

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES (BIOPHYSIQUE)

PAR
MARIO MÉTHOT

ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DE FILMS DE
MEMBRANES POURPRES

MARS 1996

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

À Jeanne, Rodrigue et Patrick

À Sonya

REMERCIEMENTS

Je voudrais dans un premier temps remercier mon directeur, le Professeur Christian Salesse du Centre de Recherche en Photobiophysique, tout d'abord pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, mais surtout pour m'avoir toujours encouragé dans mon cheminement de recherche. Christian fait partie d'une classe très spéciale de gens dont rien ne semble vouloir ébranler leur optimisme. Plus d'une fois a t-il su raviver ma flamme alors que les obstacles rencontrés me paraissaient parfois insurmontables. Je le remercie également pour la très grande confiance qu'il a toujours eue en moi. Je garde de lui le souvenir d'un ami et d'un excellent directeur de recherche.

Je tiens également à remercier mon co-directeur, le Professeur François Boucher du Centre de Recherche en Photobiophysique. Représentant pour moi "La Référence" en matière de bactériorhodopsine, à de nombreuses reprises il a su utiliser son bagage impressionnant de connaissances pour répondre à mes questions. Ses blagues notoires et sa bonne humeur généralisée ont également contribué à rendre nos échanges des plus agréables et enrichissants. Merci François!

J'aimerais aussi exprimer toute ma reconnaissance envers messieurs Gaétan Munger, Alain Tessier et André Paquette du Centre de Recherche en Photobiophysique pour le soutien technique qu'il m'ont apporté depuis les trois dernières années. Un gros merci également aux techniciens de l'atelier de mécanique.

Je ne pourrais passer sous silence l'implication du Dr. Muriel Subirade et du Professeur Michel Pézolet, tous deux du Centre de Recherche en Science et Ingénierie des Macromolécules (C.E.R.S.I.M.) de l'Université Laval à Québec. C'est lors d'un stage effectué dans le laboratoire du Professeur Pézolet et sous la supervision du Dr. Subirade que j'ai pu effectuer les mesures en spectroscopie infrarouge. Leur collaboration et leur expertise furent grandement appréciées.

J'en profite aussi pour remercier le Dr. David Vaknin de l'Iowa State University chez qui les mesures de réflectivité des rayons-X ont pu être réalisées. Tant pour sa grande expertise, pour son hospitalité durant mon séjour en Iowa et pour avoir accepté de réviser le présent manuscrit, je le remercie profondément.

J'aimerais également remercier M. Philippe Desmeules pour sa collaboration lors de la mesure des cycles CDR à l'interface air-eau. Son aide me fut des plus précieuses. Merci Philippe!

Je voudrais aussi remercier M. Hugo Lavoie de m'avoir aidé à plusieurs occasions alors que j'étais aux prises avec des problèmes d'informatique qui m'apparaissaient inextricables.

Un merci tout spécial à mon nouveau directeur de recherche, le Dr. Massimo Avoli de l'Institut Neurologique de Montréal, pour sa grande compréhension alors que j'effectuais les dernières corrections à ce manuscrit.

Finalement, j'aimerais dire merci à mes collègues et amis que j'ai eu le plaisir de connaître et de côtoyer pendant ces trois dernières années et qui m'ont toujours soutenu dans mes démarches. Parmi eux, il y a: Patrick Lagüe, Philippe Desmeules, Pierre Lavigne, Robert Grimard, Salim Messaoudi, Normand Beaudoin, Michel Déry, Hugo Lavoie, et Karl Spratte. Un merci particulier à Michel Grandbois qui m'a beaucoup appris et avec qui j'ai eu bon nombre de discussions très enrichissantes. Merci Michel! Je termine en disant un merci très spécial à ma copine Sonya Hubert pour son aide et sa compréhension pendant toute la durée de ma maîtrise.

RÉSUMÉ

La bactériorhodopsine (bR) est l'unique protéine des membranes pourpres (M.P.), lesquelles sont des régions spécifiques de la membrane cellulaire de certaines bactéries halophiles comme *Halobacterium halobium*. La bR est une protéine transmembranaire qui a la particularité de pouvoir pomper un proton d'un côté à l'autre de la M.P. suite à l'absorption de lumière. Possédant de plus de très bonnes caractéristiques de résistance envers des variations importantes de température et de pH, la bR est une candidate de choix dans l'élaboration de diverses composantes bioélectroniques. L'élaboration de ces composantes nécessite cependant l'obtention d'une densité de bR maximale et, surtout, très homogène dans l'assemblage final. Diverses techniques de fabrication sont envisagées jusqu'à maintenant, dont la possibilité d'effectuer ces opérations dans l'espace en profitant d'un environnement de microgravité. Une technique beaucoup moins coûteuse consisterait en la superposition d'un nombre désiré de films monomoléculaires de M.P. de grande qualité structurale, films obtenus selon la technique des monocouches à l'interface air-eau. L'objectif de notre étude consistait dans un premier temps à démontrer que l'intégrité fonctionnelle de la bR était préservée à l'interface air-eau. À cette fin, nous nous sommes servis de la spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau, technique nous permettant de suivre la photoisomérisation du rétinal de la bR. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la structure des films de M.P. à l'échelle micro- et macroscopique en fonction de l'état de compression des molécules à l'interface air-eau. Dans cette optique, nous avons mesuré les isothermes de pression et de potentiel de surface, déterminé l'épaisseur d'une monocouche

de M.P. par réflectivité des rayons-X, mesuré l'orientation des hélices- α de la bR par spectroscopie FTIR-ATR, enregistré des cycles de compression-décompression-recompression (CDR) et visualisé le film de M.P. par microscopie de fluorescence à l'interface air-eau. Le but visé par l'utilisation de ces différentes techniques consistait à cerner le mieux possible la pression de surface correspondant à une organisation optimale des bR et des M.P. dans ces films. Les résultats des diverses analyses structurales effectuées indiquent qu'une pression de surface de 20 mN/m correspond à un entassement optimal des bR dans le plan de la monocouche (densité surfacique maximale de bR) tout en préservant le caractère monomoléculaire du film à l'interface air-eau. Une pression de surface supérieure à 30 mN/m entraîne clairement la formation progressive de multicouches alors qu'une pression inférieure à 20 mN/m occasionne une diminution de la densité surfacique de bR.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xviii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 Origines et fonction de la bR.....	2
1.1.1 Photocycle et activité de pompe à protons de la bR.....	2
1.1.2 Photointermédiaires "spéciaux" de la bR.....	6
1.1.3 Perspectives d'utilisation de la bR en matière de bioélectronique....	8
1.1.4 Objectifs généraux de recherche.....	10
1.2 Structure de la bR et des M.P.....	11
1.2.1 Composition en acides aminés de la bR.....	11
1.2.2 Composition de la membrane pourpre.....	11
1.2.3 Structure bi- et tridimensionnelle de la bR et des M.P.....	11
1.3 L'obtention de films monomoléculaires de M.P. à l'interface air-eau..	17
1.3.1 La méthode de Hwang <i>et al.</i> (1977).....	17
1.3.2 Les "problèmes" de la méthode de Hwang <i>et al.</i> (1977).....	18
1.3.3 Films purs de membranes pourpres.....	23
1.4 Objectifs spécifiques de recherche.....	24
CHAPITRE 2: THÉORIE.....	26
2.1 La pression de surface, π , et l'isotherme de pression de surface.....	26
2.2 Le module de compressibilité isothermique, K^s	27

2.3 Le potentiel de surface, ΔV	28
2.3.1 Origine du ΔV	30
2.4 Quenching de fluorescence.....	31
2.5 Réflectivité des rayons-X.....	33
2.6 Spectroscopie FTIR-ATR.....	34
CHAPITRE 3: MATÉRIEL.....	37
3.1 Provenance et pureté des produits utilisés.....	37
3.1.1 L'eau.....	37
3.1.2 Le chlorure de sodium.....	38
3.1.3 Le mono- et bicarbonate de sodium: tampon A.....	38
3.1.4 Le mono- et dihydrogénophosphate de sodium: tampon B.....	39
3.1.5 La solution d'iodure de potassium.....	39
3.1.6 Les acides gras.....	40
3.1.7 Autres produits chimiques utilisés.....	40
3.2 L'appareillage.....	40
3.2.1 Les bains de monocouche.....	41
3.2.2 Le spectrophotomètre à l'interface air-eau.....	44
3.2.3 Le spectrofluorimètre à l'interface air-eau.....	46
3.2.4 Le réflectomètre à rayons-X.....	50
3.2.5 Le montage FTIR-ATR.....	52
CHAPITRE 4: MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	55
4.1 Préparation des échantillons.....	55
4.1.1 Isolation, purification et conservation des M.P.....	55
4.1.2 Détermination de la concentration en bR.....	56
4.1.3 Marquage de la bR avec le FITC.....	57
4.1.4 Calcul du rapport de marquage FITC:bR.....	58
4.2 Mesures expérimentales.....	62

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. Représentation schématique de la membrane pourpre et de sa provenance, la bactérie <i>Halobacterium halobium</i>	3
2. Représentation schématique d'une bactériorhodopsine avec ses sept hélices- α (A-G) et son rétinal.....	4
3. Le photocycle de la bR.....	5
4. Les photointermédiaires "spéciaux" de la bR.....	7
5. Carte de densité électronique de la membrane pourpre à une résolution de 7 Å.....	14
6. Modèle tridimensionnel d'une bR.....	15
7. La structure secondaire de la bR.....	16
8. Spectre d'absorption d'une suspension de M.P. soniquée pendant 60 sec. dans un tampon de conservation et dans un mélange d'hexane et de PC de soya.....	19

4.2.1 Calibration du système de détection de la pression de surface.....	62
4.2.2 Isothermes de pression et de potentiel de surface.....	64
4.2.3 Spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau.....	66
4.2.4 Quenching de fluorescence; cas en suspension et à l'interface air-eau.....	68
4.2.5 Réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau.....	76
4.2.6 Dépositions Langmuir-Blodgett.....	81
4.2.7 Spectroscopie FTIR-ATR.....	82
4.2.8 Cycles de compression-décompression-recompression (CDR).....	84
4.2.9 Microscopie de fluorescence à l'interface air-eau.....	85
CHAPITRE 5: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	88
5.1 Isothermes de pression et de potentiel de surface.....	88
5.1.1 L'isotherme de pression de surface.....	88
5.1.2 L'isotherme de potentiel de surface.....	97
5.2 Évaluation de la fonctionnalité de la bR à l'interface air-eau.....	100
5.2.1 Spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau.....	100
5.3 Mesure de l'orientation de la bR par quenching de fluorescence.....	105
5.3.1 Cas en suspension.....	105
5.3.2 Cas à l'interface air-eau; également dans le masque de restriction.....	108
5.3.3 Cas à l'interface air-eau; également en dehors du masque de restriction.....	113
5.4 Réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau.....	118
5.4.1 La courbe de réflectivité des rayons-X.....	118
5.4.2 Profil de densité électronique.....	121
5.4.3 Épaisseur totale et épaisseur homogène.....	121
5.4.4 La rugosité de surface.....	123

5.4.4 La rugosité de surface.....	123
5.4.5 Épaisseur et rugosité des films de M.P. en fonction de la pression de surface.....	124
5.4.6 Courbes de réflectivité et profil de densité électronique à basse pression de surface.....	126
5.4.7 Origine physique de l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité.....	128
5.5 Spectroscopie FTIR-ATR.....	131
5.5.1 Aspect qualitatif des bandes amide I et II de la bR.....	131
5.5.2 Orientation des hélices- α de la bR en fonction de la pression de surface.....	134
5.5.3 Absorbance de la bande amide I vs aire moléculaire.....	138
5.6 Cycles compression-décompression-recompression (CDR).....	141
5.6.1 La désorption et la ré-adsorption des M.P.....	152
5.6.2 Hystérèses et formation d'états métastables de la matière.....	153
5.6.3 L'irréversibilité des interactions entre les fragments de M.P.....	154
5.6.4 Agrégats de M.P. et potentiel de surface.....	155
5.7 Microscopie de fluorescence à l'interface air-eau; organisation bi-dimensionnelle des M.P. à basse pression de surface.....	156
CHAPITRE 6: CONCLUSIONS.....	166
BIBLIOGRAPHIE.....	173

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. Représentation schématique de la membrane pourpre et de sa provenance, la bactérie <i>Halobacterium halobium</i>	3
2. Représentation schématique d'une bactériorhodopsine avec ses sept hélices- α (A-G) et son rétinal.....	4
3. Le photocycle de la bR.....	5
4. Les photointermédiaires "spéciaux" de la bR.....	7
5. Carte de densité électronique de la membrane pourpre à une résolution de 7 Å.....	14
6. Modèle tridimensionnel d'une bR.....	15
7. La structure secondaire de la bR.....	16
8. Spectre d'absorption d'une suspension de M.P. soniquée pendant 60 sec. dans un tampon de conservation et dans un mélange d'hexane et de PC de soya.....	19

9. Chromatogramme en couche mince d'un extrait des lipides totaux de la M.P., d'une fraction incolore récoltée suivant la centrifugation d'une suspension de M.P. dans une solution d'hexane et de PC de soya, ainsi que d'un aliquot de PC de soya.....	20
10. Micrographie électronique d'un film de M.P.-PC de soya déposé sur un support de mica par la méthode de Langmuir-Blodgett.....	22
11. Représentation schématique d'un bain de monocouche servant à mesurer les isothermes de pression et de potentiel de surface.....	42
12. Représentation schématique du spectrophotomètre à l'interface air-eau.....	45
13. Représentation schématique du spectrofluorimètre à l'interface air-eau.....	47
14. Schéma du masque de restriction utilisé lors des expériences de quenching de fluorescence à l'interface air-eau.....	49
15. Schéma du réflectomètre à rayons-X à l'interface air-eau.....	51
16. Représentation simplifiée du montage FTIR-ATR.....	53
17. Spectre d'absorption d'une suspension de M.P.-FITC dans le tampon A.....	60

18. Spectre d'absorption d'une suspension de M.P. incubée pendant une nuit en présence de 5% (p:p) d'ammonyx LO.....	61
19. Isotherme de pression de surface de l'acide arachidique.....	63
20. Cryodécapage de la portion à l'interface film-air d'une monocouche de bR/PC de soya d'un rapport 7:1 (p:p) tel qu'observé par microscopie électronique.....	70
21. Isotherme de pression de surface de M.P. sur le tampon A.....	89
22. Variation du module de compressibilité isothermique (K^s) en fonction de l'aire moléculaire.....	91
23. Isotherme de pression de surface de M.P. sur le tampon A contenant 4M de NaCl.....	95
24. Isotherme de potentiel de surface de M.P. sur le tampon A.....	98
25. Spectres d'absorption d'un film de M.P. à l'interface air-eau à une pression de surface de 5 mN/m dans des conditions d'adaptation à la lumière et à l'obscurité.....	101
26. Spectres d'absorption d'un film de M.P. à l'interface air-eau (conditions d'adaptation à l'obscurité) à des pressions de surface allant de 5 à 30 mN/m.....	103

27. Absorbance d'un film de M.P. à l'interface air-eau en fonction de la pression de surface.....	104
28. Spectres de fluorescence d'une suspension de M.P. en fonction d'une concentration croissante en quencher (KI).....	106
29. Graphique de Stern-Volmer modifié; expérience de quenching en suspension.....	107
30. Spectres de fluorescence d'un film de M.P. à l'interface air-eau (étalement dans le masque de restriction) en fonction d'une concentration croissante de KI dans la sous-phase.....	109
31. Graphique de Stern-Volmer modifié; expérience de quenching à l'interface air-eau (étalement dans le masque de restriction).....	110
32. Spectres de fluorescence d'un film de M.P. à l'interface air-eau (étalement hors du masque de restriction) en fonction d'une concentration croissante de KI dans la sous-phase.....	114
33. Graphique de Stern-Volmer modifié; expérience de quenching à l'interface air-eau (étalement hors du masque de restriction).....	115
34. Courbe normalisée de réflectivité des rayons-X d'un film de M.P. à une pression de surface de 26 mN/m.....	119

35. Relation postulée entre le profil de densité électronique et la structure de la bR.....	120
36. Épaisseur totale et homogène et rugosité des films de M.P. en fonction de la pression de surface appliquée.....	125
37. Courbe normalisée de réflectivité des rayons-X d'un film de M.P. à une pression de surface de 1 mN/m.....	127
38A. Représentation schématique de l'hypothèse A formulée de façon à expliquer l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité en fonction de la pression de surface observée par réflectivité des rayons-X à plus de 30 mN/m.....	129
38B. Représentation schématique de l'hypothèse B formulée de façon à expliquer l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité en fonction de la pression de surface observée par réflectivité des rayons-X à plus de 30 mN/m.....	130
39. Spectres FTIR-ATR de films de M.P. pris dans la région des bandes amide I et II avec le polariseur parallèle au plan d'incidence.....	133
40. Spectres FTIR-ATR pris avec le polariseur parallèle et perpendiculaire au plan d'incidence d'un film de M.P. déposé à une pression de surface de 30 mN/m.....	135

41. Absorbance de la bande amide I de la bR en fonction de l'aire moléculaire.....	139
42. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 10 mN/m.....	144
43. Cycle CDR de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 20 mN/m.....	145
44. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 30 mN/m.....	146
45. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 40 mN/m.....	147
46. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 46 mN/m.....	148
47. Cycle CDR de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 40 mN/m et où la pression minimale atteinte lors de la décompression est de 5 mN/m.....	150
48 (A à E) Micrographies de fluorescence d'un film de M.P. à l'interface air-eau.....	158-160

49. Évolution de différents paramètres (potentiel de surface, K^s , épaisseur totale du film mesurée en rayons-X et hystérèses dans les cycles CDR) en fonction de la pression de surface.....	165
50. (A à E) Représentation schématique d'un scénario de l'organisation des M.P. en fonction de la pression de surface à l'interface air-eau pouvant rendre compte des résultats obtenus par les différentes techniques d'analyse.....	172

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1. Composition lipidique de la membrane pourpre.....	12
2. Conditions expérimentales et facteurs de dilution calculés pour les mesures de quenching de fluorescence en suspension.....	72
3. Angle des hélices- α de la bR en fonction de la pression de surface....	137

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

"Le super-ordinateur le plus performant du monde n'a pas besoin d'une seule puce semi-conductrice."

Ces paroles percutantes ne sont pas de moi. Elles viennent de Robert R. Birge, auteur d'un récent article sur les toutes dernières perspectives en matière de technologie informatique (Birge, 1995). M. Birge ne faisait alors pas allusion à un ordinateur au sens où nous l'entendons normalement, mais bien au cerveau humain. Le but de l'article en question n'était pas de louanger les vertus du cerveau. Il visait plutôt à démontrer la supériorité théorique de certaines composantes biologiques par rapport aux micropuces conventionnelles à base de silicium pour l'accomplissement de tâches comme le calcul et la capacité de stocker de l'information. Bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle d'ordinateurs à composantes biologiques sur le marché, des prototypes en laboratoire pavent déjà la route aux premiers modèles hybrides (Birge, 1990, 1995), qui correspondent à des croisements entre les composantes biologiques et les transistors conventionnels. De tous les matériaux biologiques ayant été évalués jusqu'à aujourd'hui dans la perspective d'élaborer des composantes bioélectroniques, la *bacteriorhodopsine* (bR) est sans aucun doute la candidate ayant retenu le plus d'attention.

1.1. Origines et fonctions de la bR

1.1.1 Photocycle et activité de pompe à protons de la bR

La bR est l'unique protéine des *membranes pourpres* (M.P.) qui sont des régions spécifiques de la membrane cellulaire de certaines bactéries halophiles extrêmes comme *Halobacterium halobium* (Fig. 1). La bR fut isolée pour la première fois par Oesterhelt et Stoeckenius (1971) à partir de cette lignée de bactéries. Comme la rhodopsine visuelle, la bR possède un *rétinal* qui lui confère des propriétés d'absorption de la lumière (Fig. 2). Suite à l'absorption d'un photon de longueur d'onde appropriée, la bR entre dans un photocycle qui l'amène à transiter par différents états dits *intermédiaires*, chaque intermédiaire du cycle pouvant être identifié par sa longueur d'onde d'absorption qui lui est caractéristique (Fig. 3). Finalement, la forme originale de la bR est régénérée, le cycle complet étant bouclé en 10 à 15 millisecondes. Le processus d'absorption de la lumière par la bR est couplé à un mécanisme de pompe à protons (H^+). En effet, la transition de l'intermédiaire L vers l'intermédiaire M du photocycle (Oesterhelt et Hess, 1973; Oesterhelt et Stoeckenius, 1973) est marquée par une déprotonation de la base de Schiff du rétinal (Fig. 3) et le relargage d'un proton du côté extracellulaire de la membrane s'en suit (Fig. 2). La reprise d'un proton du côté cytoplasmique de la membrane et la reprotonation de la base de Schiff sont des événements se produisant lors de la régénération de la forme bR. Le bilan net du photocycle est de un H^+ pompé de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule pour chaque photon absorbé.

Halobacterium halobium

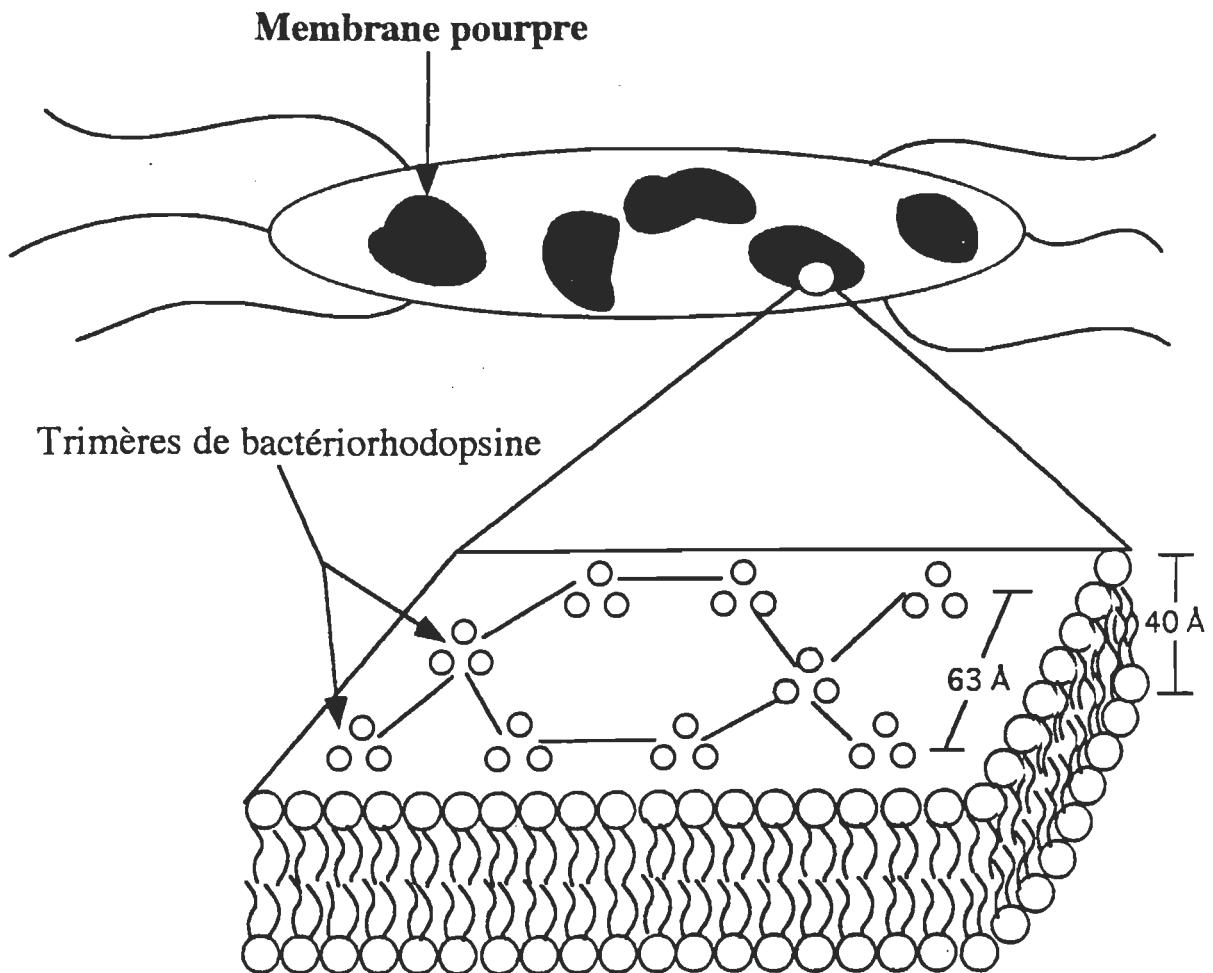


Figure 1. Représentation schématique de la membrane pourpre et de sa provenance, la bactérie *Halobacterium halobium*. Les trimères de bactériorhodopsine forment une maille cristalline hexagonale d'une dimension de 63 Å dans le plan de la membrane.

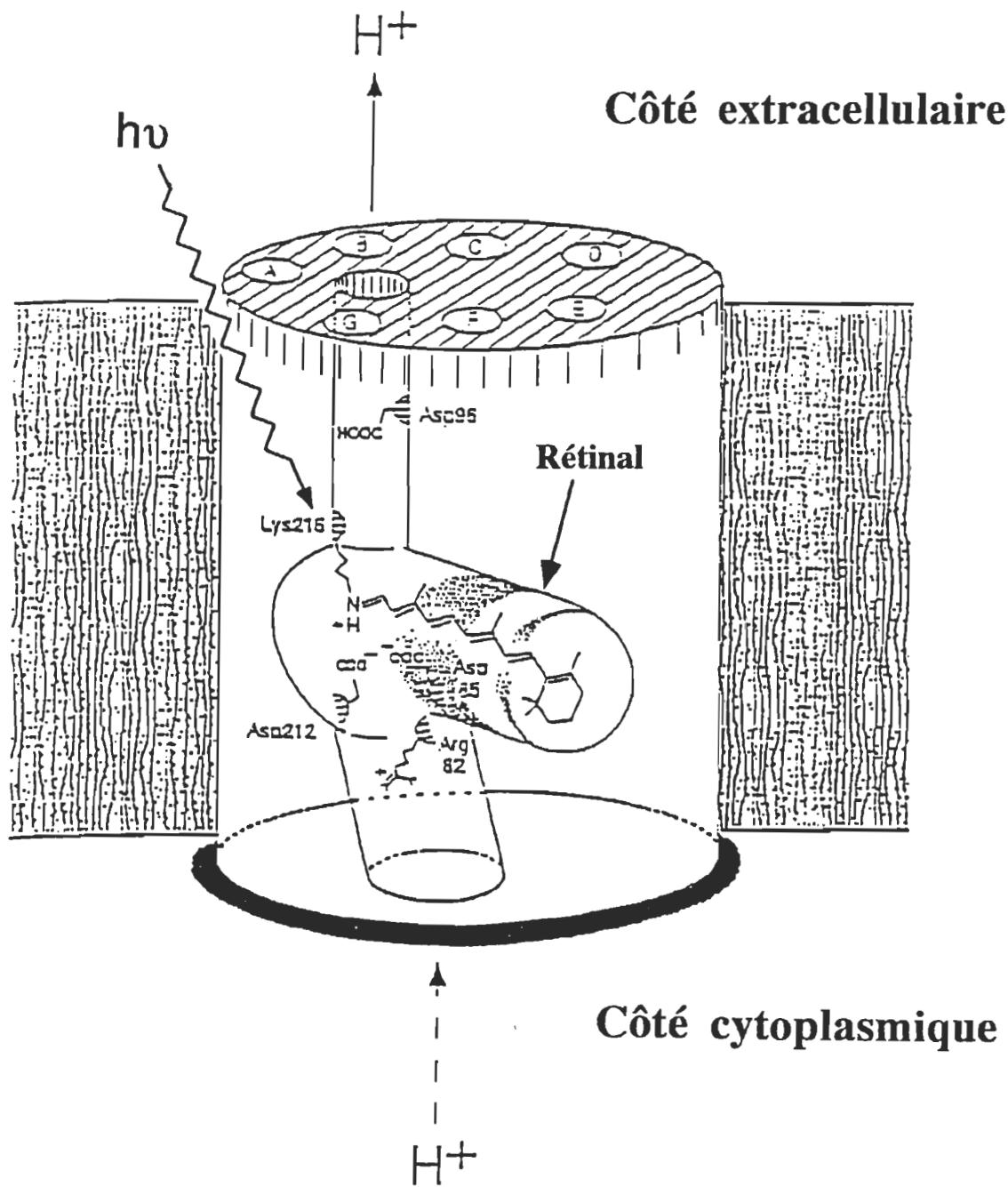


Figure 2. Représentation schématique d'une bactériorhodopsine avec ses sept hélices- α (A-G) et son rétinal. Ce dernier est responsable de l'absorption de la lumière et permet le pompage d'un proton de part et d'autre de la membrane.

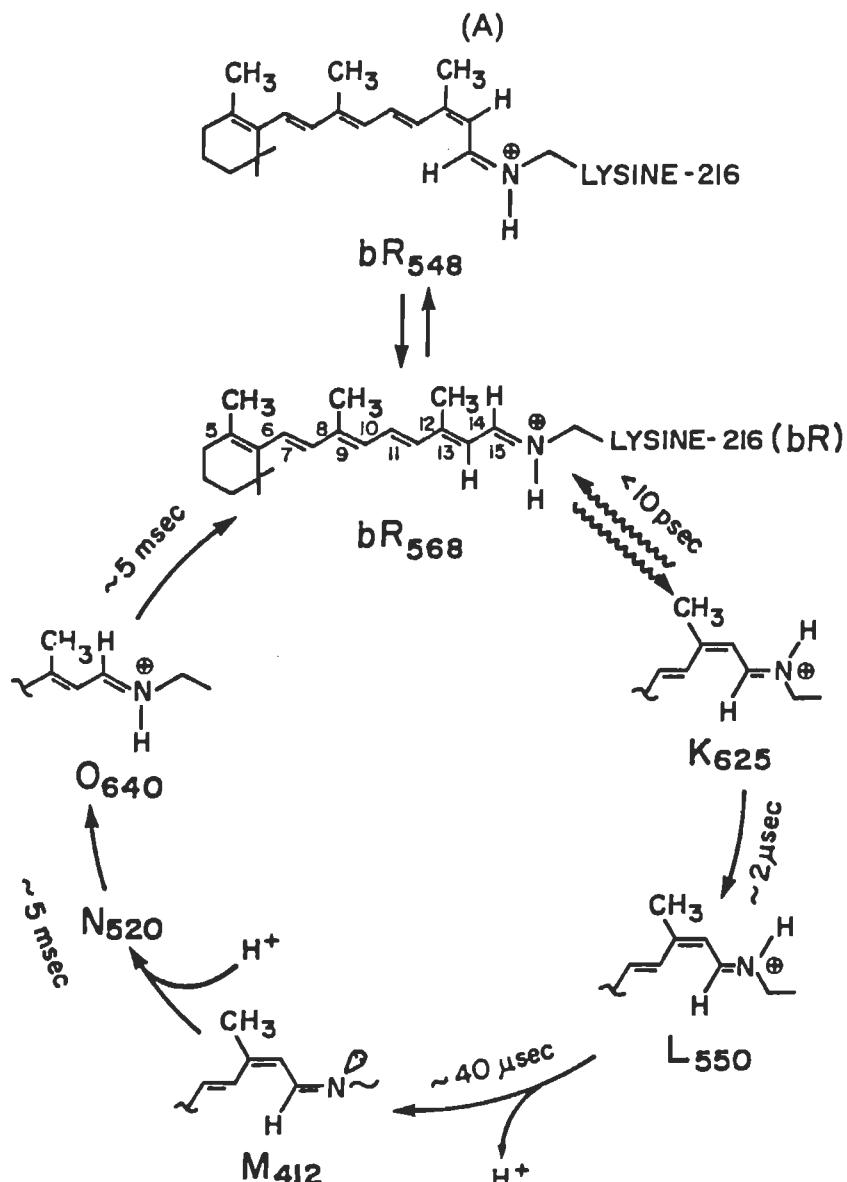


Figure 3. Le photocycle de la bR. Suite à l'absorption d'un photon, la protéine subit des changements conformationnels qui l'amènent à passer par une série d'états métastables (K, L, M, N et O) avant de retourner à la forme de départ (bR568). Ce sont les *photointermédiaires* de la bR, chacun d'entre eux étant caractérisé par une longueur d'onde d'absorption spécifique. Le cycle complet est bouclé en moins de 15 msec (d'après Cramer et Knaff, 1991).

In vivo, ce mécanisme de pompe à protons donne lieu à un gradient électrochimique de H^+ de part et d'autre de la membrane cellulaire. Ce gradient de H^+ constitue une forme d'énergie potentielle qui pourra être utilisée par la cellule pour produire une forme d'énergie (l'ATP) utilisable via un couplage chemiosmotique (théorie de Mitchell).

1.1.2 Photointmédiaires "spéciaux" de la bR

Outre les intermédiaires "réguliers" du photocycle que nous venons de voir à la section précédente, d'autres intermédiaires peuvent être obtenus par une séquence rapide d'illumination à des longueurs d'onde appropriées (Birge, 1995). La Fig. 4 montre un photocycle de la bR ainsi altéré par une séquence rapide de pulses en lumière verte et rouge. Le pulse vert entraîne les bR dans la cascade de changements conformationnels menant à la formation des mêmes photointmédiaires K, L, M, N et O vus à la Fig. 3. Les photointmédiaires N et O étant ceux dont la demi-vie est la plus longue (voir Fig. 3), la proportion de bR dans l'un ou l'autre de ces états va augmenter rapidement. En envoyant à ce moment un pulse de lumière rouge, les bR se trouvant alors dans l'état O vont emprunter une voie alternative du photocycle qui mène à la formation des états P et Q. Le photointmédiaire Q a comme particularité d'être stable pendant des années et aussi d'avoir une longueur d'onde d'absorption qui lui est propre. L'irradiation du système avec une lumière bleue reconvertit finalement les photointmédiaires Q jusqu'à l'état initial (bR₅₆₈).

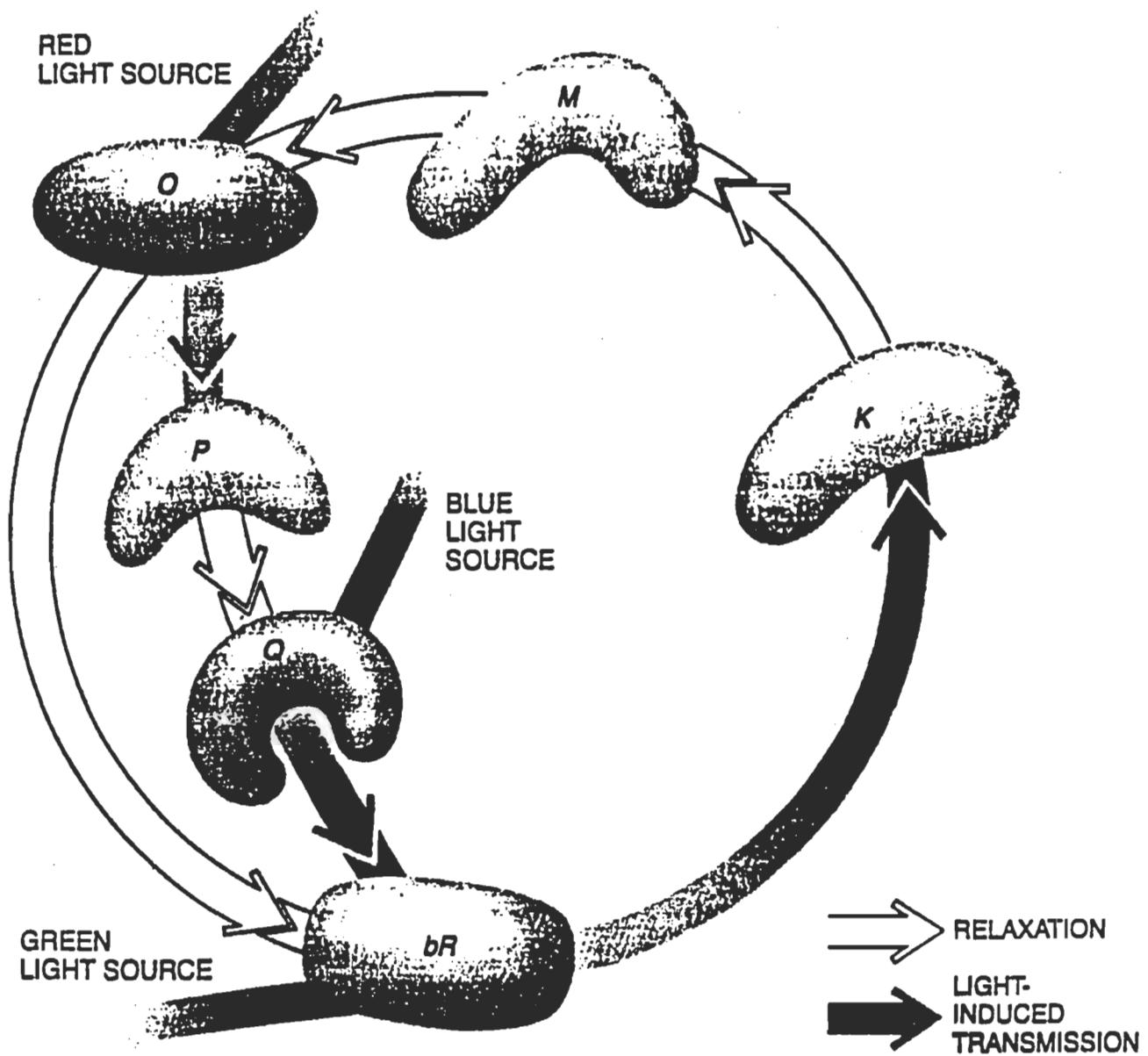


Figure 4. Les photointermédiaires "spéciaux" de la bR. Par une séquence rapide d'illumination à l'aide de sources lumineuses verte et rouge, il est possible de court-circuiter le photocycle régulier de la bR et d'obtenir les photointermédiaires P et Q. Ce dernier possède la particularité d'être stable pendant des années et d'avoir une longueur d'onde d'absorption qui lui est propre. Une lumière bleue permet enfin la reconversion de Q à bR (d'après Birge, 1995).

1.1.3 Perspectives d'utilisation de la bR en matière de bioélectronique

Birge (1990, 1995) voit en ces caractéristiques particulières du photocycle de la bR la possibilité d'emmagasiner de l'information. Le principe de fonctionnement d'un tel système est analogue au stockage binaire d'information en informatique traditionnelle où on assigne un état "0" et un état "1" à deux configurations distinctes d'une porte logique. Les photointermédiaires bR₅₆₈ et Q de la bR (puisque'ils sont à la fois stables, facilement distinguables en raison de leur longueur d'onde distincte, et qu'il est possible de passer d'un état à un autre) pourraient jouer le même rôle - pour une dimension 50 ou 100 fois plus petite - que les transistors classiques.

Miyasaka *et al.* (1992) ont élaboré un photodétecteur artificiel à base de bR. En effet, des études antérieures effectuées par ces chercheurs (Miyasaka et Koyama, 1991, 1992) ont démontré qu'en déposant des M.P. sur une électrode semi-conductrice en contact avec un électrolyte aqueux, il était possible de générer un photocourant en irradiant cette cellule avec de la lumière visible. Bien que l'origine exacte du photocourant observé soit encore mal connue (il s'agit d'un courant de déplacement de charge qui semble relié - de façon indirecte - au mécanisme de translocation de H⁺ de part et d'autre de la M.P.), Miyasaka *et al.* (1992) ont quand même su développer une sorte "d'oeil de mouche" en reliant en parallèle 64 de ces cellules à base de M.P. à un système d'amplification. Un écran LED constitué d'un même nombre de pixels et branché au système d'amplification permet finalement de visualiser les objets "vus" par le photodétecteur artificiel.

De plus, les propriétés particulières de la bR en termes d'absorption de lumière et de déplacement de charges électriques (relié au pompage de protons, voir Fig. 2) couplées à ses caractéristiques de résistance à une vaste gamme de pH et de température (Hampp, 1993; Shen *et al.*, 1993) font de la bR une candidate de choix dans l'élaboration de composantes bioélectroniques.

Un problème de taille demeure: comment organiser les bR dans l'espace pour qu'elles puissent remplir leur fonction dans ces systèmes? Les mémoires optiques à trois dimensions à base de bR requièrent par exemple une densité très homogène en protéine de façon à assurer un adressage précis des processus d'écriture et de lecture de l'information (Birge, 1995). Les cellules photodéetectrices telles qu'élaborées par Miyasaka *et al.* (1992) requièrent quant à elles une bonne homogénéité dans la distribution des bR en deux dimensions ainsi qu'un maximum de densité, d'intégrité fonctionnelle et d'orientation de la bR, de façon à pouvoir générer un signal photoélectrique d'intensité maximale en réponse à une stimulation lumineuse.

Une solution envisageable pour l'obtention d'une densité homogène en bR serait de travailler en microgravité. Les coûts associés à ce type de production sont cependant très élevés vu la nécessité d'effectuer ces opérations dans l'espace et on doit donc se pencher vers d'autres modes de production.

Une solution alternative consisterait à élaborer un système basé sur des films monomoléculaires purs de M.P. de haute qualité. La méthode des films monomoléculaires (mieux connue sous le nom de technique des monocouches) à l'interface air-eau est reconnue pour offrir un excellent contrôle du degré d'entassement moléculaire. En définissant premièrement les conditions propices à l'obtention d'une structure de films monomoléculaires purs de M.P. d'homogénéité maximale à l'interface air-eau, la méthode de déposition sur support solide de Langmuir-Blodgett pourrait par la suite permettre l'assemblage du nombre voulu de couches de M.P. et pourrait donc s'avérer une alternative de moindre coût à la microgravité.

1.1.4 Objectifs généraux de recherche

L'objectif de notre étude consiste en la production et la caractérisation des films monomoléculaires de M.P. à l'interface air-eau, ceci afin d'établir les conditions optimales à l'obtention de films de M.P. de haute qualité. Comme nous nous intéressons principalement à l'organisation spatiale de la protéine ainsi qu'à l'aspect fonctionnel de la bR (photoactivité), nous poursuivons cette section par une revue des informations structurales sur la protéine et la M.P. qui sera immédiatement suivie d'une évaluation des méthodes utilisées jusqu'à maintenant pour l'obtention de films monomoléculaires de M.P.

1.2 Structure de la bR et des M.P.

1.2.1 Composition en acides aminés de la bR

Oesterhelt et Stoeckenius (1971) furent les premiers à isoler et à caractériser la structure de la bR. Par une analyse du contenu en azote de la M.P. (micro-Kjeldahl), ils déterminèrent entre autres que la bR représente 75% en poids du contenu total de la M.P. Ils déterminèrent également par électrophorèse un poids moléculaire de 26 000 g/mole pour la bR.

1.2.2 Composition de la membrane pourpre

Une analyse subséquente de la composition de la M.P. (Kushwaha *et al.*, 1975) confirme la haute teneur en protéine des M.P. (77% p:p). Ces chercheurs ont également analysé la composante lipidique de la M.P. Le Tableau 1 fait état des résultats qu'ils ont obtenus.

1.2.3 Structure bi- et tridimensionnelle de la bR et des M.P.

Les premières études sur la structure bi- et tridimensionnelle de la bR et la M.P. ont été effectuées par Oesterhelt et Stoeckenius (1971) par diffraction des rayons-X à faible angle d'incidence, suivis par les travaux de Henderson et Unwin (1975) en diffraction électronique. Tous ces auteurs travaillaient sur un système constitué d'une multicouche de M.P.

Tableau 1
Composition lipidique de la membrane pourpre*

Composantes lipidiques	Lipides totaux, % par poids
Lipides neutres	
Squalène, dihydrosqualène, tétrahydrosqualène	4,5
β-Carotène	Traces
MK-8	1,6
Rétinal	2,5
Pigments rouges C ₅₀	-----
Phospholipides	
Phosphatidyl glycérol	4,5
Phosphatidyl glycérophosphate	52,0
Phosphatidyl glycérosulphate	4,8
Glycolipides	
X ₁	Traces
Triglycosyl diéther	19,3
X ₂	Traces
Glycolipide sulfate	10,3

* D'après les données de Kushwaha *et al.*, 1975.

Leurs mesures leur permirent de distinguer la présence de régions denses en électrons ayant un diamètre d'environ 10 Å distribuées selon un patron hexagonal régulier d'ordre p3 dans le plan de la M.P.

On remarque sur la Fig. 5 ces zones de plus grande densité électronique: trois rangées de cylindres de haute densité électronique de 10 Å de diamètre sont distribuées autour de l'axe p3. Henderson et Unwin (1975) reconnaissent ces cylindres comme étant des segments α -hélicoïdaux de la protéine orientés à 90° par rapport au plan de la membrane. À l'extérieur et parallèlement à ces rangées de cylindres se trouvent trois autres régions denses en électrons de 10 Å de largeur, chacune de ces régions étant composée de quatre autres segments en α -hélice inclinés à un certain angle par rapport à la normale au plan de la membrane. Cette inclinaison occasionne un recouvrement de leur profil de densité dans la projection dans le plan de la membrane (Fig. 5). En prenant des mesures de diffraction électronique pour différents angles d'inclinaison de leur échantillon, Henderson et Unwin (1975) sont parvenus à construire un modèle tridimensionnel de la distribution électronique de la bR (Fig. 6). Une molécule de bR est donc constituée de sept hélices- α d'un diamètre de 10 Å et d'une longueur de 40 Å (un schéma de la structure secondaire de la bR tel que nous la connaissons maintenant est d'ailleurs présenté à la Fig. 7). Trois de ces bR sont associées en un trimère autour d'un axe d'ordre p3. Ces trimères de bR sont à leur tour distribués dans le plan de la membrane selon une maille cristalline hexagonale d'une dimension de 63 Å (voir le schéma de la M.P. à la Fig. 1).

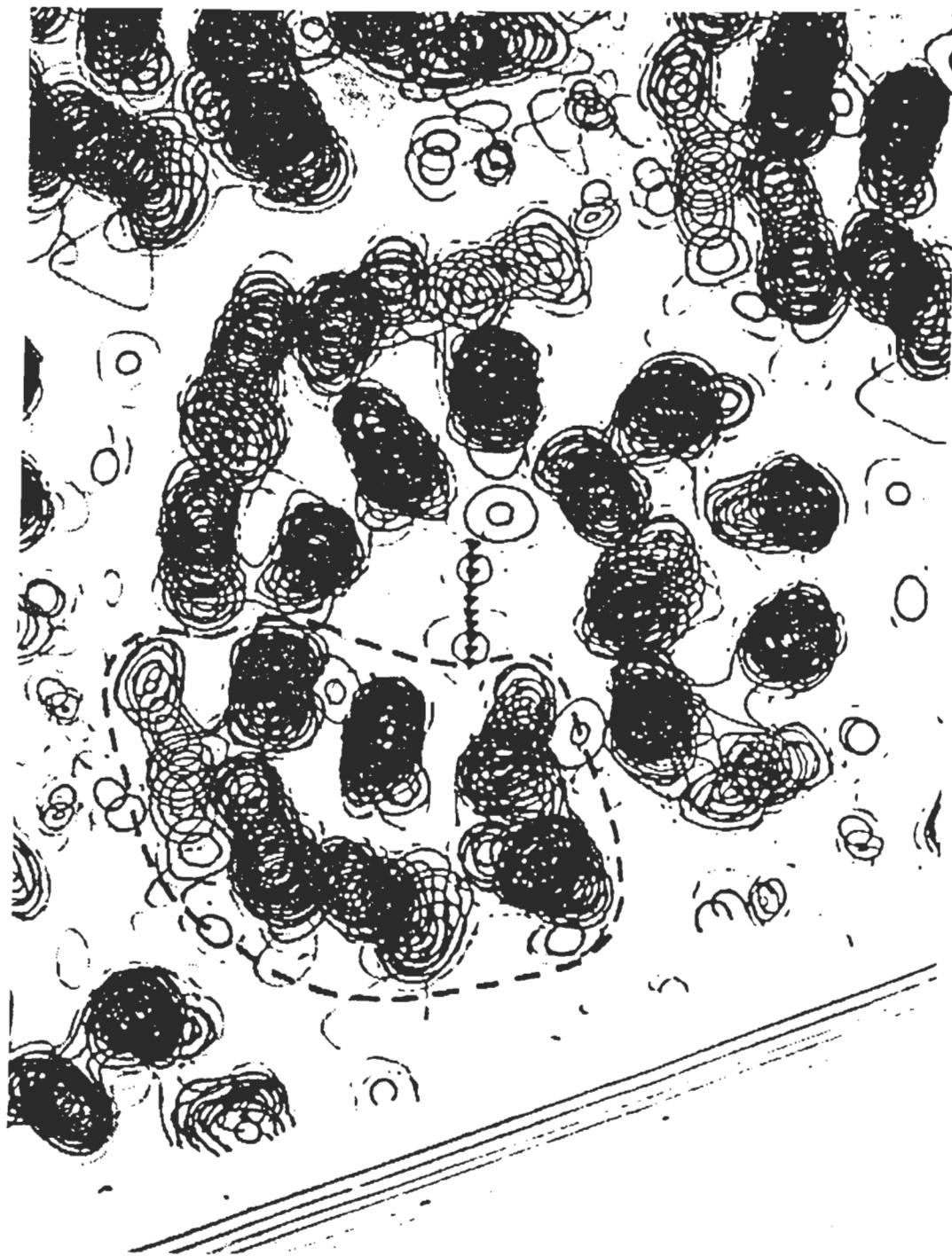


Figure 5. Carte de densité électronique de la membrane pourpre à une résolution de 7 Å (projetée dans le plan de la membrane). On y distingue un trimère de bR et même les sept hélices- α de la protéine (laquelle est délimitée par les pointillés). (d'après Henderson et Unwin, 1975).

