significance of cellular osmotic properties. *Vierteljahrschrift der Naturforschende Gesellschaft*, 44, 88-135.

Pandit, A., van Stokkum, I.H., Georgakopoulou, S., van der Zwan, G. and van Grondelle, R. (2003) Investigations of intermediates appearing in the reassociation of the light-harvesting 1 complex of Rhodospirillum rubrum. *Photosynth Res*, 75, 235-248.

Pandit, A., Visschers, R.W., van Stokkum, I.H., Kraayenhof, R. and van Grondelle, R. (2001) Oligomerization of light-harvesting I antenna peptides of Rhodospirillum rubrum. *Biochemistry*, 40, 12913-12924.

Papagiannakis, E. (2004) Shedding light on the dark states of carotenoids. *Biophysics*. Vrije Universiteit, Amsterdam, p. 154.

Papiz, M.Z., Prince, S.M., Howard, T., Cogdell, R.J. and Isaacs, N.W. (2003) The structure and thermal motion of the B800-850 LH2 complex from Rps.acidophila at 2.0A resolution and 100K: new structural features and functionally relevant motions. *J Mol Biol*, 326, 1523-1538.

Pardee, A.B., Schachman, H.K. and Stanier, R.Y. (1952) Chromatophores of Rhodospirillum rubrum. *Nature*, 169, 282-283.

Parkes-Loach, P.S., Majeed, A.P., Law, C.J. and Loach, P.A. (2004) Interactions stabilizing the structure of the core light-harvesting complex (LH1) of photosynthetic bacteria and its subunit (B820). *Biochemistry*, 43, 7003-7016.

Parkes-Loach, P.S., Sprinkle, J.R. and Loach, P.A. (1988) Reconstitution of the B873 light-harvesting complex of Rhodospirillum rubrum from the separately isolated alpha- and beta-polypeptides and bacteriochlorophyll a. *Biochemistry*, 27, 2718-2727.

Paternostre, M., Viard, M., Meyer, O., Ghanam, M., Ollivon, M. and Blumenthal, R. (1997) Solubilization and reconstitution of vesicular stomatitis virus envelope using octylglucoside. *Biophys J*, 72, 1683-1694.

Paternostre, M.T., Roux, M. and Rigaud, J.L. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry*, 27, 2668-2677.

Pfennig, N. and Truper, H.G. (1971) Higher taxa of the phototrophic bacteria. *Intl. J. Syst. Bacteriol.*, 21, 17-18.

Pfennig, N. and Truper, H.G. (1983) Taxonomy of phototrophic green and purple bacteria: a review. *Ann Microbiol (Paris)*, 134B, 9-20.

Pockels, A. (1891) Surface tension. *Nature*, 43, 437-439.

Popot, J.L., Berry, E.A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D.M., Flotenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hong, Q., Lakey, J.H., Leonard, K., Shuman, H.A., Timmins, P., Warschawski, D.E., Zito, F., Zoonens, M., Pucci, B. and Tribet, C. (2003) Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1559-1574.

Popot, J.L. and Engelman, D.M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*, 29, 4031-4037.

Psencik, J., Ikonen, T.P., Laurinmaki, P., Merckel, M.C., Butcher, S.J., Serimaa, R.E. and Tuma, R. (2004) Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria. *Biophys J*, 87, 1165-1172.

Qian, P., Addlesee, H.A., Ruban, A.V., Wang, P., Bullough, P.A. and Hunter, C.N. (2003) A reaction center-light-harvesting 1 complex (RC-LH1) from a Rhodospirillum rubrum mutant with altered esterifying pigments: characterization by optical spectroscopy and cryo-electron microscopy. *J Biol Chem*, 278, 23678-23685.

Qian, P., Hunter, C.N. and Bullough, P.A. (2005) The 8.5A projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of Rhodobacter sphaeroides. *J Mol Biol*, 349, 948-960.

Racker, E., Violand, B., O'Neal, S., Alfonzo, M. and Telford, J. (1979) Reconstitution, a way of biochemical research; some new approaches to membrane-bound enzymes. *Arch Biochem Biophys*, 198, 470-477.

Rigaud, J.L., Mosser, G., Lacapere, J.J., Olofsson, A., Levy, D. and Ranck, J.L. (1997) Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J Struct Biol*, 118, 226-235.

Rigaud, J.L., Paternostre, M.T. and Bluzat, A. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 27, 2677-2688.

Robert, B. (1996) Resonance Raman studies in photosynthesis-chlorophyll and carotenoid molecules. In Amesz, J. and Hoff, A.J. (eds.), *Biophysical techniques in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 161-176.