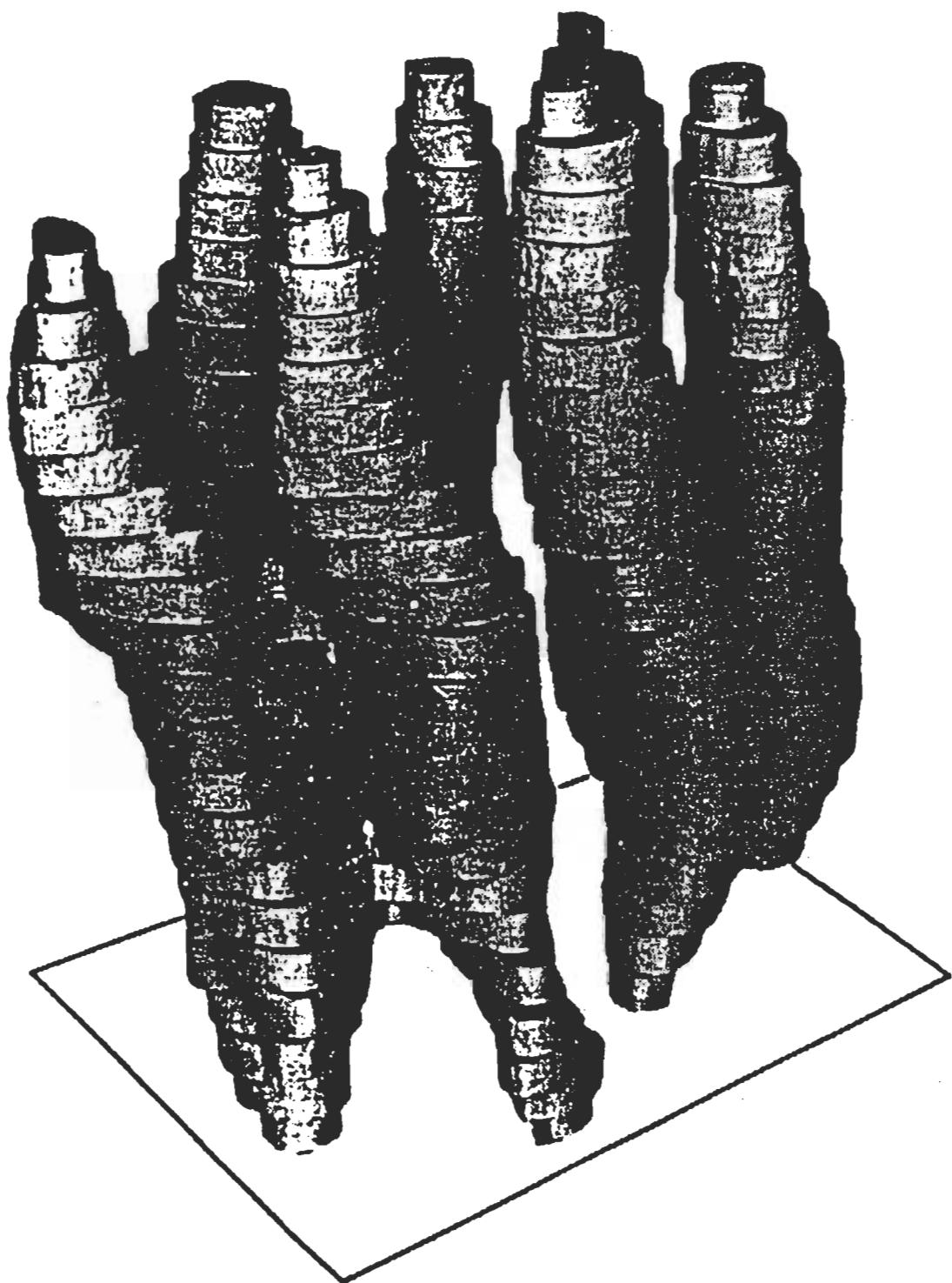


Figure 6. Modèle tridimensionnel d'une bR. Les sept segments cylindriques représentent les hélices- α de la protéine. Ces hélices- α se trouvent dans une région hydrophobe traversant la membrane pourpre de part et d'autre du feuillet lipidique (tirée de Henderson et Unwin, 1975).

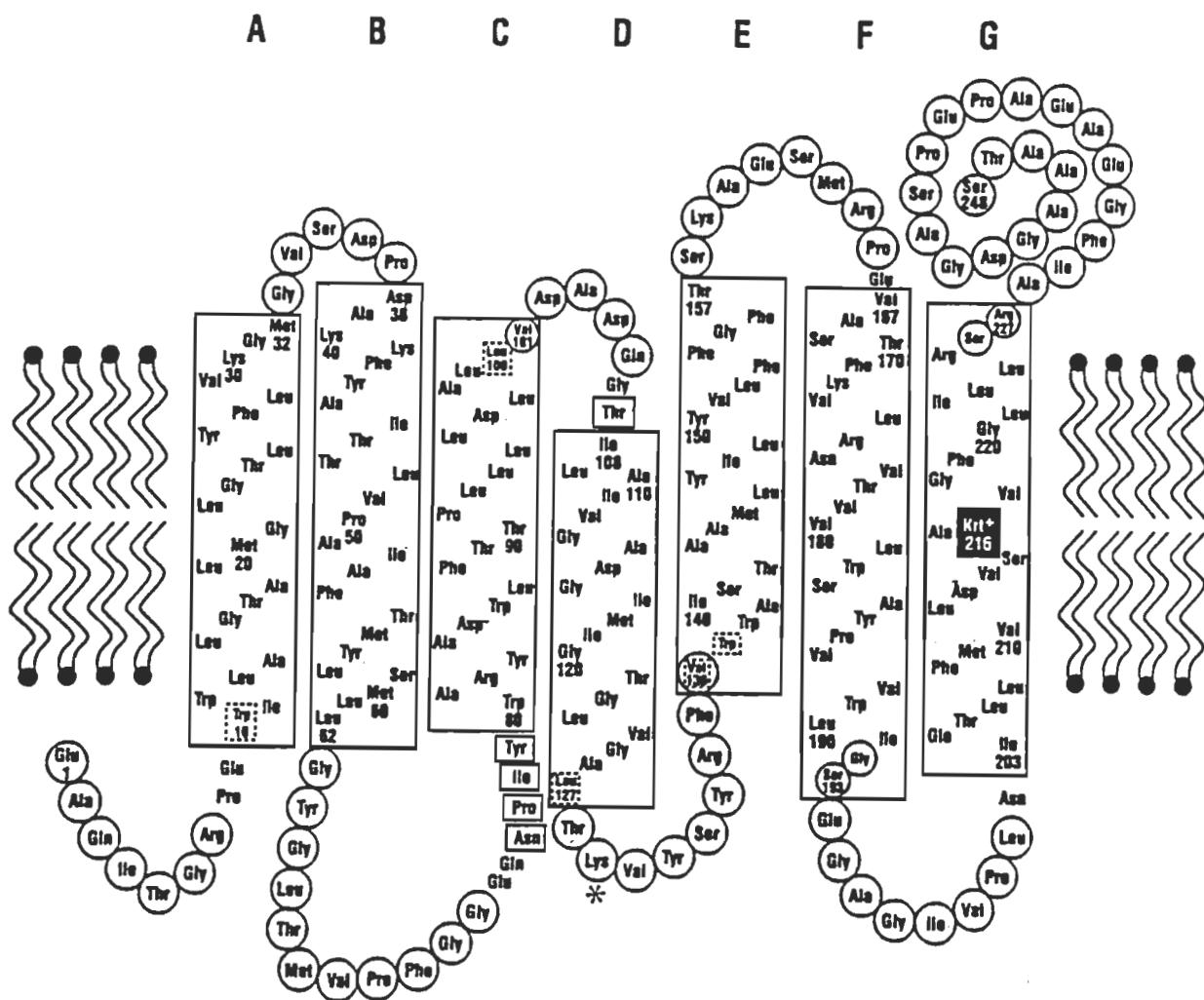


Figure 7. La structure secondaire de la bR. Les 248 acides aminés de la protéine sont répartis en sept hélices- α (A-G) intercalées dans la région hydrophobe du feuillet lipidique (sections encadrées) ainsi que dans les boucles inter-hélices baignant dans les milieux cytoplasmique et extracellulaire de la membrane pourpre (tirée de Chou *et al.*, 1992). La Lysine 129 qui peut être marquée avec une sonde fluorescente (voir section 4.1.3) est ici indiquée par un astérisque.

1.3 L'obtention de films monomoléculaires de M.P. à l'interface air-eau

1.3.1 La méthode de Hwang *et al.* (1977)

Dans un article publié en 1977, Hwang *et al.* décrivent pour la première fois une méthode permettant l'obtention de films monomoléculaires de M.P. à l'interface air-eau. Cette méthode est basée sur le concept d'étaler non pas une monocouche pure de fragments de M.P., mais bien un mélange de fragments de M.P. et de lipides exogènes (phosphatidylcholine (PC) de soya) dans l'hexane. Cette méthode est par la suite devenue un "classique", ayant ensuite été utilisée comme telle ou sous une forme légèrement modifiée (combinaison d'hexane et de diméthylformamide) par différents chercheurs (Flanagan, 1983; Schildkraut et Lewis, 1985; Hu *et al.*, 1992; Lemmetyinen *et al.*, 1992; Ikonen *et al.*, 1992a,b et 1993; Du et Liu, 1993; Niemi *et al.*, 1993).

La raison pour laquelle Hwang *et al.* (1977) ont choisi de travailler avec un tel mélange n'est pas bien précisée dans l'article. On mentionne seulement dans la section Résultats que pour des rapports bR:PC (p:p) supérieurs à 10:1, l'apparence des micrographies électroniques de ces films transférés ne montre plus la présence de fragments discrets de M.P., mais révèle plutôt la présence d'empilements de plusieurs couches de fragments de M.P. Les auteurs s'appuient ensuite sur ce résultat pour motiver leur utilisation de rapports bR:PC allant de 2:1 jusqu'à 10:1 pour la préparation de films de M.P. à l'interface air-eau.

1.3.2 Les "problèmes" de la méthode de Hwang *et al.* (1977)

Cette méthode comporte cependant trois problèmes majeurs. Il s'agit d'une part de la possibilité de dénaturation de la bR et de la délipidation des fragments de M.P. par le solvant d'étalement (l'hexane). Comme les propriétés fonctionnelles de la bR sont intimement reliées à sa structure, toute technique visant à former des films ultra-minces de M.P. doit préserver l'intégrité de la protéine. Hwang *et al.* (1977) font d'ailleurs mention de cette problématique dans leur article et reconnaissent les phénomènes de dénaturation et de délipidation par l'hexane. La Fig. 8 montre un spectre d'absorption d'une suspension de M.P. ayant subi une sonication de 60 sec. dans un tampon de conservation en présence et en absence d'un mélange hexane-PC de soya. Le spectre en présence d'hexane montre un décalage hypsochrome de 5 nm par rapport au spectre en phase aqueuse en plus d'avoir une absorbance réduite de 6%, ce qui laisse croire à une dénaturation partielle de la protéine par le solvant organique. La Fig. 9 montre quant à elle un chromatogramme en couche mince de: (A) un extrait des lipides totaux de la M.P., (B) une phase incolore obtenue lors d'une étape de préparation du mélange M.P.-PC de soya consistant en la centrifugation d'une suspension de M.P. dans une solution d'hexane et de PC de soya et (C) un aliquot de PC de soya. Toutes les taches détectées en (A) le sont également en (B), ce qui confirme la délipidation partielle des M.P. par l'hexane.

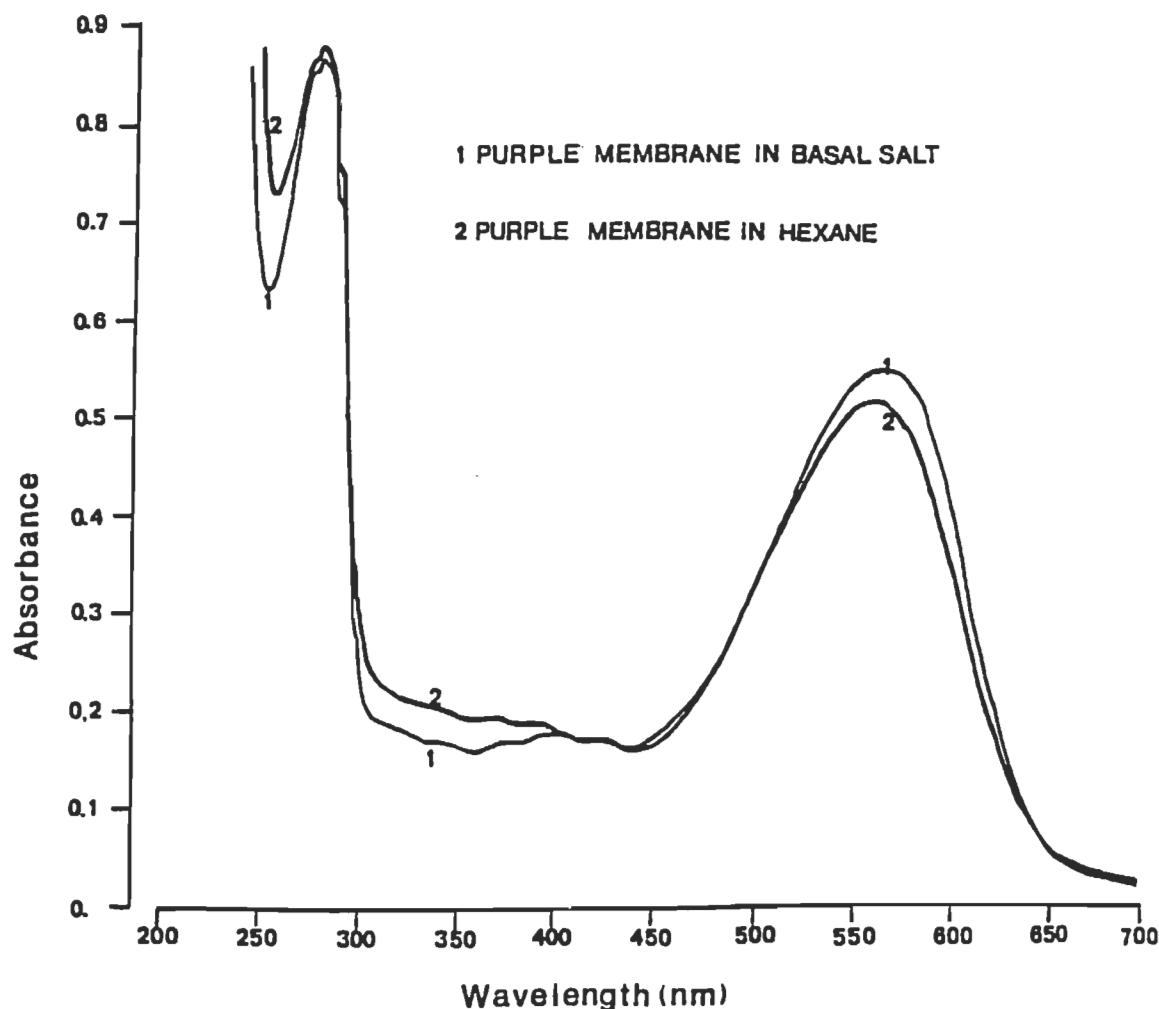


Figure 8. Spectre d'absorption d'une suspension de M.P. soniquée pendant 60 sec. dans un tampon de conservation (1) ou dans un mélange d'hexane et de PC de soya (2). Le λ_{max} de la bande d'absorption dans la gamme du visible subit un déplacement hypsochrome d'environ 5 nm dans l'hexane comparativement à la phase aqueuse en plus d'avoir une absorbance réduite de 6% (tirée de Hwang *et al.*, 1977).

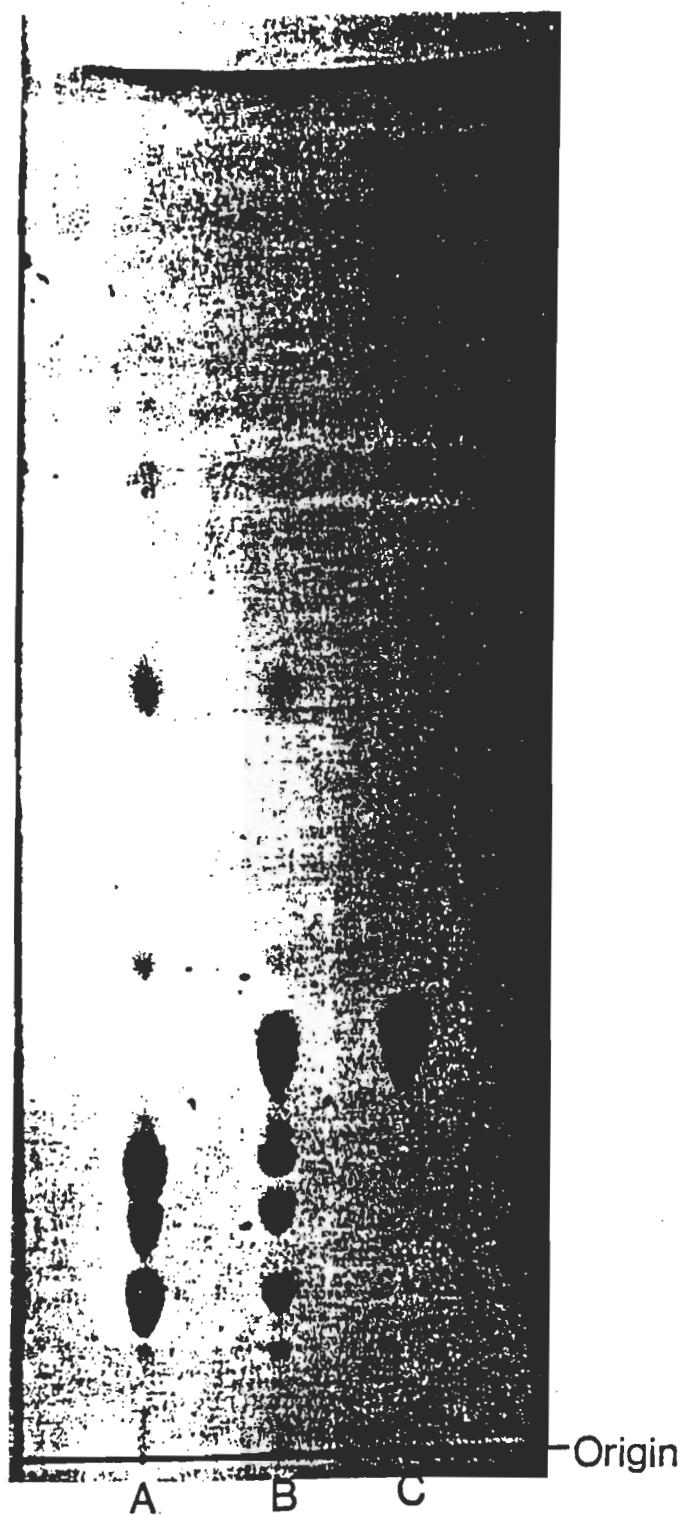


Figure 9. Chromatogramme en couche mince de: (A) un extrait des lipides totaux de la M.P., (B) une phase incolore obtenue suivant la centrifugation d'une suspension de M.P. dans une solution d'hexane et de PC de soya et (C) un aliquot de PC de soya. Toutes les taches détectées en (B) correspondent qualitativement à celles obtenues en (A); un fait confirmant la délipidation partielle des M.P. par l'hexane (tirée de Hwang *et al.*, 1977).

D'autre part, les films de M.P.- PC ainsi réalisés à l'interface air-eau n'ont qu'environ 35% de leur surface recouverte par des fragments de M.P., le reste étant couvert par les PC (Fig. 10). Le désavantage principal est que seulement le tiers de la surface du film contient des éléments photoactifs (les bR), les deux tiers étant occupés par des éléments inertes (les PC).

Or, un des objectifs visés par l'utilisation de composantes bioélectroniques consiste en une optimisation du rapport information stockée/volume (bits/cm³). On a donc avantage à trouver une méthode de formation de films de M.P. permettant l'obtention de plus grandes densités surfaciques en bR (bR/cm²).

De plus, les M.P. obtenues suivant le traitement à l'hexane font état d'une altération importante de leur structure. En effet, les fragments de M.P. qu'on peut apercevoir à la Fig. 10 n'ont qu'un diamètre moyen de 0,1 µm alors que les fragments issus des étapes d'isolation et de purification des M.P. ont un diamètre de 0,5 - 1,0 µm (F. Boucher, Département de Chimie-Biologie, UQTR, communication personnelle).

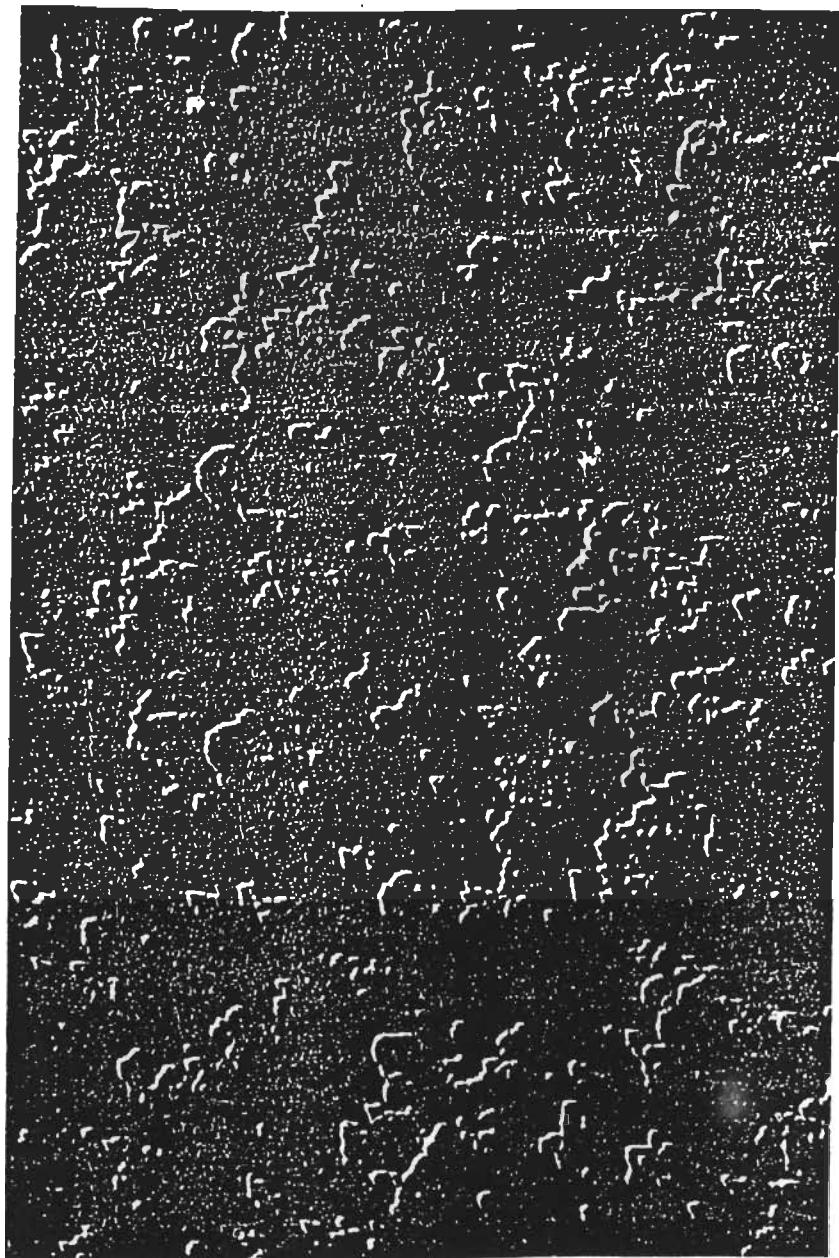


Figure 10. Micrographie électronique d'un film de M.P.-PC de soya (bR:PC = 7:1, suspension en présence d'hexane) déposé sur un support de mica par la méthode de Langmuir-Blodgett. Les fragments de M.P. d'un diamètre moyen de 0,1 μm sont distribués de façon aléatoire dans le plan du film, l'espace inter-fragments étant probablement occupé par les PC (tirée de Hwang *et al.*, 1977). La procédure d'isolation et de purification des M.P. en milieu aqueux donne quant à elle des fragments d'un diamètre moyen de 0,5 - 1,0 μm (F. Boucher, Département de Chimie-Biologie, UQTR, communication personnelle), ce qui laisse croire à une altération importante de la structure des M.P. par l'hexane.

1.3.3 Films purs de membranes pourpres

Considérant le problème de basse densité surfacique en bR associé aux films constitués d'un mélange de M.P. et de lipides exogènes, il apparaissait de plus en plus clairement que la solution à envisager était d'élaborer des films purs de M.P. De cette manière, la densité surfacique en bR serait maximale puisqu'elle pourrait, dans les meilleures conditions, atteindre la densité que l'on retrouve au sein même des M.P. Ceci correspondrait alors à une augmentation possible de la densité en bR de 300% par rapport à ce que les films de Hwang *et al.* (1977) sont en mesure de fournir. Quant au problème de dénaturation de la bR et des M.P., il était de notre avis qu'il fallait à tout prix éviter d'utiliser des solvants organiques comme solution d'étalement. En n'utilisant plus de lipides exogènes dans nos préparations, il devenait alors possible de travailler uniquement avec des suspensions aqueuses de M.P., ce qui est beaucoup plus près des conditions physiologiques pour la protéine.

Les premières tentatives de formation de films purs de M.P. sur de l'eau déionisée se sont soldées par un échec. Au lieu de demeurer à l'interface air-eau, les fragments de M.P. s'enfonçaient plutôt dans la sous-phase et on ne pouvait enregistrer aucune pression de surface en balayant l'interface avec la barrière mobile. Or, pour des films monomoléculaires de protéines à l'interface air-eau, Gaines (1966) et Pattus *et al.* (1981) notent que la présence de sels dans la sous-phase peut contribuer à prévenir la solubilisation des protéines. Nous avons alors tenté de former à nouveau des films purs de M.P., mais cette fois en utilisant une solution contenant 100

mM de NaCl et un tampon carbonate comme sous-phase (voir section Matériel). Cette fois-ci, une pression de surface pouvait être détectée lors de la compression, ce qui témoigne de la présence d'un tensio-actif à l'interface. Le premier film pur de M.P. à l'interface air-eau sans l'utilisation de solvant organique venait d'être formé.

1.4 Objectifs spécifiques de recherche

La possibilité de former des films de M.P. purs à l'interface air-eau sans utiliser de solvant organique pour l'étalement ne constituait bien sûr qu'un premier pas. Nous savions pertinemment par exemple que les films de M.P. les plus stables qui soient ne sont d'aucune utilité si la bR n'est plus fonctionnelle dans cet environnement. De plus, comme nous l'avons déjà mentionné au début de ce travail, l'utilisation éventuelle de films protéiques à des fins bioélectroniques nécessitera une grande organisation des protéines à l'échelle micro- et macroscopique. Ces raisons nous ont poussé à entreprendre des expériences visant à caractériser les propriétés tantôt structurales et tantôt fonctionnelles des films de M.P. ainsi formés à l'interface air-eau. Nous avions donc comme objectifs de:

- Caractériser les isothermes de pression et de potentiel de surface des films de M.P. à l'interface air-eau (technique des monocouches).
- Vérifier si la bR était toujours photoactive à l'interface air-eau (spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau).

- Déterminer l'orientation de la protéine à l'interface air-eau (quenching de fluorescence à l'interface air-eau).
- Mesurer l'épaisseur et la rugosité des films de M.P. à l'interface air-eau en fonction de la pression de surface; s'assurer qu'il s'agit bien de monocouches et non de multicouches (réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau).
- Mesurer l'orientation des hélices- α de la bR en fonction de la pression de surface (méthode Langmuir-Blodgett couplée à la spectroscopie FTIR-ATR).
- Étudier la réversibilité des interactions intermoléculaires promues par la pression latérale dans les films de M.P. à l'interface air-eau (cycles compression-décompression-recompression).
- Vérifier l'organisation bidimensionnelle des films de M.P. à l'interface air-eau (microscopie de fluorescence à l'interface air-eau).

CHAPITRE 2

THÉORIE

2.1 La pression de surface, π , et l'isotherme de pression de surface

La pression de surface correspond à la variation de l'énergie libre par unité de surface causée par la présence d'une densité suffisante de molécules tensio-actives à l'interface air-eau. Le terme *tensio-actif* réfère à une molécule ayant la propriété de perturber une certaine proportion des interactions attractives entre les molécules de solvant (dans le cas qui nous concerne, il s'agit de l'eau). On dit alors que les tensio-actifs réduisent la *tension superficielle* du liquide et occasionnent, par le fait même, une expansion de sa surface et un affaissement du ménisque. Par définition, la pression de surface est donnée par la relation:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

où γ_0 est la tension de surface de l'eau pure et γ est la tension de surface lorsque la surface de l'eau est recouverte d'un film de molécules tensio-actives dans un état de compression donné. L'isotherme de pression de surface correspond quant à elle au graphique pression de surface/aire moléculaire relatant l'épisode de compression à température constante d'un film tensio-actif à l'interface air-eau.

2.2 Le module de compressibilité isothermique, K^s

Lorsqu'un matériel est comprimé à température constante, les interactions entre les molécules constituant ce matériel deviennent plus importantes. Ces interactions, défavorables d'un point de vue énergétique (les interactions entre les molécules du film étant de nature répulsive), requièrent donc un apport extérieur d'énergie. Dans le cas nous concernant, cet apport d'énergie (sous forme mécanique) provient de la barrière mobile (voir Fig. 11). Étant donné qu'il s'agit d'interactions en deux dimensions (dans le plan de la monocouche), la compression se traduit par une réduction de la surface accessible et donc, de l'aire moléculaire (A). La pente instantanée de l'isotherme de pression de surface $(\delta\pi/\delta A)_T$ possède des unités de mN/m^3 . À moins de phénomènes de dissipation énergétique en cours de compression, on s'attend naturellement à ce que la pente de l'isotherme soit croissante (en valeur absolue) en fonction de la réduction de l'aire moléculaire. En ce sens, la pente instantanée de l'isotherme nous renseigne peu sur le changement des interactions intermoléculaires pouvant survenir en cours de compression. On ne prend réellement connaissance de ce changement qu'en normalisant $(\delta\pi/\delta A)_T$ par rapport à la réduction de l'aire moléculaire entraînée par la compression. On atteint alors le concept de *module de compression isothermique*, ayant comme symbole K^s et défini comme étant (Atkins, 1978; Schildkraut et Lewis, 1985):

$$K^s = - A(\delta\pi/\delta A)_T \quad (2)$$

Notons que le signe négatif est incorporé dans la définition pour que K^s ait une valeur positive (lorsqu'une pression de surface est appliquée, l'aire moléculaire de toute substance s'en trouve réduite, donc $(\delta\pi/\delta A)_T$ possède toujours une valeur négative). Étant normalisé par rapport à l'aire moléculaire, K^s nous renseigne donc directement sur la valeur de l'énergie des interactions intermoléculaires dans le plan de la monocouche (unités de mN/m ou de mJ/m^2) en faisant abstraction du paramètre relié à la compression (réduction de l'aire moléculaire).

2.3 Le potentiel de surface, $\Delta\psi$

Le concept de potentiel de surface appliqué à des mesures en monocouche à l'interface air-eau ayant déjà été décrit avec beaucoup d'élégance dans les thèses de François Lamarche (1988) et Pierre Lavigne (1994), ainsi que dans le Chapitre Choisi de Marc Brullemanns (1989), je me contenterai simplement ici de faire quelques rappels.

Le potentiel électrique interne d'une phase aqueuse (ϕ) peut être séparé en deux contributions (Aveyard et Haydon, 1973; Bockris et Reddy, 1977),

$$\phi = \psi + \chi \quad (3)$$

où on appelle communément ψ le potentiel électrique *externe*. Considérons une charge électrique ponctuelle placée dans le vide à une distance infiniment grande d'une phase quelconque (solide, liquide ou gazeuse) chargée

électriquement. ψ correspond alors au travail nécessaire pour amener cette charge ponctuelle jusqu'à une très petite distance de la phase chargée. C'est un travail de nature purement électrostatique qui ne dépend que des charges nettes (celle de la charge-test et celle de la phase étudiée) impliquées. À ψ s'ajoute χ , le potentiel de surface. Il correspond au travail nécessaire pour que la charge-test traverse l'interface et se rende jusqu'au cœur de phase. Vu la présence de charges, de dipôles et de quadrupôles à l'interface, ce travail est non-nul. C'est justement à ce potentiel χ que nous nous intéressons, ou plutôt à sa variation en fonction de l'étalement et de l'état de compression d'un film monomoléculaire à l'interface air-eau. L'accès à des valeurs de χ et de $\Delta\chi$ est cependant indirect puisque ces quantités ne sont pas mesurables expérimentalement (Aveyard et Haydon, 1973; Bockris et Reddy, 1977). Par contre, la variation du potentiel externe de la surface aqueuse ($\Delta\psi$) en absence et en présence d'un film est mesurable expérimentalement. Comme la variation du potentiel externe de la phase aqueuse peut être attribuée à la variation du potentiel χ due à la présence du film à l'interface, la mesure de la différence de potentiel externe en absence et en présence d'un film à l'interface nous renseigne donc indirectement sur les variations de potentiel χ . Il apparaît important de souligner ici que dans le jargon des personnes intéressées au comportement électrique de films monomoléculaires à l'interface air-eau, on entend par "potentiel de surface" la différence de potentiel externe en absence et en présence d'un film à l'interface. À moins de mention contraire, nous utiliserons dorénavant le terme "potentiel de surface" pour définir le $\Delta\psi$ (également appelé ΔV).

2.3.1 Origine du $\Delta\psi$

La variation du potentiel de surface suite à l'étalement d'un film à l'interface air-eau peut provenir de différentes sources, notamment:

- la réorientation des molécules d'eau à l'interface
- la réorganisation de la double couche ionique (cas d'une monocouche chargée et présence d'ions dans la sous-phase)
- la charge électrique nette des molécules formant le film (s'il y a lieu)
- le moment dipolaire perpendiculaire (μ_{\perp}), soit une projection non nulle du moment dipolaire des molécules formant le film dans un plan perpendiculaire à celui formé par l'interface air-eau.

Le système comprenant une couche monomoléculaire à l'interface air-eau est souvent comparé au cas d'un condensateur plan constitué de deux plaques parallèles conductrices portant une densité de charge σ séparées d'une distance d . La différence de potentiel ΔV est alors exprimée par,

$$\Delta V = \sigma d / \epsilon_0 D \quad (4)$$

où $\epsilon_0 D$ est la constante diélectrique absolue du milieu. En postulant que la séparation de charges puisse être approximée dans notre modèle par un dipôle de moment dipolaire effectif μ , et assumant n molécules (les dipôles) par cm^2 , alors $\sigma d = ned = n\mu$ (e étant la charge d'un électron). En exprimant l'équation (4) selon μ , nous obtenons,

$$\mu = \mu_{\perp} = \Delta V \epsilon_0 D / n = \Delta V A \epsilon_0 D \quad (5)$$

où A est l'aire moléculaire et μ_{\perp} est la projection du moment dipolaire effectif dans un plan perpendiculaire à celui formé par l'interface air-eau.

2.4 Quenching de fluorescence

De manière à vérifier l'accessibilité du quencher au fluorophore dans le cas des M.P.-FITC (fluorescéine isothiocyanate, une sonde fluorescente) nous avons débuté notre étude sur l'orientation de la bR par des mesures de quenching de fluorescence en suspension. Les M.P.-FITC ont alors leurs deux faces en contact avec le solvant contenant le quencher (KI) et devraient normalement présenter (à moins d'un encombrement stérique défavorable) une accessibilité totale au quencher. Par la suite, la détermination de l'orientation d'une protéine comme la bR par quenching de fluorescence à l'interface air-eau peut être entreprise, étant alors basée exclusivement sur le principe d'accessibilité quencher-fluorophore où l'interface air-eau constitue une barrière qui ne peut être franchie par le quencher. Les M.P. dont les bR ont été marquées sont étalées à l'interface air-eau. Des spectres de fluorescence sont ensuite enregistrés *in situ* en fonction d'une concentration croissante de KI dans la sous-phase. Puisque les bR sont marquées exclusivement d'un seul côté, seules celles ayant leur face extracellulaire orientée vers la sous-phase pourront voir leur fluorescence quenchée par le KI (les processus de quenching étant de nature collisionnelle).

La détermination quantitative de l'orientation des bR fut réalisée en utilisant l'équation de Stern-Volmer modifiée (Lakowicz, 1983) pour le cas spécial de deux populations distinctes de fluorophores, F_a et F_b , représentant respectivement les fluorescéines accessibles et inaccessibles,

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a(K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2} + \frac{1}{f_a} \quad (6)$$

$$f_a = \frac{F_a}{F_b + F_a} \quad (7)$$

où f_a représente la fraction de la fluorescence initiale qui est accessible au quencher (i.e.: ce qui correspond aux fluorescéines faisant face à la sous-phase), F_0 est l'intensité de fluorescence initiale (avant l'ajout de quencher) et ΔF est la différence entre l'intensité de fluorescence mesurée et l'intensité de fluorescence initiale. K_D et K_S représentent respectivement les constantes de quenching dynamique et statique alors que $[Q]$ est la concentration de quencher en mole/l.

L'équation (6) montre qu'en portant en graphique $F_0/\Delta F$ en fonction de $1/[Q]$, on peut déterminer f_a en extrapolant $F_0/\Delta F$ à concentration infinie en quencher, l'ordonnée à l'origine de ce graphique devenant alors égale à $1/f_a$. Un quenching de toutes les sondes fluorescentes donnera lieu à une ordonnée à l'origine égale à l'unité alors qu'un quenching partiel sera caractérisé par une ordonnée à l'origine supérieure à un.

2.5 Réflectivité des rayons-X

En réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau, un faisceau monochromatique de rayons-X, de longueur d'onde $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ et d'une intensité I_0 arrive avec un angle d'incidence α_i sur une surface aqueuse et l'intensité réfléchie I_r est détectée à un angle α_r ($\alpha_r = \alpha_i = \alpha$, conditions de réflectivité spéculaires). La réflectivité est mesurée en fonction du moment de transfert d'inertie Q_z , lequel est défini comme étant:

$$Q_z = 4\pi/\lambda * \sin\alpha \quad (8)$$

Pour de petits angles α , Q_z peut être considéré comme étant proportionnel à l'angle α . La réflectivité en fonction du moment de transfert est définie comme:

$$R(Q_z) = I_r/I_0 \quad (9)$$

À partir de la courbe de réflectivité, la densité électronique le long de la normale à l'interface, $\rho(z)$, peut être déterminée et reliée à la structure moléculaire à l'interface. La densité électronique d'un milieu homogène modifie l'indice de réfraction (η) relativement aux rayons-X selon:

$$\eta(z) = 1 - (\lambda^2/2\pi) \rho(z) r_0 \quad (10)$$

où r_0 est le rayon classique de l'électron ($r_0 = 2,82 \times 10^{-13}$ cm). La réflectivité d'un nombre fini d'interfaces parfaitement définies, $R_0(Q_z)$, peut être calculée exactement en utilisant les méthodes récursives standard (Parratt, 1954; Born et Wolf, 1959). De manière à tenir compte des vagues capillaires et des imperfections de la surface et en assumant une distribution gaussienne de densité électronique interfaciale de la forme

$$\exp(-0,5(z-z_i)^2/\sigma^2) \quad (11)$$

pour chaque interface, la réflectivité est modifiée par un facteur de type Debye-Waller (Als-Nielsen et Kjaer, 1989):

$$R(Q_z) = R_0(Q_z) e^{-(Q_z \sigma)^2} \quad (12)$$

où σ est défini comme étant la rugosité de surface.

2.6 Spectroscopie FTIR-ATR

Les expériences de FTIR-ATR ont été faites sur des M.P. déposées par la technique de Langmuir-Blodgett (LB) sur des lamelles de germanium (Ge). Pour ces mesures, un faisceau infrarouge monochromatique entre par une extrémité du cristal de Ge (voir Fig. 16, section 3.2.5) avec un angle incident de 45° après être passé par un polariseur positionné soit parallèlement ou perpendiculairement au plan d'incidence. Le faisceau fait alors 23 réflexions totales internes avant de ressortir à l'autre extrémité du

cristal pour aboutir au détecteur. À chaque réflexion sur une des parois du cristal, une petite fraction de l'énergie incidente est absorbée par le matériel déposé à sa surface. On voit alors aisément que l'absorbance totale observée pour un nombre d'onde donné dépend bien sûr, comme dans la spectroscopie infrarouge "classique", des liens chimiques, mais aussi de l'orientation moyenne des liaisons impliquées dans le phénomène d'absorption (les mesures étant faites en lumière polarisée). Ceci revient donc à dire que la spectroscopie FTIR-ATR peut-être utilisée pour calculer l'orientation moléculaire si l'échantillon étudié possède une orientation privilégiée (anisotrope) par rapport à l'interface Ge-air.

L'angle moyen que font les hélices- α de la bR par rapport à la normale du cristal de Ge a été calculé à partir des valeurs expérimentales des rapports dichroïques (R^{ATR}). Ces R^{ATR} sont obtenus en divisant les intensités d'absorption maximales de la bande amide I mesurées avec une radiation incidente parallèle (A_I) et perpendiculaire (A_{\perp}) au plan d'incidence (Fringeli et Günthard, 1981).

$$R^{ATR} = \frac{A_I}{A_{\perp}} = \frac{(E_x^2 k_x + E_z^2 k_z)}{E_y^2 k_y} \quad (13)$$

E_x , E_y et E_z sont les composantes des amplitudes du champ électrique et k_x , k_y et k_z sont les coefficients d'absorption dans les directions x, y et z, respectivement. En assumant une distribution d'orientation uniaxiale pour les hélices- α par rapport à la normale du cristal ATR, le paramètre d'ordre $f(\theta)$

reliant l'axe des hélices- α et la normale du cristal ATR fut calculé en utilisant l'expression suivante (Hübner et Mantsch, 1991),

$$R_{\text{ATR}} = \frac{E_x^2}{E_y^2} + \frac{\frac{E_z^2[f(\theta)\cos^2\alpha + \frac{1}{3}(1-f(\theta))]}{E_y^2[\frac{1}{2}f(\theta)\sin^2\alpha + \frac{1}{3}(1-f(\theta))]}} \quad (14)$$

où α représente l'angle que fait le moment de transition avec l'axe des hélices- α , θ est l'angle entre l'axe des hélices- α et la normale du cristal ATR (notons que cet angle est le même que celui entre l'axe des hélices- α et la normale de la membrane, assumant un bon contact des M.P. avec le cristal ATR (Mirabella, 1988), et $f(\theta)$ est le paramètre d'ordre (Fraser, 1953). Pour des films minces comme ceux utilisés dans la présente étude, les composantes des amplitudes du champ électrique sont de 1.41, 1.46 et 0.728 pour E_x , E_y et E_z , respectivement. Ces valeurs ont été calculées en utilisant des indices de réfraction de 1.44, 4, et 1, respectivement, pour le film de M.P., le cristal ATR (Ge) et l'air, pour un angle d'incidence de 45° (Fringeli et Günthard, 1981). Finalement, l'angle moyen des hélices- α a été calculé à partir du second polynôme de Legendre (Fraser, 1953):

$$f(\theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1) \quad (15)$$

CHAPITRE 3

MATÉRIEL

3.1 Provenance et pureté des produits utilisés

3.1.1 L'eau

Puisque la grande majorité des expériences effectuées dans le cadre de ce travail ont été faites en monocouche, la pureté de l'eau utilisée pour préparer les solutions tampons qui serviront de sous-phase est d'une grande importance. En effet, tout contaminant tensio-actif viendrait se loger à l'interface air-eau et pourrait ainsi perturber les molécules formant le film. C'est pourquoi l'eau utilisée pour faire ces solutions fut purifiée à l'aide d'un système de filtration Nanopure (Sybron-Barnstead). Ce système comprend un arrangement en série de quatre filtres: le premier sert à éliminer les particules organiques, les deux suivants retiennent les ions tandis que le dernier est un filtre mécanique à pores de 0,2 μm . À la sortie de ces filtres, l'eau possède une résistivité spécifique supérieure à 18 $\text{M}\Omega\text{.cm}$. La tension superficielle de cette eau purifiée mesurée dans le laboratoire par la méthode de la plaque de Wilhelmy est supérieure à 71,0 mN/m .

3.1.2 Le chlorure de sodium

Le NaCl utilisé dans le cadre de toutes les expériences effectuées en monocouche a été acheté de la compagnie Baxter. Il fut utilisé après purification par décantation en présence de chloroforme (la purification servant à éliminer toute trace de tensio-actifs pouvant contaminer le sel). La méthode utilisée consiste dans un premier temps à bien mélanger un volume d'une solution saturée en NaCl avec du chloroforme (Oméga Mégasolv, HPLC Grade, 99,98%) dans des proportions 3:1 dans une ampoule à décantation. Après stabilisation, on décante la phase chloroformique et on conserve la phase aqueuse. Le processus est répété de quatre à sept reprises, ou jusqu'à ce qu'on ne puisse plus voir de film mince séparant les phases aqueuse et organique en décantant. La solution saline résultante contient des traces de chloroforme qu'on élimine par la suite en chauffant la solution à 70°C pendant trois heures tout en agitant légèrement avec une barre magnétique. La concentration résultante en NaCl est ensuite déterminée grâce à l'indice de réfraction de la solution qu'on compare à une courbe standard.

3.1.3 Le mono- et bicarbonate de sodium: tampon A

Le mono- et bicarbonate de sodium (Merck Chemicals et Aesar) ont été utilisés tels que reçus pour faire le tampon A. Ce dernier comprend 39,8 mM de NaHCO₃ et 3,4 mM de Na₂CO₃ en plus de 100 mM de NaCl. Le pH de cette solution fut ajusté à 9,0 avec du NaOH. Notons que le pH de 9,0 fut initialement choisi en raison de l'absorption et de la fluorescence du FITC

(servant à marquer les bR) qui sont maximales à ce pH. C'est pourquoi le tampon A constitue la sous-phase utilisée pour toutes les expériences effectuées en monocouche à l'exception des expériences de FTIR-ATR, et fut également utilisé pour les expériences de quenching de fluorescence avec les suspensions de M.P.

3.1.4 Le mono- et dihydrogénophosphate de sodium: tampon B

Le mono- et dihydrogénophosphate de sodium (Merck Chemicals et Aesar) ont été utilisés tels que reçus pour faire le tampon B (les tampons carbonate et phosphate provenant d'autres compagnies sont inutilisables puisqu'ils contiennent une trop grande quantité de tensio-actifs). La composition de ce tampon est de 0,65 mM de NaH_2PO_4 et 11,62 mM de Na_2HPO_4 en plus de 100 mM de NaCl. Le pH de cette solution fut ensuite ajusté à 9,0 avec du NaOH. Le tampon B a été utilisé comme sous-phase pour les monocouches de M.P. dans le cadre des expériences en FTIR-ATR, le tampon carbonate donnant lieu à des pics d'absorption dans la région des bandes amide I et II.

3.1.5 La solution d'iodure de potassium

Pour les expériences de quenching de fluorescence en suspension et à l'interface air-eau, nous avons utilisé une solution d'iodure de potassium (KI) d'une concentration de 5 ou 6 M. Outre le KI, nous avons ajouté 2 mM de thiosulfate de sodium pentahydraté ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) pour prévenir

l'oxydation de l'iodure. Ces sels ont été dissous dans un volume approprié de la solution A (voir section 3.1.3).

3.1.6 Les acides gras

Les acides palmitique, stéarique et arachidique (Fisher) ont été utilisés à des fins de calibration du système de détection de la pression de surface des bains de monocouche. Cette méthode de calibration est expliquée à la section 4.2.1.

3.1.7 Autres produits chimiques utilisés

Tel que mentionné à la section 3.1.2, le chloroforme a été utilisé tel que reçu pour la purification du NaCl et comme solvant d'étalement pour les acides gras. Ce solvant, en plus du méthanol, de l'hexane (hexanes, Fisher ACS Grade), et de l'éthanol distillé (Les alcools de commerce inc.) furent utilisés à des fins de nettoyage des bains de monocouche et des seringues (Dynatech Precision Sampling Corp., et Hamilton) servant à l'étalement des acides gras et des M.P. à l'interface air-eau. La rhodamine B servant à visualiser les films de M.P. lors des expériences de microscopie de fluorescence provient de J.T. Baker Chemical.

3.2 L'appareillage

Ce travail étant basé sur des résultats provenant d'une collection de techniques, la description détaillée de chacun des appareils utilisés serait à

notre avis inappropriée, alourdissant inutilement un ouvrage déjà passablement chargé. Aussi, avons nous choisi de ne détailler que les appareils non-commerciaux, spécimens parfois uniques en leur genre et dont le lecteur risquerait de très peu connaître, voire même d'en ignorer l'existence. Les appareils commerciaux seront quant à eux simplement référencés dans le texte de la section Méthodes expérimentales.

3.2.1 Les bains de monocouche

Comme les différentes techniques utilisées au cours de ces travaux nécessitèrent l'emploi de plusieurs bains de monocouches (aussi appelés bains ou cuves de Langmuir), il serait à notre avis inapproprié de présenter ici chacun d'entre eux. Ainsi, nous nous limiterons à décrire sommairement un montage expérimental montrant les composantes principales d'un bain de monocouche. Pour une description plus exhaustive de différents bains, nous dirigeons les lecteurs à l'ouvrage désormais classique en ce domaine de Gaines (1966). Une représentation schématique d'un bain de monocouche est présentée à la Fig. 11. Le bain lui-même (1) est normalement fait de Teflon, d'aluminium ou de verre. Lorsque constitué d'un des deux derniers matériaux, il est recouvert de Teflon autoadhésif (Fluorocarbon Dielectrix Division, Lockport, NY), ce qui lui confère un caractère hydrophobe. La surface aqueuse du bain est séparée en deux compartiments par le flotteur de mica (2). Ce flotteur est relié aux bords du bain par de minces feuilles de Teflon (3), assurant ainsi l'étanchéité des deux compartiments. Le compartiment situé à l'arrière du flotteur est le compartiment de référence (4).

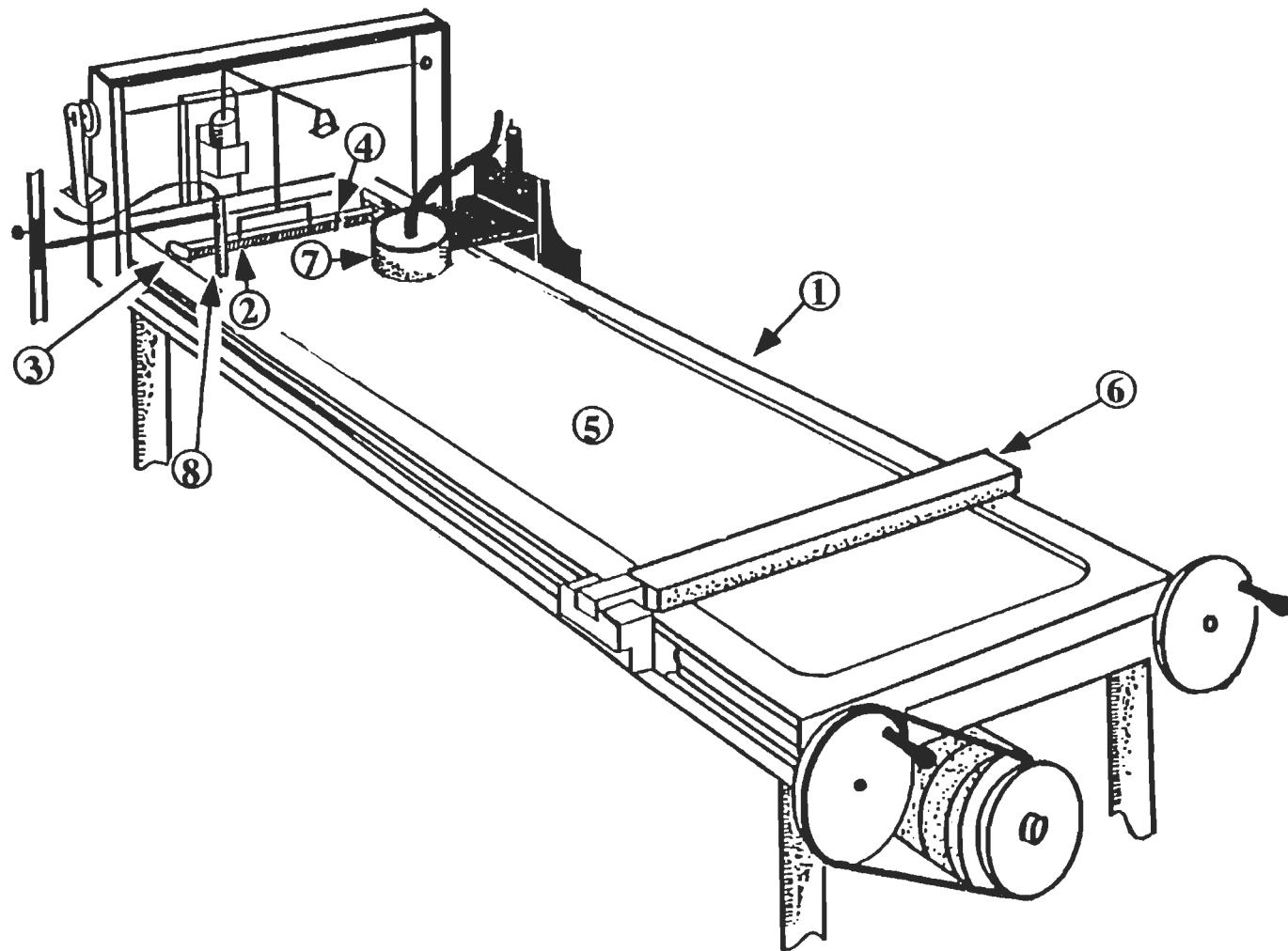


Figure 11. Représentation schématique d'un bain de monocouche servant à mesurer les isothermes de pression et de potentiel de surface. Notons que les mesures de fluorescence à l'interface ont été faites sur un bain muni d'une balance de Langmuir comme système de détection de la pression de surface. Une plaque de Wilhelmy fut utilisée lors des autres mesures en monocouche. L'identification des composantes est faite dans le texte (figure tirée de la thèse de Lamarche, 1988).

Il est en tout temps dépourvu de molécules tensio-actives, ces dernières étant étalées dans le compartiment de travail (5), situé à l'avant du flotteur. De cette manière, la tension superficielle dans le compartiment de référence demeure toujours celle de l'eau pure. La pression de surface mesurée est alors simplement la différence entre la tension superficielle régnant dans le compartiment de travail et le compartiment de référence (voir équation 1).

La compression des molécules tensio-actives se fait à l'aide de la barrière mobile (6) qui avance en direction du flotteur, réduisant ainsi la surface accessible moyenne par molécule. On définit ainsi la notion d'aire moléculaire par la relation suivante,

$$A = S/N \quad (16)$$

où S est la surface du bain accessible aux molécules tensio-actives (soit entre le flotteur et la barrière mobile) exprimée en \AA^2 , et N est le nombre de molécules étalées à la surface. L'aire moléculaire possède alors des unités de $\text{\AA}^2/\text{molécule}$.

Pour les expériences en potentiel de surface, une électrode radioactive (7) de ^{241}Am (Nuclear Radiation Development, Grand Island, NY) est placée à une distance de 1 à 3 mm au-dessus de la surface aqueuse du compartiment de travail. L'électrode de référence (8) est quant à elle placée dans la sous-phase du compartiment de référence (nous référons les lecteurs à la section 2.3 pour des informations concernant l'origine et la mesure du potentiel de surface).

3.2.2 Le spectrophotomètre à l'interface air-eau

Le spectrophotomètre et le spectrofluorimètre à l'interface air-eau sont deux appareils de très grande précision construits de façon artisanale autour d'un même bain de monocouche par les techniciens de l'atelier de mécanique de l'UQTR. Ces appareils ayant déjà fait l'objet d'un mémoire (Chérid, 1992), nous nous contenterons ici de tirer quelques grandes lignes quant à leur construction et leur fonctionnement.

Une représentation schématique du spectrophotomètre à l'interface air-eau est présentée à la Fig. 12. Au coeur de l'appareil, on retrouve un bain de monocouche de type Langmuir (1) qui sert à la fois pour le spectrophotomètre et le spectrofluorimètre, les deux étant placés côte à côte dans l'enceinte du bain. C'est au-dessous de ce bain de monocouche qu'on retrouve la presque totalité de l'optique de l'appareil. Une source de lumière visible (2) envoie premièrement son rayonnement à un séparateur de faisceau de type Polka (3). La partie réfléchie du faisceau atteint un premier miroir ellipsoïde (4) qui va focaliser le faisceau à l'entrée du monochromateur (5). À la sortie de ce dernier, la lumière atteint un second séparateur de faisceau. Une faible portion du rayonnement incident est réfléchie vers un détecteur d'intensité (6) qui, par une boucle rétroactive, assure ainsi la stabilité du rayonnement de la source (2). Le faisceau qui traverse le séparateur se rend jusqu'au modulateur (7) d'où il sera envoyé alternativement aux miroirs plans 3 ou 4 (pm 3 ou pm 4). Le faisceau échantillon est celui qui, du miroir plan 3, traverse la sous-phase et la monocouche pour se rendre à la photodiode 1 (ph 1).

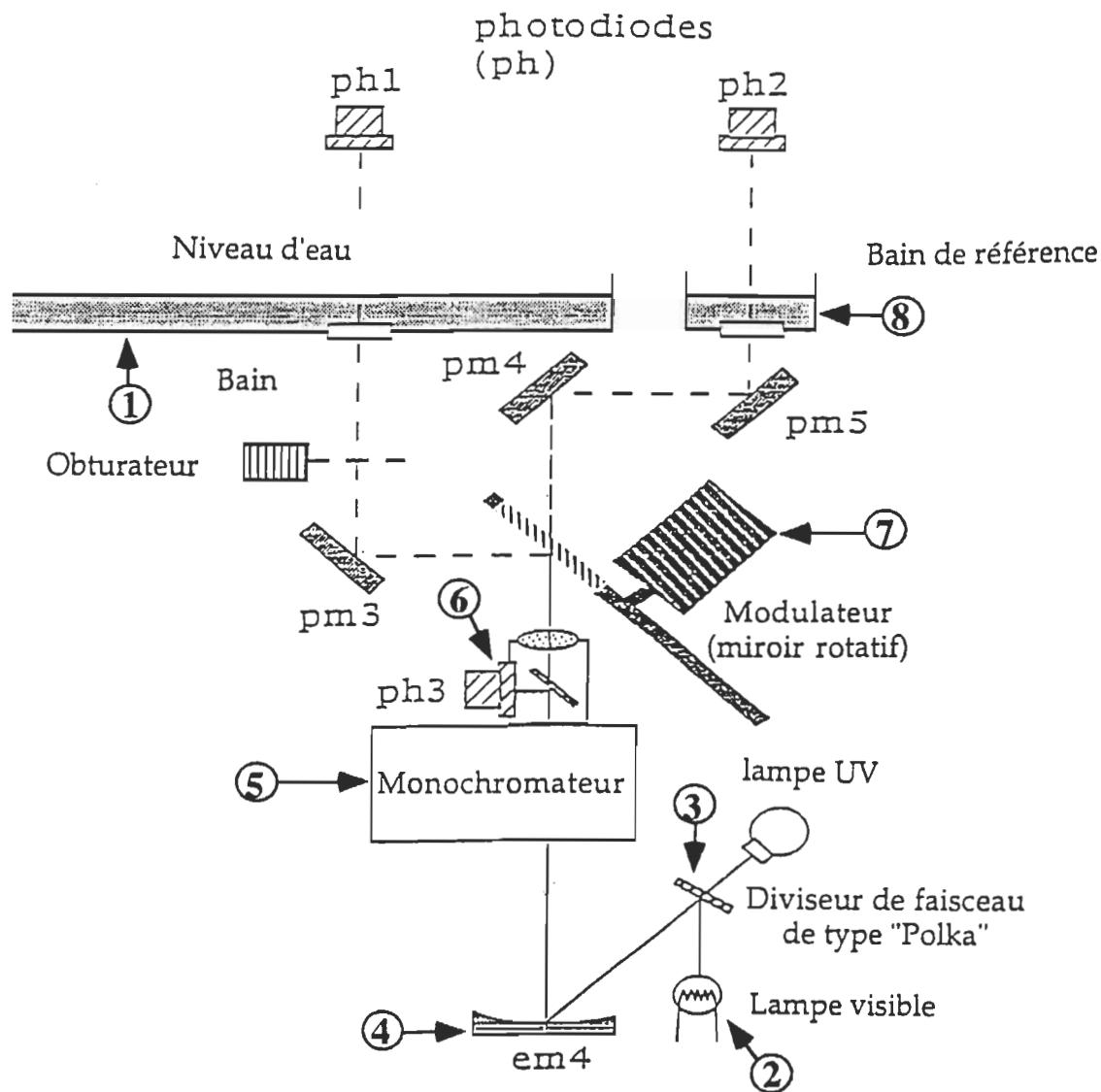


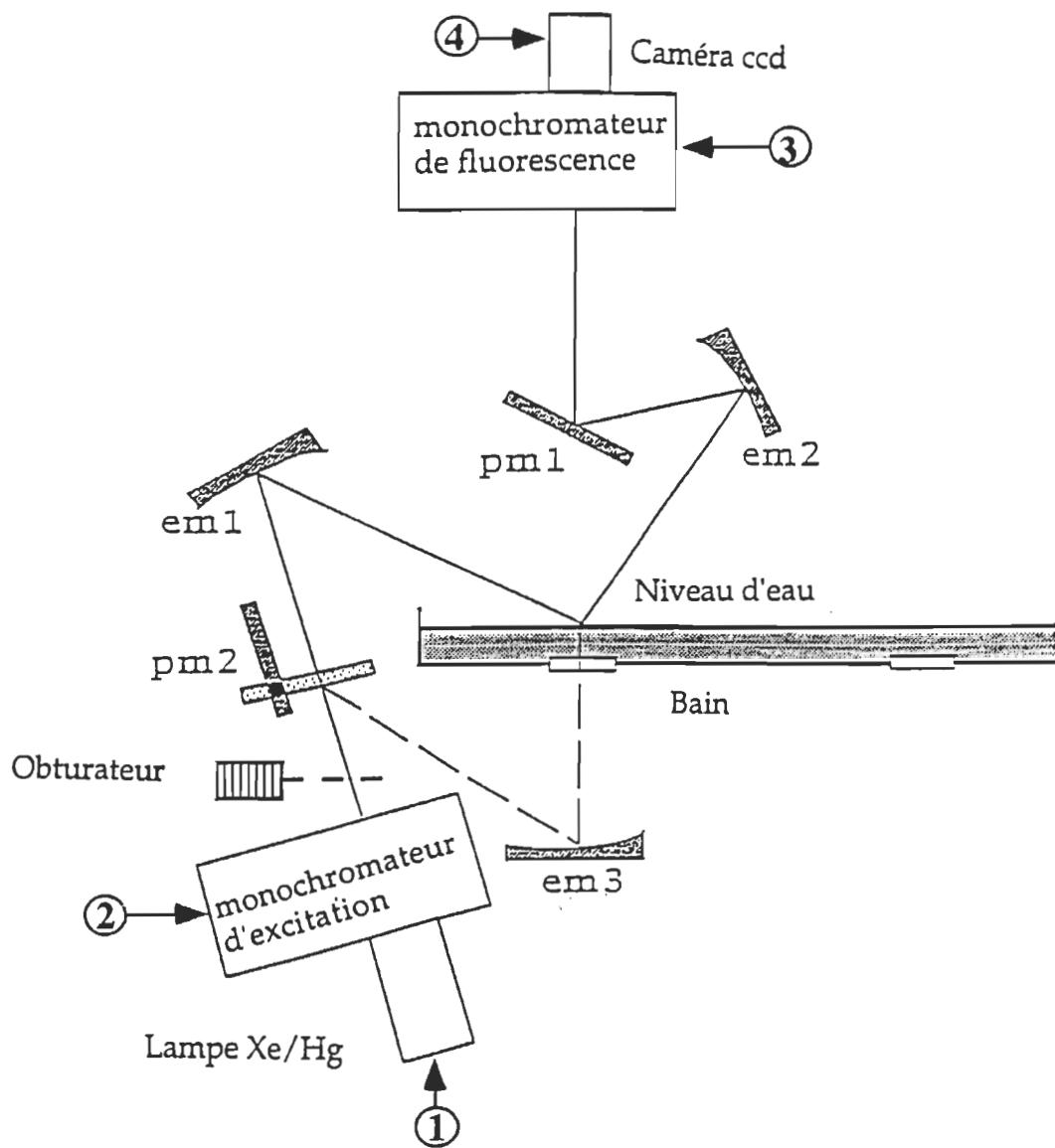
Figure 12. Représentation schématique du spectrophotomètre à l'interface air-eau. Les composantes et le principe de fonctionnement sont détaillés dans le texte.

Le faisceau de référence passe quant à lui par les miroirs plans 4 et 5 (pm 4 et pm 5) avant de traverser le compartiment de référence (ne contenant pas de monocouche) pour aboutir à la photodiode 2. C'est finalement la différence entre les signaux provenant des photodiodes 1 et 2 (ph 1 et ph 2) qui, après filtration et amplification, permet d'obtenir l'absorbance d'une seule couche de molécules à l'interface air-eau.

3.2.3 Le spectrofluorimètre à l'interface air-eau

Un schéma du parcours optique du spectrofluorimètre à l'interface air-eau est présenté à la Fig. 13. La lumière d'excitation provenant d'une lampe au xénon/mercure (1) entre dans le monochromateur d'excitation (2). À sa sortie, le faisceau d'excitation peut prendre l'un des deux parcours suivants: a) Il peut être réfléchi sur le miroir plan 2 (pm 2), puis être focalisé sur l'interface air-eau grâce au miroir ellipsoïdal 3 (em 3). C'est le mode d'excitation dit *par transmission*, puisque le faisceau incident doit traverser la sous-phase avant d'exciter les molécules du film. b) Alternativement, il peut continuer son parcours jusqu'au miroir ellipsoïdal 1 (em 1) et être focalisé par ce dernier à l'interface air-eau. Ce mode d'excitation est dit *par incidence oblique*.

Dans la plupart des applications, le résultat final de ces deux modes d'excitation est sensiblement le même. Aussi, avons nous opté pour le mode par incidence oblique pour toutes nos expériences de fluorescence à l'interface air-eau.



pm: miroir plan

em: miroir ellipsoïdal

Figure 13. Représentation schématique du spectrofluorimètre à l'interface air-eau. L'identification des composantes ainsi que le principe de fonctionnement sont détaillés dans le texte.

Une fois excitées, les molécules fluorescentes du film vont émettre des radiations selon un mode que nous pouvons, à toutes fins pratiques, considérer comme isotrope. Le miroir ellipsoïdal 2 (em 2) captera donc une partie de cette fluorescence et la focalisera sur le miroir plan 1 (pm 1). De là, cette radiation sera acheminée au monochromateur d'émission (3), puis finalement à la caméra CCD (4) où elle sera détectée. Cette dernière permet notamment d'obtenir un spectre complet (plage de 200 nm) de haute qualité en quelques secondes seulement.

Pour les expériences de quenching de fluorescence à l'interface air-eau, l'utilisation d'un masque de restriction s'avérait nécessaire (Fig. 14). En effet, le volume de sous-phase contenue dans le bain (environ 3,5 l) nécessiterait une quantité impressionnante de KI afin d'atteindre des concentrations supérieures à 1 M, rendant ainsi inutilement l'expérience très coûteuse. Le masque rond fait de céramique (matériel hydrophile facilitant l'entrée de la monocouche à l'intérieur du masque) est d'un diamètre interne de 7,5 cm et possède une ouverture de 3,0 cm sur le côté. Cette ouverture peut être fermée à l'aide d'une barrière de Teflon (Fig. 14) s'engageant dans des glissières prévues à cet effet le long de l'ouverture.

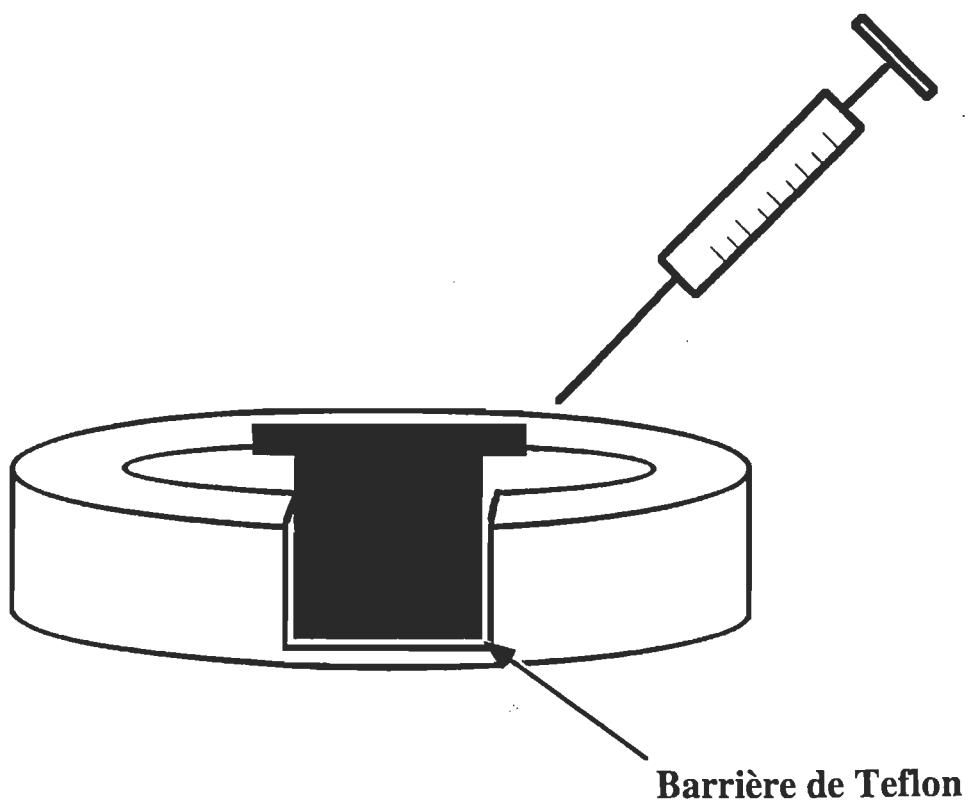


Figure 14. Schéma du masque de restriction utilisé lors des expériences de quenching de fluorescence à l'interface air-eau (les glissières dans lesquelles s'engage la barrière de Teflon ne sont pas montrées).

3.2.4 Le réflectomètre à rayons-X

Les expériences de réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau ont été réalisées au cours d'un stage dans le laboratoire du Dr David Vaknin au Ames National Laboratory (Iowa, U.S.A.).

Tel que montré par le schéma de la Fig. 15, le bain de monocouche est au cœur du réflectomètre à rayons-X. Ne figurant pas sur ce schéma se trouve le générateur de rayons-X de type anode rotative d'où provient le faisceau incident (à l'extrême gauche de la Fig. 15). Ce dernier entre dans le monochromateur et en ressort avec une longueur d'onde de 1,54 Å. Le faisceau incident poursuit son chemin à travers des fentes ajustables (S₁ et S₂), passant également par un atténuateur d'intensité pour se rendre à la surface du bain avec un angle d'incidence rasant.

Il est important de noter que l'intensité du faisceau incident de rayons-X est continuellement enregistrée en temps réel. De cette manière, l'intensité du faisceau réfléchi est normalisée par rapport à l'intensité du faisceau incident de façon à contrecarrer les possibles fluctuations du générateur de rayons-X. Les rayons-X réfléchis à l'interface air-eau passent quant à eux à travers d'autres fentes ajustables (S₃ et S₄) avant d'atteindre le détecteur d'intensité à l'autre extrémité de l'appareil.

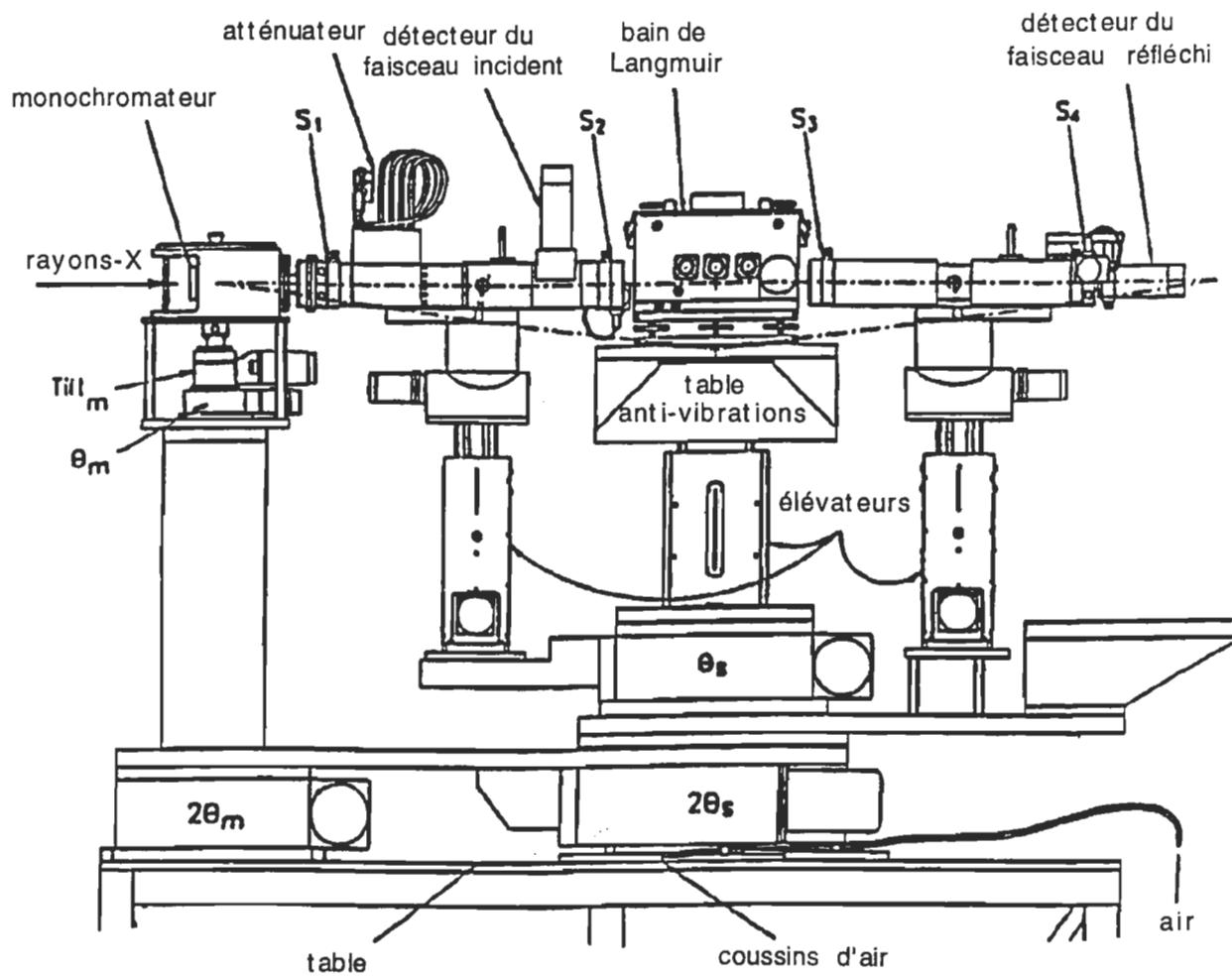


Figure 15. Schéma du réflectomètre à rayons-X à l'interface air-eau. Le bain de monocouche est situé en haut au centre de la figure.

Il est important d'ajouter que le bain de monocouche ainsi que les bras incident et de détection de l'appareil sont montés sur un système d'élévateurs permettant une translation de ces éléments le long de l'axe des "z" (soit du haut vers le bas). Ce déplacement est contrôlé par ordinateur et permet de faire varier θ , l'angle d'incidence des rayons-X ($\theta = \alpha$; voir la section 2.5 pour de plus amples renseignements quant aux implications de ce changement de l'angle θ).

Notons également que l'ensemble des éléments de l'appareil (monochromateur, bras d'incidence et de détection, bain de monocouche) sont montés sur des fixations permettant une légère rotation dans les plans parallèle (θ_m , θ_s , $2\theta_m$, $2\theta_s$) et perpendiculaire ($Tilt_m$) à l'interface air-eau. Finalement, tous ces éléments sont à l'abri des oscillations mécaniques grâce à l'utilisation d'une table anti-vibration.

3.2.5 Le montage FTIR-ATR

Les expériences en FTIR-ATR ont été faites au cours d'un stage dans le laboratoire du Dr Michel Pézolet à l'Université Laval (Québec).

Un schéma simplifié du montage FTIR-ATR est présenté à la Fig.16. Les lamelles de germanium recouvertes des échantillons de M.P. sont d'abord fixées sur le montage FTIR-ATR avant d'être introduites dans le spectrophotomètre.

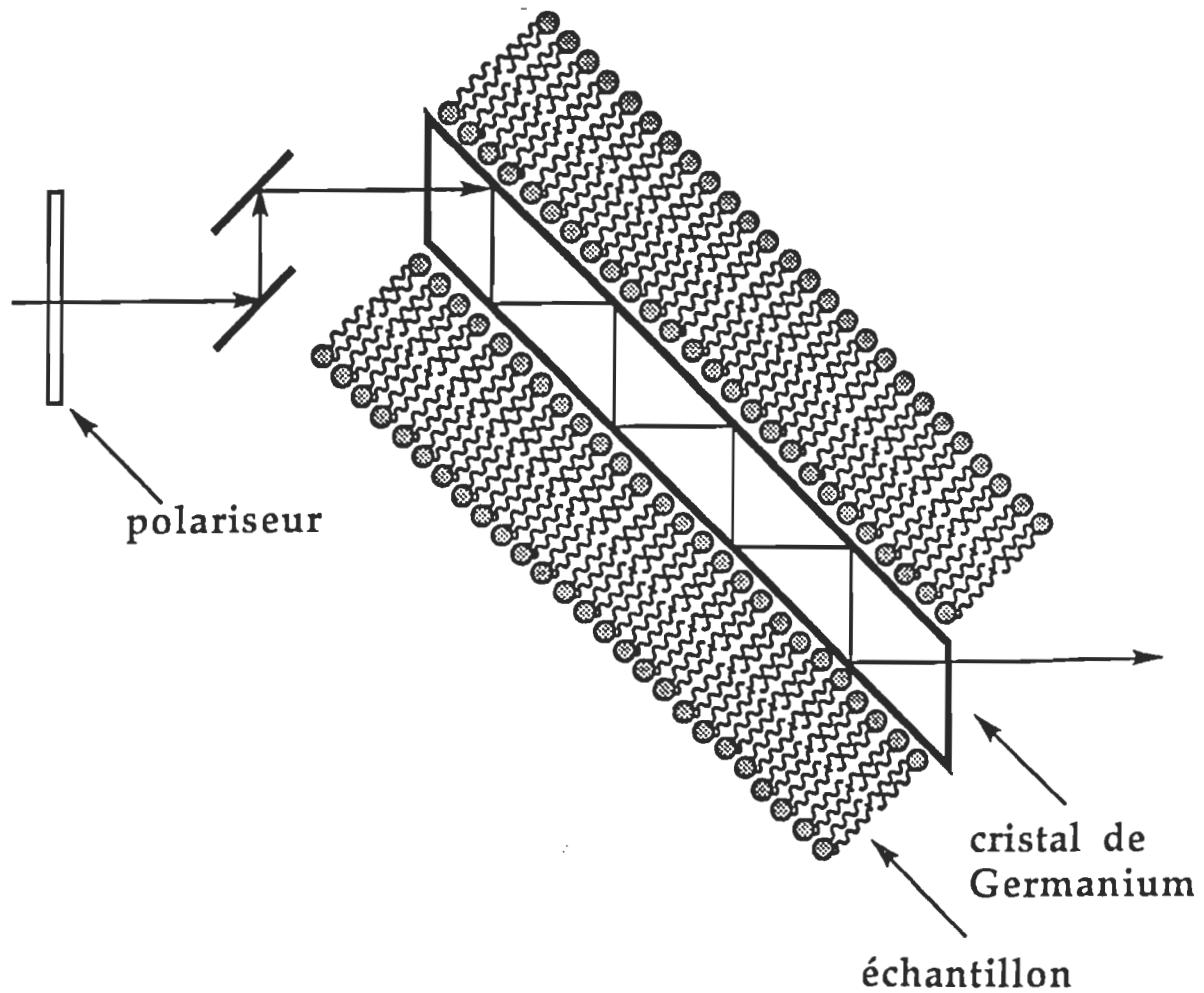


Figure 16. Représentation simplifiée du montage FTIR-ATR. Le principe de fonctionnement du montage est détaillé dans le texte.

Un faisceau laser provenant du spectrophotomètre (Nicolet modèle Magna 550) traverse premièrement un polariseur, la radiation prenant ainsi une polarisation parallèle ou perpendiculaire au plan du cristal de germanium. À la sortie du polariseur, la lumière incidente est dirigée par un jeu de miroirs plans jusqu'au cristal de germanium. Elle pénètre à angle droit à une extrémité biseautée (45° par rapport au plan du cristal) du cristal et y subit 23 réflexions totales internes. La radiation infrarouge émergeant finalement à l'autre extrémité du cristal est dirigée par des miroirs plans jusqu'au détecteur du spectrophotomètre. L'acquisition et le traitement initial des données ainsi que le changement d'axe du polariseur sont contrôlés par ordinateur via le logiciel d'acquisition Omnic (Nicolet).

CHAPITRE 4

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Dans cette section, nous expliciterons dans un premier temps les méthodes générales de préparation des échantillons de M.P. en vue des différentes expériences effectuées. Nous ferons notamment référence à la procédure utilisée pour isoler, purifier et conserver les M.P. Nous parlerons ensuite des méthodes utilisées pour déterminer la concentration en bR ainsi que pour son marquage avec une sonde fluorescente. Dans un deuxième temps, nous parcourerons l'ensemble des détails expérimentaux associés à chacune des méthodes utilisées, soit les isothermes de pression et de potentiel de surface, la spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau, les mesures de quenching de fluorescence en suspension et à l'interface air-eau, la reflectivité des rayons-X à l'interface air-eau, la spectroscopie FTIR-ATR, les cycles CDR et la microscopie de fluorescence. Notons seulement que toutes les expériences effectuées dans le cadre de ce travail ont été réalisées à température et pression atmosphérique normale.

4.1 Préparation des échantillons

4.1.1 Isolation, purification et conservation des M.P.

Les M.P. ont été isolées et purifiées selon la méthode de Kates *et al.*

(1982) dans le laboratoire du professeur François Boucher. Les fragments de M.P. obtenus selon cette méthode de purification ont un diamètre moyen de 0.5 - 1.0 μm . Ces fragments de M.P. ont ensuite été suspendus dans le milieu de conservation contenant 4.3 M de NaCl, 27 mM de KCl et 81 mM de MgSO₄.7H₂O et conservés à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation. Avant d'être utilisé, un aliquot approprié de cette suspension de M.P. était lavé 3 fois par centrifugation (17 500 g) et resuspendu dans de l'eau déionisée. La concentration en bR de cette suspension était ensuite ajustée à 10⁻⁵ M par spectroscopie d'absorption, tel que décrit à la section suivante. Toutes les expériences dans le cadre de ce travail ont été faites à partir de telles suspensions de M.P.

4.1.2 Détermination de la concentration en bR

L'un des objectifs de ce travail étant de déterminer l'aire moléculaire de la bR via les isothermes de pression de surface, il était impératif, dans un premier temps, de déterminer le plus précisément possible la concentration en bR dans la solution d'étalement. Nous avons, pour ce faire, utilisé la spectroscopie d'absorption UV-visible. Après avoir adapté les bR à la lumière (voir section 4.2.3) et connaissant le coefficient d'extinction molaire de la bR à 568 nm ($\epsilon = 58\,000\,1\,\text{mole}^{-1}\,\text{cm}^{-1}$), on en déduit la concentration (mole l⁻¹) selon la relation de Beer-Lambert suite à la mesure du spectre d'absorption,

$$A = \epsilon bc \quad (17)$$

où A est l'absorbance à 568 nm, ϵ est le coefficient d'extinction molaire ($1 \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b est le parcours optique (cm) et c est la concentration (mole l^{-1}).

4.1.3 Marquage de la bR avec le FITC

Afin de déterminer l'orientation de la bR à l'interface air-eau, nous avons choisi la méthode de quenching de fluorescence. Or, cette méthode requiert que les bR soient marquées soit sur leur face cytoplasmique ou sur leur côté extracellulaire (voir section 2.4). Nous avons utilisé la méthode de marquage de Heberle et Dencher (1992) où un groupement fluorescent, la fluorescéine isothiocyanate (FITC, Molecular Probes), est lié sur un seul acide aminé de la face extracellulaire de la protéine, la lysine 129. Heberle et Dencher (1992) ont démontré grâce aux techniques de clivage enzymatique, d'électrophorèse SDS-PAGE, de fluorescence et de séquençage que seule la lysine 129 de la bR était marquée. Il s'agit en effet de la seule lysine comportant un groupement amine libre qui est accessible au milieu aqueux (voir Fig. 7). La façon de procéder au marquage est la suivante:

On débute par une centrifugation d'une suspension de M.P. à 17 500 g pendant 15 min. (Sorvall, rotor S-34) et on resuspend le culot dans le tampon A dépourvu de NaCl. La concentration en bR de cette nouvelle suspension est ensuite déterminée par spectroscopie d'absorption puis ajustée à 10^{-5} M . On mélange ensuite le FITC avec la suspension de M.P. dans des proportions molaires de 100:1 (FITC:bR). On protège ce mélange de la lumière et on l'agitte légèrement pendant 6 heures à la température de la

pièce. De façon à se débarrasser du FITC libre (ne s'étant pas lié à la bR), on fait 3 lavages successifs par centrifugation/resuspension (15 min. à 17 500g) dans le tampon A (sans NaCl), puis on entrepose cette suspension à l'abri de la lumière pendant toute la nuit à 4°C. On refait à nouveau 3 autres lavages par centrifugation/resuspension (17 500g) dans une solution contenant 150 mM de KCl (de manière à se débarrasser du FITC pouvant avoir établi une interaction électrostatique faible avec les M.P.). Le culot résultant est finalement resuspendu dans le tampon A (avec NaCl). La détermination subséquente du rapport de marquage (nombre de FITC/bR) implique, dans un premier temps, l'adaptation des bR à la lumière grâce à une lampe de 300 W (lumière blanche) et d'un filtre IR (afin d'éviter toute détérioration thermique de l'échantillon). Cette adaptation de la bR à la lumière permet de déplacer son λ_{max} de 560 (obscurité) à 568 nm (lumière), éloignant ainsi la bande d'absorption de la protéine de celle du FITC (495 nm) en minimisant le chevauchement de leur bande d'absorption. On illumine ainsi l'échantillon pendant 1 min, puis on prend un spectre d'absorption UV-visible (Pye-Unicam) sur une plage de 800 à 400 nm et on note les absorbances à 568 (bR) et 495 nm (FITC). Le calcul du rapport de marquage se fait ensuite par la méthode décrite à la section suivante. Les M.P.-FITC sont finalement entreposées dans le tampon de conservation.

4.1.4 Calcul du rapport de marquage FITC:bR

Étant donné le chevauchement des bandes d'absorption de la bR (568 nm) et du FITC (495 nm), il était nécessaire, dans un premier temps, de vérifier s'il y avait contribution de l'absorbance d'une espèce au maximum

d'absorbance de l'autre espèce (Fig. 17). On entreprit donc la démarche suivante inspirée de l'article de Baribeau et Boucher (1984): On mit un aliquot de M.P.-FITC dans le tampon A en présence de 5% (p:p) d'ammonyx LO, de manière à obtenir une concentration finale en bR d'environ 5×10^{-6} M. Cet échantillon fut incubé toute la nuit à 4°C en le protégeant contre la lumière et en l'agitant légèrement. On prit finalement un spectre d'absorption de cette solution de 800 à 325 nm. Le spectre résultant (Fig.18) montre que l'absorbance à 568 nm est très faible; soit moins de 13 % de la valeur d'absorbance avant la dénaturation à l'ammonyx LO (comparer avec la Fig. 17). Cette valeur d'absorbance résiduelle est probablement due à la bR (Baribeau et Boucher, 1984). La bande d'absorption du FITC étant maintenant entièrement dévoilée grâce à l'affaissement de la bande de la bR, on voit maintenant que le FITC ne contribue nullement à l'absorbance de la bR à 568 nm. De même, la très faible diminution d'absorbance de la bande du FITC en présence d'ammonyx LO (comparer avec la Fig. 17) indique que la contribution mutuelle d'absorbance du FITC et de la bR au λ_{max} de l'autre espèce était minimale. Le calcul du rapport de marquage pouvait donc s'effectuer directement à partir du spectre des M.P.-FITC en comparant le rapport des absorbances maximales (à 495 et 568 nm) et en connaissant les coefficients d'extinction molaires du FITC et de la bR de la manière suivante:

$$\text{Rapport de marquage (FITC:bR)} = (A_{495}/A_{568}) \times (\epsilon_{\text{bR}}/\epsilon_{\text{FITC}}) \quad (18)$$

Les rapports de marquage ainsi obtenus pour les M.P.-FITC ont toujours été supérieurs à 0,9, comme noté par Heberle et Dencher (1992).

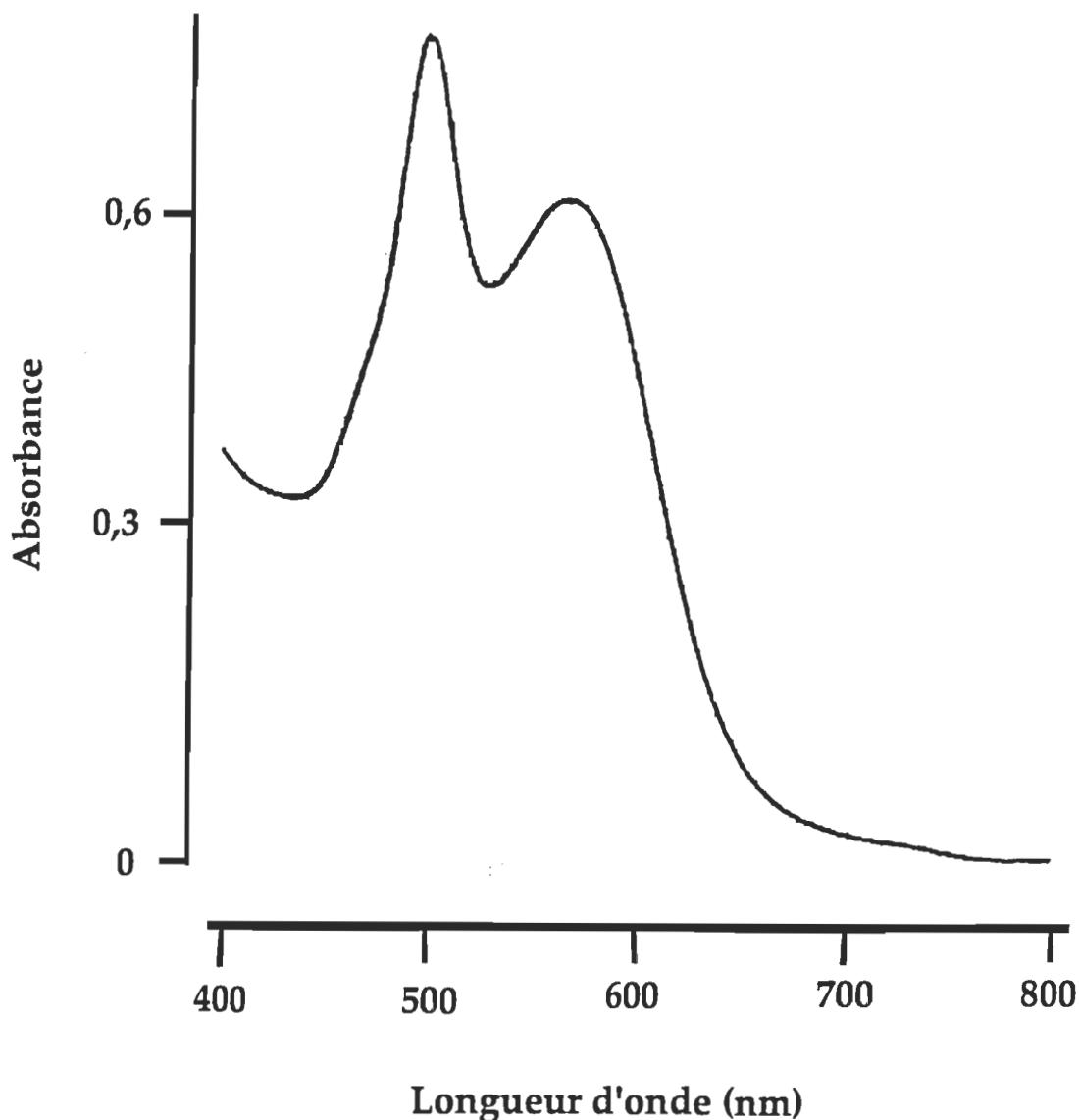


Figure 17. Spectre d'absorption d'une suspension de M.P.-FITC dans le tampon A. La bande centrée à 495 nm est due à l'absorption du FITC alors que la bande centrée à environ 568 nm est celle de la bR. Le chevauchement des bandes d'absorption nécessita des mesures supplémentaires afin de déterminer la contribution respective de l'absorbance de chacune des espèces à 495 et 568 nm.

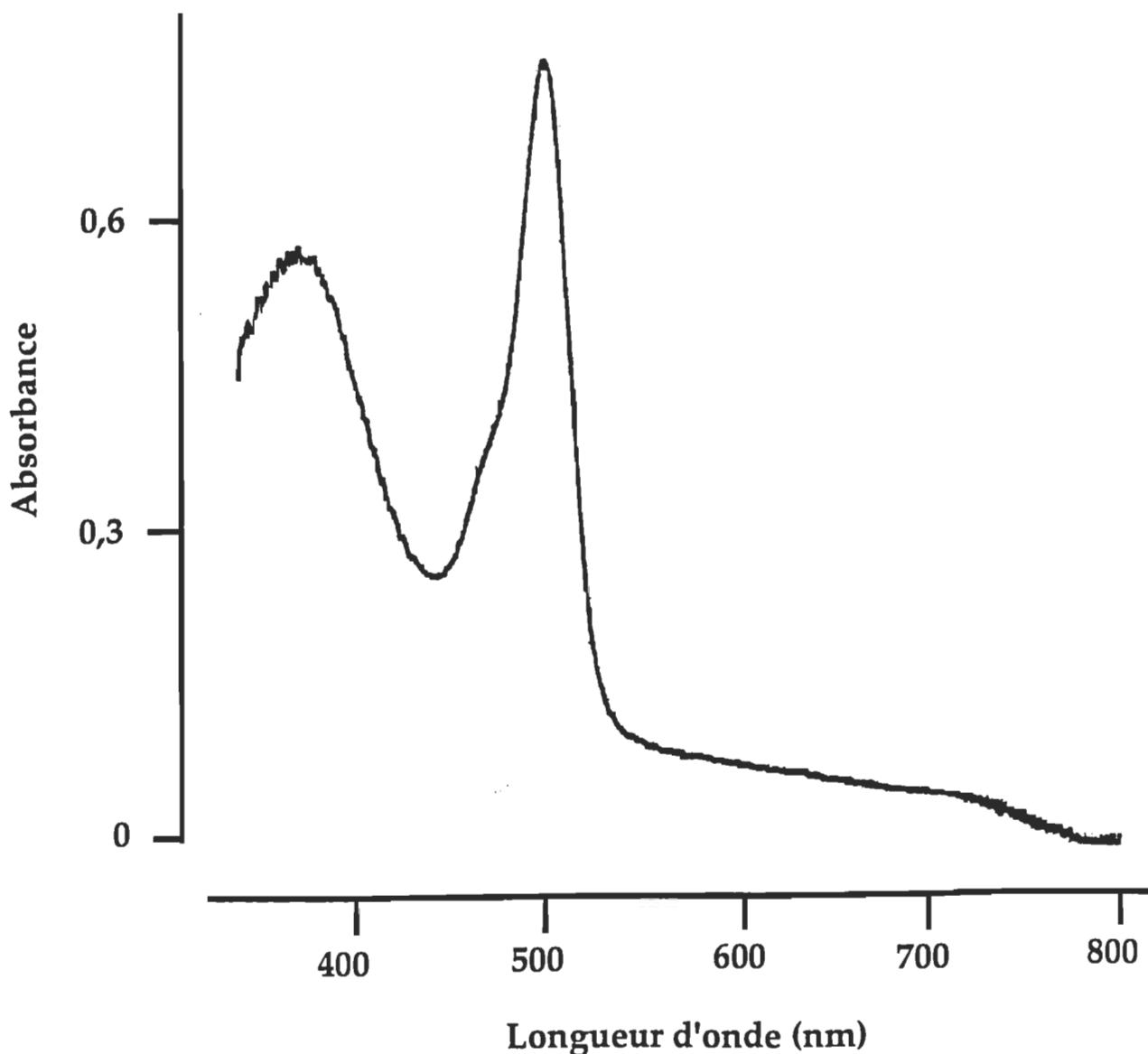


Figure 18. Spectre d'absorption d'une suspension de M.P. incubée pendant une nuit en présence de 5% (p:p) d'ammonyx LO. La bR étant dénaturée par le détergent, seule la bande d'absorption du FITC (495 nm) demeure. En comparant ce spectre à celui de la Fig. 17, on voit que la contribution d'absorbance de chacune des espèces est négligeable au λ_{max} de l'autre espèce (la valeur de l'absorbance du FITC à 495 nm est presqu'identique avant et après dénaturation de la bR alors qu'elle est nulle à 568 nm).

4.2 Mesures expérimentales

4.2.1 Calibration du système de détection de la pression de surface

Le principe de cette calibration étant expliqué en détail dans l'ouvrage de Gaines (1966), nous ne mentionnons ici que l'essentiel de la méthode. Premièrement, une monocouche d'un des acides gras mentionnés à la section 3.1.6 est préparée à l'interface air-eau du bain à calibrer. Le nombre de molécules étalées de l'acide gras en question est calculé et mis en relation avec les dimensions du bain de telle sorte qu'avant compression, aucune pression de surface ne puisse être détectée (pour ces acides gras, une aire moléculaire avant compression de $30 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ est normalement utilisée). Ce nombre doit cependant être suffisant pour qu'une légère compression des molécules à l'aide de la barrière mobile amène ces dernières en contact les unes avec les autres et donne ainsi lieu à une pression de surface détectable (on dit alors d'une telle monocouche qu'elle est au "lift-off", (Fig. 19, point A)). Cette monocouche est ensuite comprimée à une vitesse de 2 à 5 $\text{\AA}^2/\text{molécule}.\text{min.}$ jusqu'au "collapse" (Fig. 19, point C) du film (pour une monocouche d'acide gras, le "collapse" constitue la région de l'isotherme où se produit une importante inflexion de la courbe; notamment, une réduction additionnelle de l'aire moléculaire par la barrière mobile entraîne un effondrement de la structure monomoléculaire ordonnée et une chute importante dans la pression de surface détectée).