Robert, B., Andrianambinintsoa, S. and Lutz, M. (1985) Structural characterization of high 800 nm-absorbing light-harvesting complexes from Rhodospirillales from their resonance Raman spectra. *J Biochem (Tokyo)*, 98, 349-354.

Robert, B., Cogdell, R.J. and Van Grondelle, R. (2003) The light-harvesting system of purple bacteria. In Green, B.R. and Parson, W.W. (eds.), *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 169-194.

Robert, B. and Lutz, M. (1985) Structure of antenna complexes of several Rhodospirillales from their resonance Raman spectra. *Biochim Biophys Acta*, 807, 10-23.

Roszak, A.W., Howard, T.D., Southall, J., Gardiner, A.T., Law, C.J., Isaacs, N.W. and Cogdell, R.J. (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from Rhodopseudomonas palustris. *Science*, 302, 1969-1972.

Rothman, J.E. and Lenard, J. (1977) Membrane asymmetry. *Science*, 195, 743-753.

Rutkauskas, D., Cogdell, R.J. and van Grondelle, R. (2006a) Conformational relaxation of single bacterial light-harvesting complexes. *Biochemistry*, 45, 1082-1086.

Rutkauskas, D., Novoderezhkin, V., Gall, A., Olsen, J., Cogdell, R.J., Hunter, C.N. and van Grondelle, R. (2006b) Spectral trends in the fluorescence of single bacterial light-harvesting complexes: experiments and modified redfield simulations. *Biophys J*, 90, 2475-2485.

Rutkauskas, D., Olsen, J., Gall, A., Cogdell, R.J., Hunter, C.N. and van Grondelle, R. (2006c) Comparative study of spectral flexibilities of bacterial light-harvesting complexes: structural implications. *Biophys J*, 90, 2463-2474.

Sanders, C.R. and Nagy, J.K. (2000) Misfolding of membrane proteins in health and disease: the lady or the tiger? *Curr Opin Struct Biol*, 10, 438-442.

Sanders, C.R. and Prosser, R.S. (1998) Bicelles: a model membrane system for all seasons? *Structure*, 6, 1227-1234.

Sansom, M.S., Bond, P.J., Deol, S.S., Grottesi, A., Haider, S. and Sands, Z.A. (2005) Molecular simulations and lipid-protein interactions: potassium channels and other membrane proteins. *Biochem Soc Trans*, 33, 916-920.

Schafmeister, C.E., Miercke, L.J. and Stroud, R.M. (1993) Structure at 2.5 A of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins. *Science*, 262, 734-738.

Scherz, A. and Parson, W.W. (1984) Oligomers of bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin with spectroscopic properties resembling those found in photosynthetic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 766, 653-665.

Scherz, A. and Rosenbach-Belkin, V. (1989) Comparative study of optical absorption and circular dichroism of bacteriochlorophyll oligomers in Triton X-100, the antenna pigment B850, and the primary donor P-860 of photosynthetic bacteria indicates that all are similar dimers of bacteriochlorophyll a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 1505-1509.

Scherz, A., Rosenbach-Belkin, V. and Fisher, J.R.E. (1991) Chlorophyll aggregates in aqueous solutions. In Scheer, H. (ed.), *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, US, pp. 237-268.

Scheuring, S. (2006) AFM studies of the supramolecular assembly of bacterial photosynthetic core-complexes. *Curr Opin Chem Biol*, 10, 387-393.

Scheuring, S., Busselez, J. and Levy, D. (2005a) Structure of the dimeric PufX-containing core complex of Rhodobacter blasticus by in situ atomic force microscopy. *J Biol Chem*, 280, 1426-1431.

Scheuring, S., Francia, F., Busselez, J., Melandri, B.A., Rigaud, J.L. and Levy, D. (2004) Structural role of PufX in the dimerization of the photosynthetic core complex of Rhodobacter sphaeroides. *J Biol Chem*, 279, 3620-3626.

Scheuring, S., Levy, D. and Rigaud, J.L. (2005b) Watching the components of photosynthetic bacterial membranes and their in situ organisation by atomic force microscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1712, 109-127.

Scheuring, S., Seguin, J., Marco, S., Levy, D., Robert, B. and Rigaud, J.L. (2003) Nanodissection and high-resolution imaging of the Rhodopseudomonas viridis photosynthetic core complex in native membranes by AFM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1690-1693.

Scheuring, S. and Sturgis, J.N. (2005) Chromatic adaptation of photosynthetic membranes. *Science*, 309, 484-487.

Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Lohr, F., Schneider, B., Dotsch, V. and Bernhard, F. (2006) Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*.

Seguin, J., Mayer, C., Robert, B. and Arluison, V. (2008) Thermodynamics of the beta(2) association in light-harvesting complex I of Rhodospirillum rubrum. Implication of peptide identity in dimer stability. *Febs J*, 275, 1240-1247.