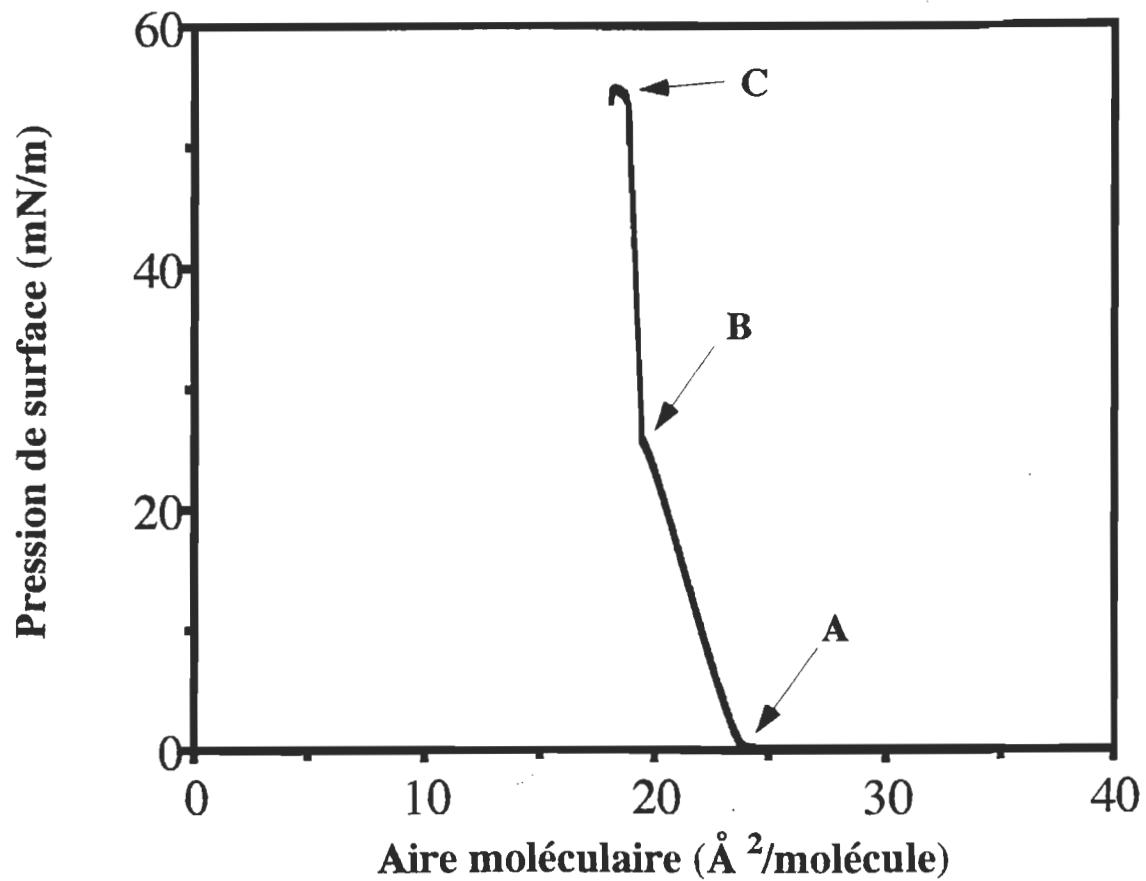


Figure 19. Isotherme de pression de surface de l'acide arachidique. Cette isotherme comprend trois régions: celle du "lift-off" (A), celle de la transition de phase (B) et finalement, celle du collapse (C). La transition de phase d'un état liquide expansé à solide condensé de cet acide gras donne lieu à un changement abrupt dans la compressibilité du film (point B). Cette transition physique s'opère à une pression de surface très bien caractérisée pour une telle compression isotherme. On se sert alors de cet événement pour calibrer le système de détection de la pression de surface des bains de monocouche.

Lors de cette compression isotherme, des changements dans l'état physique des molécules d'acide gras vont s'effectuer (transition liquide expansé à solide condensé), ce qui donnera lieu à un changement net et abrupt dans la pente de la courbe de l'isotherme (Fig. 19, point B) à une pression de surface qui est caractéristique de l'acide gras en question. Cette transition de phase étant très bien caractérisée pour les acides gras, nous nous sommes servis de cet événement pour calibrer les détecteurs de pression de surface. L'isotherme d'acide arachidique présentée à la Fig. 19 montre une telle transition (point B) à une pression de surface de 25,7 mN/m.

4.2.2 Isothermes de pression et de potentiel de surface

L'isotherme de pression de surface est un outil qui permet de dégager certaines informations sur les interactions intermoléculaires (aire moléculaire, compressibilité, "collapse"), la structure et l'organisation de molécules amphiphiles à l'interface air-eau. Cette technique est aujourd'hui utilisée dans de nombreux laboratoires à travers le monde pour caractériser les propriétés interfaciales d'acides gras, de lipides, de polypeptides et de protéines en plus d'une vaste gamme de polymères. Tel que mentionné à la section 1.3.1, Hwang *et al.* (1977) furent les premiers chercheurs à appliquer cette technique à l'étude des M.P. Cependant, comme nous l'avons vu à la section 1.3.2, leur méthode de préparation des échantillons et de formation des films de M.P. à l'interface air-eau occasionne une certaine dénaturation de la bR et une délipidation partielle des M.P. (Figs. 8 et 9). Nous avons donc repris ces mesures avec nos propres conditions expérimentales. L'isotherme de potentiel de surface sert quant à lui à recueillir des

informations sur les propriétés électrostatiques des films à l'interface air-eau. Hwang *et al.* (1977) furent également les premiers à appliquer cette technique à l'étude des M.P., mais pour les raisons ci-haut mentionnées, nous avons également repris cette étude. Les isothermes de pression et de potentiel de surface ont été faites sur le tampon A ou sur un autre tampon ayant la même composition que le tampon A à l'exception près qu'il contient 4 M de NaCl. Notons que ces isothermes de pression et de potentiel de surface ont été mesurées avec un bain de Langmuir muni d'une plaque de Wilhelmy comme système de détection de la pression de surface et d'une électrode ionisante (^{241}Am) pour la mesure du potentiel de surface (voir Fig. 11). La façon de préparer un film de M.P. à l'interface air-eau est très simple: il s'agit d'étaler goutte à goutte (goutte de très petite dimension étant déposée dès son apparition à l'extrémité de l'aiguille, de façon à minimiser les pertes de M.P. dans la sous-phase) un volume approprié d'une suspension de M.P. (dans l'eau déminéralisée, $[\text{bR}] = 10^{-5}$ M) à l'interface à l'aide d'une seringue en prenant soin de couvrir un maximum de surface avec le volume à étaler. Cette dernière précaution permet l'obtention d'un film plus homogène tout en minimisant les pertes de M.P. dans la sous-phase au moment de l'étalement (nous avons en effet constaté qu'en étalant les M.P. au même endroit, les aires moléculaires s'en trouvaient réduites). On doit de plus observer un temps d'attente de 50 min. entre la fin de la déposition et le début de la compression, ceci dans le but de laisser les M.P. se distribuer avec la plus grande homogénéité possible à l'interface (voir section 5.1 à ce sujet). Connaissant le nombre de molécules de bR étalées à l'interface air-eau (la concentration en bR de la solution à étaler ayant été préalablement déterminée par spectroscopie d'absorption, voir section 4.1.2) ainsi que la

surface du bain de monocouche en tout point lors de la compression, on en déduit alors l'aire disponible par molécule de bR (on parlera simplement d'aire moléculaire, exprimée en $\text{\AA}^2/\text{molécule}$). La compression du film de M.P. se fait à une vitesse de $68 \text{ \AA}^2/\text{molécule min}$ jusqu'à une pression de surface donnée, clairement au-dessus du collapse (46 mN/m). Le temps moyen requis pour faire une compression complète est d'un peu moins de 20 minutes. Notons que les opérations mécaniques ainsi que l'acquisition des données sont faites à l'aide d'un microordinateur. Ainsi, les données de pression et de potentiel de surface sont enregistrées simultanément en fonction de la réduction de l'aire moléculaire grâce à l'utilisation de deux canaux d'acquisition indépendants.

4.2.3 Spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau

Toute caractérisation des propriétés structurales des films de M.P. dans l'optique de les utiliser en bioélectronique pourrait s'avérer inutile si la bR perdait ses propriétés photoactives dans l'environnement de l'interface air-eau. C'est pourquoi, avant d'entreprendre l'étude structurale des films de M.P., nous nous sommes penchés sur l'activité de la protéine dans ce milieu.

La spectroscopie d'absorption constitue un moyen simple et efficace pour s'assurer que l'intégrité fonctionnelle de la bR est préservée à l'interface air-eau. Nous pouvons en effet suivre ainsi la photoisomérisation du rétinal, lequel passe de la conformation 13-cis à la conformation tout-trans suite à l'absorption d'un photon. Cette photoisomérisation constitue une des toutes premières étapes du photocycle de la bR (Fig. 3) menant

éventuellement au pompage d'un proton du côté cytoplasmique vers le côté extracellulaire de la membrane (voir section 1.1.1). Cette photoisomérisation du rétinal suite à l'adaptation de la bR à la lumière peut être suivie par spectroscopie d'absorption en raison des différentes longueurs d'ondes d'absorption des états adapté à l'obscurité (560 nm) et adapté à la lumière (570 nm) (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971).

Les conditions expérimentales de formation et de compression du film de M.P. sont les mêmes que lors de la mesure des isothermes de pression et de potentiel de surface (section 4.2.2). Notons que toutes les opérations ultérieures à l'étalement ont été effectuées à l'obscurité complète de façon à maintenir les bR dans un état adapté à l'obscurité. Le film fut ensuite comprimé jusqu'à une pression latérale de 5 mN/m et maintenu ainsi pendant 10 min à des fins de stabilisation. Un spectre d'absorption de 400 à 700 nm (lecture à tous les 1 nm, 1 sec d'intégration par lecture) fut ensuite pris dans ces conditions. Le film de M.P. fut ensuite irradié à l'aide d'une lumière blanche pendant 30 min de manière à convertir les bR à des conditions d'adaptation à la lumière. Un autre spectre d'absorption fut pris immédiatement après cette irradiation avec les mêmes paramètres instrumentaux qu'en adaptation à l'obscurité. De plus, nous avons pris des spectres d'absorption à l'interface air-eau d'un film de M.P. (adapté à l'obscurité) à des pressions de surface allant de 5 à 30 mN/m.

4.2.4 Quenching de fluorescence; cas en suspension et à l'interface air-eau

Tel que nous l'avons mentionné à la section 1.1.1, la bR possède la capacité de pomper des H^+ du côté cytoplasmique vers le côté extracellulaire de la membrane. L'utilisation éventuelle de la bR à des fins bioélectroniques impliquera donc de pouvoir tirer le meilleur profit possible de ce déplacement unidirectionnel de charges en orientant un maximum de bR dans la même direction. Hwang *et al.* (1977) furent les premiers à s'attarder à l'orientation des bR à l'interface air-eau. La méthode utilisée par ces auteurs pour déterminer l'orientation de la protéine dans des films monomoléculaires de M.P. est celle du cryodécapage. Cette technique consiste à briser le film de M.P. dans le plan de la membrane, séparant ainsi les deux feuillets lipidiques de la bicouche.

Selon Hwang *et al.* (1977), on peut alors discerner entre les côtés cytoplasmique et extracellulaire des M.P. en raison de l'apparence différente qu'ont ces portions membranaires lorsqu'observées au microscope électronique. La portion extracellulaire des M.P. a une apparence lisse alors que la portion cytoplasmique démontre une surface rugueuse (Fig. 20). Par calcul du rapport des surfaces couvertes par chacune de ces portions membranaires, Hwang *et al.* (1977) ont déterminé que plus de 85% des fragments de M.P. ont leur côté cytoplasmique orienté vers la phase aqueuse.

Cette méthode comporte cependant deux faiblesses majeures: d'une part, elle nécessite un transfert du film de M.P. vers un support solide (feuille de mica). Comme tout type de transfert de films monomoléculaires, la possibilité de perturber le système est réelle et il est difficile d'en connaître l'ampleur à moins de pouvoir comparer avec un système *in situ*.

D'autre part, le calcul de l'orientation des M.P. est plutôt indirect et ambigu, faisant intervenir une estimation de la surface relative recouverte par une surface lisse (partie extracellulaire) et une surface rugueuse (partie cytoplasmique). La méthode de quenching de fluorescence possède par contre l'avantage de pouvoir déterminer l'orientation de la bR directement à l'interface air-eau et d'offrir une méthode plus directe du calcul d'orientation (voir section 2.4).

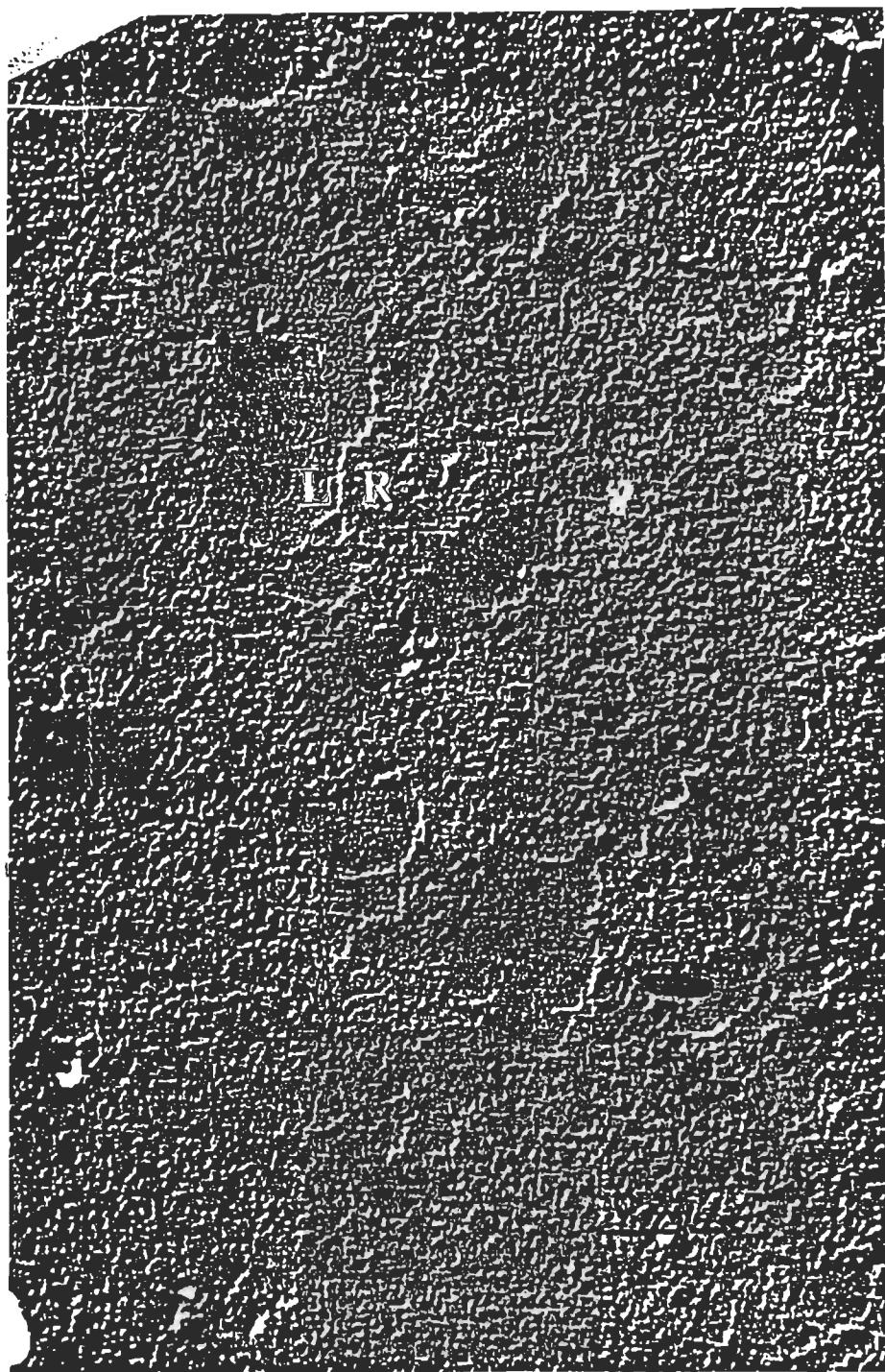


Figure 20. Cryodécapage de la portion à l'interface film-air d'une monocouche de bR/PC de soya d'un rapport 7:1 (p:p) tel qu'observé par microscopie électronique (tirée de Hwang *et al.*, 1977). Le calcul du rapport de la surface occupée par les régions d'aspect rugueux (R; associées au côté cytoplasmique de la M.P.) par rapport à celle occupée par les régions d'aspect lisse (L; côté extracellulaire) est de 85%.

Pour les mesures de quenching de fluorescence en suspension, 2 ml d'une suspension de M.P.-FITC ($[bR] = 10^{-5}$ M) étaient placés dans une cuvette de fluorescence qui est introduite dans le spectrofluorimètre. Les spectres de fluorescence de cette suspension furent pris dans les conditions suivantes:

Longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) = 475 nm

Longueur d'onde du maximum d'émission = 520 nm

Plage des longueurs d'onde balayées = 500 à 600 nm, lecture à tous les 1 nm

Temps d'intégration = 1 sec

Il convient de noter que la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) du FITC se situe à 495 et non à 475 nm. Nous avons utilisé une λ_{ex} de 475 nm tant en suspension qu'à l'interface air-eau en raison de la proximité spectrale de la bande de fluorescence (520 nm). Ceci permet de minimiser la quantité de lumière parasite à 520 nm provenant de la lampe, problème qui revêt une grande importance, particulièrement lors des mesures en monocouche où les intensités de fluorescence sont très faibles. On prit donc un premier spectre de fluorescence de cette suspension en absence de quencher et on ajouta progressivement 1 mL d'une solution de 6M de KI à raison de 100 μ L par addition, un spectre étant pris après chacun de ces ajouts. L'ajout d'un certain volume de solution de KI dans la cellule entraîne un effet de dilution des M.P.-FITC et nous avons dû apporter un facteur de correction aux intensités de fluorescence observées. Le tableau 2 résume la situation. Une fois ces corrections apportées, on construit un graphique de Stern-Volmer modifié (voir section 2.4).

Tableau 2

Conditions expérimentales et facteurs de dilution calculés pour les mesures de quenching de fluorescence en suspension.

Vol. total (mL)	Vol. de KI ajouté (µL)	[KI] (M)	Facteur de dilution
2,5	0	0	1
2,6	100	0,23	1,04
2,7	200	0,44	1,08
2,8	300	0,64	1,12
2,9	400	0,83	1,16
3,0	500	1,00	1,20
3,1	600	1,16	1,24
3,2	700	1,31	1,28
3,3	800	1,45	1,32
3,4	900	1,59	1,36
3,5	1 000	1,71	1,40

Pour ce qui est des mesures de quenching à l'interface air-eau, les M.P.-FITC sont étalées à la surface de la même façon que lors de la mesure des isothermes de pression et de potentiel de surface. On respecte en outre les mêmes temps d'attente et de vitesse de compression. Les conditions instrumentales sont les suivantes:

Longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) = 475 nm

Longueur d'onde du maximum d'émission = 520 nm

Plage des longueurs d'onde balayées = 500 à 700 nm

Temps d'intégration = 10 sec

La particularité du bain de monocouche utilisé, outre la présence du spectrofluorimètre, est le masque de restriction (voir Fig. 14). Ce masque de céramique est placé à une extrémité du bain, près du flotteur de Langmuir et directement sous le faisceau d'excitation de l'appareil (Fig. 13). Il possède une ouverture de 30 mm permettant à la monocouche de M.P.-FITC de pénétrer à l'intérieur. Notons que les premières expériences de quenching de fluorescence à l'interface air-eau ont été effectuées à l'aide d'un masque de Teflon. L'impossibilité de faire pénétrer la monocouche de M.P.-FITC à l'intérieur de ce masque de Teflon à des pressions de surface de moins de 10 mN/m (tel que vérifié par l'absence de fluorescence) nous forcèrent à étaler les M.P.-FITC directement dans le masque de Teflon et d'enregistrer la pression de surface grâce à un système de Wilhelmy.

Nous avons ultérieurement opté pour un masque de céramique (décrit ci-dessus), lequel permettait une entrée immédiate des M.P.-FITC lors de la compression. Une fois le film de M.P.-FITC formé et comprimé à la pression de surface désirée, soit 20 mN/m, une porte de Teflon était descendue dans des glissières prévues à cet effet sur les côtés de l'ouverture du masque, emprisonnant ainsi la monocouche à l'intérieur (l'étanchéité de ce masque a été vérifiée au préalable en plaçant une solution concentrée de rhodamine B dans le masque entouré d'eau; aucune fuite n'a pu être détectée). Notons que la pression de surface de 20 mN/m fut choisie puisqu'elle constitue un point intermédiaire dans l'isotherme de pression de surface (voir Fig. 21) et se trouve dans la portion linéaire de cette isotherme.

Une fois le film de M.P.-FITC à l'intérieur du masque, l'expérience de quenching de fluorescence s'effectue de la même façon, indépendamment du mode d'étalement de la monocouche. Dans le cas où le film de M.P.-FITC fut comprimé à l'intérieur du masque, un spectre de fluorescence de la monocouche a été pris avant et après la fermeture du masque. Les spectres obtenus avaient des intensités de fluorescence presqu'identiques, ce qui nous permet de conclure que l'étape de fermeture du masque ne perturbe pas la monocouche.

L'étanchéité du masque de restriction empêche toute diffusion intérieur <-----> extérieur, créant ainsi un milieu de volume restreint (18 mL) où des concentrations croissantes de KI peuvent être obtenues par ajouts successifs d'une solution concentrée (5 M) dans la sous-phase. Cependant, comme l'optique de l'appareil est mise au point pour une hauteur bien

précise de la sous-phase (voir section 3.2.3), le volume de tampon dans le masque doit demeurer constant.

Ceci implique que tout ajout de solution de KI dans le masque doit être précédé du prélèvement d'un volume équivalent de sous-phase. Nous parlerons donc dorénavant de *volume d'échange* pour qualifier la quantité de solution prélevée et ajoutée dans le masque. Cette délicate opération s'est faite à l'aide d'une seringue de 1 mL insérée directement à travers le film. Aucun changement n'a pu être noté entre le spectre de fluorescence pris avant et après échange de 1 mL de sous-phase (sans KI), ce qui nous permet donc de conclure que cette opération ne perturbe pas le film de façon significative. Un temps d'attente de 10 min fut respecté entre l'échange de solutions et la prise de spectre de façon à ce que la concentration en KI soit homogène partout dans le masque. Notons à cet effet que la sous-phase du masque était légèrement agitée par une barre magnétique (1 x 1 x 5 mm; 60-100 rpm) durant cette période d'attente. Les concentrations en KI dans le masque après chaque échange ont été calculées selon la formule suivante:

$$C_f = C_m - (C_m - C_q)V_x/V_m \quad (19)$$

où,

C_f = concentration finale dans le masque

C_m = concentration dans le masque avant échange

C_q = concentration de la solution de KI

V_x = volume d'échange (1 mL)

V_m = volume du masque (18 mL)

Nous avons ensuite tracé un graphique de Stern-Volmer modifié (voir section 2.4) avec ces résultats en procédant de la même façon que dans le cas en suspension. Aucun facteur de correction n'était nécessaire cette fois-ci, les M.P.-FITC ne subissant pas d'effet de dilution.

4.2.5 Réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau

La réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau est une technique permettant d'obtenir des informations sur la structure des films. Elle permet notamment d'en mesurer *l'épaisseur* et la *rugosité*. Comme nous voulions nous assurer du caractère *monomoléculaire* des films de M.P. à l'interface air-eau, nous avons alors mesuré l'épaisseur de nos films à différentes pressions de surface grâce à cette technique et nous avons comparé les valeurs obtenues avec celles de la littérature (Henderson et Unwin, 1975; voir section 1.2.3) pour les dimensions de la protéine. Il devenait alors possible de statuer sur l'état mono-, bi- ou multimoléculaire de nos films. Les données de rugosité nous ont fourni quant à elles des renseignements sur l'organisation bidimensionnelle (dans le plan du film) des fragments de M.P.

En réflectivité des rayons-X, le paramètre de rugosité est un indice de la variabilité de l'épaisseur du film en différents endroits de sa surface. En d'autres termes, la rugosité est analogue à la topographie; elle permet d'indiquer la présence de "montagnes" et de "vallées" (à l'échelle moléculaire) dans le film à l'interface air-eau. Toujours dans cette perspective, notre quête vers une homogénéité structurale maximale des films de M.P. nous poussera alors à rechercher les conditions expérimentales

permettant l'obtention de films ayant l'aspect des grandes plaines de l'Ouest plutôt que celui des montagnes Rocheuses.

La première étape à suivre afin d'obtenir une courbe de réflectivité d'une monocouche est de faire la mesure avec le tampon seul. Ceci correspond en quelque sorte à "prendre le zéro"; il sera par la suite possible de normaliser la courbe de réflectivité en présence de la monocouche et de déterminer ainsi la contribution du film de M.P. seul.

La deuxième étape à suivre est de calculer "à la main" la densité électronique du tampon utilisé. Cette opération constitue en quelque sorte une étape de calibration. Il s'agit d'établir un lien entre la courbe de réflectivité obtenue et la densité électronique du milieu, ce qui permettra par la suite d'attribuer une densité électronique au film étudié en comparant avec les valeurs obtenues pour le tampon seul.

Bien que ceci constitue la règle de base pour attribuer une constante de calibration dans le programme servant à traiter les courbes de réflectivité, d'autres options sont également possibles. En outre, s'il est possible de calculer la densité électronique de la substance à étudier (i.e.: le film de M.P. dans notre cas), on peut également entrer cette valeur dans l'ordinateur. Ceci permet généralement d'obtenir une meilleure corrélation entre la courbe de réflectivité et le profil de densité électronique en apportant des restrictions à la gamme de densités électroniques possibles pour le film. Autrement dit, ceci permet de limiter le degré de liberté associé à ce paramètre.

Or, bien que le calcul de la densité électronique du tampon soit relativement simple en y allant composante par composante, ce genre d'analyse devient ardue dans le cas des M.P. Il faut en effet dénombrer, dans un premier temps, le nombre d'électrons dans chaque acide aminé de la protéine et en faire la somme. Ensuite, il faut faire un tel dénombrement pour ce qui est des lipides des M.P. Là, les choses se compliquent puisque bien que les M.P. ne contiennent qu'une faible proportion de lipides, soit environ 20-25% en poids (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971; Kushwaha *et al.*, 1975; voir tableau 1), ces derniers sont présents dans la M.P. dans une grande variété de structures et de composition, ce qui rend plus difficile le dénombrement un à un des électrons provenant des lipides des M.P.

Nous avons donc développé une méthode approximative pour le calcul de la densité électronique des M.P. mais qui possède l'avantage d'être à la fois très simple et rapide à utiliser. Cette méthode est basée sur le fait que les molécules constituant la M.P. (i.e.: la bR et les lipides) ne contiennent que des atomes légers, c'est-à-dire possédant une masse atomique égale ou inférieure à celle du calcium. Ces atomes possèdent tous (l'hydrogène mis à part) un nombre égal de protons, neutrons et électrons. On peut donc dire, en première approximation, que la masse totale de la bR et de ses lipides associés représente la sommation de "n" fois (masse d'un proton + masse d'un neutron + masse d'un électron), l'approximation venant du fait qu'on considère l'hydrogène comme étant du deutérium (i.e.: possédant un neutron, un proton et un électron). La M.P. étant constituée d'environ 75% de bR en poids (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971; Kushwaha *et al.*, 1975), le reste étant

des lipides, on peut ainsi en déduire le poids d'un trimère de bR et de ses lipides associés:

Poids moléculaire de la bR = 26 000 g/mole.

Trimère de bR = 78 000 g/mole = 75% du poids total

Poids total du trimère de bR + lipides = $78\ 000 / 0.75 = 104\ 000$ g/mole

Le nombre d'électrons présents dans un trimère peut alors être calculé de la façon suivante:

Masse d'un proton + neutron + électron = $3,348514 \times 10^{-24}$ g

Nombre d'électrons dans trimère + lipides = $(104\ 000 \text{ g/mole}) / (3,348514 \times 10^{-24} \text{ g}/(\text{électron} + \text{proton} + \text{neutron})) (6,023 \times 10^{23} \text{ molécules/mole})$
 $= 51\ 575$ électrons (...et le même nombre de protons et de neutrons).

Le calcul de la densité électronique nécessite également la connaissance du volume occupé par le trimère de bR et de ses lipides associés. Or, les travaux en diffraction électronique faits par Henderson et Unwin (1975) sur les M.P. leur permirent de calculer des dimensions de $63 \text{ \AA} \times 63 \text{ \AA}$ pour la maille cristalline du réseau de trimères (voir Fig. 5). Quant à l'épaisseur d'une M.P., ces derniers auteurs mentionnent 49 \AA comme étant la distance séparant des couches successives de M.P. (travaux faits en rayons-X avec des multicouches de M.P.). Cette distance comprend cependant une certaine contribution de l'eau d'hydratation inter-membranaire ainsi que des boucles extramembranaires reliant les hélices- α de la bR, soit une région membranaire de faible densité électronique. Ces mêmes auteurs donnent 40

Å comme étant la longueur des segments en hélice- α de la protéine, région de densité électronique maximale. Nous avons donc choisi de prendre 40 Å comme étant l'épaisseur d'une M.P. dans les calculs de densité électronique. La densité électronique des M.P. est donc calculée de la manière suivante:

$$\text{Densité électronique des M.P.} = 51\ 575 \text{ électrons} / (63\text{\AA} \times 63\text{\AA} \times 40\text{\AA}) = 0,325 \text{ é/Å}^3$$

Notons seulement que lorsque cette méthode de calcul est comparée au dénombrement un à un des électrons de la M.P., on obtient des résultats très semblables (0,325 é/Å³ par la méthode du poids moléculaire vs 0,347 é/Å³ par la méthode du dénombrement un à un des électrons).

La densité électronique des M.P. ayant été calculée, il est alors possible de mesurer une courbe de réflectivité d'un film de M.P. L'étalement, le temps d'attente et la vitesse de compression du film de M.P. sont faits exactement dans les mêmes conditions que lors des mesures d'isothermes de pression et de potentiel de surface (voir section 4.2.2).

Une fois le film comprimé à la pression de surface désirée (1, 10, 12.5, 20, 22.5, 26, 30, 37, 38, 42, 43 ou 46 mN/m), une période d'attente de 15 min. est respectée à des fins de stabilisation du film. On commence alors à irradier le film avec les rayons-X avec un angle rasant, de façon à obtenir une réflectivité totale (voir section 2.5). Puis, on incline progressivement le bras incident de l'appareil, diminuant ainsi l'angle fait par les rayons-X par rapport à la normale à l'interface tout en enregistrant la réflectivité grâce au

détecteur (Fig. 15) installé à un angle équivalent de l'autre côté du bain. Passé un certain angle critique, il se produit une chute importante de la réflectivité qui est due au phénomène de transmission des rayons-X dans la sous-phase. On continue la mesure en inclinant davantage les bras incident et de détection du réflectomètre jusqu'au point où on ne détecte plus suffisamment de rayons-X.

4.2.6 Dépositions Langmuir-Blodgett

Les M.P. furent déposées sur des lamelles de germanium (cristaux pour ATR) par la méthode dite de Langmuir-Blodgett. Brièvement, cette méthode consiste à prélever une seule couche de molécules amphiphiles sur un substrat solide (lamelle de germanium) à partir d'une monocouche de ces molécules à l'interface air-eau. Plus précisément, nous commençons par mettre le tampon B dans le bain de monocouche et y plonger de 10,5 mm la lamelle de germanium. Le plan de cette lamelle est orienté perpendiculairement à la direction d'avancement de la barrière mobile. Une monocouche de M.P. est ensuite étalée selon la méthode décrite à la section 4.2.2 et ensuite comprimée jusqu'à des pressions de surface de 10, 20, 30, 40 ou 46 mN/m (une nouvelle monocouche de M.P. fut utilisée pour chaque pression de surface à l'étude). Une fois la pression de surface désirée atteinte, un temps de 10 min fut respecté à des fins de stabilisation du film. Ajoutons que ce temps de relaxation du film était suffisant pour que la vitesse moyenne d'avancement de la barrière mobile (système de contrôle de la pression de surface; avancement nécessaire qui permet de garder une pression de surface stable) passe sous les 1 mm/min, ce qui est indicatif d'un

film stable. Suivant ce temps d'attente, la lamelle est retirée de la sous-phase à une vitesse de 15 mm/min alors que la pression de surface est gardée constante. Toutes les opérations mécaniques sont contrôlées par ordinateur via le logiciel commercial KSV 3 000 (KSV Instruments). Aussitôt émergées, les lamelles furent placées immédiatement dans un dessicateur pour une période d'au moins une heure avant la prise des spectres infrarouge.

4.2.7 Spectroscopie FTIR-ATR

Salesse *et al.* (1990) ont déjà déterminé qu'une réorientation de la rhodopsine à l'interface air-eau avait lieu en fonction de la pression de surface. La rhodopsine et la bR étant des protéines très semblables au point de vue structurel (protéines transmembranaires à sept hélices- α), nous voulions déterminer si une telle réorientation se produisait avec la bR dans nos films. Ces mesures d'orientation des hélices- α de la bR ont été faites par spectroscopie FTIR-ATR sur des monocouches de M.P. déposées sur des lamelles de germanium à différentes pressions de surface par la méthode de Langmuir-Blodgett (voir section précédente). Cette méthode offre l'avantage d'avoir un excellent contrôle sur le degré d'entassement moléculaire et donne une assurance à la fois quant à l'homogénéité et l'état monomoléculaire du film. Le transfert des M.P. par la technique de Langmuir-Blodgett permet enfin la détermination de l'orientation des hélices- α de la bR pour des échantillons déposés à différentes pressions de surface.

Les lamelles recouvertes d'une monocouche de M.P. furent introduites dans le compartiment-échantillon du spectrophotomètre infrarouge et fixées sur le montage ATR (Fig. 16). Ce compartiment-échantillon est sous purge constante d'air sec. Un premier spectre infrarouge est ensuite pris dans chacune des polarisations (horizontale et verticale) sur la plage de 400 à 4 000 cm⁻¹. Ces spectres sont constitués de 250 itérations prises à un rythme de 1 itération/sec à une résolution de 2 cm⁻¹. La présence de traces d'eau dans l'enceinte de l'appareil donne lieu à de nombreux pics d'absorption, notamment dans la région des bandes amide I et II de la protéine. Ces pics d'absorption perdent cependant rapidement de l'ampleur avec le temps passé par les lamelles dans l'enceinte, de sorte que le second spectre (également pris dans chacune des polarisations) n'est pas entaché de pics d'absorption de l'eau. On prend alors deux spectres infrarouge pour chaque lamelle en ne gardant que le deuxième. La lamelle est ensuite lavée trois fois à l'eau déionisée et trois fois au méthanol à l'aide de chiffons à faible peluchage et sechée sous azote. Cette lamelle nettoyée est ensuite replacée dans le spectrophotomètre infrarouge et on reprend à nouveau une série de deux spectres, chacun d'eux dans les polarisations verticale et horizontale. Le deuxième spectre est conservé et constitue le blanc; il sera par la suite soustrait du spectre de l'échantillon. L'analyse spectrale ainsi que le calcul des paramètres d'ordre et de l'orientation des hélices- α s'est ensuite faite grâce au logiciel SpectraCalc.

4.2.8 Cycles de compression-décompression-recompression (CDR)

La compression de molécules amphiphiles à l'interface air-eau peut donner lieu à des interactions intermoléculaires qui sont irréversibles (au sens thermodynamique du terme). La pression latérale exercée à l'aide de la barrière mobile peut ainsi promouvoir la formation d'états métastables comme l'agrégation, la fusion membranaire ou la formation de multicouches, par exemple. On peut facilement imaginer que certains de ces phénomènes peuvent affecter grandement la structure des films de M.P. Les conditions expérimentales optimales à l'élaboration de films ultramince de protéines photosensibles sont celles où une homogénéité maximale de la structure du film est atteinte *dans les trois dimensions* (dans le plan de la membrane et selon l'épaisseur). Notre poursuite vers l'obtention de ces conditions expérimentales optimales nous amène donc à identifier les régions de l'isotherme des films de M.P. démontrant les caractéristiques de la formation de ces états métastables.

Tel que mentionné dans la thèse de P. Lavigne (1994), l'observation de boucles d'hystérèse pour un processus cyclique indique la formation d'un ou de plusieurs états métastables de la matière suite à une ou plusieurs transitions irréversibles. Ces transitions peuvent par exemple être promues par l'application d'une pression de surface suffisante à l'aide d'une barrière mobile sur un film à l'interface air-eau. En pratique, on soumet les films de M.P. à des cycles de compression-décompression-recompression (cycles CDR) et ce, pour différentes pressions maximales atteintes lors du cycle (i.e: la pression où la compression est arrêtée et à partir de laquelle on effectue la

décompression du film). L'observation d'une boucle d'hystérèse dans un cycle CDR pour une pression maximale donnée sera alors indicatrice de la formation d'états métastables de la matière.

Le bain de monocouche ainsi que la méthode d'étalement, le temps d'attente et la vitesse de compression utilisés pour ces expériences sont les mêmes que pour les isothermes de pression et de potentiel de surface (section 4.2.2). La différence principale cette fois-ci est que la compression se fait jusqu'à une pression de surface donnée (10, 20, 30, 40 ou 46 mN/m) et le film est décomprimé immédiatement jusqu'à l'obtention d'une pression de surface nulle. On attend ensuite 5 min. avant de recomprimer à nouveau le film jusqu'à la pression maximale atteinte lors de la première compression. Nous avons à la fois enregistré les isothermes de pression et de potentiel de surface pour ces cycles CDR, ce qui nous permettra d'établir une corrélation entre le comportement tensio-actif (pression de surface) et électrique (potentiel de surface) des films de M.P. en ce qui a trait principalement à la formation d'états métastables induits par la compression.

4.2.9 Microscopie de fluorescence à l'interface air-eau

Avant de terminer notre étude sur la structure des films de M.P., une question importante demeurait: quelle est l'organisation macroscopique des fragments de M.P. à l'interface air-eau? En effet, nous avons étudié, à l'échelle moléculaire, la structure de la bR et des M.P. par réflectivité des rayons-X et par spectroscopie FTIR-ATR. La spectroscopie de fluorescence à l'interface air-eau nous permit de déterminer quelle était l'orientation des

M.P. dans cet environnement. Il restait maintenant à savoir comment les fragments de M.P. pouvaient bien s'organiser entre eux à l'interface air-eau.

La microscopie de fluorescence nous semblait alors tout indiquée pour cette tâche. Il est ainsi possible de visualiser un film monomoléculaire à l'interface air-eau en injectant simplement une sonde fluorescente dans la sous-phase et en faisant la mise au point du microscope sur l'interface (Lavigne *et al.*, 1994). Nous avons donc utilisé cette technique pour visualiser un film de M.P. pendant une décompression de 10 à 0 mN/m.

Le montage de microscopie de fluorescence à l'interface air-eau utilisé pour ces mesures est similaire à celui décrit précédemment par Grainger *et al.* (1989). Pour les expériences en microscopie de fluorescence à l'interface air-eau, les films de M.P. ont été étalés et comprimés jusqu'à une pression de surface de 10 mN/m suivant la méthode décrite pour les isothermes de pression et de potentiel de surface (section 4.2.2). On injecte alors 15 μ L d'une solution de rhodamine B de concentration 10^{-5} M dans la sous-phase, directement sous l'objectif du microscope (Nikon). Cette sonde fluorescente possède la particularité d'être légèrement hydrophobe, de telle sorte qu'une fois injectée dans la sous-phase, elle aura tendance à remonter vers la surface et à se loger à l'interface air-eau. L'objectif du microscope étant alors mis au point sur l'interface, on détecte des zones claires qui sont dues à la présence de rhodamine et des zones plus sombres correspondant à des régions où la sonde est exclue du plan de l'interface par la compression du film.

Le film fut ensuite décomprimé jusqu'à une pression de surface de 0 mN/m à une vitesse de $10 \text{ \AA}^2/\text{molécule}.\text{min}$ tout en visualisant le film à l'aide d'une caméra vidéo (Hammamatsu) reliée au microscope (notons que des objectifs de 20, 40 et 100X ont été utilisés en alternance durant la prise de mesures). L'image du film peut alors être enregistrée en temps réel sur cassette vidéo ou envoyée spontanément sur pellicule. Le film fut ensuite laissé ainsi à pression nulle pendant une heure.

CHAPITRE 5

RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.1 Isothermes de pression et de potentiel de surface

De façon à caractériser les propriétés interfaciales des films de M.P., nous avons débuté notre étude par la mesure des isothermes de pression et de potentiel de surface à l'interface air-eau. L'isotherme de pression de surface nous fournit des informations sur *l'organisation spatiale* et les *interactions intermoléculaires* des fragments de M.P. (aire moléculaire, compressibilité, "collapse"), tandis que l'isotherme de potentiel de surface nous renseigne sur les propriétés électrostatiques de tels films. Nous verrons plus loin que la non-reproductibilité des aires moléculaires fait en sorte que ce paramètre ne peut être utilisé comme critère fiable pour décrire l'état d'un film. Notons cependant que les isothermes de pression et de potentiel de surface (ainsi que K^s) présentés ici sont issus de la même compression, et peuvent donc être comparées directement en termes d'aire moléculaire.

5.1.1 L'isotherme de pression de surface

Une isotherme de pression de surface d'un film de M.P. à l'interface air-eau est présentée à la Fig. 21. Cette isotherme peut-être divisée en trois régions distinctes:

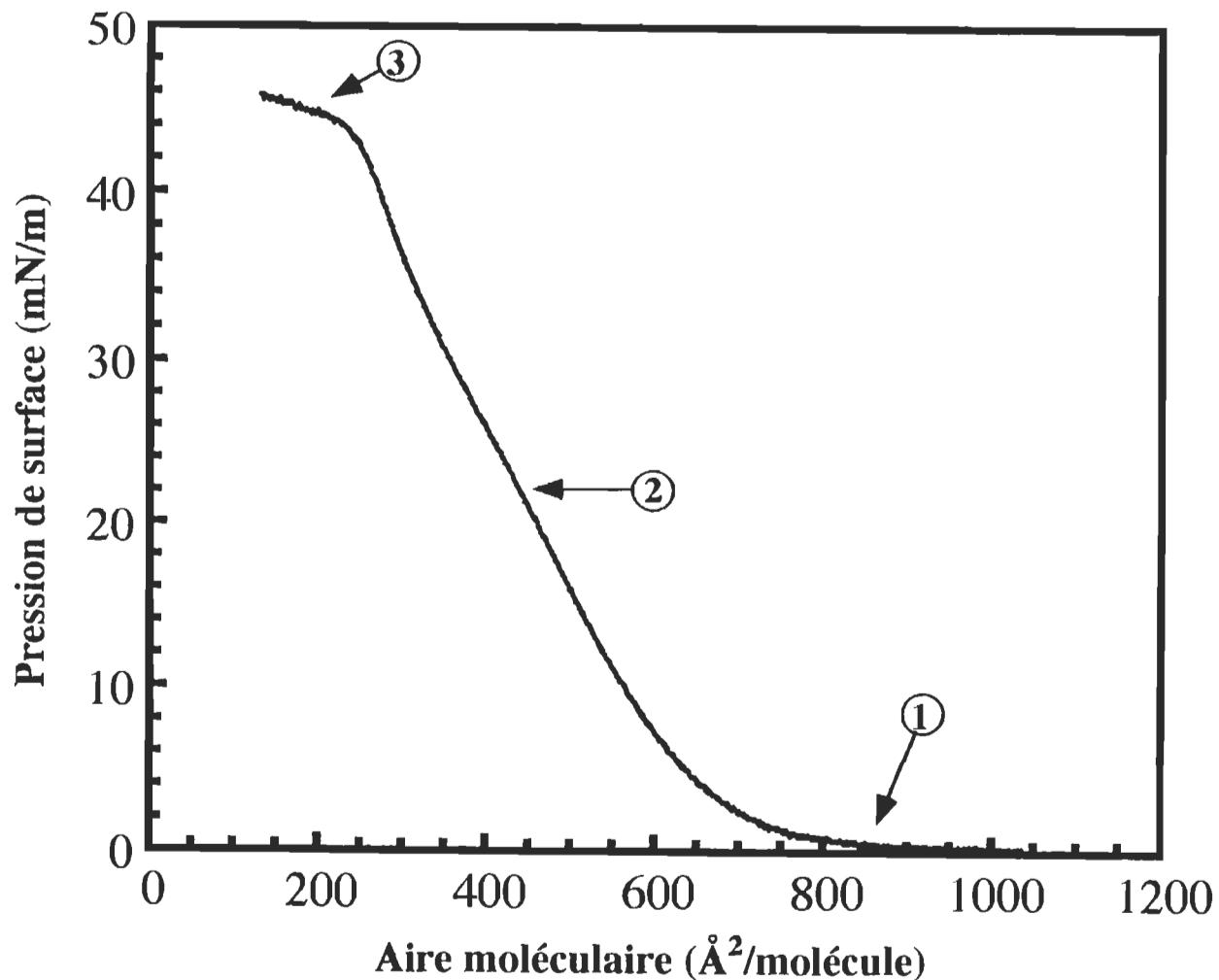


Figure 21. Isotherme de pression de surface de M.P. sur le tampon A. On peut diviser cette isotherme en trois régions. On retrouve aux deux extrémités de l'isotherme, d'une part, la région du "lift-off" (1) aux grandes aires moléculaires et, d'autre part, la région du collapse (3) dans la zone de compression maximale. Entre ces deux régions sied une zone s'étendant sur plus de 30 mN/m où la compressibilité du film change peu (2).

- a) La région du "lift-off" (1), caractérisée par le début d'une pression de surface mesurable. Cette région est suivie d'une augmentation progressive de la pente de l'isotherme jusqu'à ce que la courbe devienne linéaire. Cette zone s'étend de 0 mN/m ($\approx 850 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) jusqu'à près de 10 mN/m ($\approx 575 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Bien que la reproductibilité de ces isothermes en termes de pression de surface soit bonne (les événements caractéristiques aux "bornes" des régions que nous définissons étant reproductibles à 1 mN/m près) et que la forme de l'isotherme est toujours la même, la reproductibilité en termes d'aire moléculaire est médiocre ($300 \pm 170 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ à 38 mN/m, soit $\pm 57\%$; comparer avec la valeur de $55 \pm 1 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ à 38 mN/m, soit $\pm 1,8\%$ pour une monocouche de dioleoyl-phosphatidylcholine (Ducharme *et al.*, 1985). La non-reproductibilité des aires moléculaires (voir plus loin) pourrait s'expliquer par des pertes de M.P. dans la sous-phase.
- b) Une région d'augmentation monotone (2) de la pression de surface (où K^s atteint un maximum de 50 mN/m à une pression de surface d'environ 18 mN/m, puis diminue à des pressions supérieures; voir Fig. 22) comprise entre 10 mN/m ($\approx 575 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) et 42 mN/m ($\approx 230 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) à l'exception d'un léger changement de pente de l'isotherme vers 20-22 mN/m (pointé par la flèche (2) sur la Fig. 21). Quoique difficile à distinguer sur cette isotherme, ce changement de pente est probablement relié à la valeur maximale qu'atteint K^s vers 18 mN/m (voir plus loin).
- c) La région correspondant au "collapse" (3) du film de M.P. qui débute vers 43 mN/m. Cette région est marquée par une diminution de la pente de l'isotherme et une diminution importante de K^s (Fig. 22).

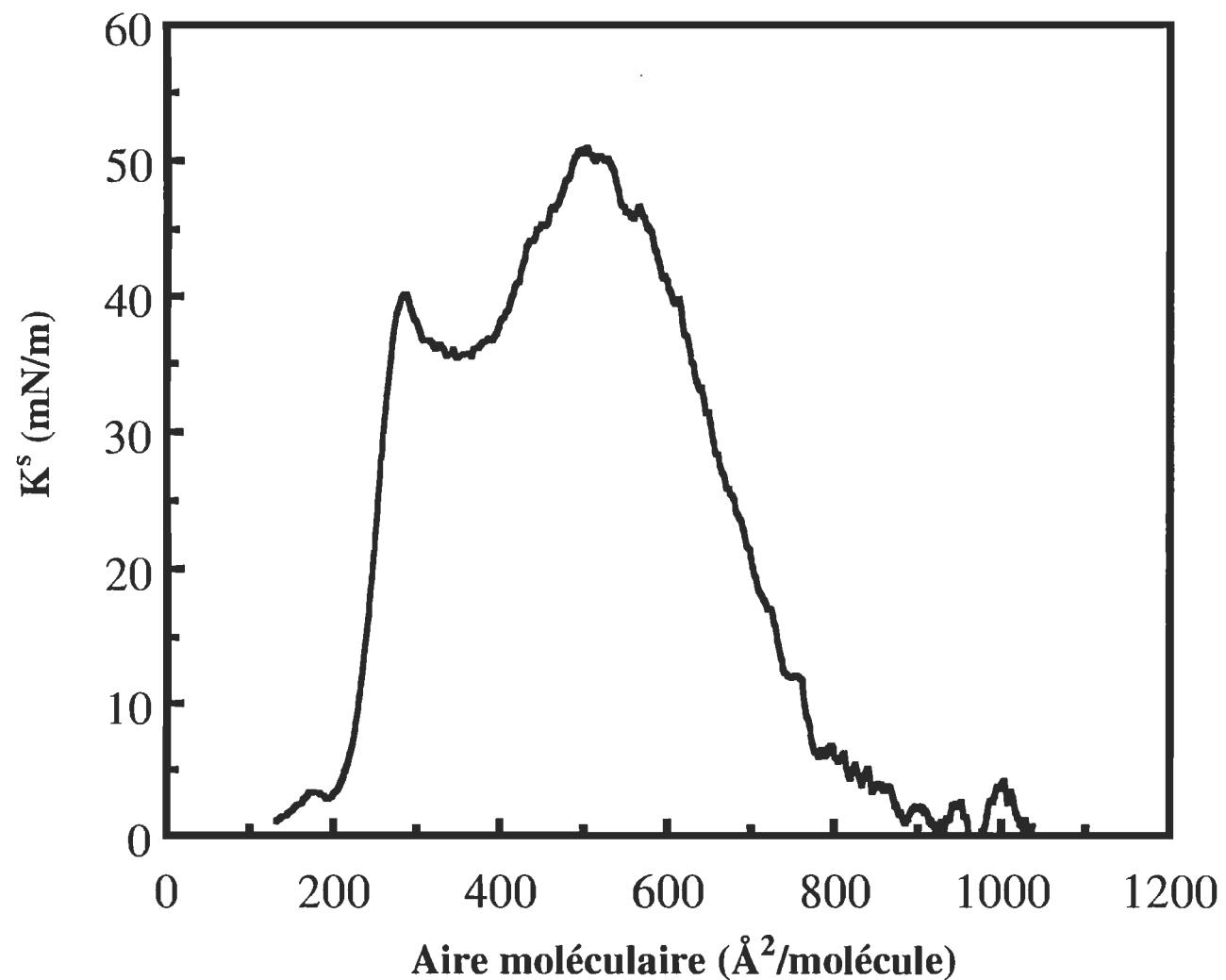


Figure 22. Variation du module de compressibilité isothermique (K^s) en fonction de l'aire moléculaire.

D'une façon générale, nous avons observé que les films de M.P. à l'interface air-eau demeuraient très stables pendant des heures à une pression de surface donnée dans la gamme de 5 à 40 mN/m. Typiquement, un film comprimé, par exemple, jusqu'à 30 mN/m et laissé reposer à des fins de stabilisation verra sa pression de surface diminuer d'environ 1 - 1,5 mN/m pendant les premières 15 minutes, puis se stabilisera à cette nouvelle pression de surface qu'il conservera des heures durant.

Parmi les principales caractéristiques de cette isotherme se trouvent les faibles valeurs d'aire moléculaire pour l'ensemble des pressions de surface. Rappelons seulement ici que l'aire moléculaire représente la surface moyenne occupée par une molécule de bR dans le plan de l'interface. Or, nous mesurons au maximum des aires d'environ $1050 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ au "lift-off" et d'environ $350 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ au collapse du film (résultats non-montrés). Or, Henderson et Unwin (1975) ont mesuré par diffraction des électrons et des rayons-X des dimensions de $63 \text{ \AA} \times 63 \text{ \AA}$ pour la maille cristalline du réseau hexagonal de trimères de bR. Ceci revient à dire qu'à l'intérieur de la membrane pourpre, un trimère de bR et ses lipides associés occupent une surface de 3969 \AA^2 , soit $1323 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ de bR et ses lipides associés. Ces aires moléculaires étant beaucoup plus grandes que celles que nous avons obtenues en monocouche, nous avons formulé quelques hypothèses pouvant rendre compte des faibles aires moléculaires obtenues:

- La dénaturation de la protéine à l'interface air-eau. En effet, si la bR perd sa structure à sept hélices- α , il est possible qu'elle occupe une moindre surface à l'interface air-eau. Cette hypothèse est cependant peu plausible si

l'on considère d'une part la stabilité légendaire de la bR (Shen *et al.*, 1993) et, d'autre part, la structure native à sept hélices- α de la protéine qui est déjà très compacte (Fig. 6) On pourrait plutôt s'attendre à une *augmentation* de l'aire moléculaire suivant une dénaturation. Notons à cet effet que l'intégrité fonctionnelle (voir section 5.2) et structurale (section 5.5) de la bR est préservée à l'interface air-eau, ce qui élimine la thèse de la dénaturation.

- La formation de multicouches de M.P. à l'interface air-eau. En effet, si les fragments de M.P. se chevauchent, l'aire moléculaire *apparente* s'en trouvera d'autant réduite, les protéines étant ainsi réparties sur plus d'un seul plan. En opposition à cette hypothèse, se trouve le fait qu'on retrouve de faibles valeurs d'aire moléculaire dès le "lift-off". Dans cette région, très peu d'énergie mécanique est appliquée (par la barrière mobile) sur le film pour promouvoir un tel arrangement alors que le caractère amphiphile des M.P. favorise plutôt la répartition maximale des fragments à l'interface air-eau.

- La perte de fragments de M.P. dans la sous-phase. Cette perte pourrait survenir soit au moment de l'étalement ou lors de la compression. L'argument est ici très semblable à l'hypothèse des multicouches; moins de fragments de M.P. à l'interface air-eau résulte en une réduction de l'aire moléculaire apparente. De manière à vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré des isothermes de pression de surface sur le tampon A contenant 4M NaCl (au lieu de 100 mM de NaCl), avec comme résultat l'obtention de plus grandes aires moléculaires (comparer Figs. 21 et 23). Par exemple, l'aire moléculaire pour une pression de surface de 20 mN/m est de 470 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ sur 100 mM de sel, alors qu'elle est de 700 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ sur 4

M de sel. Les aires moléculaires pour toutes les pressions de surface sont cependant encore plus faibles que l'aire estimée d'après les résultats de Henderson et Unwin (environ 1320 \AA^2 , un trimère de bR et de ses lipides associés occupant une aire de $63 \text{ \AA} \times 63 \text{ \AA}$; voir section 1.2.3), ce qui nous laisse croire qu'une concentration élevée en sel pourrait minimiser, mais non éliminer complètement, les pertes de M.P. dans la sous-phase. Notons que le décalage observé de la pression de surface au collapse vers les faibles pressions de surface (comparer avec Fig. 21) est un artefact qui est dû à la réduction de la tension superficielle par la grande concentration de sel dissous. Gaines (1966) et Pattus *et al.* (1981) ont auparavant fait la constatation qu'une plus grande concentration en sels donnait lieu à de plus grandes aires moléculaires pour des films protéiques. Ils ont interprété ceci comme étant le résultat d'une plus grande affinité des protéines pour l'interface et donc d'une réduction des pertes de protéines dans la sous-phase. Comme nous le verrons plus loin, nous avons constaté lors de la mesure des cycles CDR que le tracé en recompression était toujours décalé vers les grandes aires moléculaires (comparativement aux tracés de compression et de décompression; voir Fig. 43). Nous avons interprété ce résultat comme provenant d'une réinsertion de fragments de M.P. dans le plan du film. Ces fragments seraient passés dans la sous-phase au moment de l'étalement et pourraient remonter à l'interface air-eau lorsque le film est décomprimé jusqu'à pression nulle (voir section 5.6). De plus, le caractère non-reproductible des aires moléculaires vient renforcer l'hypothèse de pertes dans la sous-phase.

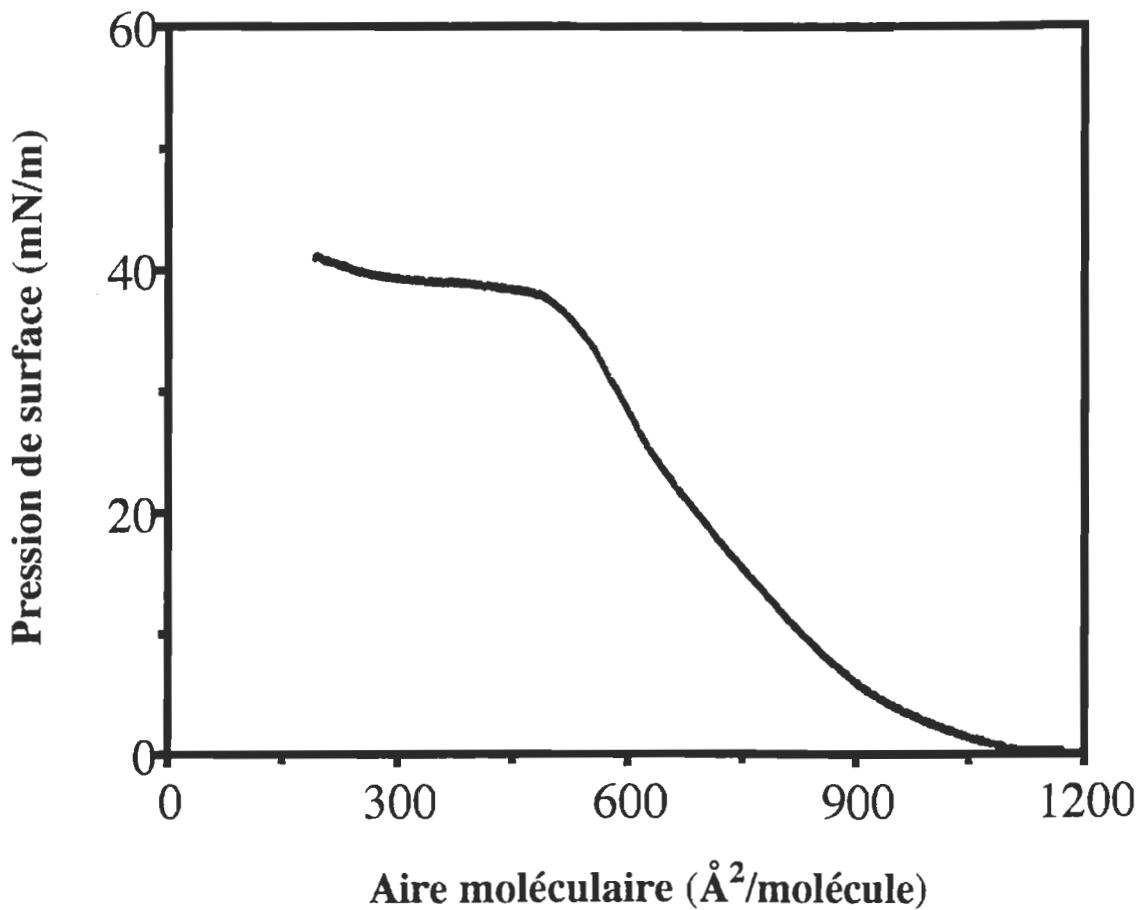


Figure 23. Isotherme de pression de surface de M.P. sur le tampon A contenant 4M de NaCl. La forme de l'isotherme demeure sensiblement la même qu'avec 100 mM de NaCl (Fig. 21) excepté pour un décalage vers les grandes aires moléculaires et les faibles pressions de surface. L'augmentation de l'aire moléculaire apparente est expliquée par une réduction des pertes de M.P. dans la sous-phase alors que la réduction de la pression de surface au collapse est un artefact (voir texte).

La stabilité dans le temps de tels films laisse également supposer que ces pertes auraient lieu lors de l'étalement des M.P. à l'interface air-eau et non après compression. Il est cependant plus difficile de donner une interprétation valable des événements se produisant dans la région du collapse sur la seule base des isothermes de pression de surface. Il en va également de même pour le changement de pente observé vers 20-22 mN/m (voir Fig. 21).

Du côté de K^s (Fig. 22), il est intéressant de voir qu'une valeur maximale est atteinte vers $500 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, soit à une pression d'environ 18 mN/m (correspondant probablement au léger changement de pente observé sur l'isotherme de pression de surface, voir Fig. 21) et qu'une compression additionnelle du film entraîne une chute de cette valeur de K^s . Ceci permet de supposer qu'une interaction maximale entre les fragments de M.P. soit atteinte vers 18 mN/m et qu'une pression de surface plus élevée occasionne une diminution importante de ces interactions (dissipation de l'énergie potentielle accumulée; voir section 2.2).

À cette étape-ci, il est encore trop tôt pour pouvoir statuer sur le type de dissipation énergétique impliqué (perte de M.P. dans la sous-phase, formation de multicouches, ...); c'est pourquoi d'autres méthodes d'analyse utilisées dans le cadre de ce travail seront présentées plus loin dans le but de mieux décrire les divers événements moléculaires prenant place au cours de la compression.

5.1.2 L'isotherme de potentiel de surface

La Fig. 24 montre une isotherme de potentiel de surface d'un film de M.P. à l'interface air-eau. On peut distinguer quatre régions de cette isotherme:

- a) La première région (1) rencontrée lors du début de la compression est caractérisée par un potentiel stable à près de 0 mV. Elle correspond à des aires moléculaires supérieures à celles du "lift-off", c'est-à-dire au moment où la pression de surface est encore nulle (voir Fig. 21).
- b) La seconde région (2) montre une augmentation prononcée du potentiel de surface entre 900 et 500 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ (de 0 à 18 mN/m respectivement. La pression correspondant au potentiel maximum peut varier de ± 2 mN/m d'une expérience à l'autre). Le potentiel de surface atteint alors une valeur maximale qui peut varier de 100 à près de 250 mV d'une expérience à l'autre. Notons également que le taux d'augmentation du potentiel de surface (en fonction de la compression) varie lui-aussi d'une expérience à l'autre.
- c) La troisième région (3) est celle où le potentiel de surface atteint un plateau. La largeur de ce plateau varie cependant d'une expérience à l'autre entre 0 et 200 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$. La Fig. 24 est ici un exemple où l'atteinte d'une valeur maximale de potentiel de surface est immédiatement suivie de la région de décroissance du potentiel.

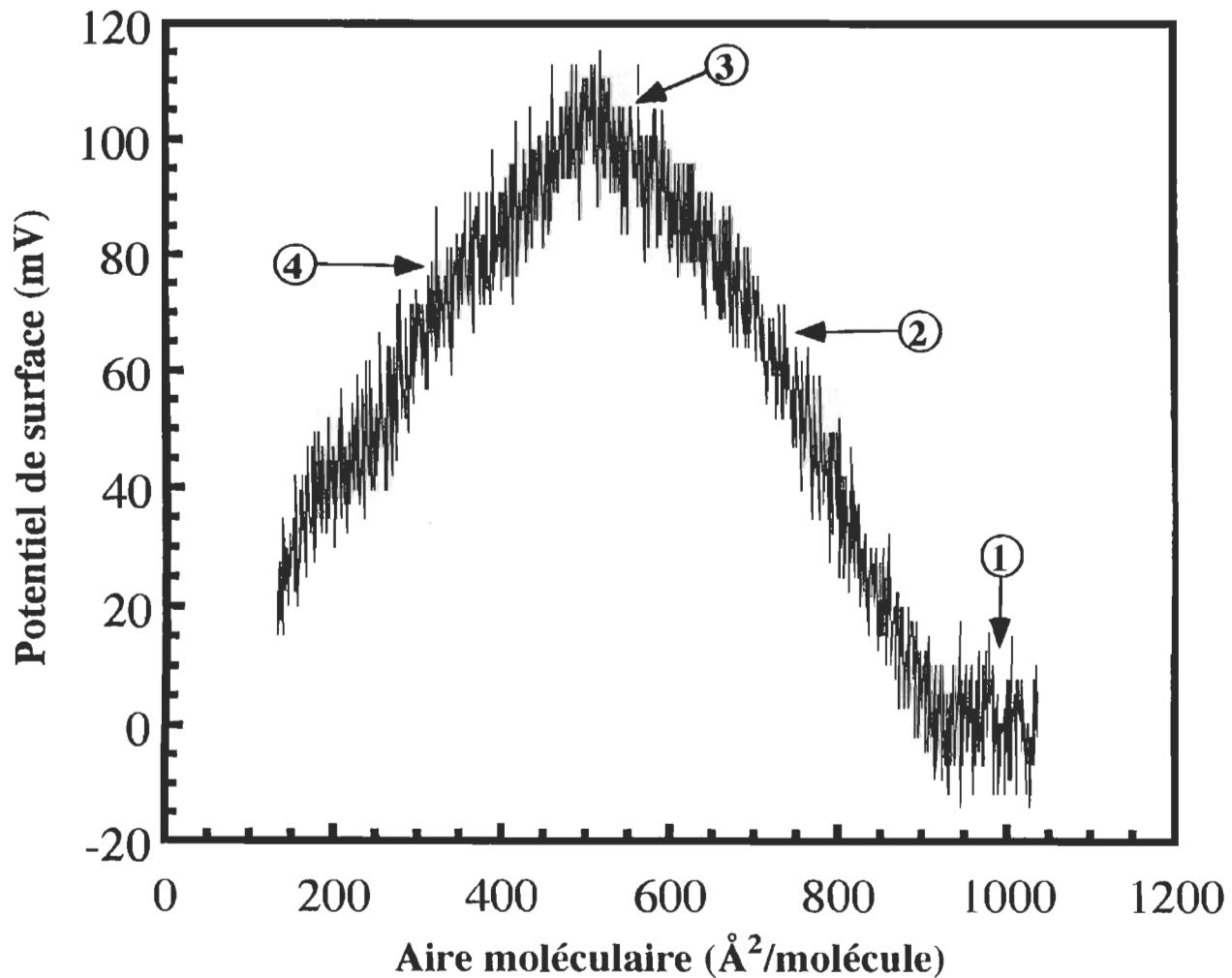


Figure 24. Isotherme de potentiel de surface de M.P. sur le tampon A. Cette isotherme peut-être divisée en quatre régions, chacune d'entre elles traduisant possiblement un événement physique altérant la structure du film de M.P.

d) Finalement, la quatrième région (4) de l'isotherme de potentiel de surface est caractérisée par une chute du potentiel de surface. Ce dernier décroît d'une façon plus ou moins linéaire avec la réduction de l'aire moléculaire à un taux qui peut varier d'une expérience à une autre. Fait intéressant observé lors de l'enregistrement en parallèle des isothermes de pression et de potentiel de surface: le début de cette décroissance de potentiel de surface coïncide toujours (à 1 ou 2 mN/m près) avec le léger changement de pente dans l'isotherme de pression de surface noté vers 20-22 mN/m (Fig. 21). À partir des données recueillies grâce aux isothermes de potentiel de surface, nous avons formulé certaines hypothèses pour tenter d'expliquer les phénomènes observés. Étant donné le caractère non-spécifique des informations recueillies par cette méthode, d'autres expériences ont été utilisées pour confirmer ou infirmer ces hypothèses (voir plus loin).

La valeur nulle de potentiel de surface obtenue dans la première région de l'isotherme s'explique assez facilement. L'aire moléculaire étant très grande dans cette région, une certaine proportion de la surface du bain est alors complètement dépourvue de monocouche. Le potentiel nul résulte donc de l'absence de film sous l'électrode de mesure. L'augmentation du potentiel de surface dans la seconde région de l'isotherme peut être expliquée par l'arrivée des fragments de M.P. sous l'électrode de détection. En effet, l'étalement des M.P. se fait partout à la surface du bain (voir section 4.2), sauf sous l'électrode de détection et dans les quelques cm^2 entourant cette dernière (pour des considérations d'ordre pratique). La compression à l'aide de la barrière mobile réduit alors progressivement l'aire disponible et force les M.P. à couvrir l'ensemble de la surface du bain. La présence d'un plateau

dans la troisième région de l'isotherme réfléterait d'ailleurs un état optimal de l'organisation des fragments de M.P. alors que la décroissance du signal dans la quatrième région serait attribuable à la perte progressive de cette organisation optimale (noter que le maximum de potentiel de surface correspond, en termes d'aire moléculaire, assez précisément avec le maximum de K^s ; voir Fig. 22). Divers scénarios sont alors envisageables, comme la perte de fragments de M.P. dans la sous-phase, la superposition de ces fragments de M.P. (augmentation de la constante diélectrique du milieu, voir équation 4), ou une réorientation de la protéine de telle sorte que le moment dipolaire perpendiculaire μ_{\perp} (voir équation 5) qui lui est associé diminue d'amplitude. Les expériences que nous avons effectuées grâce à d'autres techniques nous permettront de trancher entre ces hypothèses (voir plus loin).

5.2 Évaluation de la fonctionnalité de la bR à l'interface air-eau

5.2.1 Spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau

La Fig. 25 montre les spectres d'absorption des M.P. à l'interface air-eau pour les conditions d'adaptation à l'obscurité (D.A.) et à la lumière (L.A.). Ces deux spectres ont été pris alors que le film de M.P. se trouvait à une pression de surface de 5 mN/m. On remarque immédiatement un déplacement bathochrome de 10 nm de la bande d'absorption suite à l'adaptation à la lumière, où le maximum d'absorption passe de 560 à 570 nm.

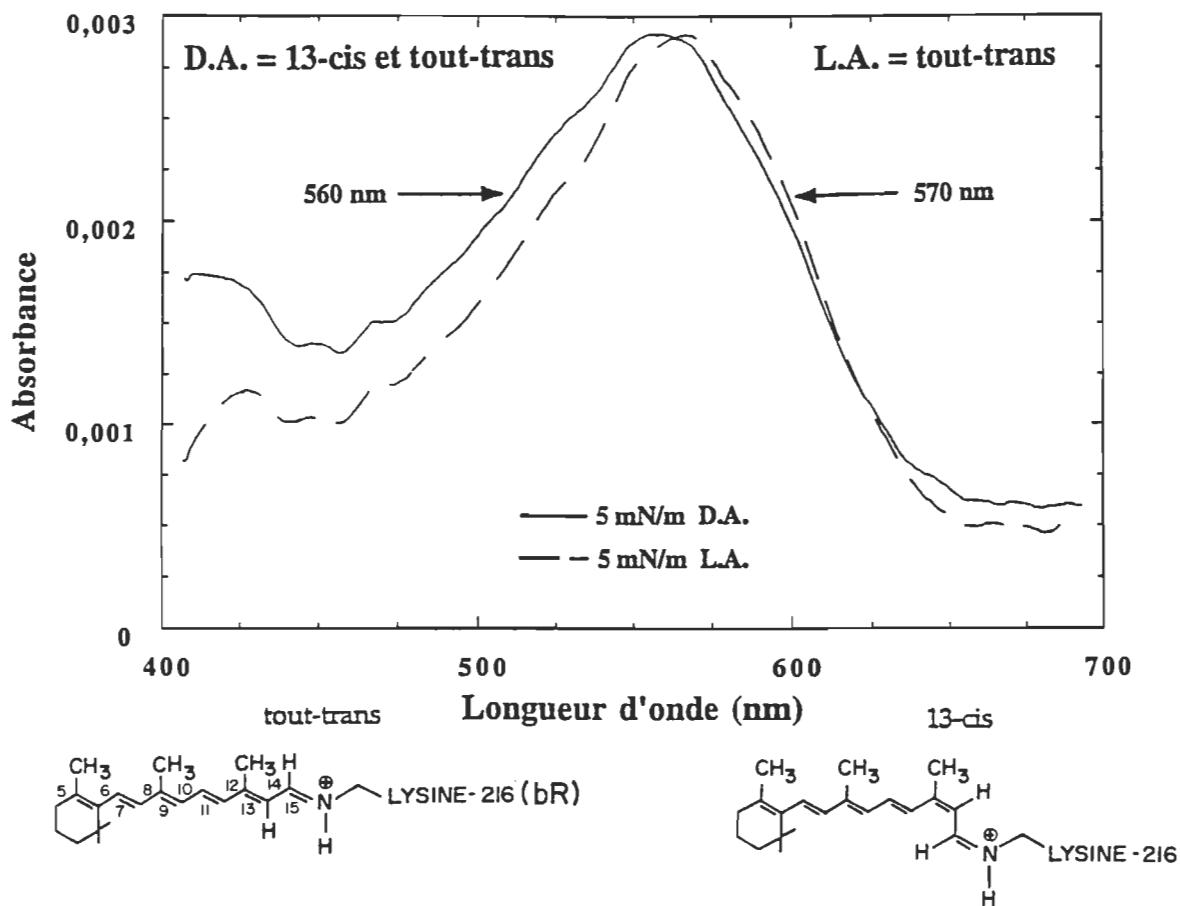


Figure 25. Spectre d'absorption d'un film de M.P. à l'interface air-eau à une pression de surface de 5 mN/m dans des conditions d'adaptation à la lumière (---) et à l'obscurité (—). Suivant l'adaptation à la lumière, on observe un déplacement bathochrome de 10 nm du λ_{max} . Ce déplacement spectral est bien caractérisé dans le cas des suspensions aqueuses de M.P. et résulte d'une isomérisation du rétinal. Ceci suggère fortement que l'intégrité fonctionnelle de la bR est préservée à l'interface air-eau.

Ce déplacement spectral est caractéristique d'une photoisomérisation du rétinal suite à une adaptation à la lumière (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971; voir section 4.2.3), ce qui suggère fortement que l'intégrité fonctionnelle de la bR est préservée à l'interface air-eau.

Des spectres d'absorption d'un film de M.P. en état d'adaptation à l'obscurité ont également été pris à des pressions de surface allant de 5 à 30 mN/m (voir Fig. 26). On voit alors que l'intensité de la bande d'absorption de la bR (D.A. = 560 nm) croît de façon monotone avec la pression de surface. La Fig. 27 confirme d'ailleurs cette relation linéaire entre l'absorbance et la pression de surface. Or, il est intéressant de constater que la plage de pressions de surface de 5 à 30 mN/m correspond également à une région linéaire dans l'isotherme de pression de surface des M.P. (voir Fig. 21).

La spectroscopie d'absorption apporte alors une évidence supplémentaire à l'effet que les films de M.P. sont très stables à l'interface air-eau et que la compression amène bel et bien un accroissement de la densité bi-dimensionnelle en M.P. et non à une solubilisation des fragments dans la sous-phase.

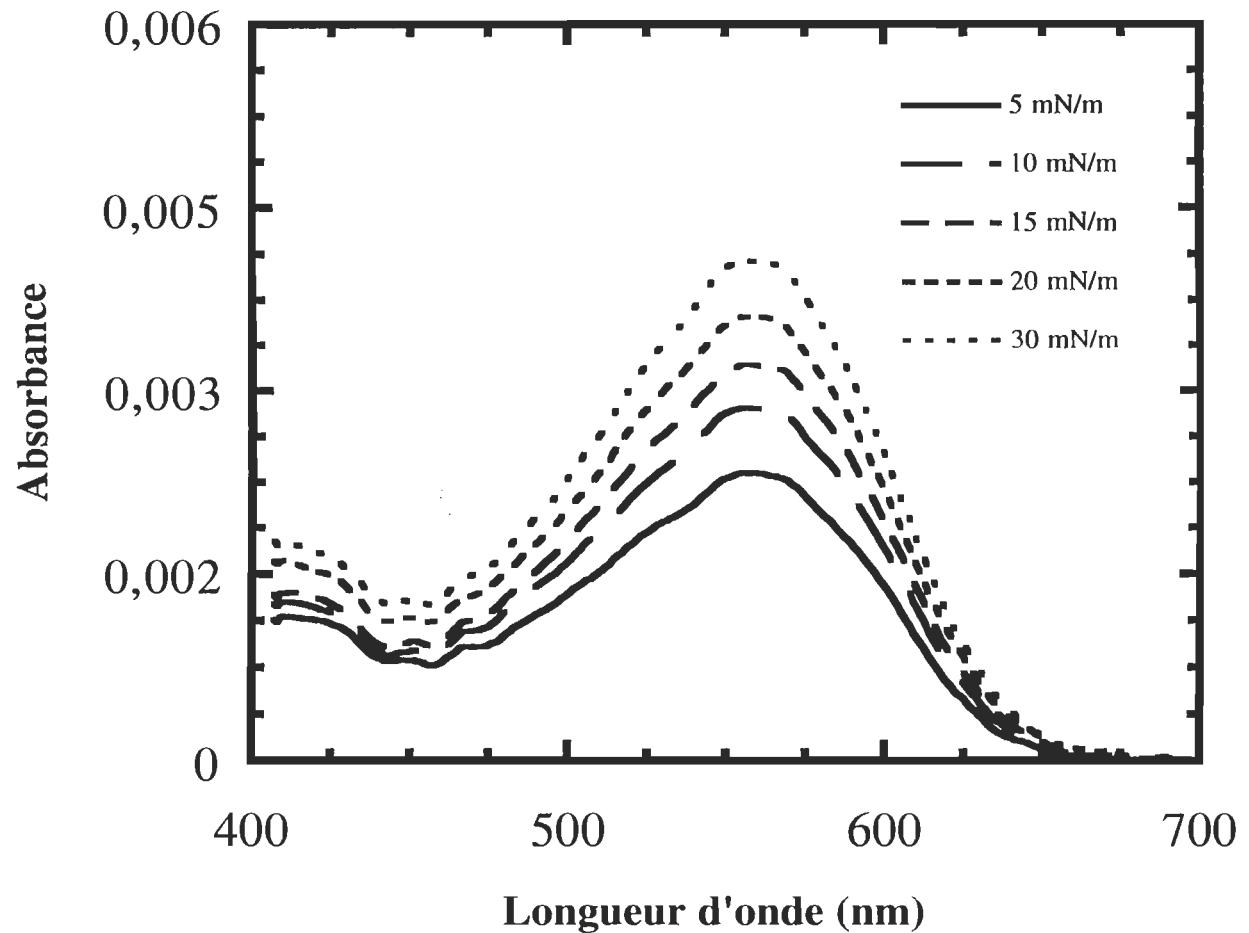


Figure 26. Spectres d'absorption d'un film de M.P. à l'interface air-eau (conditions d'adaptation à l'obscurité) à des pressions de surface allant de 5 à 30 mN/m.

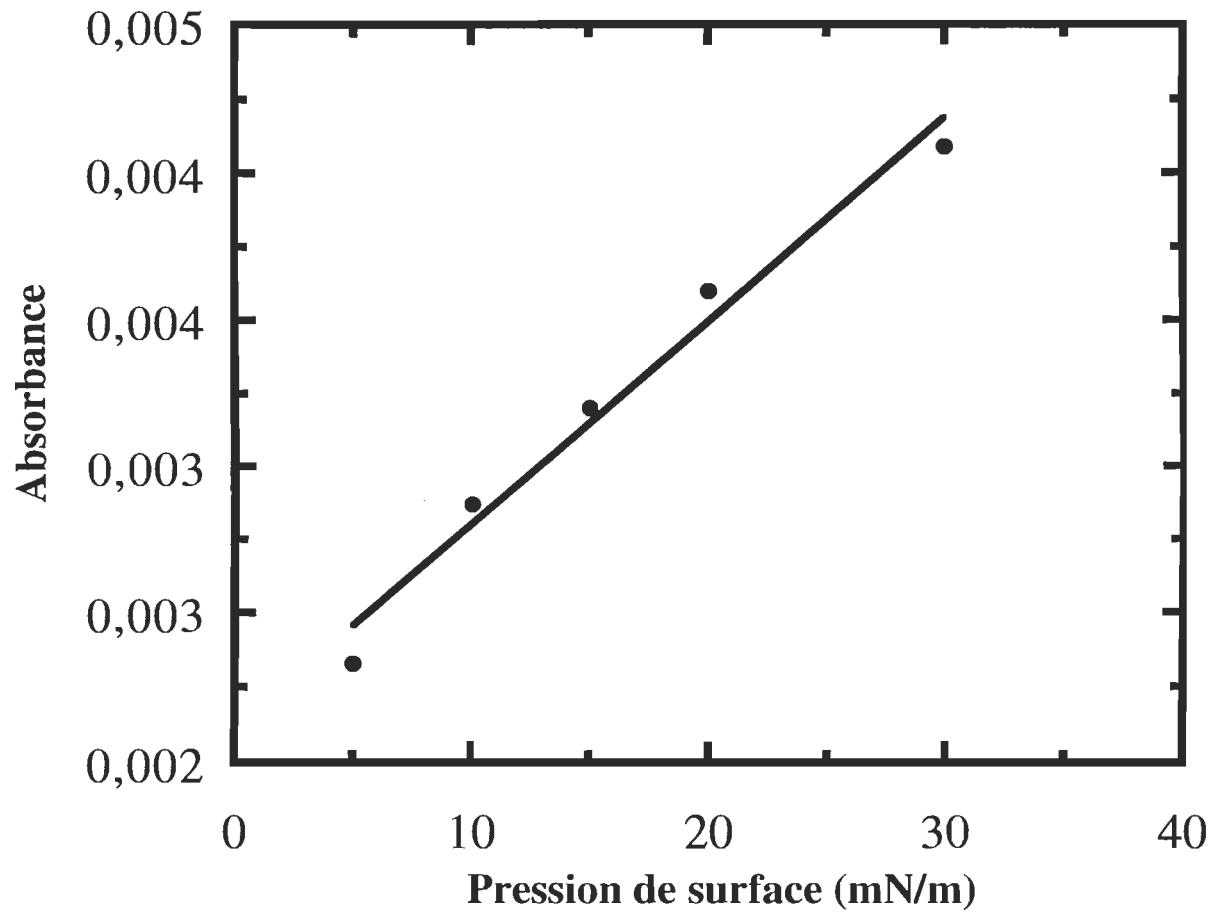


Figure 27. Absorbance d'un film de M.P. à l'interface air-eau en fonction de la pression de surface. Pour des pressions de surface allant de 5 à 30 mN/m, la relation entre l'absorbance et la pression de surface est linéaire.

5.3 Mesure de l'orientation de la bR par quenching de fluorescence

5.3.1 Cas en suspension

Les spectres de fluorescence d'une suspension de M.P. pris à des concentrations croissantes en KI sont présentés à la Fig. 28 (voir le tableau 2, section 4.2.5 pour les concentrations en KI utilisées). La détermination quantitative du degré d'accessibilité est faite selon l'équation de Stern-Volmer modifiée (éq. 6, voir section 2.4), où f_a représente directement la fraction des fluorophores accessibles au quencher. Ce graphique de Stern-Volmer modifié pour le cas du quenching de fluorescence des M.P.-FITC en suspension est présenté à la figure 29. On remarque ici que les points expérimentaux obtenus suivent l'allure d'une droite, l'intensité du maximum de fluorescence du FITC à 520 nm diminuant en fonction d'une concentration croissante de quencher dans la sous-phase. Il s'agit là d'un comportement typique de quenching de fluorescence en solution/suspension (Lakowicz, 1983) où l'une des constantes de quenching (généralement K_S) devient négligeable vis-à-vis l'autre. Ainsi, l'équation polynomiale de degré 2 (éq. 6) devient linéaire par rapport à la concentration en quencher. Une extrapolation de $I_0/\Delta I$ à une concentration infinie en quencher (soit à $1/[KI] = 0$ sur ce graphique) nous indique que la fraction de fluorophores accessibles dans nos suspensions de M.P.-FITC est de 1,0 (Fig. 29). Le KI a donc librement accès à toutes les fluorescéines liées à la bR.

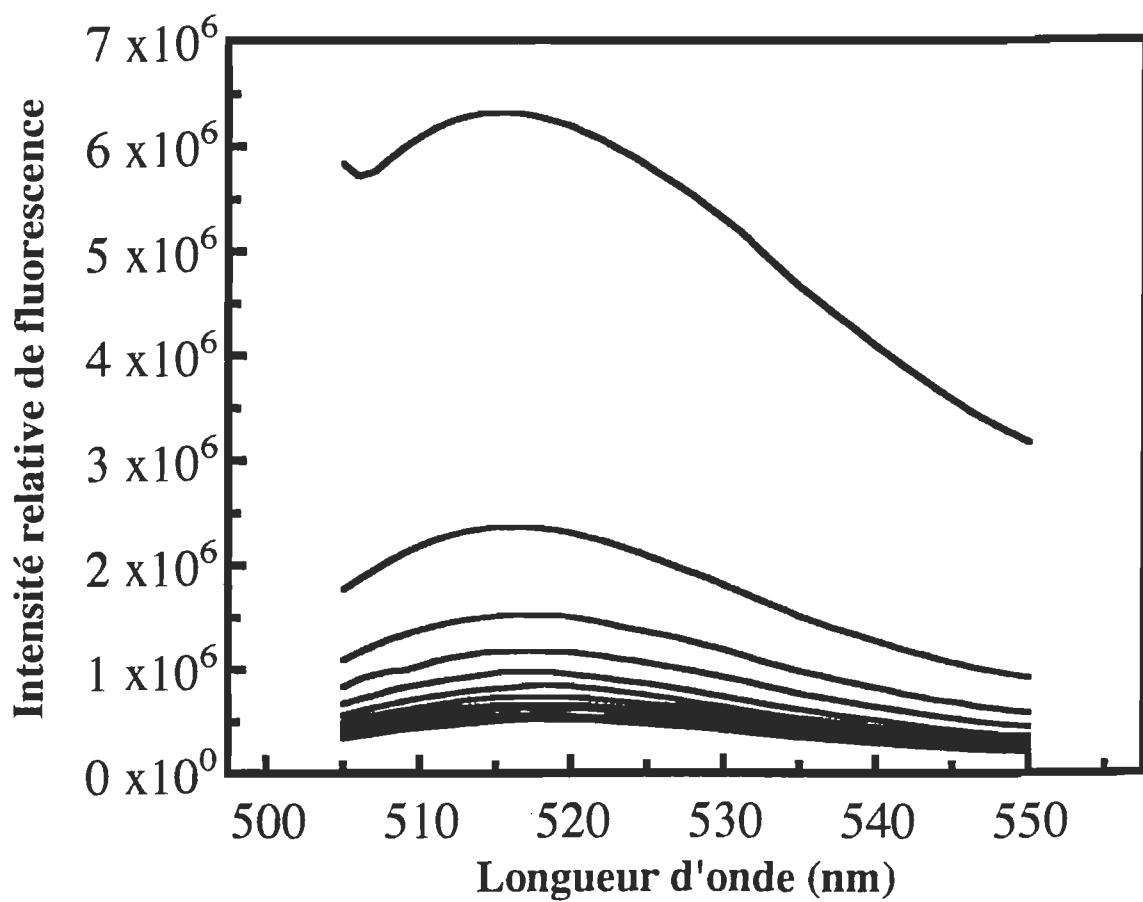


Figure 28. Spectres de fluorescence d'une suspension de M.P. en fonction d'une concentration croissante en quencher (KI). Le spectre du haut est celui correspondant à une concentration nulle en KI. Les spectres subséquents ont été pris avec une concentration en KI croissante de la façon décrite au Tableau 2.

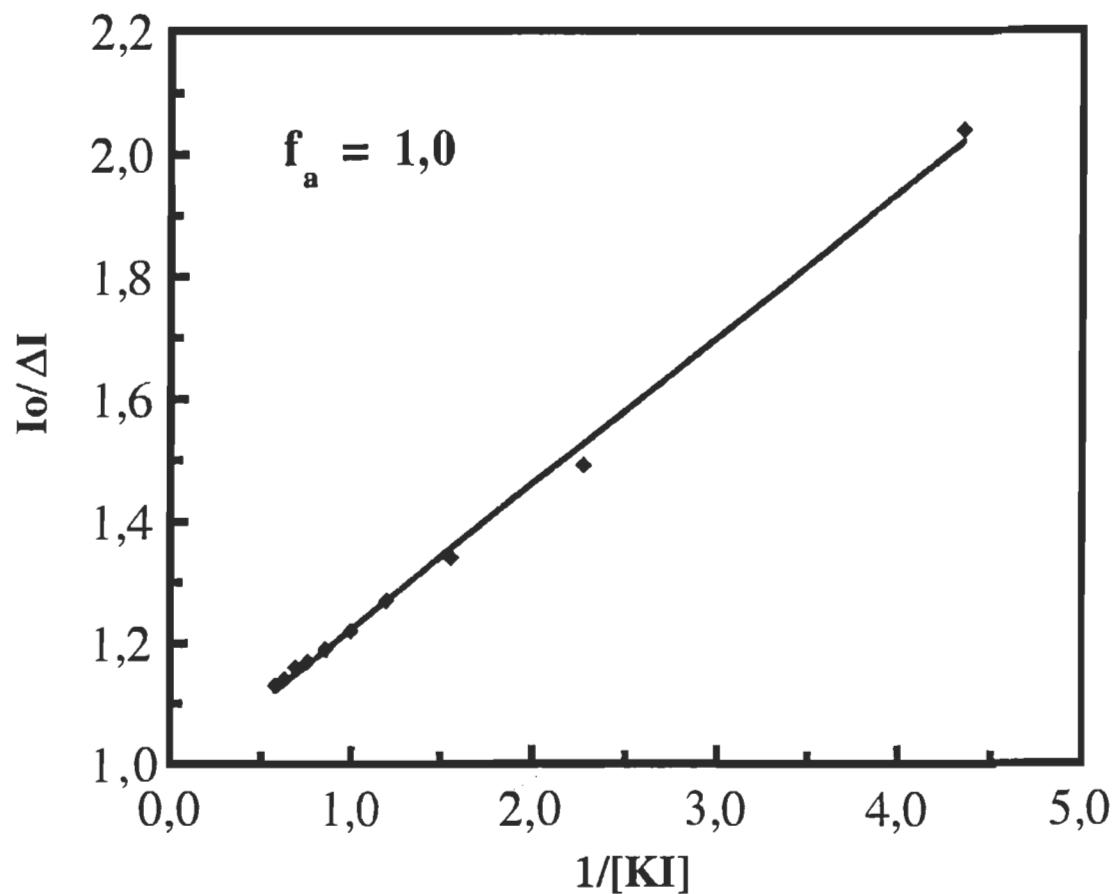


Figure 29. Graphique de Stern-Volmer modifié; expérience de quenching en suspension. $(I_0/\Delta I)^{-1}$ fournit f_a , la fraction des fluorophores accessibles au quencher. Une valeur de f_a de 1,0 signifie que tous les fluorophores sont accessibles.

Les mesures de quenching de fluorescence à l'interface air-eau ont ainsi pu être entreprises car toute fluorescence résiduelle après extrapolation de $I_0/\Delta I$ à concentration infinie en quencher sera nécessairement attribuée à des M.P. ayant leur côté extracellulaire exposé à l'air (voir Fig. 7).

5.3.2 Cas à l'interface air-eau; également dans le masque de restriction

D'une façon similaire aux suspensions de M.P.-FITC, nous avons fait des expériences de quenching de fluorescence à l'interface air-eau afin de déterminer l'orientation des M.P.-FITC dans cet environnement. Des monocouches de M.P.-FITC furent étalées à l'interface air-eau directement dans le masque de restriction (voir section 4.2.4) et des spectres de fluorescence furent pris *in situ* pour des concentrations croissantes de quencher dans la sous-phase (Fig. 30). La détermination quantitative de l'orientation des M.P.-FITC s'est faite selon l'équation de Stern-Volmer modifiée (éq. 6), la fraction accessible f_a correspondant ici directement à la fraction des M.P. ayant leur face extracellulaire tournée vers la sous-phase (Fig. 7).

La Fig. 31 montre que ce type de quenching diffère sensiblement du cas en suspension. Les intensités maximales de fluorescence du FITC à 520 nm diminuent toujours selon une augmentation de la concentration de KI dans la sous-phase, mais le comportement de quenching n'est plus le même. En effet, on remarque que les points expérimentaux ne suivent plus l'allure d'une droite.

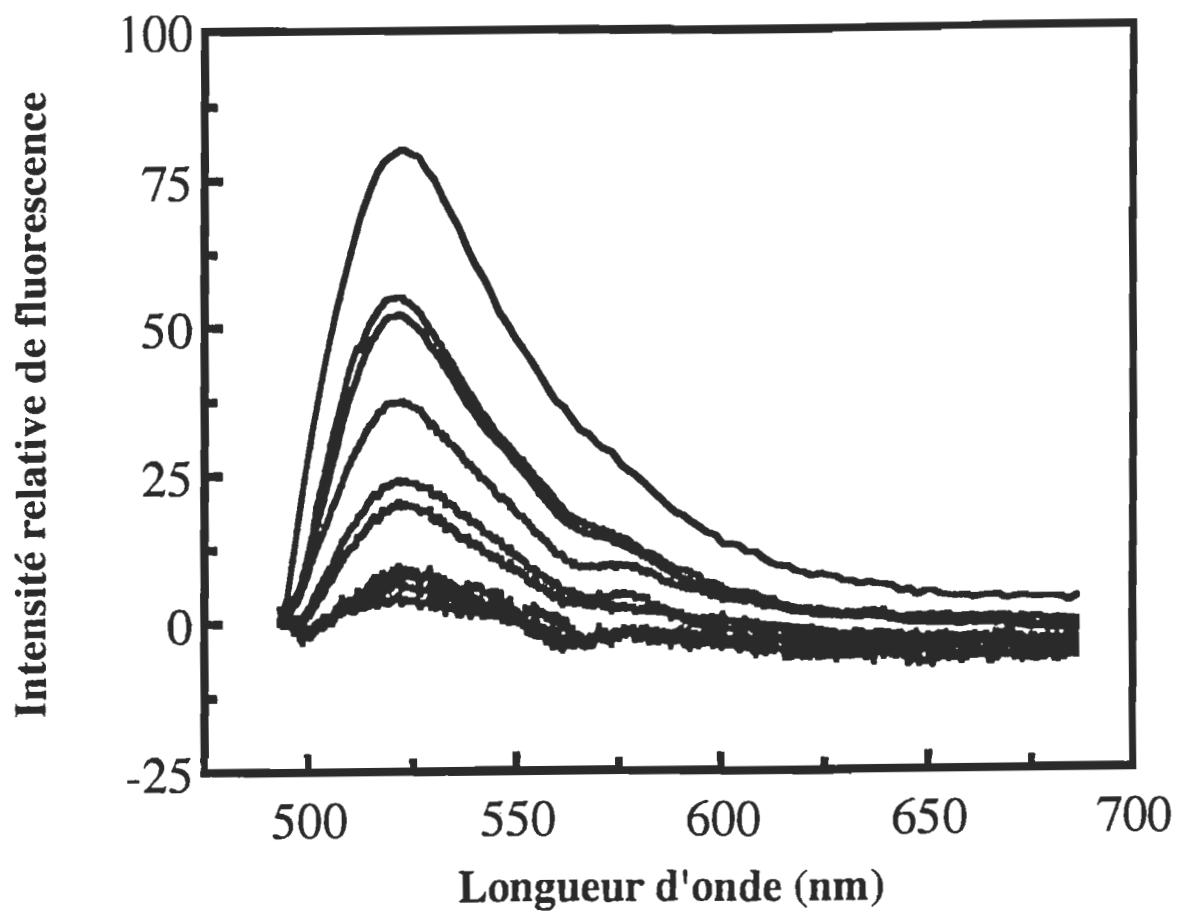


Figure 30. Spectres de fluorescence d'un film de M.P. à l'interface air-eau (étalement dans le masque de restriction) en fonction d'une concentration croissante de KI dans la sous-phase. Le spectre du haut a été pris en absence de quencher et les spectres subséquents correspondent à des concentrations croissantes de KI (voir section 4.2.4).

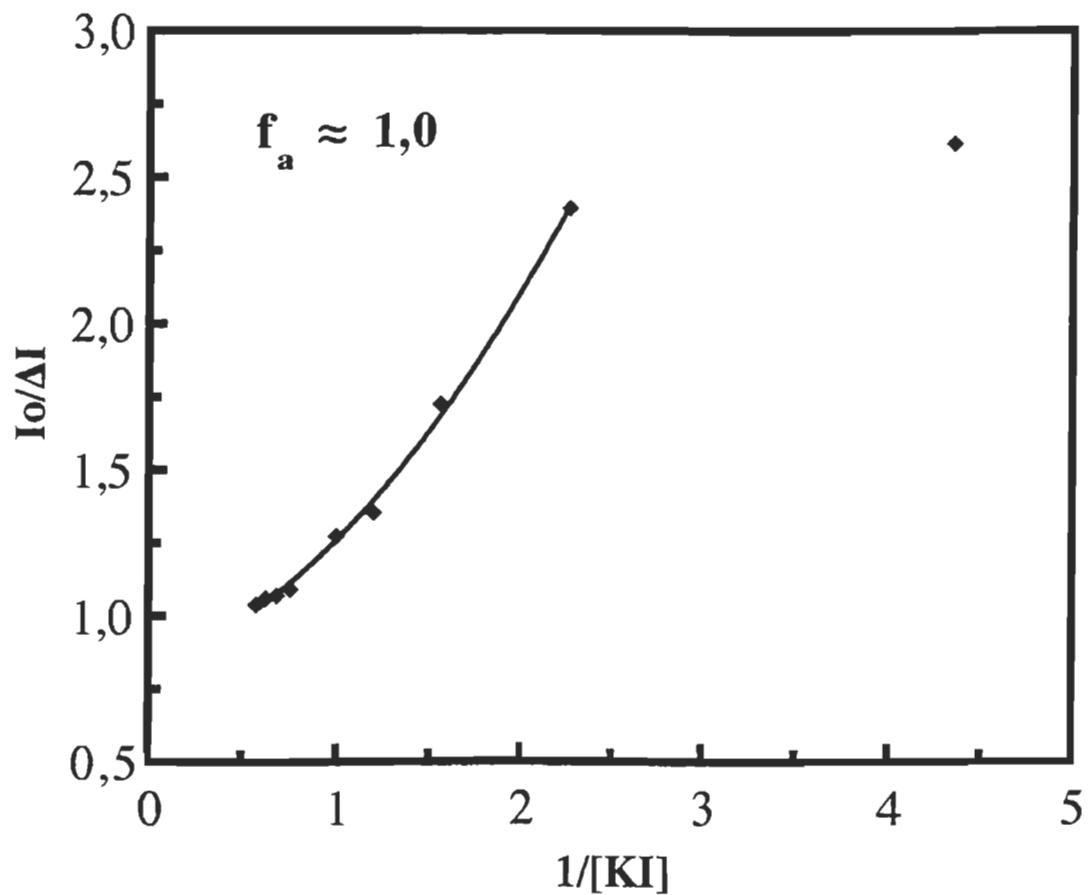


Figure 31. Graphique de Stern-Volmer modifié; expérience de quenching à l'interface air-eau (étalement dans le masque de restriction). L'extrapolation de $I_0/\Delta I$ à une concentration infinie en KI donne une f_a de 1,0, ce qui signifierait une orientation de 100% pour les M.P. à l'interface air-eau. Cette hypothèse sera par contre invalidée par les expériences de quenching où l'étalement des M.P.-FITC s'est fait hors du masque de restriction.

Si l'on considère tous les points expérimentaux, à l'exception du dernier aux grandes valeurs de $1/[KI]$, ils peuvent être lissés à l'aide d'une équation polynomiale de deuxième degré (courbe en trait plein, Fig. 31). Le dernier point (aux grandes valeurs de $1/[KI]$) dévie cependant clairement d'un comportement polynomial de second degré. Nous avons obtenu le même type de comportement pour les trois expériences de quenching que nous avons effectuées à l'interface air-eau.

Nous croyons que la différence principale entre les résultats obtenus en suspension et à l'interface air-eau peut être expliquée, du moins en partie, par un mode de quenching différent dans les deux cas. En effet, la théorie de Stern-Volmer prédit un comportement polynomial du deuxième degré pour un quenching de fluorescence dont les deux constantes de quenching, statique et dynamique (K_S et K_D , respectivement; voir équation 6), sont non-nulles.