Shelly, K.R., Golovich, E.C., Dillman, K.L. and Beck, W.F. (2008) Intermolecular Vibrational Coherence in the Bacteriochlorophyll Proteins B777 and B820 from Rhodospirillum rubrum. *J Phys Chem B*, 112, 1299-1307.

Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Muramoto, K., Terada, H., Kurauchi, T., Tadehara, Y., Yamasaki, A., Sugimura, T., Kurono, S., Tsujimoto, K., Mizushima, T., Yamashita, E., Tsukihara, T. and Yoshikawa, S. (2007) Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase. *Embo J*, 26, 1713-1725.

Siebert, C.A., Qian, P., Fotiadis, D., Engel, A., Hunter, C.N. and Bullough, P.A. (2004) Molecular architecture of photosynthetic membranes in Rhodobacter sphaeroides: the role of PufX. *Embo J*, 23, 690-700.

Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-731.

Sistrom, W.R. (1960) A requirement for sodium in the growth of Rhodopseudomonas spheroides. *J Gen Microbiol*, 22, 778-785.

Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y. and Alakhov, Y.B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, 242, 1162-1164.

Stahlberg, H., Dubochet, J., Vogel, H. and Ghosh, R. (1998) Are the light-harvesting I complexes from Rhodospirillum rubrum arranged around the reaction centre in a square geometry? *J Mol Biol*, 282, 819-831.

Sturgis, J.N., Gall, A., Ellervee, A., Freiberg, A. and Robert, B. (1998) The effect of pressure on the bacteriochlorophyll a binding sites of the core antenna complex from Rhodospirillum rubrum. *Biochemistry*, 37, 14875-14880.

Sturgis, J.N., Jirsakova, V., Reiss-Husson, F., Cogdell, R.J. and Robert, B. (1995) Structure and properties of the bacteriochlorophyll binding site in peripheral light-harvesting complexes of purple bacteria. *Biochemistry*, 34, 517-523.

Sturgis, J.N. and Niederman, R.A. (1990) Acid denaturation of the B875 light-harvesting complex in membranes of Rhodobacter sphaeroides. *Photosynth Res*, 23, 241-248.

Sturgis, J.N., Olsen, J.D., Robert, B. and Hunter, C.N. (1997) Functions of conserved tryptophan residues of the core light-harvesting complex of Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, 36, 2772-2778.

Sturgis, J.N. and Robert, B. (1994) Thermodynamics of membrane polypeptide oligomerization in light-harvesting complexes and associated structural changes. *J Mol Biol*, 238, 445-454.

Sundstrom, V., Pullerits, T. and Van Grondelle, R. (1999) Photosynthetic light-harvesting: reconciling dynamics and structure of purple bacterial LH2 reveals function of photosynthetic unit. *J. Phys. Chem. B*, 103, 2327-2346.

Swem, L.R., Elsen, S., Bird, T.H., Swem, D.L., Koch, H.G., Myllykallio, H., Daldal, F. and Bauer, C.E. (2001) The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in Rhodobacter capsulatus. *J Mol Biol*, 309, 121-138.

Tandori, J., Tokaji, Z., Misurda, K. and Maroti, P. (2005) Thermodynamics of light-induced and thermal degradation of bacteriochlorins in reaction center protein of photosynthetic bacteria. *Photochem Photobiol*, 81, 1518-1525.

Tribet, C., Audebert, R. and Popot, J.L. (1996) Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15047-15050.

Tunnicliffe, R.B., Ratcliffe, E.C., Hunter, C.N. and Williamson, M.P. (2006) The solution structure of the PufX polypeptide from Rhodobacter sphaeroides. *FEBS Lett*, 580, 6967-6971.

Tyurina, Y.Y., Shvedova, A.A., Kawai, K., Tyurin, V.A., Kommineni, C., Quinn, P.J., Schor, N.F., Fabisiak, J.P. and Kagan, V.E. (2000) Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine. *Toxicology*, 148, 93-101.

Ubarretxena-Belandia, I., Baldwin, J.M., Schuldiner, S. and Tate, C.G. (2003) Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *Embo J*, 22, 6175-6181.

Valkunas, L., Janusonis, J., Rutkauskas, D. and Van Grondelle, R. (2007) Protein dynamics revealed in the excitonic spectra of single LH2 complexes. *J. Lumin.*, 127, 269-275.

Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C. and Rapoport, T.A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427, 36-44.