Le lissage à l'aide d'un polynôme du deuxième degré que nous avons effectué sur les points expérimentaux (à l'exception du dernier) a un coefficient de corrélation (r^2) de 0,99, ce qui constitue à notre avis un bon indicatif d'une contribution équivalente des processus statique et dynamique au quenching global. Quant à la déviation du point aux grandes valeurs de $1/[KI]$, nous avançons l'hypothèse qu'elle puisse être reliée à un phénomène d'interface tel celui de la couche ionique diffuse. La monocouche de M.P. possède en effet, à $pH = 9,0$, une charge électrique nette négative qui résulte de la sommation d'un grand nombre de charges ponctuelles. Ceci attire des contre-ions (principalement les ions K^+) de la sous-phase à venir former une couche ionique de charge opposée directement sous le film (voir Brullemans

(1989) pour une description détaillée du phénomène de la couche ionique diffuse). Le champ électrique et le potentiel chimique causés par cette première séparation de charges feront en sorte qu'une certaine quantité de co-ions (principalement les ions I^-) pourraient migrer du cœur de phase vers la couche diffuse. Le résultat global de ce phénomène sera qu'une concentration plus grande en co-ions I^- se retrouverait près de la monocouche comparativement au cœur de phase. Ce gradient de concentration entre l'interface et le cœur de phase (gradient qui s'amenuise d'ailleurs avec une concentration en KI croissante dans la sous-phase) sera encore plus grand dans le cas des contre-ions K^+ . Donc, la concentration de KI calculée pour l'ensemble de la sous-phase constituerait une sous-estimation de la concentration réelle présente directement sous l'interface. En ce sens, la déviation observée aux grandes valeurs de $1/[KI]$ (soit à la plus faible concentration en KI; 230 mM, voir tableau 3) pourrait ainsi s'expliquer par une concentration interfaciale en KI supérieure (et donc par un quenching plus important) à celle du cœur de phase. Il ne s'agit cependant ici qu'une tentative d'explication. Ce phénomène, qui déborde du cadre de ce travail, nécessiterait une analyse beaucoup plus approfondie avant de pouvoir tirer des conclusions valables à son sujet.

Pour ce qui est du calcul de l'orientation des M.P., la détermination de f_a se fait par extrapolation de $I_0/\Delta I$ à concentration infinie en quencher sur le graphique de Stern-Volmer modifié (Fig. 31). Or, on constate sur ce graphique que même avec une concentration en KI de seulement 1,71 M dans la sous-phase ($1/[KI] = 0,58$), la valeur de $I_0/\Delta I$ est déjà tombée à 1,04.

Nous en concluons qu'à concentration infinie en KI, toute la fluorescence serait quenchée (donc $f_a = 1,0$), ce qui revient à dire que toutes les M.P.-FITC seraient orientées avec leur côté extracellulaire vers la sous-phase (Fig. 7). Nous verrons cependant à la section suivante que ces résultats sont probablement dus à un artefact, un certain nombre de M.P.-FITC pouvant ici se retrouver sous le film et contribuer à l'intensité de fluorescence initiale.

5.3.3 Cas à l'interface air-eau; étalement en dehors du masque de restriction

On peut voir, comme dans les cas précédents, que la fluorescence diminue au fur et à mesure qu'on ajoute du KI. Le comportement de quenching est présenté à la Fig. 32 (voir section 4.2.4). Le graphique de Stern-Volmer modifié correspondant à cette expérience est présenté à la Fig. 33.

La différence principale entre les résultats obtenus pour les deux méthodes d'étalement se situe au niveau de f_a : alors qu'avec la méthode d'étalement dans le masque nous obtenions une f_a de 1,0, la meilleure extrapolation à concentration infinie en quencher pour le cas de l'étalement en-dehors du masque donne une f_a d'environ 0,5 (c'est à dire, une orientation aléatoire où 50% des bR auraient leur côté extracellulaire tourné vers la sous-phase).

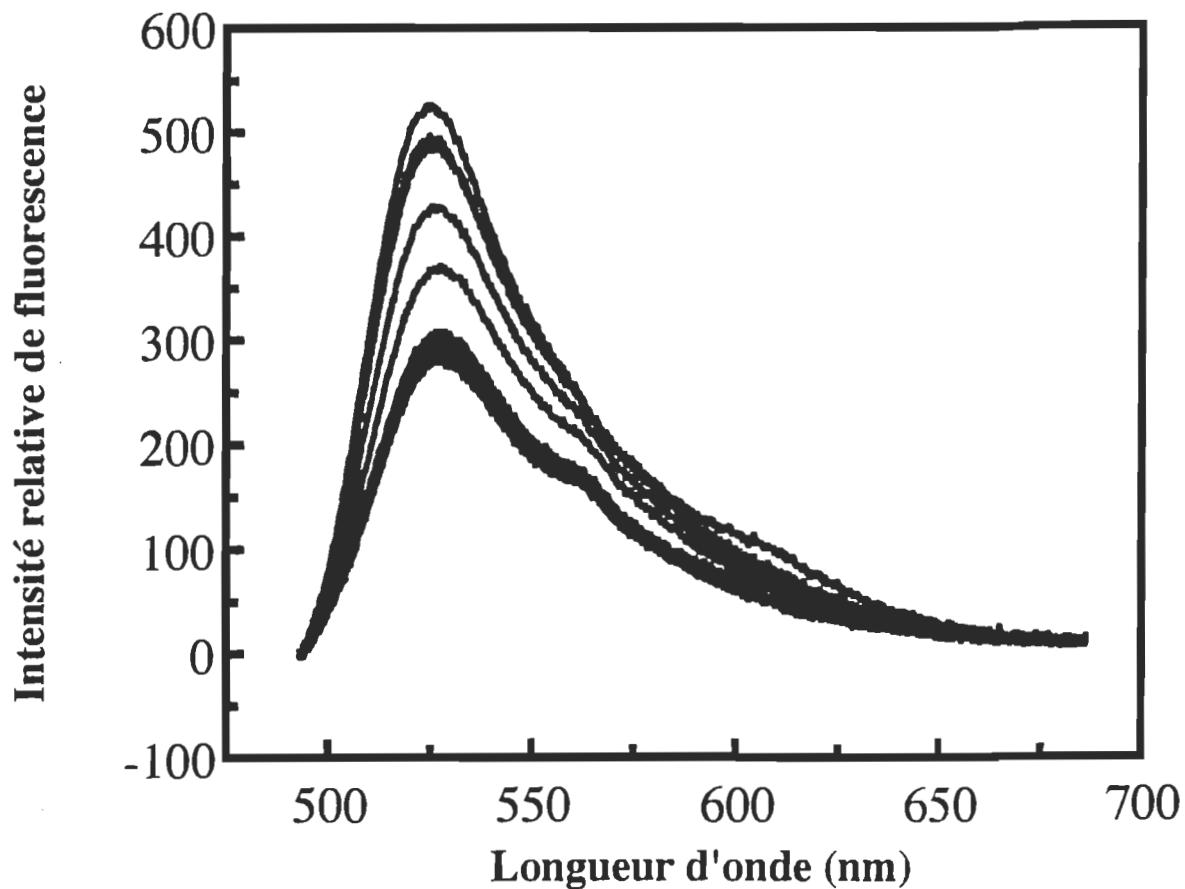


Figure 32. Spectres de fluorescence d'un film de M.P. à l'interface air-eau (également hors du masque de restriction) en fonction d'une concentration croissante de KI dans la sous-phase. Notons la présence d'une importante fluorescence résiduelle même avec une concentration de plus de 2 M de KI dans la sous-phase.

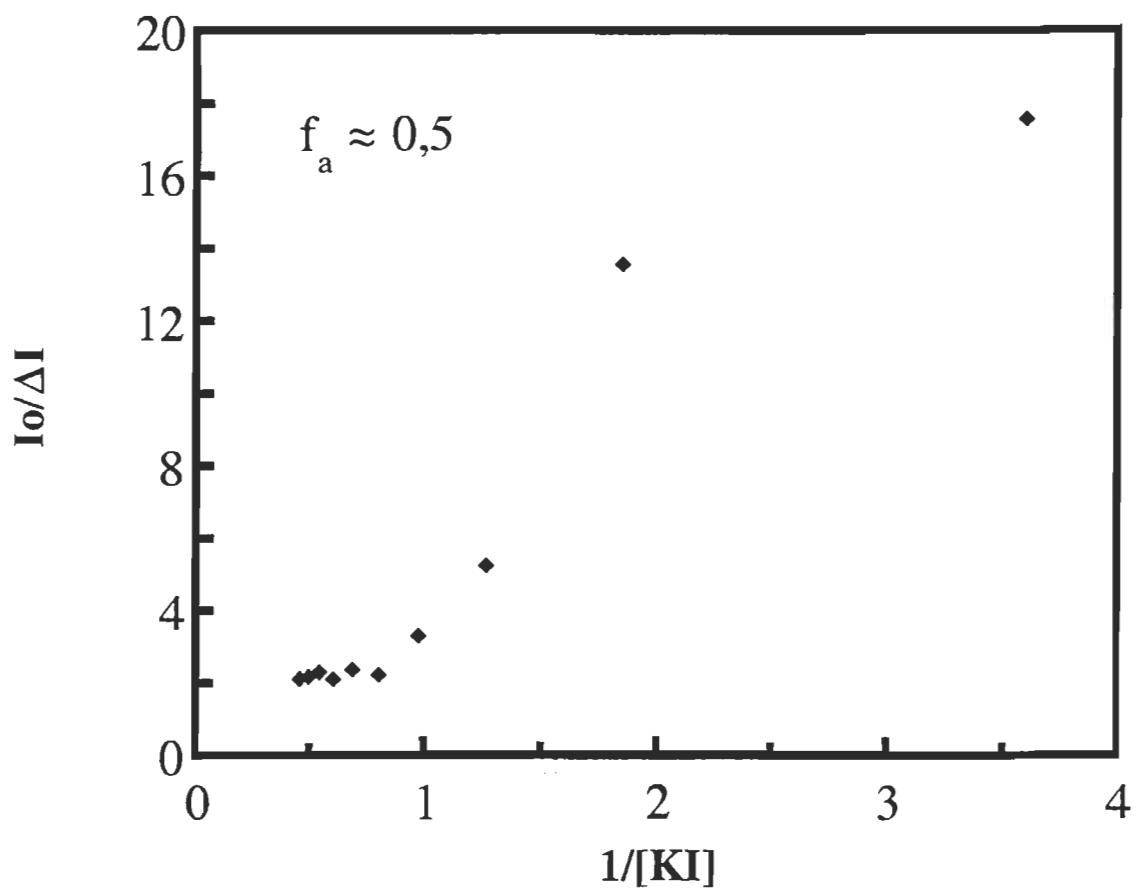


Figure 33. Graphique de Stern-Volmer modifié; expérience de quenching à l'interface air-eau (étalement hors du masque de restriction). La valeur de $Io/\Delta I$ tendant vers 2,0 aux plus faibles valeurs de $1/[KI]$, f_a est alors estimée à 0,5, ce qui signifierait une orientation aléatoire (50%) des M.P. à l'interface air-eau.

Notons cependant qu'aucun type de lissage (polynomial, exponentiel,...) ne permet de traduire fidèlement la répartition des points expérimentaux obtenus et encore moins de fournir une valeur fiable de l'ordonnée à l'origine (extrapolation de $I_0/\Delta I$ à une concentration infinie en quencher).

En regardant à la fois les spectres de fluorescence (Fig. 32) et le graphique de Stern-Volmer modifié (Fig. 33), on constate que l'intensité de fluorescence résiduelle atteint une valeur minimale pour les six derniers ajouts de KI, ce qui n'était pas le cas lors des expériences où les M.P. étaient étalées directement dans le masque (voir section précédente). Il semble donc que le quenching atteigne déjà ici une efficacité maximale à une concentration de KI de 1,25 M ($1/KI = 0,8$) et que la valeur de $I_0/\Delta I$ à concentration infinie en quencher soit de 2 (voir Fig. 33), correspondant à une f_a de 0,5.

Cette différence majeure entre les mesures de f_a obtenues par ces deux modes d'étalement peut être expliquée par l'hypothèse suivante: lors de l'étalement, des fragments de M.P. sont perdus dans la sous-phase (ce fait a été mis en évidence par l'obtention de faibles valeurs d'aire moléculaire lors des isothermes de pression de surface et par d'autres méthodes que l'on verra plus loin). Or, *si l'étalement des M.P. s'effectue dans le masque de restriction*, une partie des fragments de M.P. perdus dans la sous-phase lors de l'étalement pourra contribuer à l'intensité totale de fluorescence détectée (notons que le spectrofluorimètre à l'interface air-eau peut détecter la fluorescence provenant de n'importe quel point le long de la normale à

l'interface air-eau sur une distance de \pm quelques μm de part et d'autre du point focal, i.e.: la monocouche). Les mesures de quenching de fluorescence faites dans ces conditions comprennent alors possiblement une contribution provenant de deux populations de M.P.; l'une à l'interface air-eau (avec un seul côté membranaire accessible au quencher) et l'autre submergée sous la première (et ayant les deux côtés membranaires accessibles au quencher). Si la quantité de M.P. composant la dernière population est assez importante, le résultat obtenu indiquera une f_a très grande (comme c'est le cas avec l'étalement dans le masque). D'un autre côté, *si l'étalement des M.P. a lieu à l'extérieur et suffisamment loin du masque de restriction* et que le film de M.P. est ensuite comprimé dans ce masque, seule la population à l'interface air-eau demeure présente lors des expériences de quenching. La suite logique de ce raisonnement porte à croire que les résultats obtenus avec un étalement en dehors du masque sont plus pertinents, la f_a de 0,5 réflétant plus fiablement, pensons-nous, l'orientation de la bR à l'interface air-eau.

Il faut cependant se rendre à l'évidence à l'effet que la méthode de détermination de l'orientation de la bR par quenching de fluorescence à l'interface air-eau possède ses limites. Hormis les difficultés d'ordre technique inhérentes à cette méthode, le facteur limitant en termes de précision sur la mesure d'orientation demeure la fiabilité que l'on peut escompter de l'extrapolation de $I_0/\Delta I$ à concentration infinie en KI. Cette extrapolation pour le cas du quenching à l'interface air-eau est d'autant plus difficile qu'aucun lissage ne permet de traduire fidèlement la répartition des points expérimentaux obtenus. Le cas du quenching en suspension est quant à lui plus simple étant donné que la relation entre $I_0/\Delta I$ et $1/[KI]$ est linéaire;

l'extrapolation de $I_0/\Delta I$ à concentration infinie en quencher est alors simplement calculée grâce à l'équation de la droite reliant les points expérimentaux. En somme, il est de notre avis que les mesures d'orientation de la bR faites par quenching de fluorescence doivent être envisagées avec précaution et discernement.

5.4 Réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau

5.4.1 La courbe de réflectivité des rayons-X

La Fig. 34 montre une courbe de réflectivité pour un film de M.P. à 26 mN/m. Cette courbe est normalisée par rapport à la réflectivité d'une interface où la densité électronique, $\rho(z)$, change de façon abrupte de zéro (air) jusqu'à la densité du tampon, $\rho_t = 0,334 \text{ e/}\text{\AA}^3$. L'axe horizontal du graphique représente le moment de transfert d'inertie (Q_z), un paramètre qui est directement proportionnel à l'angle d'incidence (α_i) des rayons-X pour des faibles valeurs de α_i (voir équation 8, section 2.5). L'axe vertical du graphique principal représente la réflectivité normalisée, R/R_F . Pour ce qui est de l'encart à la Fig. 34, l'axe horizontal représente la dimension perpendiculaire à l'interface air-eau (Z) alors que l'axe vertical indique la densité électronique du milieu sondé (ρ) en $\text{e/}\text{\AA}^3$. Cet encart est le profil de densité électronique du film de M.P. Ce profil de densité électronique est le résultat de calculs qui sont faits directement à partir de la courbe de réflectivité des rayons-X. La Fig. 35 montre comment ce profil de densité électronique est ensuite utilisé pour extraire les informations d'épaisseur homogène, d'épaisseur totale et de rugosité du film (voir ci-dessous).

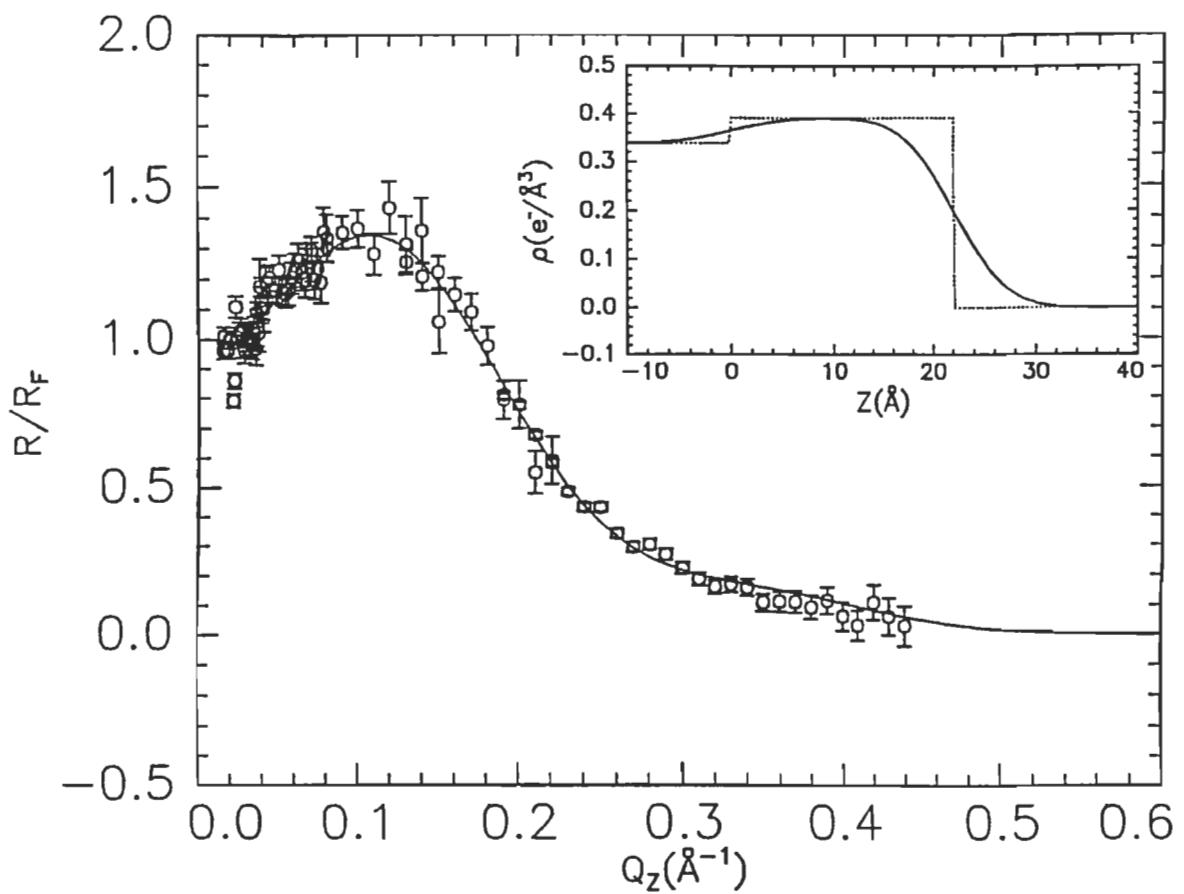


Figure 34. Courbe normalisée de réflectivité des rayons-X d'un film de M.P. à une pression de surface de 26 mN/m (encart: profil de densité électronique du même film).

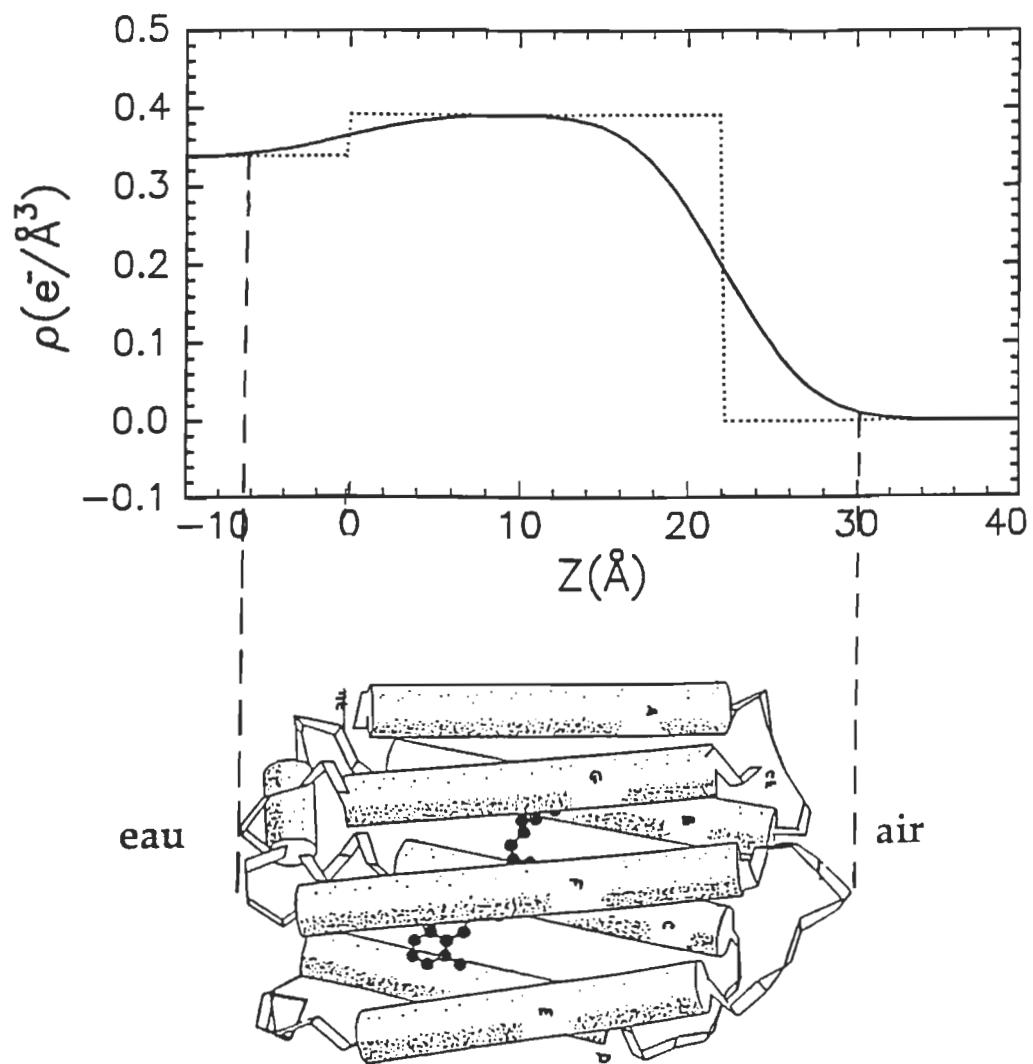


Figure 35. Relation postulée entre le profil de densité électronique et la structure de la bR. Les pointillés définissent la zone d'équidensité électronique et délimitent l'épaisseur homogène du film, alors que les lignes discontinues délimitent l'épaisseur totale du film qui peut être reliée à la longueur de la protéine.

5.4.2 Profil de densité électronique

La Fig. 35 nous fournit directement l'information sur la distribution de la densité électronique selon un profil de profondeur (i.e.: perpendiculairement à l'interface air-eau). En allant de gauche à droite sur ce graphique (donc, selon la dimension de l'épaisseur du film), on repère sur l'échelle "y" la densité électronique du milieu pour une profondeur allant de -10 Å (dans la sous-phase) jusqu'à 40 Å (dans l'air), 0 Å correspondant à l'interface eau-film. À -10 Å, la densité électronique mesurée ($0,334 \text{ e/Å}^3$) est simplement celle de la sous-phase (eau). En remontant de plus en plus vers l'air (i.e.: vers les grandes valeurs de "Z"), la densité électronique augmente dû à la présence du film de M.P. à l'interface. Cette densité atteint un maximum vers $Z = 10\text{Å}$, puis redescend finalement jusqu'à une densité nulle vers 32 Å. Cette densité électronique correspond alors simplement à celle de l'air.

5.4.3 Épaisseur totale et épaisseur homogène

Deux paramètres d'épaisseur peuvent être extraits d'un graphique comme celui de la Fig. 35: *l'épaisseur homogène* et *l'épaisseur totale* du film. En effet, une zone d'équidensité électronique est indiquée par une ligne pointillée sur ce graphique, la distance entre les bornes de cette zone (ici entre $Z = 0$ et $Z = 22 \text{ Å}$) définissant l'épaisseur homogène. Il s'agit bien sûr d'un concept simpliste d'interface où tous les électrons constituant le film seraient distribués de façon homogène à travers toute l'épaisseur du film, donnant ainsi lieu à des interfaces idéales eau-film et film-air (i.e.: étant

parfaitement définies dans le sens de la profondeur). Cette situation ne reflète cependant pas la réalité de façon satisfaisante. En effet, les interfaces eau-film et film-air ne peuvent montrer des frontières de densité électronique aussi clairement définies en raison de la structure même de la bR et de la M.P. (voir Figs. 1 et 7 ainsi que le schéma de la bR au bas de la Fig. 35). Bref, la densité électronique de la M.P. (et par le fait même, l'épaisseur de la M.P.) n'est pas homogène, mais varie plutôt d'une valeur maximale (au centre de la M.P.) à une valeur minimale (portion supérieure des boucles extra-membranaires de la bR).

Nous avons alors préféré utiliser le concept d'*épaisseur totale* où les électrons constituant le film sont répartis selon une distribution gaussienne, avec un maximum de densité électronique au centre de la distribution (la courbe en trait plein sur la Fig. 35). Les interfaces eau-film et film-air constituent les zones de plus faible densité électronique (boucles extra-membranaires de la bR) alors que la portion hydrophobe du film est la zone de densité maximale. Les bornes définissant l'*épaisseur totale* du film sont alors établies comme étant, du côté aqueux (voir ligne discontinue reliant le profil de densité électronique au schéma de la bR au bas de la Fig. 35):

- l'endroit où la densité électronique devient supérieure à celle de la sous-phase, i.e.: où on commence à détecter la contribution des électrons provenant du film.

et du côté de l'air:

- l'endroit où la densité électronique devient minimale, juste avant d'être nulle, i.e.: là où on détecte encore une contribution des électrons provenant probablement des boucles extramembranaires des protéines avant d'atteindre complètement l'air.

5.4.4 La rugosité de surface

La rugosité de surface indique en quelque sorte de combien le profil de densité électronique dévie du comportement "idéal" où les interfaces eau-film et film-air sont parfaitement définies (film parfaitement homogène). En termes plus concrets, la rugosité est un indicateur de la "topographie" du film; une faible valeur de rugosité est le signe d'une surface de film plutôt plane alors qu'une grande valeur de rugosité indique au contraire des variations plus importantes dans l'épaisseur du film (présence de "montagnes" et de "vallées" à la surface du film). On peut également visualiser le problème à une échelle encore beaucoup plus petite. Prenons le cas présenté à la Fig. 35. Si l'on considère un seul fragment de M.P., la rugosité est, d'un point de vue physique, la variation moyenne de l'épaisseur d'une M.P. d'un endroit à un autre de sa surface. La bR étant plus longue que l'épaisseur de la bicouche lipidique (à cause des boucles extramembranaires; voir Fig. 7), c'est elle qui va définir l'épaisseur maximale du film alors que la bicouche lipidique, plus mince, va définir l'épaisseur minimale du film.

D'un point de vue formel, la rugosité est définie comme étant le quart de la différence entre l'épaisseur totale et l'épaisseur homogène (puisque'on considère la rugosité indépendamment de chaque côté de la membrane). Ainsi, un film d'une épaisseur totale de 40 Å et d'une épaisseur homogène de 20 Å a une rugosité de 5 Å.

5.4.5 Épaisseur et rugosité des films de M.P. en fonction de la pression de surface

De façon à vérifier si des changements dans la structure des films avaient lieu en fonction de la compression des M.P. à l'interface air-eau, des courbes de réflectivité des rayons-X ont été mesurées avec des films de M.P. à des pressions de surface allant de 1 à 46 mN/m, un nouveau film étant préparé pour chaque mesure. La Fig. 36 montre l'épaisseur totale et homogène des films de M.P., ainsi que la rugosité de surface en fonction de la pression de surface. On peut y voir que l'épaisseur (totale et homogène) et la rugosité augmentent de façon importante en fonction de la pression de surface. Pour ce qui est de l'épaisseur (totale et homogène), elle est à son minimum à des pressions inférieures à 30 mN/m, puis augmente à des pressions latérales supérieures. L'épaisseur totale passe alors d'une valeur de 38-40 Å à des pressions de surface de 20-30 mN/m jusqu'à environ 51-52 Å à une pression de 46 mN/m. Sur une même plage de pressions de surface, la rugosité passe quant à elle d'environ 4 Å (20-30 mN/m) à plus de 5,5 Å (46 mN/m).

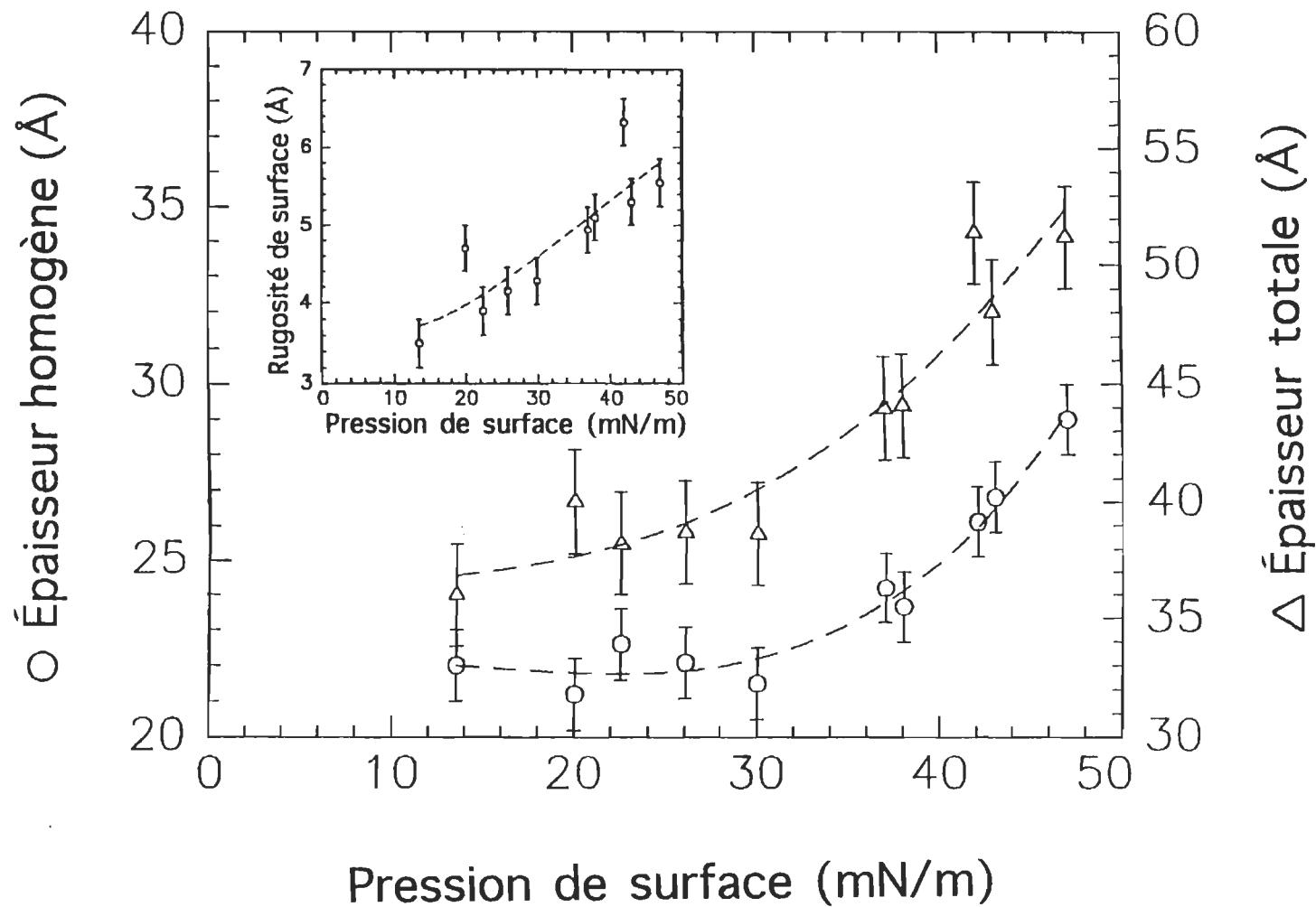


Figure 36. Épaisseur totale et homogène des films de M.P. en fonction de la pression de surface appliquée (encart: rugosité de surface de ces films en fonction de la pression de surface). On constate une nette augmentation d'épaisseur et de rugosité pour des pressions supérieures à 30 mN/m.

5.4.6 Courbes de réflectivité et profil de densité électronique à basse pression de surface

On doit également noter que des courbes de réflectivité ont été mesurées avec des films de M.P. à des pressions de surface aussi basses que 1 mN/m (Fig. 37). Dans ces cas, le lissage de la courbe de réflectivité était de moins bonne qualité et donnait lieu à une déformation du profil de densité électronique (voir l'encart de la Fig. 37).

L'origine physique à la base de ce phénomène demeure, quant à elle, ambiguë. Nous croyons cependant que le problème est relié au fait que le film de M.P. soit très inhomogène à faible pression de surface, possédant même des régions de la surface complètement dépourvues de M.P. (tel que le suggèrent d'ailleurs les résultats obtenus lors de la mesure des cycles CDR (section 5.6) et de microscopie de fluorescence (section 5.7)). De tels "trous" aux dimensions macroscopiques pourraient possiblement donner lieu à une intensité de rayons-X réfléchis qui varie en fonction du temps (l'enregistrement d'une courbe de réflectivité prend plus de six heures et nécessite un film ultra stable à l'interface air-eau), ce qui expliquerait l'aspect "bosselé" du lissage de la courbe de réflectivité présentée à la Fig. 37.

Quoi qu'il en soit, nous n'avons conservé que les résultats des mesures faites à plus de 10 mN/m pour lesquelles le lissage de la courbe de réflectivité et le profil de densité électronique étaient toujours de bonne qualité.

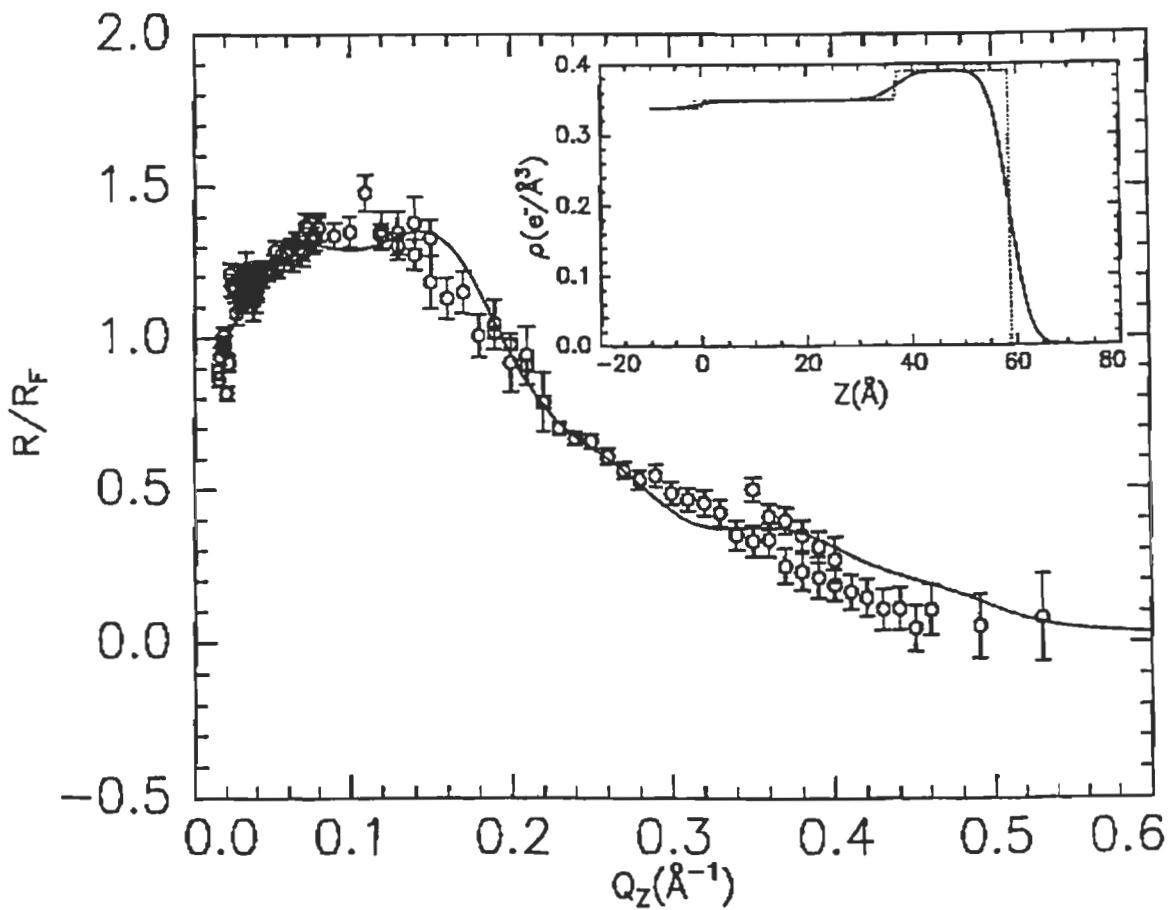


Figure 37. Courbe normalisée de réflectivité des rayons-X d'un film de M.P. à une pression de surface de 1 mN/m (encart: profil de densité électronique du même film). Le lissage obtenu pour cette courbe est de moins bonne qualité que pour les courbes de réflectivité mesurées à des pressions de surface de plus de 10 mN/m.

5.4.7 Origine physique de l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité

L'augmentation de la rugosité et de l'épaisseur (totale et homogène) en fonction de la pression de surface (pour des pressions de surface supérieures à 30 mN/m) constitue un indice quant à l'unicité du phénomène physique impliqué. En d'autres termes, ces deux paramètres sont probablement influencés par le (les) même(s) changement(s) structural(aux) affectant le film de M.P. Suite à ces résultats, nous émettons deux hypothèses pouvant expliquer ce comportement:

Hypothèse A: La pression latérale appliquée pourrait changer l'orientation des hélices- α de la protéine de façon à ce qu'elles soient plus redressées (plus parallèles à la normale de l'interface). D'une telle manière, l'épaisseur totale du film ainsi que la rugosité de surface s'en trouveraient augmentées (voir Fig. 38A). À noter qu'un tel changement d'orientation de la protéine a déjà été mesuré dans le cas de la rhodopsine par ellipsométrie (Salesse *et al.*, 1990).

Hypothèse B: La pression latérale pourrait forcer les fragments de M.P. à glisser les uns sur les autres tel que proposé à la Fig. 38B. L'épaisseur totale ainsi que la rugosité de surface mesurées seraient alors plus importantes.

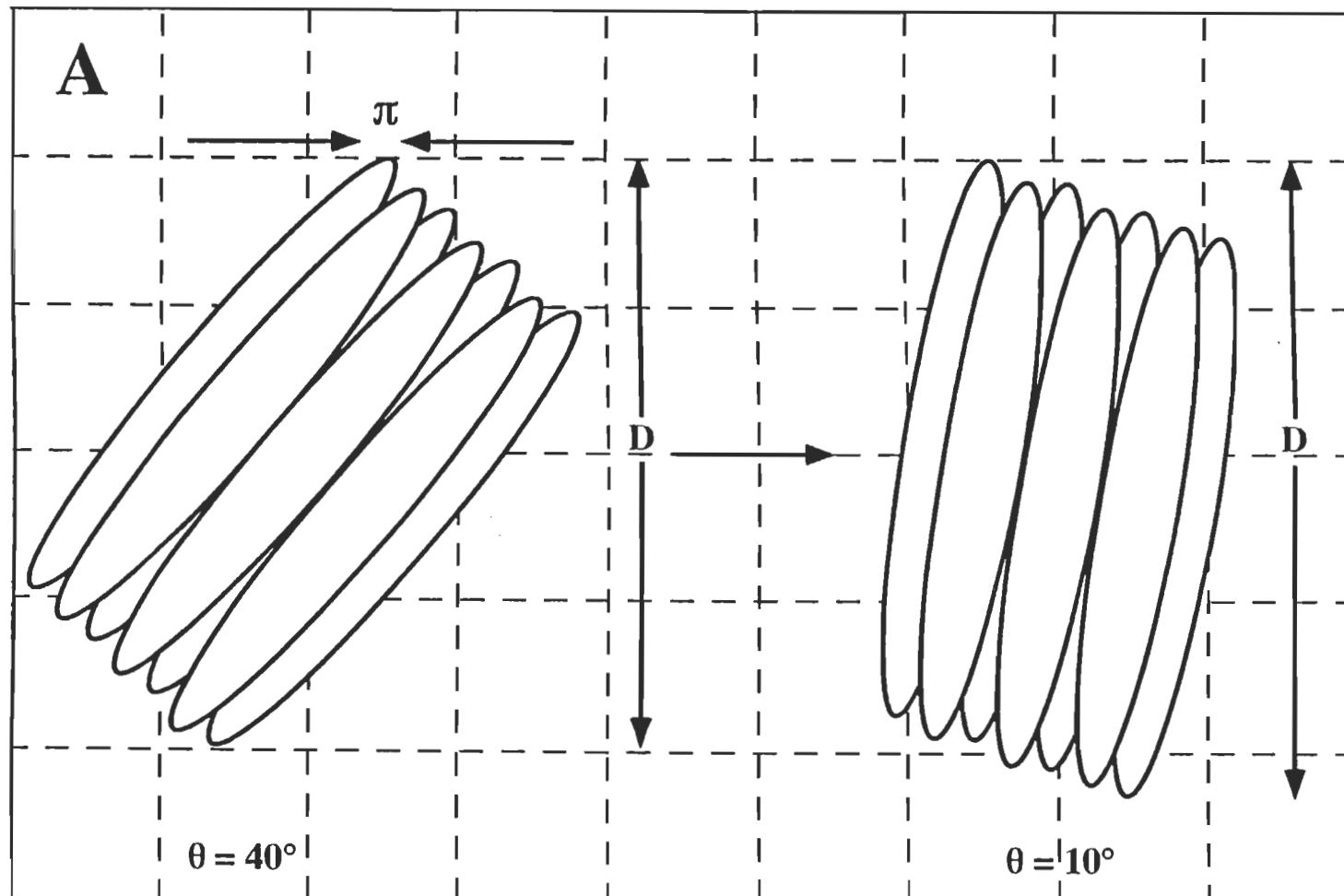


Figure 38A: Représentation schématique de l'hypothèse A formulée de façon à expliquer l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité en fonction de la pression de surface observée par réflectivité des rayons-X à plus de 30 mN/m. En postulant que les bR sont déjà inclinées à faible pression de surface, l'application d'une pression supplémentaire pourrait redresser la protéine et, par le fait même, entraîner une augmentation de la rugosité et de l'épaisseur (D) mesurée perpendiculairement à l'interface air-eau.

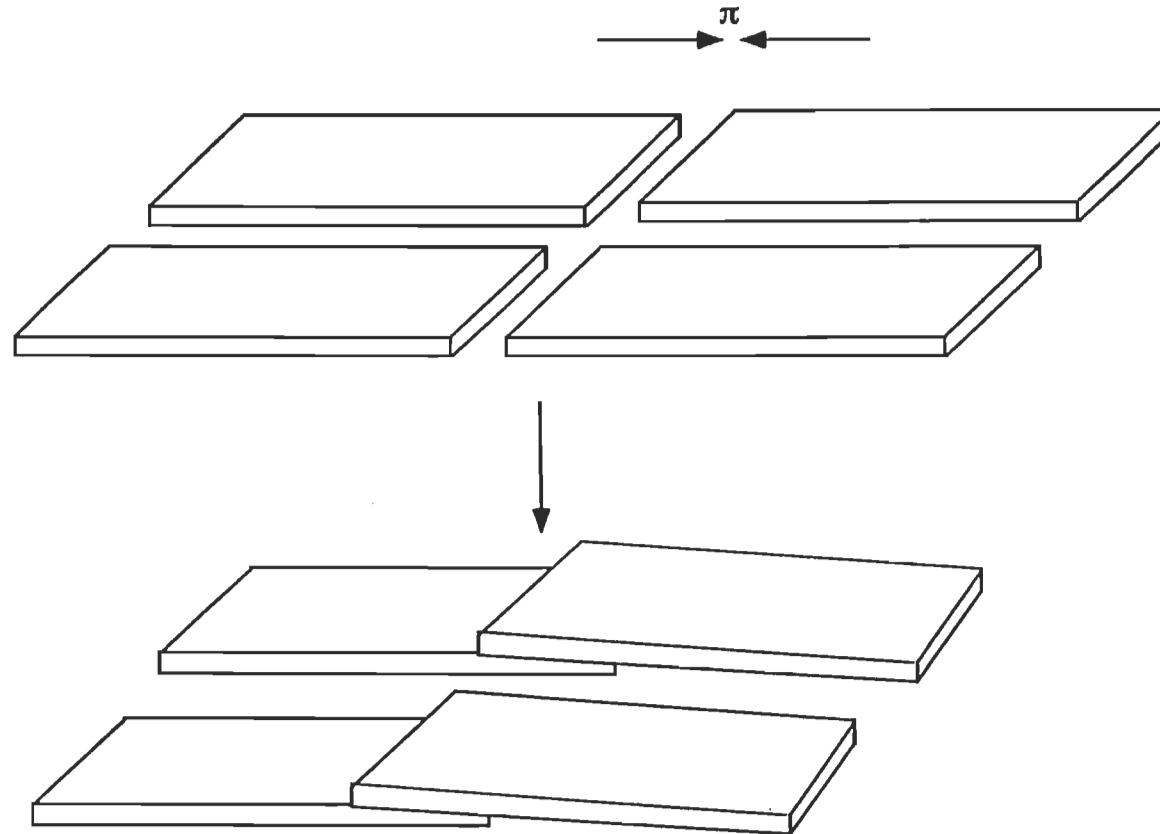
B

Figure 38B: Représentation schématique de l'hypothèse B. En postulant que les bR peuvent se superposer sans couler dans la sous-phase, l'application d'une pression de surface suffisante pourrait forcer la formation d'une structure multilamellaire et, par le fait même, entraîner une augmentation de la rugosité et de l'épaisseur mesurée perpendiculairement à l'interface air-eau.

Puisque la méthode de réflectivité des rayons-X n'est sensible qu'à la distribution de densité électronique le long de la normale à l'interface, il nous est impossible de trancher entre ces deux hypothèses uniquement sur la base de ces résultats. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers la technique de spectroscopie FTIR-ATR.

5.5 Spectroscopie FTIR-ATR

Lors de cette étude, nous avons pris des spectres FTIR-ATR d'échantillons de M.P. déposés sur des lamelles de Ge par la méthode LB à différentes pressions de surface. Le but de cette étude était, dans un premier temps, de trancher entre les hypothèses soulevées à la section précédente (réorientation de la bR ou la superposition des fragments de M.P.). Pour ce faire, nous avons mesuré l'angle d'inclinaison des hélices- α de la bR, et ceci pour des échantillons déposés à des pressions de surface allant de 10 à 46 mN/m. Dans un deuxième temps, notre étude allait consister à déterminer si la pression de surface était un élément important dans le type de conformation que la protéine allait adopter. Finalement, des mesures de l'intensité maximale de la bande amide I de la bR en fonction de la pression de surface ont été faites dans le but de vérifier l'hypothèse de la superposition des fragments de M.P. en fonction de la pression de surface.

5.5.1 Aspect qualitatif des bandes amide I et II de la bR

La Fig. 39 montre des spectres FTIR-ATR de la région des bandes amides I et II pour des films de M.P. déposés à 10, 20, 30, 40 et 46 mN/m.

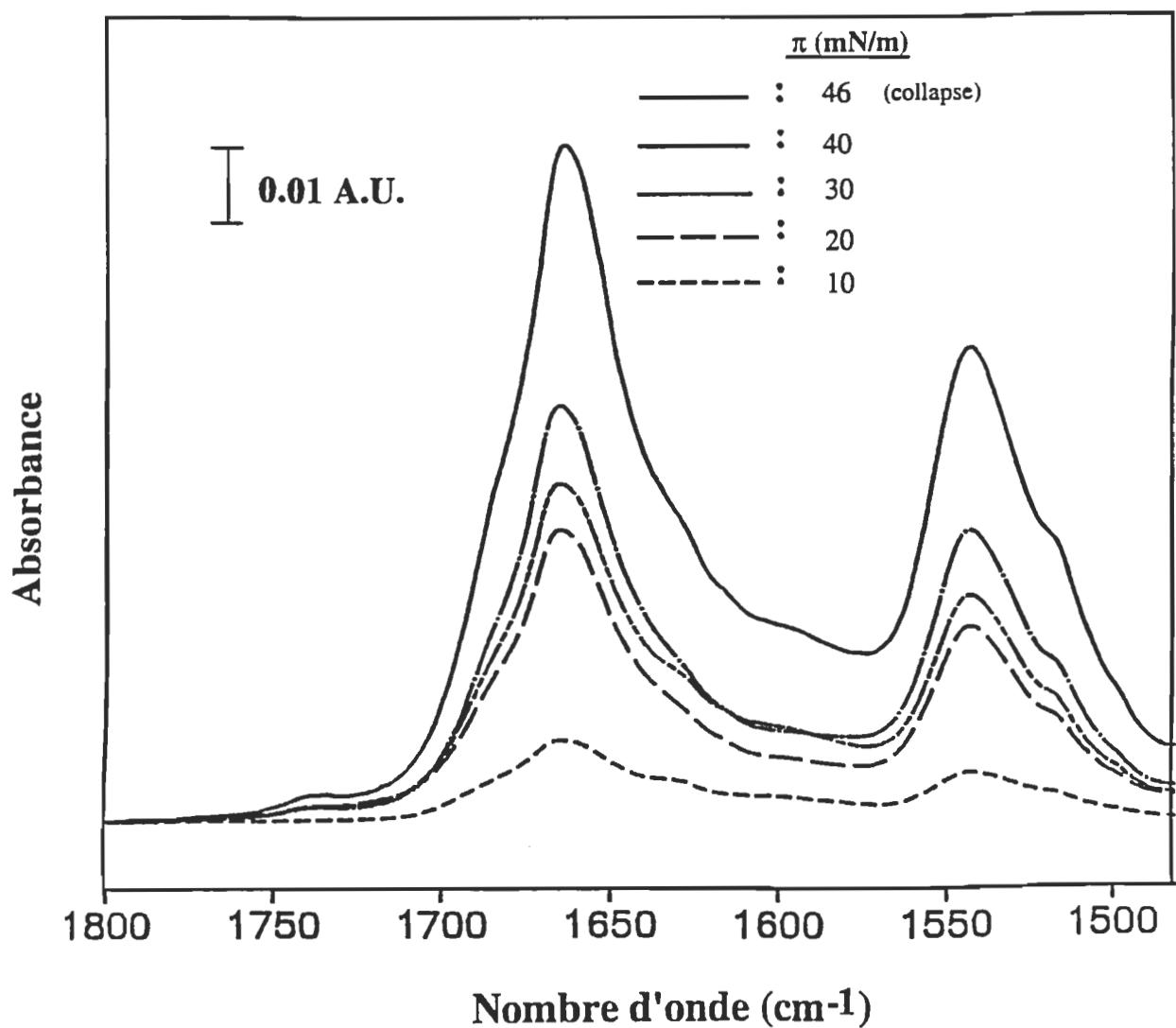


Figure 39. Spectres FTIR-ATR de films de M.P. pris dans la région des bandes amide I et II avec le polariseur parallèle au plan d'incidence. Ces spectres correspondent respectivement à des films de M.P. déposés à des pressions de surface de 10 à 46 mN/m.

Ces spectres ont été pris avec le polariseur parallèle au plan d'incidence. On peut voir que peu importe la pression de surface à laquelle s'est faite la déposition, les bandes amide I et II de la protéine sont localisées à 1664 et 1543 cm^{-1} , respectivement. De plus, des épaulements sont observés de chaque côté de la bande amide I à 1633 et 1688 cm^{-1} .

La position des bandes amide I et II est reconnue comme étant très sensible à la conformation adoptée par la protéine et peut donc être très utile pour déterminer la structure secondaire des protéines (Dousseau et Pézolet, 1990). L'obtention des bandes amide I et II à des fréquences respectives de 1664 et 1543 cm^{-1} , peu importe la pression de surface à laquelle s'est faite la déposition, est un bon indicatif que la conformation adoptée par la protéine demeure inchangée dans la gamme des pressions de surface allant de 10 à 46 mN/m . Autre fait à noter: lorsque le polariseur est parallèle au plan d'incidence, la fréquence de la bande amide I de la bR à 1664 cm^{-1} se trouve décalée vers les hautes fréquences d'approximativement 7-8 cm^{-1} comparativement à la plupart des protéines dont la conformation est majoritairement en hélice- α . Ce comportement particulier de la bR a été rapporté pour la première fois par Rothschild et Clark (1979) et il fut par la suite proposé par le groupe de Gibson et Cassim (1989) que la bR contient une proportion substantielle d'hélice dans la conformation de type α_{II} plutôt qu'une conformation exclusivement en α_I . Des calculs théoriques pour ce type de conformation en hélice α_{II} donnent une fréquence de 1540 cm^{-1} pour la bande amide II (Dwivedi et Krimm, 1984), ce qui se rapproche de la valeur mesurée de 1543 cm^{-1} .

De plus, les épaulements observés à 1633 et 1688 cm⁻¹ ont été assignés à une petite proportion de la structure totale qui serait en feuillet β (Rothschild et Clark, 1979; Jap *et al.*, 1983; Gibson et Cassim, 1989) ainsi qu'à la vibration C=N de la base de Schiff du rétinal (1633 cm⁻¹) (Earnest *et al.*, 1990).

5.5.2 Orientation des hélices- α de la bR en fonction de la pression de surface

Tel que décrit à la section 2.6, le calcul des rapports dichroïques s'effectue en divisant la valeur de l'absorbance de la bande amide I de la bR mesurée avec une radiation parallèle par celle mesurée avec une radiation perpendiculaire au plan d'incidence. Pour ce faire, nous avons pris des spectres FTIR-ATR dans ces deux plans de polarisation et ce, pour chacun des échantillons déposés à des pressions de surface différentes.

Un exemple de spectres pris avec ces deux polarisations pour un même échantillon déposé à 30 mN/m est présenté à la Fig. 40. On s'aperçoit au premier coup d'oeil de la forte tendance dichroïque des spectres (i.e.: de la grande différence entre les absorbances de la bande amide I dans les deux états de polarisation de la lumière), ce qui indique une *orientation préférentielle* des hélices- α . Un échantillon non-orienté donnerait en effet une absorption équivalente pour les deux polarisations.

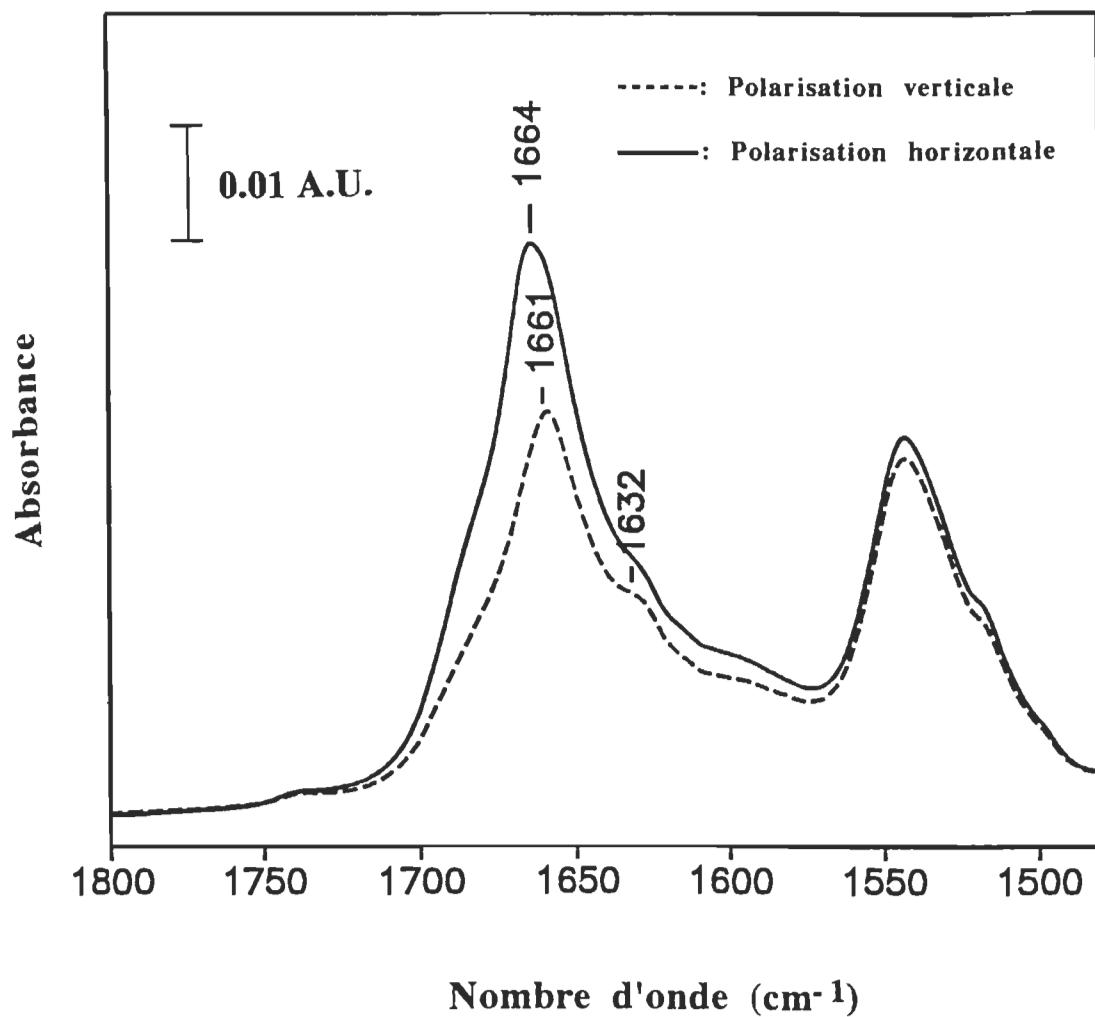


Figure 40. Spectres FTIR-ATR pris avec le polariseur parallèle (---) et perpendiculaire (—) au plan d'incidence d'un film de M.P. déposé à une pression de surface de 30 mN/m. Le fort dichroïsme observé pour la bande amide I indique que les hélices- α de la bR possèdent une orientation préférentielle.

Les rapports dichroïques (RATR), paramètres d'ordre ($f(\theta)$) et l'angle moyen (θ) que font les hélices- α de la bR avec la normale au cristal ATR sont donnés dans le tableau 3. On peut constater que les valeurs obtenues pour l'angle moyen θ des hélices- α de la bR se retrouvent dans l'intervalle de 39 à 41° et ceci peu importe la pression de surface à laquelle a été faite la déposition.

Le fait que l'angle d'inclinaison des hélices- α de la bR ne varie presque pas (moins de 2,5 degrés) en fonction de la pression de surface est un résultat très important dans le cadre de cette étude. En effet, il signifie que l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité des films de M.P. en fonction de la pression de surface, telle que mesurée en réflectivité des rayons-X pour des pressions supérieures à 30 mN/m, ne peut être attribuée à une réorientation de la protéine sous l'effet de la pression latérale, tel que proposé à la Fig. 38A. En effet, il est possible de calculer que la différence de moins de 2,5 degrés entre l'angle θ minimum et maximum (tableau 3) équivaut au maximum à une augmentation d'épaisseur de 1 Å. De plus, les valeurs d'angle θ obtenues (39-41°) diffèrent sensiblement de la valeur de moins de 26° rapportée auparavant par Rothschild et Clark (1979).

Cependant, deux lacunes majeures quant à la procédure expérimentale de Rothschild et Clark (1979) peuvent être soulignées. Ces lacunes découlent toutes deux d'un manque de contrôle des interactions intermoléculaires (protéine-protéine) dans la préparation des échantillons. En effet, ces chercheurs déposent une goutte d'une suspension aqueuse de M.P. sur une lamelle de verre qui est ensuite séchée sous un jet d'azote.

Tableau 3

Angle des hélices- α de la bR en fonction de la pression de surface*

π (mN/m)	(R ^{ATR})	f(θ)	(θ)
10	1,45	0,26	41,2
20	1,47	0,28	40,2
30	1,46	0,27	40,8
40	1,46	0,27	40,8
46	1,51	0,31	38,8

*: Les angles θ ont été calculés en utilisant $\alpha = 24^\circ$. Toutes ces valeurs représentent la moyenne de deux séries de mesures indépendantes.

Or, dans un premier temps, ces conditions expérimentales donnent lieu à un film où le nombre de couches de M.P. va varier d'un endroit à un autre de la surface de la lamelle (système de multicouches d'épaisseur variable). Dans un deuxième temps, cette méthode n'offre aucun contrôle du degré d'entassement moléculaire (nombre de bR par cm^2 ou cm^3). Par conséquent, les mesures d'orientation faites par Rothschild et Clark (1979) doivent être considérées avec beaucoup de prudence.

5.5.3 Absorbance de la bande amide I vs aire moléculaire

L'absorbance maximale des films de M.P. à 1664 cm^{-1} (bande amide I) a été portée en graphique en fonction de l'aire moléculaire de la bR (Fig. 41). Les points expérimentaux correspondent à un film de M.P. déposé à 10, 20, 30, 40 et 46 mN/m . La relation entre l'absorbance de ces films et l'aire moléculaire de la bR est linéaire. Autre fait intéressant, l'absorbance du dernier point expérimental (46 mN/m) est environ le double de celle du point à 40 mN/m , alors que l'aire moléculaire à 46 mN/m est approximativement égale à la moitié de l'aire correspondante à 40 mN/m .

Nous croyons d'une part que la relation linéaire entre l'absorbance et l'aire moléculaire indique que: 1) il ne se produit pas de perte substantielle de M.P. dans la sous-phase en cours de compression entre 10 et 46 mN/m ; fait déjà observé par spectroscopie d'absorption à l'interface air-eau (Fig. 27); 2) les dépositions LB sur les cristaux ATR sont de bonne qualité, les M.P. étant étalées de façon uniforme à leur surface (ceci se reflète également dans l'obtention de rapports de déposition toujours supérieurs à 0,9).

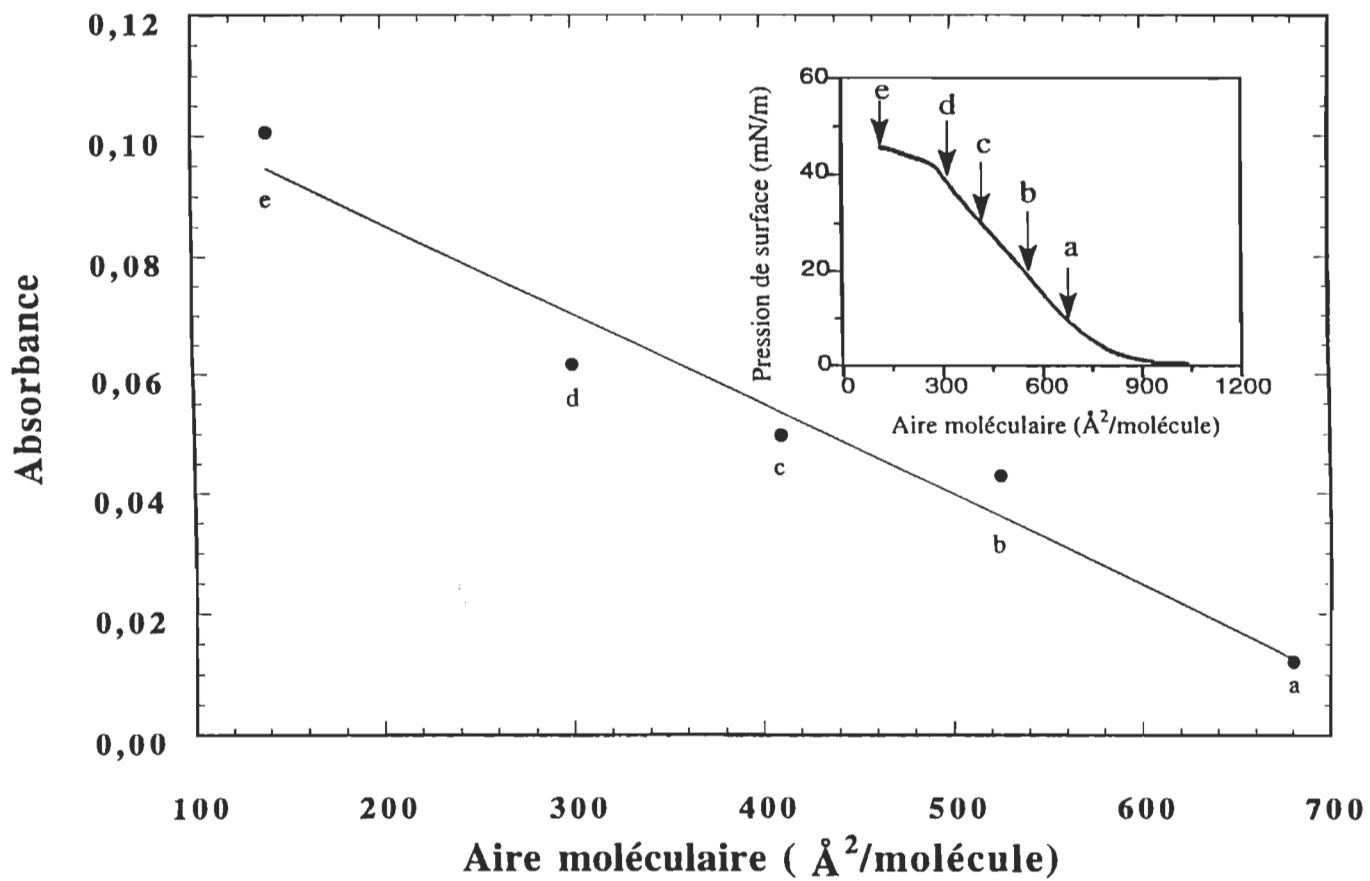


Figure 41. Absorbance de la bande amide I de la bR (avec le polariseur parallèle au plan d'incidence) en fonction de l'aire moléculaire correspondant aux dépositions faites entre 10 et 46 mN/m. (encart: isotherme de pression de surface montrant les endroits (points a jusqu'à e) où une déposition LB a eu lieu).

D'autre part, la région de 10 à 40 mN/m constitue la région "linéaire" de l'isotherme de pression de surface des M.P. (voir l'encart de la Fig. 41). L'obtention d'une relation linéaire entre l'absorbance de la bande amide I et l'aire moléculaire dans cette plage de pressions de surface n'est alors pas surprenante; elle reflète simplement la densité bi-dimensionnelle (2-D) de la bR à la surface du cristal de Ge, laquelle doit normalement être équivalente à la densité de la bR en 2-D à l'interface air-eau (i.e.: à l'aire moléculaire). Cependant, la région de 40 à 46 mN/m correspond quant à elle à une zone de transition sur l'isotherme de pression de surface des M.P. (Fig. 41; encart). En effet, on y constate une diminution importante de la pente de la courbe (diminution importante de K^s , voir Fig. 22) que l'on attribue au collapse du film. En dépit de cette transition, la relation linéaire entre l'absorbance de la bande amide I et l'aire moléculaire est toujours maintenue. De plus, l'aire moléculaire de la bR chute de moitié entre 40 et 46 mN/m alors que l'absorbance passe du simple au double entre ces deux points. Ces résultats favorisent l'hypothèse d'un collapse caractérisé par la formation d'une structure multilamellaire de M.P. à l'interface air-eau, tel que proposé à la Fig 38B. En effet, l'obtention d'une absorbance deux fois plus grande entre 40 et 46 mN/m s'expliquerait non pas par une densité en bR deux fois supérieure dans le plan de l'interface, mais bien par la superposition de deux couches de M.P. à la surface du cristal ATR. Il est également à noter que cette interprétation est en accord avec l'augmentation de l'épaisseur des films de M.P. mesurée par réflectivité des rayons-x à l'interface air-eau (section 5.4) bien que dans ce dernier cas, l'épaisseur obtenue pour une pression de surface de 46 mN/m ne corresponde pas encore à une bicouche. Il faut cependant se rappeler que le phénomène de formation de multicouches est

progressif et qu'au-dessus du collapse (43 mN/m), la pente de l'isotherme devient très faible (Fig. 21). La seule valeur de pression de surface (par exemple, 46 mN/m) n'est plus assez précise pour indiquer le degré de formation de la bicouche et on doit plutôt se concentrer sur la variation d'aire moléculaire entre deux événements donnés. Ceci explique probablement pourquoi l'épaisseur du film mesurée en réflectivité des rayons-X à 46 mN/m n'est pas le double de sa valeur à 30 ou 40 mN/m, tel qu'observé par FTIR-ATR.

5.6 Cycles compression-décompression-recompression (CDR)

Schildkraut et Lewis (1985) ont déjà émis l'hypothèse que la pression latérale exercée sur les fragments de M.P. puisse promouvoir leur agrégation réversible. Ces chercheurs débutèrent leurs expériences par la mesure d'isothermes de compression-expansion (pour différentes pressions de surface maximales atteintes lors de la compression) avec des films purs de M.P. Ils observèrent alors des hystérides pour les isothermes dont la pression de surface maximale était supérieure à 20 mN/m, ce qui les amena à la conclusion que des agrégats de M.P. étaient formés à des pressions supérieures à 20 mN/m. Ils entreprirent alors de mesurer les isothermes de compressions successives où un film pur de M.P. était comprimé, décomprimé et recomprimé et ceci, pour différentes pressions maximales atteintes lors de la compression (les films de M.P. étaient décomprimés jusqu'à pression nulle et maintenus ainsi pendant 5 min. avant la recompression). Nous appelons cette séquence un cycle de compression-décompression-recompression ou cycle CDR. Schildkraut et Lewis (1985)

observèrent alors que pour des pressions de surface maximales de 35 mN/m atteintes lors du cycle CDR, les courbes de compression et de recompression (d'où le terme de compressions successives utilisé par ces auteurs) se superposent, alors que pour des pressions maximales supérieures, la courbe de recompression est décalée vers les petites aires moléculaires comparativement à la courbe de compression. Ils concluent alors que le phénomène d'agrégation des M.P. se produisant à des pressions supérieures à 20 mN/m serait réversible, et que le décalage de la courbe de recompression pour des pressions maximales supérieures à 35 mN/m serait dû à une dissolution des fragments de M.P. dans la sous-phase. Les conditions expérimentales de ces auteurs étant cependant différentes des nôtres (utilisation d'hexane pour la suspension des M.P., tampon de la sous-phase ayant une composition complètement différente), nous avons décidé de reprendre ces expériences sur les cycles CDR avec nos propres conditions.

L'objectif général associé aux expériences sur les cycles de compression-décompression-recompression (cycles CDR) sur des monocouches de M.P. était de vérifier la réversibilité des interactions fragments-fragments promues par la pression latérale exercée sur ces films à l'interface air-eau. Plus spécifiquement, nous avons vu, d'une part, que le potentiel de surface (Fig. 24) commence à chuter de façon importante à des pressions supérieures à environ 20 mN/m, ce qui pourrait être attribué à la formation de multicouches de M.P. (effet de diélectrique). D'autre part, nous avons mesuré par réflectivité des rayons-X une augmentation de l'épaisseur et de la rugosité des films de M.P. pour des pressions supérieures à 30 mN/m (Fig. 36), alors que l'augmentation du simple au double de l'absorbance de la

bande amide I (FTIR-ATR; Fig. 41) entre 40 et 46 mN/m nous indique seulement la présence de multicouches à 46 mN/m. L'objectif spécifique des cycles CDR était alors de préciser davantage la pression de surface à laquelle débute la formation de multicouches de M.P. à l'interface air-eau.

Les Fig. 42 à 46 montrent les cycles CD et CDR de pression et de potentiel de surface obtenus pour des pressions de surface allant de 10 à 46 mN/m. Pour des pressions maximales de 10 et 20 mN/m (Figs. 42 et 43, respectivement), on peut constater l'absence d'hystérèse sur les isothermes de pression de surface (π -A). En effet, les tracés π -A de la compression sont presque superposés aux tracés en décompression, ces derniers se retrouvant très légèrement décalés vers les grandes aires moléculaires. Du côté des tracés de potentiel de surface (ΔV -A), on remarque également ce décalage vers les grandes aires du tracé en décompression mais seulement lorsque π atteint 0 mN/m dans la phase de décompression. Pour des pressions supérieures à 0 mN/m, les tracés de compression et décompression en potentiel de surface sont presque parfaitement superposés.

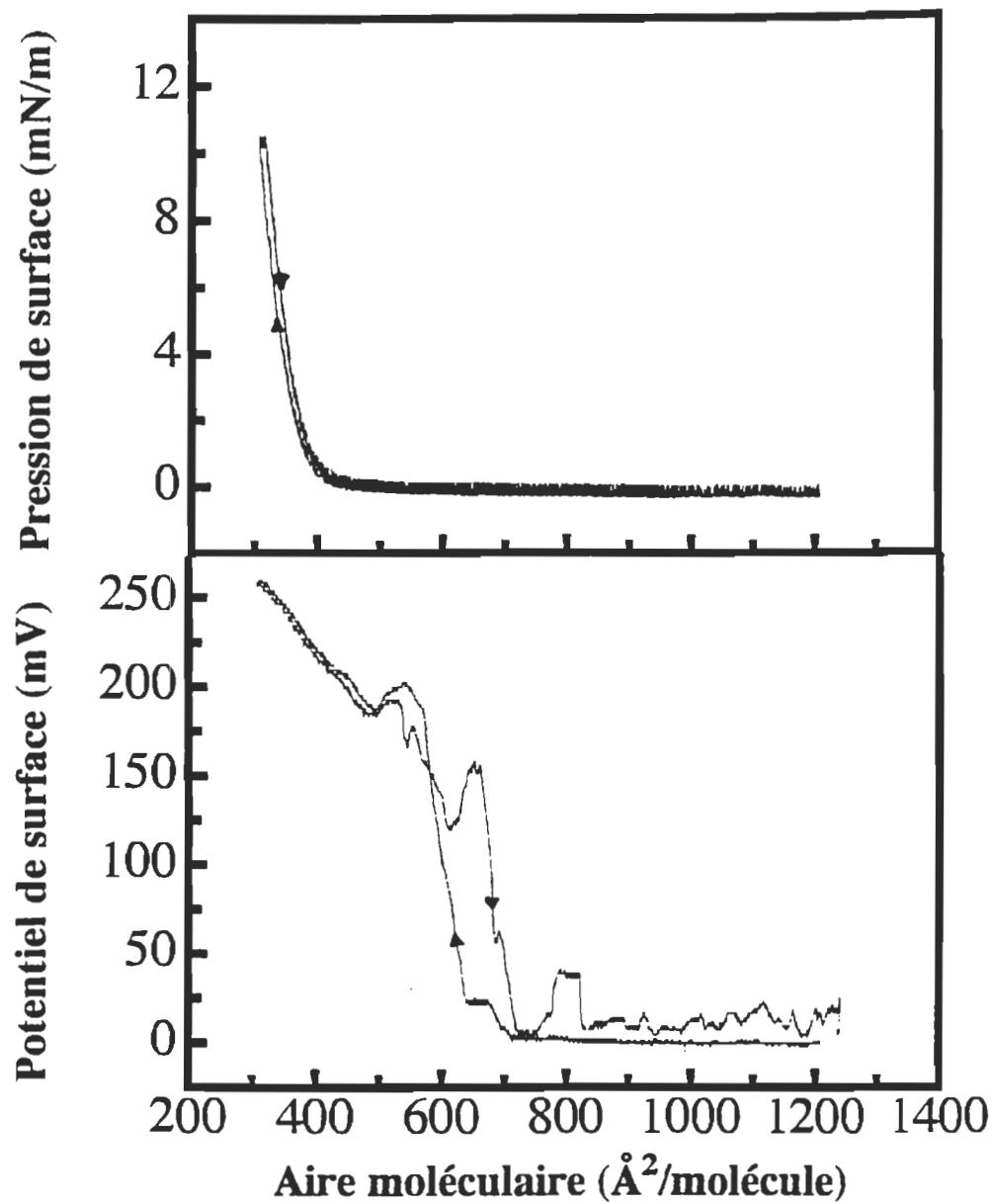


Figure 42. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 10 mN/m (le tracé en recompresion n'est montré que pour une pression de 20 mN/m, voir Fig. 43). Les flèches indiquent s'il s'agit d'une compression ou d'une décompression. Sur le cycle π -A, on remarque l'absence d'hystérèse entre le tracé de compression et celui de décompression. Sur le cycle ΔV -A, on peut voir des variations spontanées dans le signal de potentiel du tracé en décompression à pression nulle.

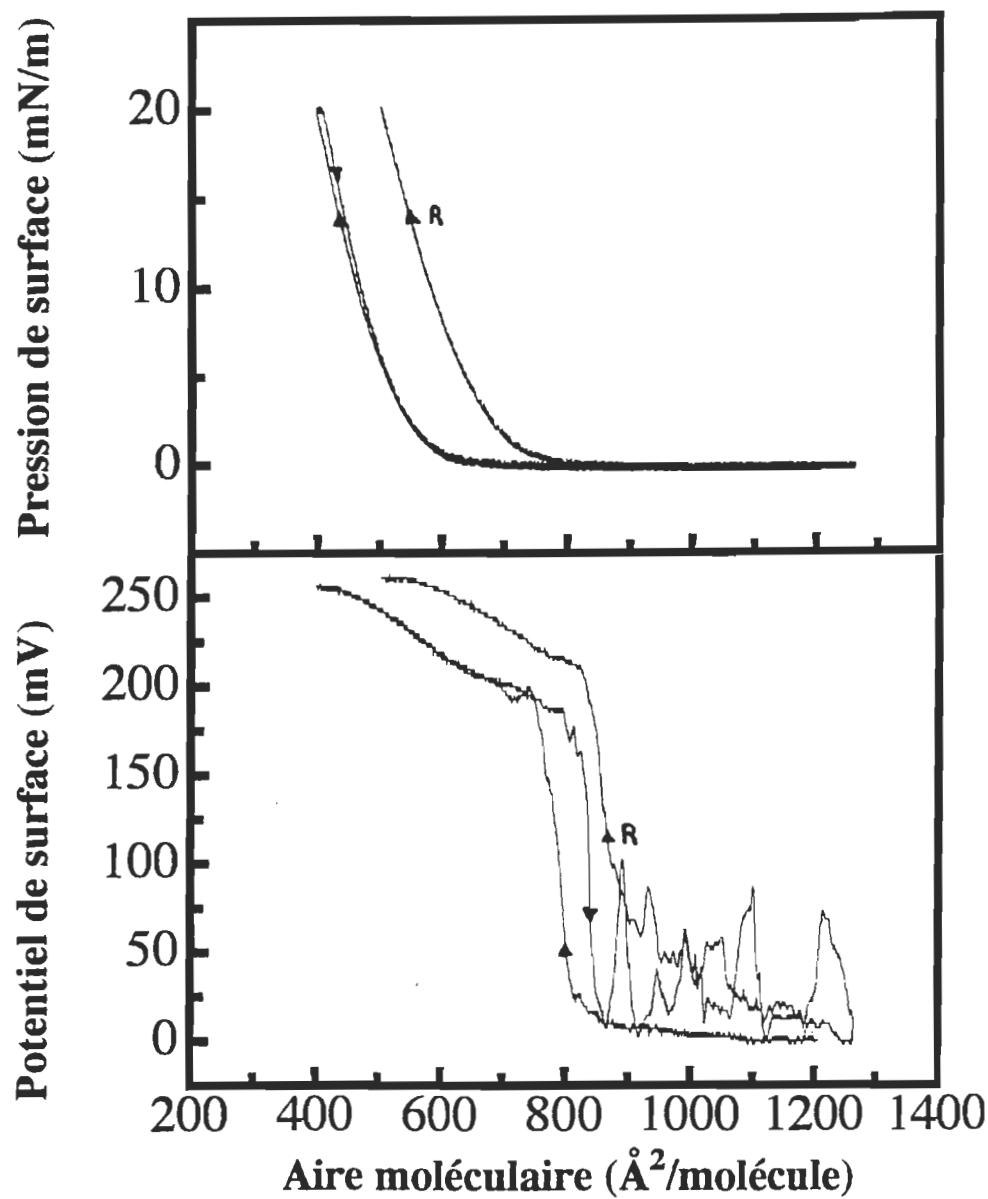


Figure 43. Cycle CDR de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 20 mN/m. Sur le cycle π -A, on remarque l'absence d'hystérèse entre le tracé de compression et celui de décompression. Le tracé en recompression (R) est toujours largement décalé vers les grandes aires moléculaires pour toutes les pressions de surface étudiées. Sur le cycle ΔV -A, on voit que les variations spontanées dans le signal de potentiel du tracé en décompression à pression nulle sont plus importantes que lors du cycle à 10 mN/m.

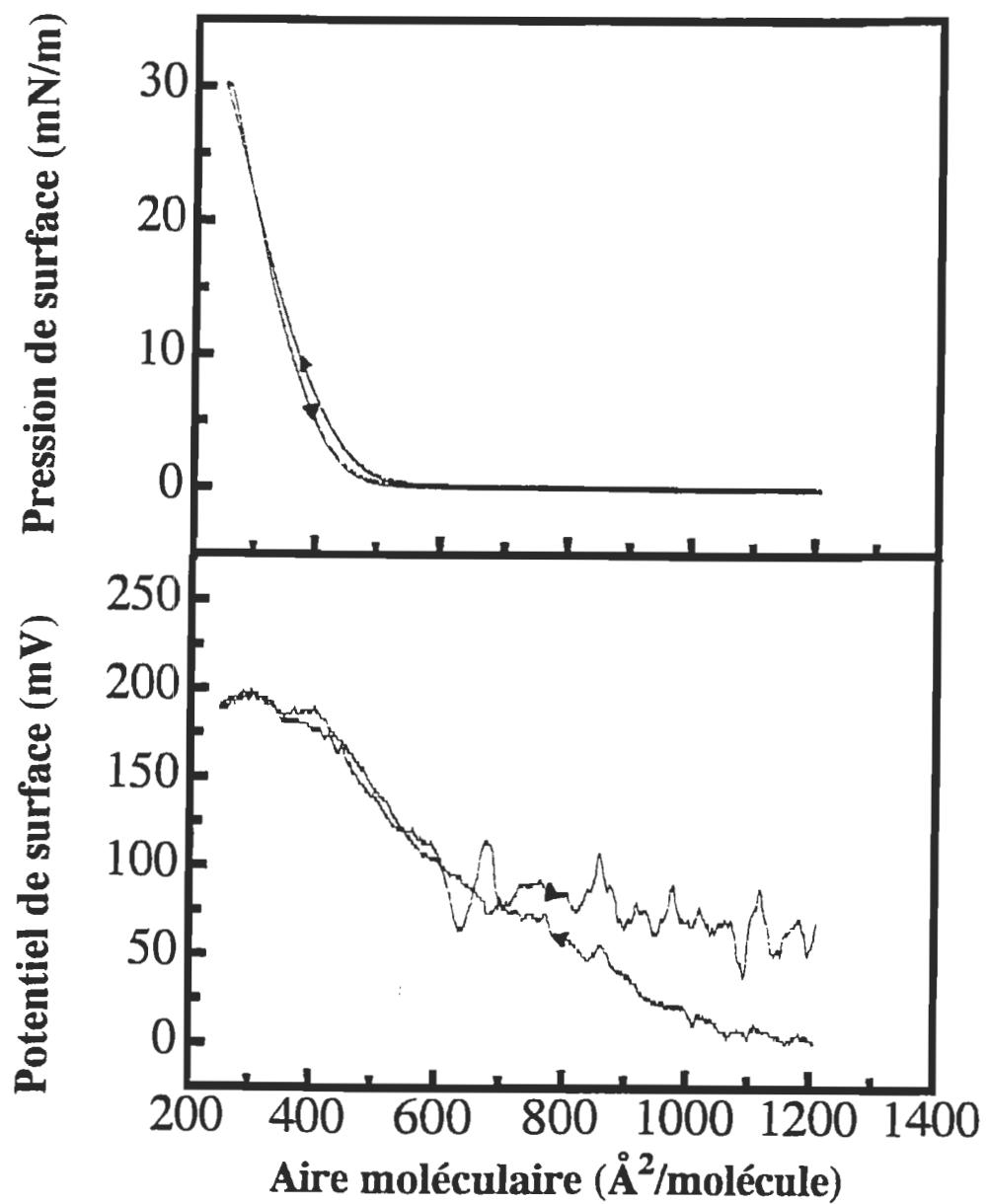


Figure 44. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 30 mN/m. Sur le cycle π -A, on remarque la présence d'une faible hystérèse entre le tracé de compression et celui de décompression. Sur le cycle ΔV -A, on voit toujours des variations spontanées dans le signal de potentiel du tracé en décompression à pression nulle.

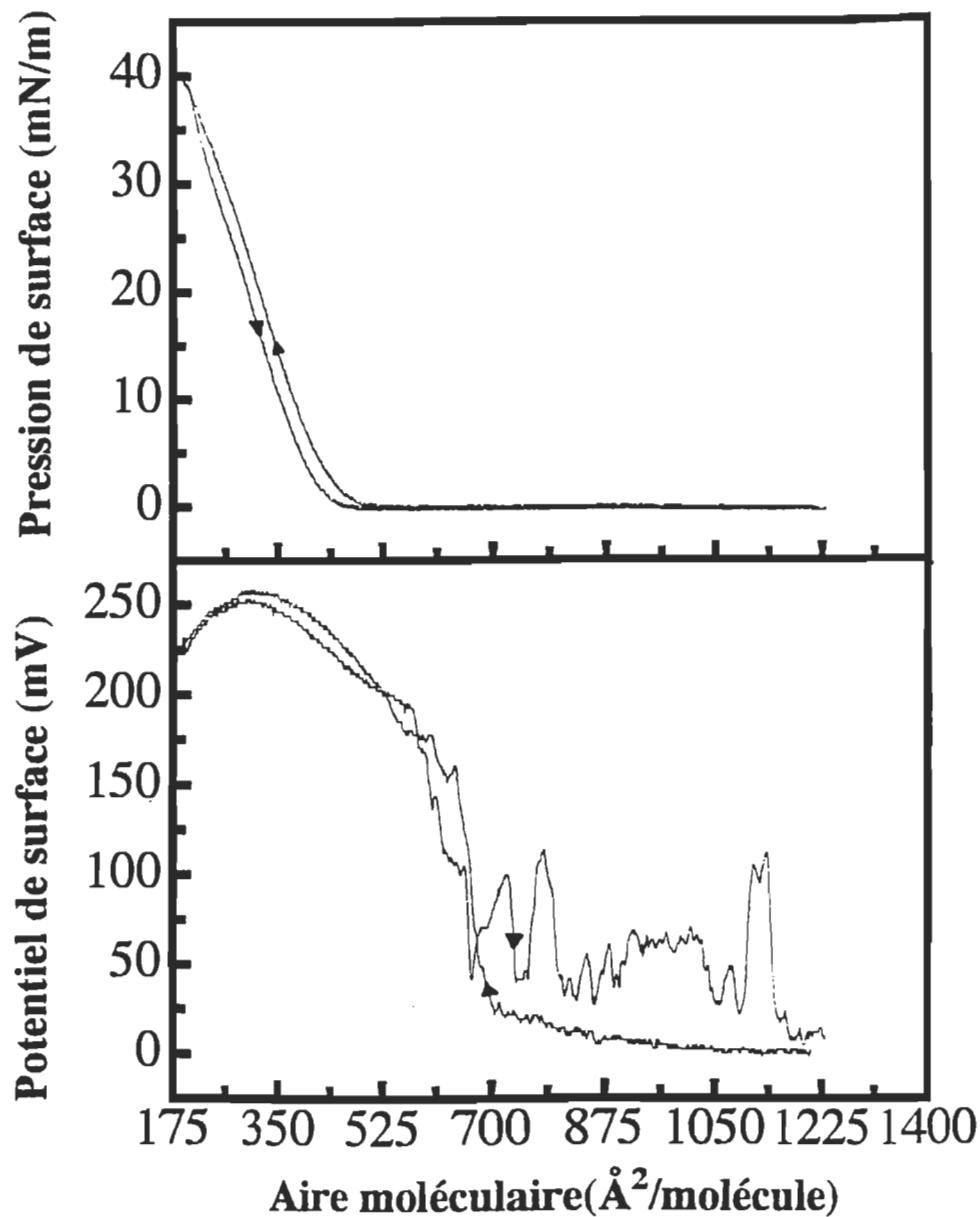


Figure 45. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 40 mN/m. On voit cette fois-ci l'apparition d'une plus forte hystérèse entre le tracé de compression et celui de décompression sur le cycle π -A. Sur le cycle ΔV -A, on constate la présence de variations spontanées de forte amplitude dans le signal de potentiel du tracé en décompression à pression nulle.

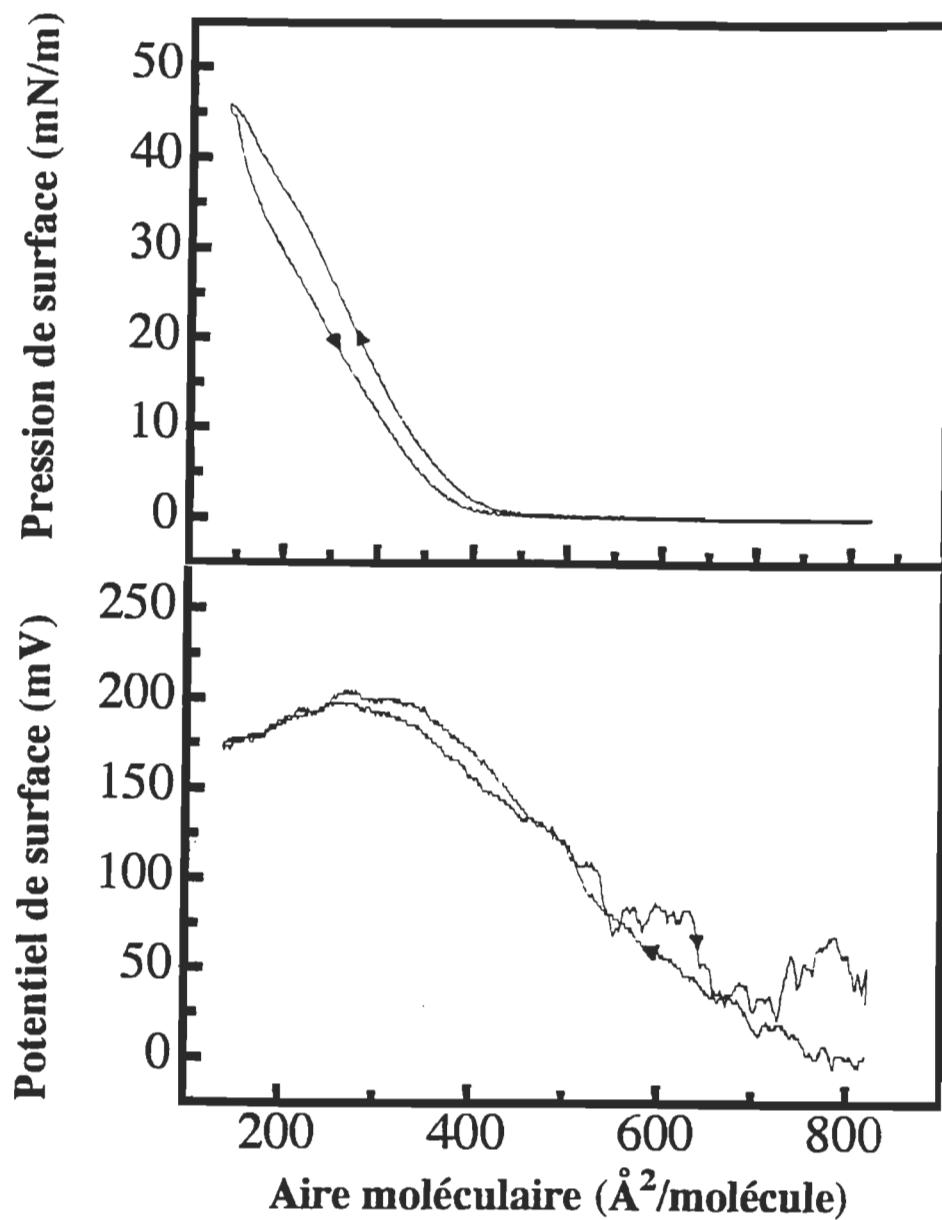


Figure 46. Cycle CD de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 46 mN/m. On voit que l'hystérèse entre le tracé de compression et celui de décompression sur le cycle π -A est maximale. Sur le cycle ΔV -A, on remarque la présence de variations spontanées de plus faible amplitude dans le signal de potentiel du tracé en décompression à pression nulle.

De plus, on remarque pour toutes les valeurs de pression de surface maximale étudiées que le tracé de recompression sur les courbes π -A est toujours largement décalé vers les grandes aires moléculaires comparativement aux tracés de compression et de décompression (le phénomène étant identique à toutes les pressions de surface étudiées, nous ne présentons à des fins de clarté que les tracés de compression et de décompression sur les figures correspondant aux autres pressions de surface). Nous présentons un exemple de ce décalage à la Fig. 43 où on voit un cycle CDR effectué jusqu'à une pression de surface de 20 mN/m. Ce décalage vers les grandes aires moléculaires est simplement dû à la réinsertion de fragments de M.P. dans la monocouche lorsque cette dernière séjourne un certain temps à pression nulle dans la phase de décompression (voir plus loin, ainsi qu'à la section 5.6.1).

À 30, 40 et 46 mN/m (Figs. 44, 45, et 46, respectivement), on voit apparaître une hystérèse sur les isothermes π -A, les tracés en décompression étant décalés vers les plus petites aires moléculaires comparativement aux tracés en compression. L'importance de cette hystérèse est d'autant plus grande que la pression maximale atteinte lors du cycle est élevée.

La Fig. 47 montre un cycle CDR fait dans des conditions identiques aux cycles précédents, excepté pour la pression minimale atteinte lors de la décompression qui était de 5 mN/m plutôt que 0 mN/m comme précédemment. La pression de surface maximale atteinte lors de ce cycle était de 40 mN/m.

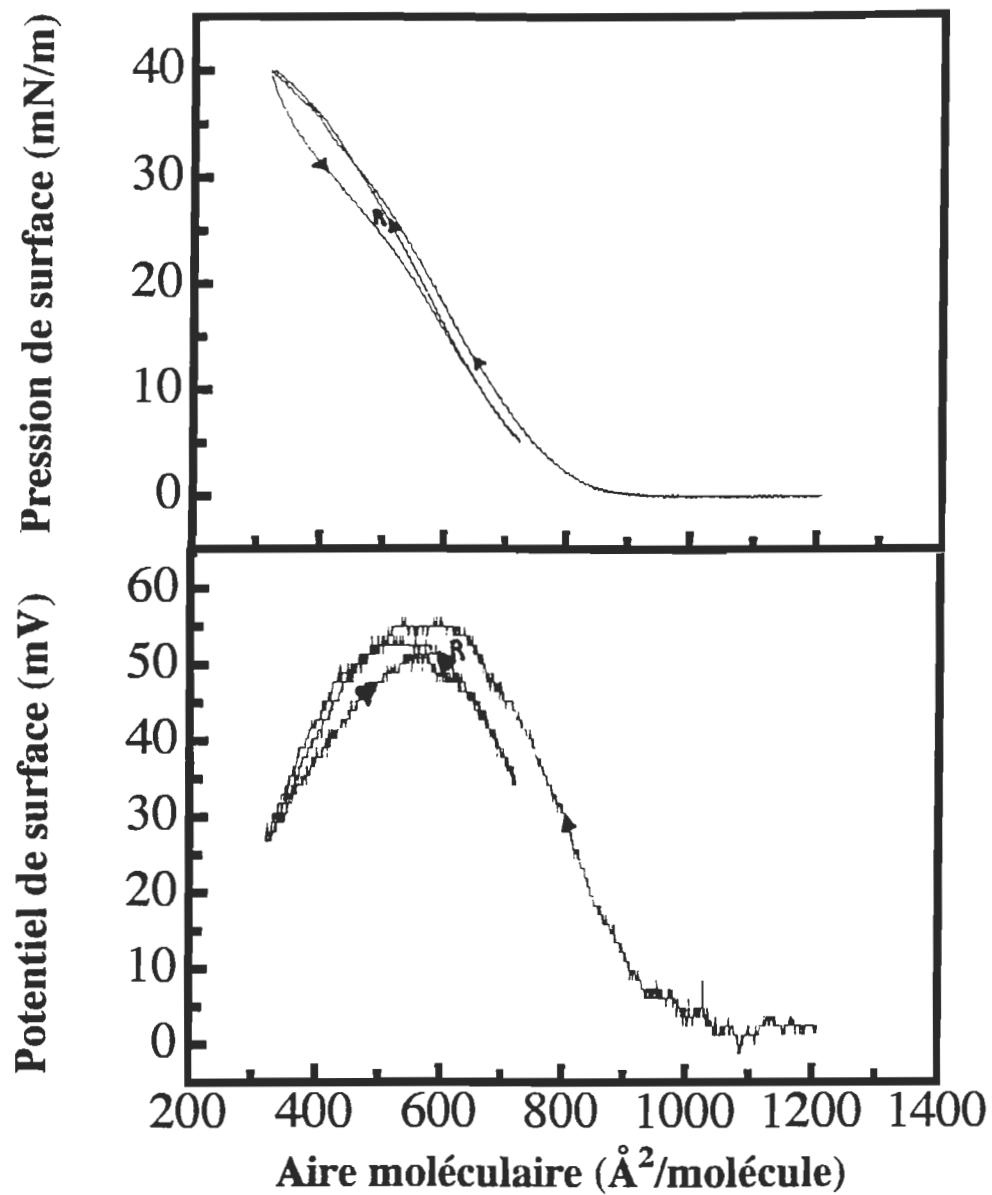


Figure 47. Cycle CDR de pression et de potentiel de surface d'un film de M.P. où la pression maximale atteinte est de 40 mN/m et où la pression minimale atteinte lors de la décompression est de 5 mN/m (comparativement à 0 mN/m pour tous les autres cycles CDR). On constate toujours la présence d'une plus forte hystérèse entre le tracé de compression et celui de décompression sur le cycle π -A. Cependant, le tracé de recompression n'est plus décalé vers les grandes aires mais se superpose plutôt au tracé de compression. On remarque le même phénomène sur le cycle ΔV -A.

On remarque toujours l'obtention d'une forte hystérèse dans la courbe π -A alors que, cette fois-ci, le tracé en recompression n'est plus décalé vers les grandes aires moléculaires comme précédemment. Ce tracé rejoint en fait celui de la première compression vers les 30 mN/m et poursuit alors sa montée en se superposant quasi parfaitement sur ce dernier. Ceci démontre la nécessité que le film soit complètement décomprimé jusqu'à pression nulle pour qu'une réinsertion de fragments de M.P. dans la monocouche soit possible (voir plus loin, section 5.6.1).

Autre détail intéressant concernant les courbes ΔV -A: la présence de variations spontanées importantes (sous forme de "pics") dans le potentiel de surface à pression nulle sur les tracés de décompression et de recompression. Ces "pics", plus importants sur les isothermes où la pression de surface maximale est supérieure à 10 mN/m, peuvent atteindre des amplitudes de 75, 100 et même 150 mV sur ces tracés alors qu'ils sont complètement absents des tracés de compression (voir Figs 42 à 46). Ces variations spontanées peuvent être expliquées par la formation d'agrégats de M.P. (voir plus loin, section 5.6.4).