Van Grondelle, R., Decker, J.P., Gillbro, T. and Sundstrom, V. (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1187, 1-65.

van Grondelle, R. and Novoderezhkin, V. (2001) Dynamics of excitation energy transfer in the LH1 and LH2 light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria. *Biochemistry*, 40, 15057-15068.

van Meer, G. (2005) Cellular lipidomics. *Embo J*, 24, 3159-3165.

van Mourik, F., van der Oord, C.J.R., Visscher, K.J., Parkes-Loach, P.S., Loach, P.A., Visschers, R.W. and Van Grondelle, R. (1991) Exciton interactions in the light-harvesting antenna of photosynthetic bacteria studied with triplet-singlet spectroscopy and singlet-triplet annihilation on the B820 subunit form of Rhodospirillum rubrum. *Biochim Biophys Acta*, 1059, 111-119.

VanAken, T., Foxall-VanAken, S., Castleman, S. and Ferguson-Miller, S. (1986) Alkyl glycoside detergents: synthesis and applications to the study of membrane proteins. *Methods Enzymol*, 125, 27-35.

Vegh, A.P. and Robert, B. (2002) Spectroscopic characterisation of a tetrameric subunit form of the core antenna protein from Rhodospirillum rubrum. *FEBS Lett*, 528, 222-226.

Visschers, R.W., Chang, M.C., van Mourik, F., Parkes-Loach, P.S., Heller, B.A., Loach, P.A. and van Grondelle, R. (1991) Fluorescence polarization and low-temperature absorption spectroscopy of a subunit form of light-harvesting complex I from purple photosynthetic bacteria. *Biochemistry*, 30, 5734-5742.

Visser, H.M., Somsen, O.J., van Mourik, F., Lin, S., van Stokkum, I.H. and van Grondelle, R. (1995) Direct observation of sub-picosecond equilibration of excitation energy in the light-harvesting antenna of Rhodospirillum rubrum. *Biophys J*, 69, 1083-1099.

Walian, P., Cross, T.A. and Jap, B.K. (2004) Structural genomics of membrane proteins. *Genome Biol*, 5, 215.

Wallin, E. and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, 7, 1029-1038.

Walz, T. and Ghosh, R. (1997) Two-dimensional crystallization of the light-harvesting I-reaction centre photounit from Rhodospirillum rubrum. *J Mol Biol*, 265, 107-111.

Wang, Z.Y., Suzuki, H., Kobayashi, M. and Nozawa, T. (2007) Solution structure of the Rhodobacter sphaeroides PufX membrane protein: implications for the quinone exchange and protein-protein interactions. *Biochemistry*, 46, 3635-3642.

Westerhuis, W.H., Hunter, C.N., Van Grondelle, R. and Niederman, R.A. (1999) Modeling of Oligomeric-State Dependent Spectral Heterogeneity in the B875 Light-Harvesting Complex of Rhodobacter sphaeroides by Numerical Simulation. *J Phys Chem B*, 103, 7733-7742.

White, S.H. (2004) The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci*, 13, 1948-1949.

White, S.H. (2005) How hydrogen bonds shape membrane protein structure. *Adv Protein Chem*, 72, 157-172.

White, S.H. and von Heijne, G. (2005) Transmembrane helices before, during, and after insertion. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 378-386.

White, S.H. and Wimley, W.C. (1998) Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim Biophys Acta*, 1376, 339-352.

White, S.H. and Wimley, W.C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 28, 319-365.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51, 221-271.

Wood, K., Frolich, A., Paciaroni, A., Moulin, M., Hartlein, M., Zaccai, G., Tobias, D.J. and Weik, M. (2008) Coincidence of Dynamical Transitions in a Soluble Protein and Its Hydration Water: Direct Measurements by Neutron Scattering and MD Simulations. *J Am Chem Soc.*

Wood, K., Plazanet, M., Gabel, F., Kessler, B., Oesterhelt, D., Tobias, D.J., Zaccai, G. and Weik, M. (2007) Coupling of protein and hydration-water dynamics in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 18049-18054.

Yu, S.M., McQuade, D.T., Quinn, M.A., Hackenberger, C.P., Krebs, M.P., Polans, A.S. and Gellman, S.H. (2000) An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization. *Protein Sci*, 9, 2518-2527.

Zimmerberg, J. and Gawrisch, K. (2006) The physical chemistry of biological membranes. *Nat Chem Biol*, 2, 564-567.

Zimmerberg, J. and Kozlov, M.M. (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 9-19.

Zuber, H. (1985) Structure and function of light-harvesting complexes and their polypeptides. *Photochem. Photobiol.*, 42, 821-844.

Zuber, H. and Brunisholz, R.A. (1991) *Structure and function of antenna polypeptides and chlorophyll-protein complexes: principes and variability*. CRC.

Zuber, H. and Cogdell, R. (1995) Structure and organization of purple bacterial antenna complexes. In Blankenship, R.E., Madigan, M.T. and Bauer, C.E. (eds.), *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 2, pp. 315-348.