5.6.1 La désorption et la ré-adsorption des M.P.

Tout d'abord, l'obtention de tracés de recompression fortement décalés vers les grandes aires moléculaires comparativement aux tracés de compression et décompression est imputable à la réinsertion dans la monocouche de fragments de M.P. se trouvant directement sous le film. Cette réinsertion n'est cependant possible que lorsque le film de M.P. se trouve dans un état très expansé, comme le démontre l'absence de ce phénomène lorsque la décompression ne se fait que jusqu'à une pression de 5 mN/m (Fig. 47). Le tracé de recompression n'est alors pas décalé vers les grandes aires moléculaires, comme c'est le cas lorsque la décompression se fait jusqu'à pression nulle. Schildkraut et Lewis (1985) font d'ailleurs mention d'une possible ré-adsorption de fragments de M.P. dans la monocouche suivant une désorption réversible s'étant produite lors de compressions à des π supérieures à 35 mN/m. Nous ajoutons ici que le phénomène que nous avons observé nous permet de dire qu'une adsorption de fragments de M.P. est possible dans le cas de cycles CDR où le film de M.P. a atteint des pressions maximales de 10 à 46 mN/m *en autant que le film puisse séjourner un certain temps dans un état très expansé ($\pi = 0$ mN/m) entre les étapes de décompression et de recompression.* Contrairement à Schildkraut et Lewis (1985), nous croyons que les M.P. pouvant être adsorbées à pression nulle ne proviennent pas de M.P. s'étant désorbées de la monocouche lors de l'étape de compression mais proviennent plutôt de M.P. ayant coulé sous le film lors de l'étape de l'étalement. En effet, si des M.P. s'étaient réellement désorbées de la monocouche lors de l'étape de compression, nous aurions alors observé une hystérèse dans les

courbes π -A à 10 et 20 mN/m, ce qui n'est pas le cas. De plus, nous avons déjà interprété les petites aires moléculaires observées pour toutes les monocouches faites sur le tampon A ne contenant que 100 mM de NaCl comme provenant de pertes de M.P. survenues lors de l'étalement (voir section 5.1). Comme nous l'avons vu précédemment, ces pertes peuvent être minimisées par l'utilisation de fortes concentrations de NaCl (4M; Fig. 23) dans la sous-phase. Ceci revient à dire que des quantités non-négligeables de M.P. se retrouvent déjà dans la sous-phase avant même que la première compression ne se fasse et qu'on n'a pas besoin de faire appel à un processus de désorption lors de la compression pour en rendre compte.

5.6.2 Hystérèses et formation d'états métastables de la matière

Il y a deux résultats ressortant de cette étude qui confirment la formation d'états métastables suivant l'application d'une pression latérale sur les films de M.P.: les hystérèses dans les courbes CDR de π -A et les variations spontanées (pics) observées dans le potentiel de surface à pression nulle sur les tracés de décompression et recompression.

Du côté des hystérèses observées sur les courbes π -A, nous avons rencontré ce phénomène seulement à des pressions de surface de 30 mN/m ou plus, alors que Schildkraut et Lewis (1985) font mention d'une hystérèse dès 20 mN/m (bien qu'on ne puisse pas la distinguer sur la figure présentée dans leur article...). De plus, ces auteurs interprètent les hystérèses comme étant le résultat d'une agrégation réversible des fragments de M.P. promue par une pression latérale de plus de 15 mN/m. L'interprétation que nous

faisons des résultats obtenus via les courbes de CDR confirme effectivement une agrégation des M.P. promue par la pression latérale, mais là où nos interprétations divergent de celles de Schildkraut et Lewis (1985), c'est au niveau de la pression latérale minimum qui serait nécessaire pour entraîner une agrégation ainsi qu'à propos de la réversibilité du processus. De plus, les hystérèses obtenues ne sont pas nécessairement le seul fruit d'une agrégation. En effet, la formation de multicouches pourrait tout aussi bien rendre compte de ces hystérèses et nous aurons besoin d'une technique supplémentaire (la microscopie de fluorescence à l'interface air-eau, voir section 5.7) pour nous permettre d'en savoir davantage.

5.6.3 L'irréversibilité des interactions entre les fragments de M.P.

Les hystérèses observées pour les cycles CDR à des pressions de surface égales ou supérieures à 30 mN/m sont indicatrices d'interactions métastables (irréversibles, au sens thermodynamique du terme) entre les fragments de M.P. En effet, pour un processus parfaitement réversible, le travail d'expansion est égal au travail de compression:

$$\Delta G_{\text{comp}} = -\Delta G_{\text{exp}} \quad (18)$$

Toute inégalité entre le travail de compression et celui que fournit le film durant l'expansion provient normalement de la formation de ces interactions métastables et est généralement emmagasinée sous forme d'énergie libre de stabilisation (voir thèse de P. Lavigne, 1994). Outre les considérations thermodynamiques sur l'irréversibilité, ce dernier terme est

communément utilisé pour définir l'impossibilité de revenir en arrière jusqu'à l'état précédent une transformation nouvellement opérée. En ce sens, il semble qu'à tout le moins *une partie* des transformations opérées sur les films de M.P., grâce à la pression latérale, soient de nature *métastables*, i.e.: puissent s'effectuer en sens inverse moyennant des conditions appropriées (une pression latérale réduite et l'injection d'énergie dans le système) et un temps suffisamment long. La Fig. 47 témoigne de cette situation: le tracé de recompression est presque superposé au tracé de la première compression (donc: retour en arrière possible, moyennant un temps d'attente de 5 min et l'injection d'énergie dans le film) alors que l'hystérèse entre les tracés de compression et de décompression confirme la véritable nature irréversible (au sens thermodynamique) des interactions entre les fragments de M.P.

5.6.4 Agrégats de M.P. et potentiel de surface

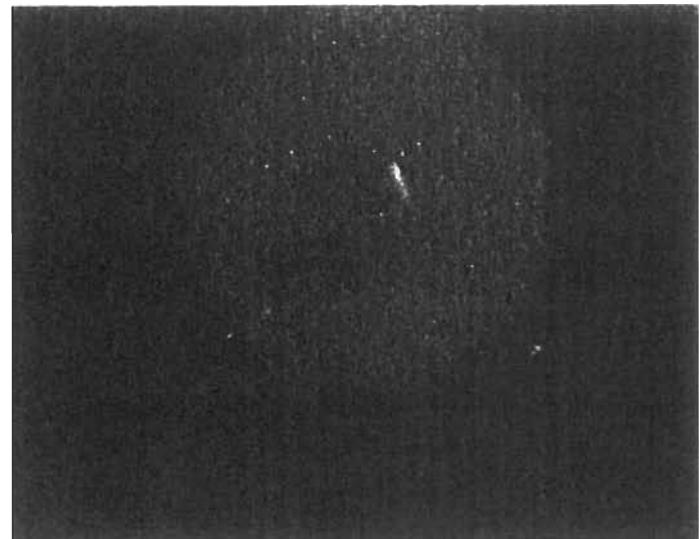
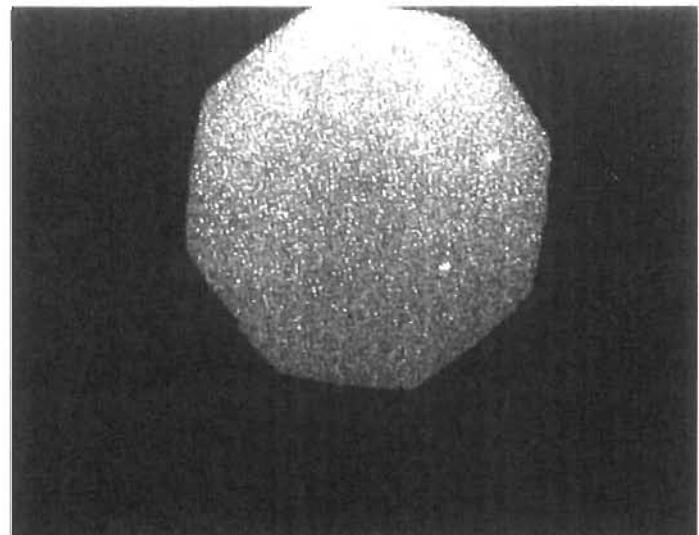
Pour ce qui est des variations spontanées observées à pression nulle sur les tracés de décompression et de recompression des courbes $\Delta V-A$, nous croyons qu'il s'agit d'une indication supplémentaire de la formation d'états *stables* et *irréversibles* (au sens thermodynamique et commun du terme). En effet, de telles variations spontanées dans le potentiel de surface à pression nulle pour des films d'homopolypeptides à l'interface air-eau ont déjà été interprétées comme provenant d'agrégats ou de domaines bi-dimensionnels de dimensions variées se déplaçant dans le plan de l'interface et passant occasionnellement sous l'électrode de mesure (Lavigne *et al.*, 1994). La présence de telles variations spontanées du signal de potentiel de surface pour les tracés de décompression et de recompression (alors qu'elles sont absentes

des tracés de compression) laissent croire à une formation irréversible d'agrégats de M.P. promue par la pression de surface et ceci, même pour des pressions latérales aussi faibles que 10 mN/m. Un appui visuel à cette hypothèse est fourni par les résultats obtenus en microscopie de fluorescence à l'interface air-eau (voir ci-dessous, section 5.7) où l'on voit très clairement des tels agrégats après la décompression d'un film de 10 à 0 mN/m (Fig. 48E).

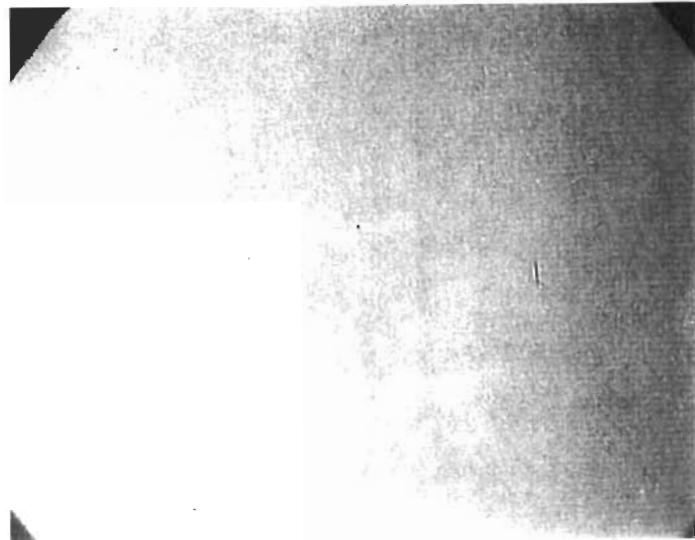
5.7 Microscopie de fluorescence à l'interface air-eau; organisation bi-dimensionnelle des M.P. à basse pression de surface

Les mesures de microscopie de fluorescence ont été faites sur des films de M.P. à l'interface air-eau entre 0 et 10 mN/m. Le but de ces mesures était de vérifier l'organisation bi-dimensionnelle de ces films sur une échelle semi-macroscopique (de 1 à quelques centaines de micromètres) de façon à pouvoir visualiser la formation possible d'agrégats lors du processus de compression. Les résultats précédemment obtenus en réflectivité des rayons-X (section 5.4) laissaient entrevoir la présence de films homogènes à des pressions de surface > 10 mN/m et d'inhomogénéités croissantes dans le plan de l'interface pour des pressions inférieures à 10 mN/m. On obtenait en effet un lissage de moins bonne qualité pour la courbe de réflectivité à 10 mN/m (résultat non-montré) ainsi que pour la courbe à 1 mN/m (Fig. 37). Cette interprétation n'était cependant basée que sur des évidences indirectes. D'un autre point de vue, les variations spontanées de potentiel de surface obtenues à pression nulle dans les phases de décompression et de recompression lors

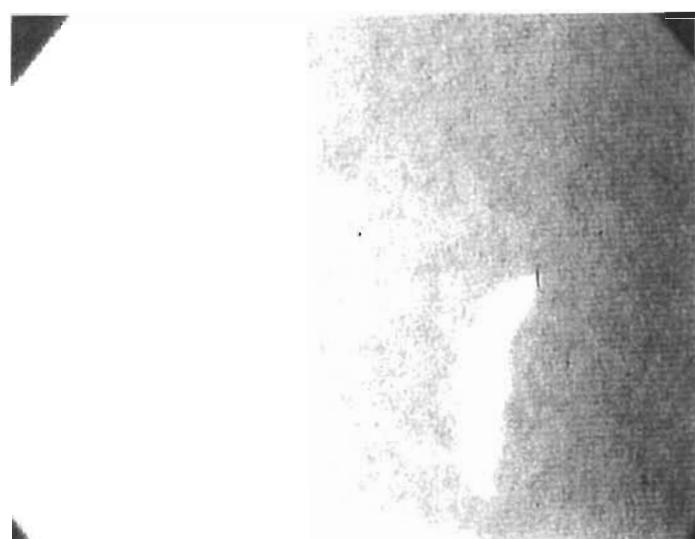
des cycles CDR (voir section précédente) indiquent la formation possible d'agrégats de M.P. même lors d'une compression à une pression maximale aussi basse que 10 mN/m. Des hystérèses dans les isothermes de pression de surface mesurées lors de ces cycles CDR ne sont cependant observées qu'à plus de 30 mN/m. Y a t-il formation d'agrégats **et** de multicouches? Si oui, quel est le phénomène qui précède l'autre? À quelle pression de surface s'opèrent ces changements dans la structure des films de M.P.? C'est pour tenter d'obtenir plus de renseignements sur ces questions que nous avons alors cru bon de vérifier l'état d'organisation de ces films d'une manière beaucoup plus directe par microscopie de fluorescence où un film de M.P. est visualisé à différentes étapes lors d'une décompression de 10 à 0 mN/m. La Fig. 48 montre une série de photographies du film de M.P. à l'interface air-eau prises à différentes étapes de la décompression. Notons que de 10 mN/m à environ 2 mN/m, nous étions dans l'impossibilité de faire le point sur l'interface en raison d'une trop faible intensité de fluorescence provenant du film. À la Fig 48A, on voit une image du film de M.P. prise à 1,5 mN/m à l'aide de l'objectif de 20X. On commence alors à pouvoir distinguer le film, l'intensité de fluorescence provenant de l'ensemble du film s'accroissant progressivement en cours de décompression. Sur la Fig. 48B, le film de M.P. atteint ici une pression de 1 mN/m (objectif de 20X). L'intensité de fluorescence est beaucoup plus importante qu'à la Fig. 48A et semble toujours être distribuée de façon assez homogène à la surface du film.

A $\pi = 1,5 \text{ mN/m}$ $\text{---} = 100 \text{ }\mu\text{m}$ **B** $\pi = 1 \text{ mN/m}$ $\text{---} = 100 \text{ }\mu\text{m}$ 

C

 $\pi = 1 \text{ mN/m}$  = 50 μm 

D

 $\pi = 0 \text{ mN/m}$  = 50 μm 

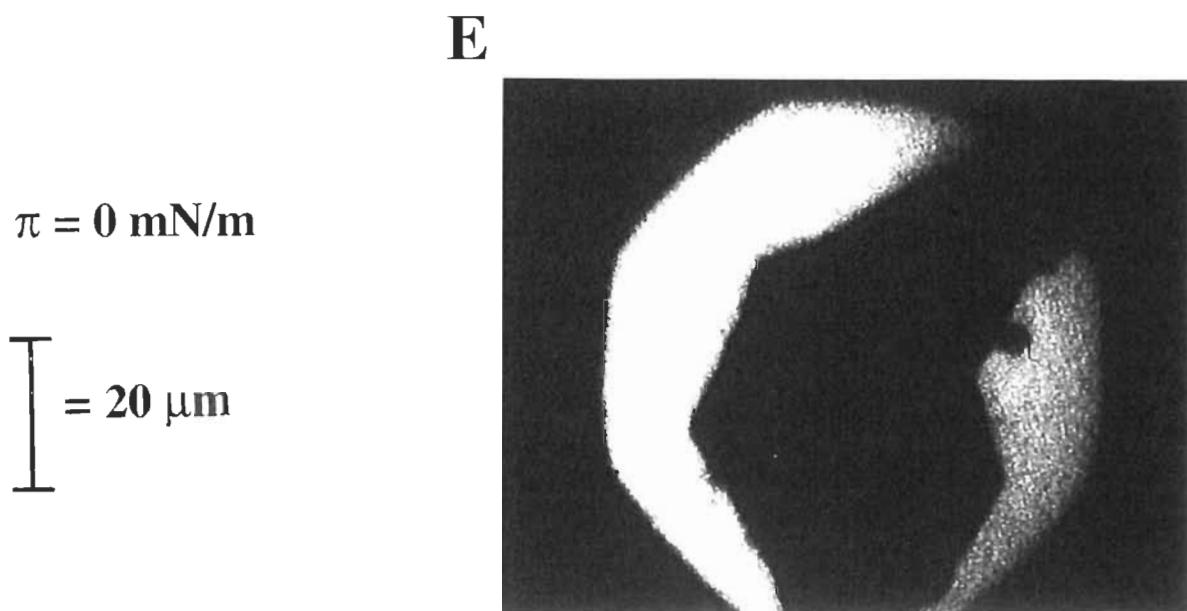


Figure 48 (A à E). Micrographies de fluorescence d'un film de M.P. à l'interface air-eau. Ces micrographies ont été prises à différentes pressions de surface durant l'étape de décompression de ce film de 10 à 0 mN/m. La visualisation du film est rendue possible grâce à l'injection de 15 μl d'une solution de rhodamine B d'une concentration de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ dans la sous-phase. Une intensité de fluorescence suffisante pour visualiser le film n'apparaît que vers 2 mN/m lors de la décompression. La micrographie E a été prise suivant un temps d'attente d'une heure à pression nulle.

À la Fig. 48C, on voit toujours le film à 1 mN/m, mais cette fois-ci à l'aide de l'objectif de 40X, ce qui permet de voir que la fluorescence est toujours distribuée de façon homogène à petite échelle. La micrographie 48D a été prise immédiatement après l'atteinte d'une aire moléculaire maximale (décompression complète du film, pression de surface = 0 mN/m, objectif = 40X). L'intensité de fluorescence est toujours maximale et semble être distribuée de façon relativement homogène bien qu'on puisse apercevoir des bris dans la monocouche caractérisés par des zones très claires dans un environnement plus sombre ici et là dans le film. Finalement, à la Fig. 48E, on voit le film de M.P. après 1 heure d'attente à pression nulle. On remarque ici que des changements majeurs dans la structure du film se sont produits. On aperçoit la présence d'îlots sombres baignant dans un environnement très clair, i.e. où l'intensité de fluorescence est grande.

L'interprétation que nous pouvons donc tirer des résultats présentés à la Fig. 48 est la suivante: à une pression de surface supérieure à 2 mN/m, aucune fluorescence n'est observée en raison de la couverture efficace de l'interface par les M.P. à une échelle semi-macroscopique (supérieure aux dimensions d'un fragment de M.P., soit 0,5 - 1,0 μm). En cours de décompression à des pressions inférieures à 2 mN/m, la distance moyenne inter-fragments devient suffisamment grande pour que la rhodamine puisse s'y insérer (Fig. 48A). Une décompression encore plus prononcée fait augmenter la distance inter-fragments et donne lieu à une augmentation du nombre de molécules de rhodamine dans le plan de l'interface. Ceci se traduit par une augmentation de l'intensité de fluorescence observée pour toutes les régions du film (Fig. 48B et C). La décompression jusqu'à pression

nulle (Fig. 48D) entraîne des bris dans le film de M.P. où les molécules de rhodamine s'insèrent en grand nombre (puisque il y a probablement absence totale de film dans ces régions) et donnent lieu à une forte intensité de fluorescence entre les agrégats de M.P. Ces bris dans le film *pourraient s'expliquer* par la rupture d'interactions M.P./M.P. à longue portée promues par la pression latérale lors de la compression du film, interactions qui donneraient au film entier une très grande cohésion à l'échelle semi-macroscopique, même pour de faibles valeurs de pression de surface (1 mN/m). La pression de surface étant maintenant nulle, ces interactions seraient alors supplantées par des interactions à courte portée entre les fragments de M.P. et/ou par un effet de compétition entre les fragments de M.P. et les molécules d'eau dans le plan du film, ce qui donnerait finalement naissance à de petits agrégats de M.P. ($\approx 50 \mu\text{m}$) entourés d'une interface dépourvue de M.P. où les molécules de rhodamine s'insèrent en grand nombre (Fig. 48E).

Certains faits saillants des résultats obtenus en microscopie de fluorescence apportent des renseignements très intéressants quant à la structure des films de M.P. à l'interface air-eau. Premièrement, le fait de ne pouvoir distinguer le film qu'à des pressions de surface inférieures à 2 mN/m indique que le degré d'entassement des fragments de M.P. est assez élevé pour empêcher qu'un grand nombre de molécules de rhodamine s'insère entre ces fragments (ce qui explique probablement pourquoi la réinsertion de fragments de M.P. de la sous-phase vers la monocouche ne peut s'effectuer qu'à pression nulle; voir section 5.6). Deuxièmement, on n'observe des agrégats de M.P. que lorsque le film est décomprimé jusqu'à

pression nulle. De plus, immédiatement après l'atteinte d'une pression de 0 mN/m, nous observons seulement des bris dans la structure du film (Fig. 48D) mais pas encore d'agrégats. Ceci signifie qu'il règne au sein des films de M.P. à l'interface air-eau une grande force d'interaction à longue portée entre les fragments de M.P., ce qui permet le maintien d'une structure homogène (à une échelle de plus de 1 μm) jusqu'à de très faibles valeurs de pression de surface. Cette grande force de cohésion inter-fragments est possiblement responsable du fait que les monocouches de M.P.-FITC ne pénétraient pas à l'intérieur du masque de Teflon lors des mesures de quenching de fluorescence (voir section 4.2.4), malgré une pression de surface pouvant aller jusqu'à 10 mN/m, et ceci en dépit d'une ouverture de 30 mm de largeur!

Un autre fait très intéressant qui découle de ces observations est que la formation des agrégats de M.P. n'est pas responsable des hystérèses observées lors des cycles CDR. Cette conclusion est basée sur les résultats suivants:

- Lors des cycles CDR à 10 et 20 mN/m, on ne détecte aucune hystérèse. Pourtant, on détecte des variations spontanées (pics) de potentiel de surface à pression nulle dans les tracés en décompression et en recompression (voir Figs. 42 à 46), variations spontanées qui, selon toute vraisemblance, résultent de la présence d'agrégats de M.P. Ces variations spontanées ne sont cependant pas présentes sur les tracés de compression.

- Les résultats obtenus en microscopie de fluorescence montrent clairement qu'une compression à une pression de surface de seulement 10 mN/m est suffisante pour promouvoir la formation d'agrégats de M.P., agrégats qui n'apparaissent d'ailleurs qu'après un certain temps passé à pression nulle lors de l'étape de décompression (Fig. 48E).

La seule explication logique aux hystérides observées à partir de 30 mN/m lors des cycles CDR demeure alors la formation de multicouches de M.P. La pression de surface de 30 mN/m à laquelle apparaissent ces hystérides correspond d'ailleurs avec l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité des films de M.P. détectée par réflectivité des rayons-X. Rappelons également que la chute observée dans la valeur de K^s et de potentiel de surface en cours de compression commence de façon importante vers 18 et 20 mN/m, respectivement. La coïncidence en termes de pression de surface de ces quatre événements mesurés par des techniques totalement différentes (voir Fig. 49) laisse présager qu'ils puissent représenter autant de manifestations d'un seul et même phénomène physique: la formation de multicouches.

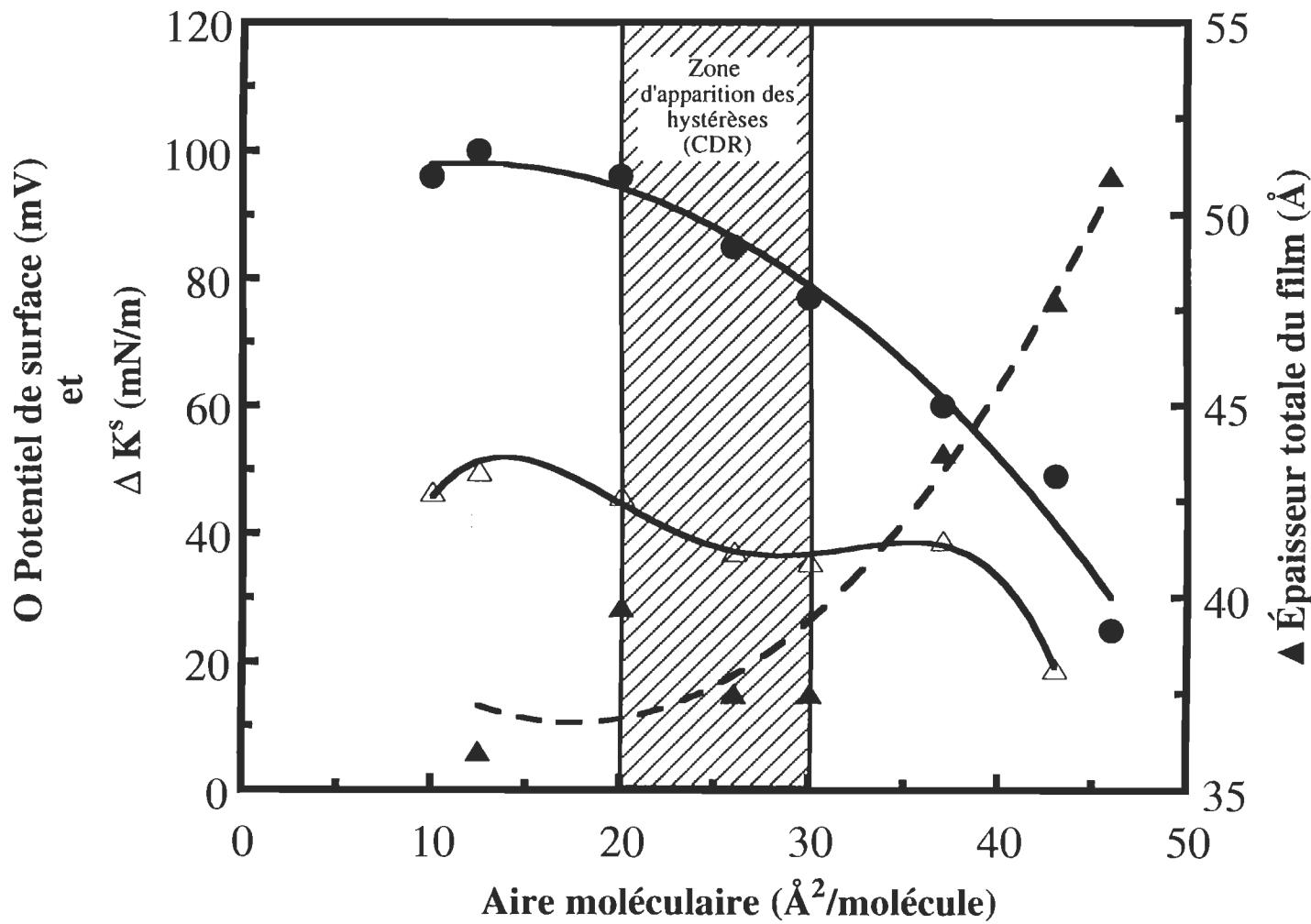


Figure 49. Évolution de différents paramètres (potentiel de surface, K^s , épaisseur totale du film mesurée en rayons-X et hystéroses dans les cycles CDR) en fonction de la pression de surface. La coïncidence des événements (chute de la valeur du potentiel et de K^s , augmentation de l'épaisseur et l'apparition des hystéroses) dans la gamme de pressions de surface allant de 20 à 30 mN/m laisse présager l'existence d'une origine physique commune à ces phénomènes.

CHAPITRE 6

CONCLUSIONS

Les différentes méthodes utilisées tout au long de ces travaux nous ont permis d'obtenir une collection d'informations structurales et fonctionnelles sur les films de M.P. à l'interface air-eau:

- La technique des monocouches nous a permis dans un premier temps de former des films purs et stables de M.P. à l'interface air-eau. Par la mesure des isothermes de pression de surface, nous avons constaté que les aires moléculaires obtenues étaient beaucoup plus faibles que pouvaient le laisser croire les résultats de Henderson et Unwin (1975) obtenus par diffraction des rayons-X et des électrons (voir Fig. 21). Ce fait nous amena à croire qu'une perte importante de matériel survenait avec l'utilisation de faibles concentrations de sel dans la sous-phase (tampon A contenant 100 mM NaCl) et que cette perte était minimisée par l'utilisation de grandes concentrations en sel (4M NaCl; voir Fig. 23). De plus, la variation de K^s en fonction de l'aire moléculaire (Fig. 22) montre un maximum vers $500 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ correspondant à une pression de surface de 18 mN/m, ce qui indique qu'une interaction maximale entre les fragments de M.P. a lieu à cette pression.

- La présence d'un plateau dans l'isotherme de potentiel de surface (Fig. 24) nous a amené à émettre l'hypothèse qu'une organisation optimale des M.P. à l'interface air-eau puisse être atteinte entre des valeurs minima et maxima de pression de surface.

- La spectroscopie d'absorption nous a permis de démontrer que le phénomène de la photoisomérisation du rétinal, suite à une période d'adaptation des bR à la lumière, avait lieu à l'interface air-eau. Ce résultat constitue une bonne évidence que l'intégrité fonctionnelle de la bR est préservée à l'interface air-eau.

- La réflectivité des rayons-X à l'interface air-eau confirma le caractère monomoléculaire des films de M.P. En effet, les profils de densité électronique obtenus pour des pressions de surface entre 20 et 30 mN/m montrent une épaisseur totale d'environ 40 Å pour ces films. Or, Henderson et Unwin (1975) ont mesuré une longueur de 40 Å pour les hélices- α de la bR par diffraction électronique. L'épaisseur que nous avons mesurée par réflectivité des rayons-X correspondrait donc effectivement à une seule couche de protéines à l'interface air-eau. Cependant, pour des pressions de surface supérieures à 30 mN/m, l'épaisseur mesurée croît avec la pression de surface, ce qui nous amena à formuler les hypothèses de la réorientation des hélices- α et celle de la superposition des fragments de M.P. pour tenter d'expliquer ce phénomène. La réflectivité des rayons-X n'est cependant pas en mesure de trancher entre ces deux hypothèses et il a fallu avoir recours aux mesures en FTIR-ATR pour y parvenir.

Un autre paramètre mesuré en réflectivité des rayons-X, la rugosité de surface, nous renseigne sur l'organisation de la bR et des M.P. dans le plan de l'interface. À l'instar de l'épaisseur des films de M.P., la rugosité de surface est à son minimum pour des valeurs de pression latérale de moins de 30 mN/m et croît pour des valeurs de pression de surface supérieures (Fig. 36). À des pressions supérieures à 30 mN/m, l'augmentation de la rugosité peut être expliquée par les mêmes hypothèses que pour l'augmentation de l'épaisseur: soit une réorientation des hélices- α ou une superposition des fragments de M.P.

- La spectroscopie FTIR-ATR nous a permis de trancher entre l'hypothèse de la réorientation des hélices- α et celle de la superposition des fragments de M.P. Nous avons en effet mesuré l'angle d'inclinaison des hélices- α de la protéine pour des échantillons de M.P. déposés par la méthode de Langmuir-Blodgett à différentes pressions de surface (tableau 3). Nous avons vu que cet angle demeurait constant peu importe la pression de surface et que, par conséquent, l'hypothèse de la réorientation des hélices- α ne pouvait rendre compte de l'augmentation de l'épaisseur et de la rugosité des films de M.P. De plus, les mesures de l'absorbance de la bande amide I de la bR en fonction de la pression de surface révélèrent qu'entre 40 et 46 mN/m (soit dans la zone de "collapse" de l'isotherme) la valeur d'absorbance double pour une réduction de moitié dans l'aire moléculaire (Fig. 41). Cet élément vient quant à lui renforcer l'hypothèse selon laquelle une superposition des fragments de M.P. a lieu dans la zone de "collapse" du film.

La position de la bande amide I de la bR confirme par ailleurs le contenu élevé en hélices- α de la protéine, alors que la position de la bande amide II est indicatif selon Gibson et Cassim (1989) de la présence d'une proportion non-négligeable d'hélices en conformation α_{II} . La fréquence de ces bandes demeure inchangée peu importe la pression de surface et est très près des valeurs obtenues par d'autres chercheurs comme Rothschild et Clark (1979). Nous y voyons donc un indice que la structure native de la bR est préservée à l'interface air-eau, peu importe la pression de surface.

- Par la présence de boucles d'hystérèse lors de compressions à des pressions de 30 mN/m ou plus, les cycles CDR en pression et en potentiel de surface ont révélé la formation d'états métastables promus par la pression latérale au sein des films de M.P. à l'interface air-eau. Pour des cycles CDR à des pressions maximales de 10 mN/m ou plus, la présence de variations spontanées dans le potentiel de surface (pics) à pression nulle lors de la décompression et la recompression (Figs. 42 à 46) laissaient croire en la présence d'agrégats de M.P. De plus, le décalage vers les grandes aires moléculaires des courbes de pression et de potentiel de surface lors de la recompression (voir Fig. 43) peut être expliqué par une réinsertion de fragments de M.P. présents dans la sous-phase vers la monocouche durant la période d'attente à pression nulle. Ces fragments pourraient avoir migré directement sous la monocouche lors de l'étalement et former graduellement une ou plusieurs couches diffuses sous l'interface air-eau, prêtes à s'y insérer une fois la pression redevenue égale à zéro. Cette hypothèse pourrait également rendre compte de la déviation au comportement linéaire du

quenching lors des mesures à l'interface air-eau (voir sections 5.3.2 et 5.3.3).

- La microscopie de fluorescence à l'interface air-eau apporte un support visuel à l'hypothèse de la formation d'agrégats de M.P. postulée lors des cycles CDR. On peut en effet visualiser des agrégats de M.P. formés lors d'une compression jusqu'à 10 mN/m suivie d'une décompression à pression nulle. Ces agrégats ne sont cependant formés qu'après une période d'attente à pression nulle suivant la décompression. De plus, pouvant être formés suite à une compression jusqu'à une pression maximale de seulement 10 mN/m, ces agrégats ne peuvent être tenus responsables de la présence d'hystérèses (cycles CDR) qui ne sont observées qu'à des pressions de 30 mN/m ou plus.

En s'appuyant sur les résultats mentionnés ci-dessus, nous proposons le scénario suivant pour illustrer le comportement des films de M.P. à l'interface air-eau: premièrement, nous attribuons l'augmentation importante de K^s entre 0 et 5 mN/m (Fig. 22) à une couverture progressive de la surface disponible du bain par les fragments de M.P. À 0 mN/m, il n'y aurait pratiquement aucun contact statique entre les fragments; la tension de surface demeure alors celle de l'eau pure (Fig. 50A). La réduction de l'aire moléculaire donne lieu à un accroissement des contacts inter-fragments jusqu'au point où (vers 5 mN/m) toute la surface disponible est recouverte par les M.P. à une échelle macroscopique (Fig. 50B). Une augmentation supplémentaire de la pression de surface jusqu'à 20 ou 30 mN/m donnerait lieu à une réorientation des M.P. dans le plan de l'interface jusqu'à ce que tout l'espace inter-fragments soit rempli à l'échelle microscopique (Fig.

50C). Au-delà de ce point, l'augmentation de la pression de surface forcerait progressivement les fragments de M.P. à glisser les uns au-dessus des autres et ceci, en plusieurs endroits de la surface, marquant ainsi le début du "collapse" du film (Fig. 50D). Finalement, la compression du film jusqu'à 43 mN/m occasionne la généralisation de la formation de multicouches à travers l'ensemble du film (Fig. 50E), ce qui se traduit par une inflexion importante dans l'isotherme de pression de surface (Fig. 21) dans la zone du collapse.

Parmi les diverses techniques d'analyse présentées ici, plusieurs constituent une méthode nouvelle et efficace dans l'étude des films monomoléculaires. Cette étude démontre de plus que les besoins de films de M.P. ultramince, photoactifs et de bonne qualité structurale pour l'élaboration de différentes composantes bioélectroniques peuvent aisément être remplis par la formation de monocouches de M.P. à l'interface air-eau. Qui plus est, les diverses techniques utilisées démontrent qu'une pression de surface d'environ 20 mN/m apparaît idéale dans l'optique d'une telle élaboration. Cette pression correspond en effet à un maximum dans la couverture de l'interface par les M.P. (densité bi-dimensionnelle maximale en bR) sans compromettre l'organisation monomoléculaire optimale du film (préservation de l'état monomoléculaire du film).

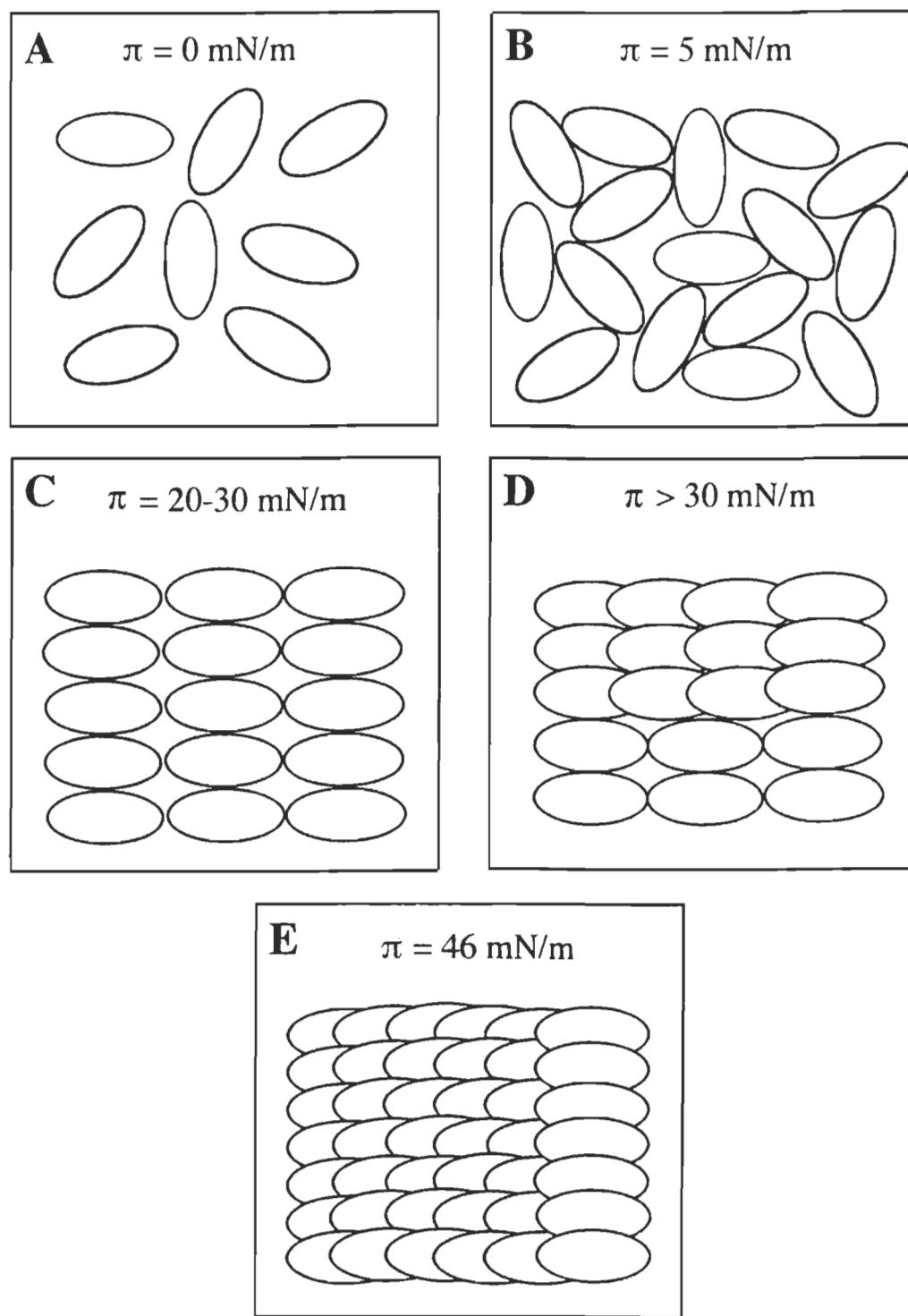


Figure 50 (A à E). Représentation schématique d'un scénario de l'organisation des M.P. en fonction de la pression de surface à l'interface air-eau pouvant rendre compte des résultats obtenus par les différentes techniques d'analyse (détails dans le texte).

BIBLIOGRAPHIE

- Als-Nielsen, J., et Kjaer, K., Phase Transitions in Soft Condensed Matter, Riste, T. et Sherrington, D., Editeurs, Proc. NATO ASI ser. B 211, Plenum Press, New York, 1989 page 113.
- Atkins, P.W., Physical Chemistry, Oxford University Press, Great Britain, 1978.
- Aveyard, R. et Haydon, D.A., An Introduction to the Principles of Surface Chemistry, London, Cambridge University Press, 1973.
- Baribeau, J. et Boucher, F., Isolation, purification and partial characterization of stable forms of monomeric bacteriorhodopsin in lauryl sucrose. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 1984, 63, 305-312.
- Birge, R.R., Photophysics and molecular electronic applications of the rhodopsins. Annu. Rev. Phys. Chem., 1990, 41, 683-733.
- Birge, R.R., Protein-based computers. Scientific American, 1995, 272, 90-95.
- Bockris, J.O'M. et Reddy, A.K.N., Modern Electrochemistry, Tomes 1 et 2, New York, Plenum Press, 1977.
- Born, M., Wolf, E., Principles of Optics, MacMillan, New York, 1959.
- Brullemans, M., Adsorption d'un agent antitumoral (le celiptium) à l'interface phosphatidylglycérol-eau: mesures électrophorétiques et mesures de potentiel et de pression de surface à l'interface air-eau. Chapitres Choisis de Biophysique, Université du Québec à Trois-Rivières, 1989.

- Chérid, N.E., Mise au point d'un système de mesure pour étudier les propriétés d'absorption et de fluorescence à l'interface air-eau. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, 1992.
- Chou, K.C., Carlacci, L., Maggiora, G.M., Parodi, L.A. et Schultz, M.W., An energy-based approach to packing the 7-helix bundle of bacteriorhodopsin. Protein Science, 1992, 1, 810-27.
- Cramer, W.A. et Knaff, D.B., Energy Transduction in Biological Membranes, Springer-Verlag, New-York, 1991 p. 301.
- Dousseau, F. et Pézolet, M., Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparisons between classical and partial least-squares methods. Biochemistry, 1990, 29, 8771-8779.
- Du, W. et Liu, S., Saturated optical non-linearity of bacteriorhodopsin Langmuir-Blodgett films derived from degenerate multiwave mixing. Thin Solid Films, 1993, 229, 122-27.
- Ducharme, D., Salesse, C. et Leblanc, R.M., Ellipsometric studies of rod outer segment phospholipids at the nitrogen-water interface. Thin Solid Films, 1985, 132, 83-90.
- Dwivedi, A.M., et Krimm, S., Vibrational analysis of peptides, polypeptides and proteins: conformational sensitivity of the α -helix spectrum: α_I and α_{II} poly (L-alanine). Biopolymers, 1984, 23, 923.
- Earnest, T.N., Herzfeld, J. et Rothschild, K.J., Polarized Fourier transform infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin, Biophysical Journal, 1990, 58, 1539-1546.

- Flanagan, M.T., The deposition of Langmuir-Blodgett films containing purple membrane on lipid- and paraffin-impregnated filters. Thin Solid Films, 1983, 99, 133-38.
- Fraser, R.D.B., Infrared dichroïsm in fibrous proteins. Journal of Chemical Physics, 1953, 21, 462.
- Fringeli, U.P., et Günthard, H.H., Membrane Spectroscopy, Springer Verlag, Berlin, 1981 p. 270.
- Gaines Jr., G.L., Insoluble Monolayers at Liquid/Gas Interfaces, Interscience, New York ,1966.
- Gibson, N.J., et Cassim, J., Evidence for an α II-type helical conformation for bacteriorhodopsin in the purple membrane. Biochemistry, 1989, 28, 2134-2139.
- Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H. et Salesse, C., An enzyme caught in action: direct imaging of hydrolytic function and domain formation of phospholipase A₂ in phosphatidylcholine monolayers. FEBS Letters, 1989, 252, 73-82.
- Hampp, N., Heat-proof proteins. Nature, 1993, 366, 12.
- Heberle, J. et Dencher, N.A., Surface-bound optical probes monitor proton translocation and surface potential changes during the bacteriorhodopsin photocycle. Proceedings of the National Academy of Science of the United States, 1992, 89, 5996-6000.
- Henderson, R. et Unwin, P.N.T., Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. Nature, 1975, 257, 28-32.
- Hu, K.S., Wang, A.J., Tan, M.Q., Li, J.R. et Jiang, L., Preparation and characterization of purple membrane Langmuir-Blodgett films. Chinese Science Bulletin, 1992, 37, 231-34.

- Hübner, W. et Mantsch, H.H., Orientation of specifically labeled phosphatidylcholine multilayers from polarized attenuated total reflection FT-IR spectroscopy. Biophysical Journal, 1991, 59, 1261.
- Hwang, S.B., Korenbrot, J. I. et Stoeckenius, W., Structural and spectroscopic characteristics of bacteriorhodopsin in air-water interface films. J. Membrane Biol., 1977, 36, 115-135.
- Ikonen, M., Peltonen, J., Vuorimaa, E, et Lemmetyinen, H., Study of photocycle and spectral properties of bacteriorhodopsin in Langmuir-Blodgett films. Thin Solid Films, 1992a, 213, 277-84.
- Ikonen, M., Sharonov, A., Tkachenko, N. et Lemmetyinen, H., The photovoltage of bacteriorhodopsin in X- and Z- type monolayers and Z-type multilayer Langmuir-Blodgett film. Structures and Functions of Retinal Proteins, 1992b, 221 189-92.
- Ikonen, M., Sharonov, A., Tkachenko, N., et Lemmetyinen, H., The photovoltage signals of bacteriorhodopsin in Langmuir-Blodgett films with different molecular orientations. Advanced Materials for Optics and Electronics, 1993, 2, 115-22.
- Jap, B.K., Maestre, M.F., Hayward, S.B. et Glaeser, R.M., Peptide-chain secondary structure of bacteriorhodopsin, Biophysical Journal, 1983, 43, 81-89.
- Kates, M., Kushwaha, S.C., et Sprott, G.D., Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. Methods in Enzymology, 1982, 88, 98-111.
- Kushwaha, S.C., Kates, M. et Martin, W.G., Characterization and composition of the purple and red membrane from *Halobacterium halobium*. Canadian Journal of Biochemistry, 1975, 53, 284-92.

- Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, 1983.
- Lamarche, F., Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, 1988.
- Lavigne, P., Tancrède, P., Lamarche, F., Grandbois, M., et Salesse, C., The organization of poly- γ -benzyl-L-glutamate in the α -helical conformation at the air-water interface. Thin Solid Films, 1994, 242, 229-33.
- Lavigne, P., Une nouvelle approche pour mesurer la contribution des résidus hydrophobes à la stabilisation de la structure tertiaire des protéines globulaires. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, 1994.
- Lemmetyinen, H., Ikonen, M., Sharonov, A. et Tkachenko, N., Time-resolved transient absorption and photoresponse studies of oriented bacteriorhodopsin in Langmuir-Blodgett films. Laser Spectroscopy of Biomolecules, 1992, 1921, 209-20.
- Mirabella, F.M., A critical evaluation of internal reflection spectroscopic methods for determining macromolecular orientation in polymer surfaces. Applied Spectroscopy, 1988, 42, 1258-1265.
- Miyasaka, T. et Koyama, K., Photoelectrochemical behavior of purple membrane Langmuir-Blodgett films. Chemistry Letters, 1991, 1645-1648.
- Miyasaka, T. et Koyama, K., Rectified photocurrents from purple membrane Langmuir-Blodgett films at the electrode-electrolyte interface. Thin Solid Films, 1992, 210/211, 146-149.

- Miyasaka, T., Koyama, K., et Itoh, I., Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor. Science, 1992, 255, 342-344.
- Niemi, H.E.-M., Ikonen, M., Levlin, J.M. et Lemmetyinen, H., Bacteriorhodopsin in Langmuir-Blodgett films imaged with a scanning tunneling microscope. Langmuir, 1993, 9, 2436-47.
- Oesterhelt, D. et Hess, B., Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. European Journal of Biochemistry, 1973, 37, 316-26.
- Oesterhelt, D. et Stoeckenius, W., Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Nature New Biology, 1971, 233, 149-52.
- Oesterhelt, D. et Stoeckenius, W., Functions of a new photoreceptor membrane. Proceedings of the National Academy of Science of the United States, 1973, 70, 2853-57.
- Parratt, L.G., Surface studies of solids. Physical Reviews, 1954, 95, 359.
- Pattus, F., Rothen, C., Streit, M. et Zahler, P., Further studies on the spreading of biomembranes at the air-water interface. Structure, composition, enzymatic activities of human erythrocyte and sarcoplasmic reticulum membrane films. Biochimica Biophysica Acta, 1981, 647, 29-39.
- Rothschild, K.J. et Clark, N.A., Polarized infrared spectroscopy of oriented purple membrane. Biophysical Journal, 1979, 25, 473-486.
- Salesse, C., Ducharme, D., Leblanc, R.M., et Boucher, F., The estimation of rod outer segment disk membrane lateral pressure and molecular area

of rhodopsin by the measurement of its orientation at the nitrogen-water interface from an ellipsometric study. Biochemistry, 1990, 29, 4567-75.

- Schildkraut, J. et Lewis, A., Purple membrane and purple membrane-phospholipid Langmuir-Blodgett films. Thin Solid Films, 1985, 134, 13-26.
- Shen, Y., Safinya, C.R., Liang, K.S., Ruppert, A.F. et Rothschild, K.J., Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140°C in two-dimensional films. Nature, 1993, 366, 48-50.