

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
SAMIR ELOUATIK

Modulation réversible de l'activité de la bactériorhodopsine :
aspects optique et électrocinétique de la conversion énergétique par ses
états couplé et découplé

Décembre 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 Mélanie et Souhaïb

RÉSUMÉ

Sous l'effet de la lumière visible, la bactériorhodopsine native, contenue dans la membrane pourpre des halobactéries, agit comme une pompe électrogénique qui transfère des protons de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane bactérienne. Cette transduction énergétique du rayonnement lumineux en gradient électrochimique de protons est associée, d'une part, à une séquence cyclique de réactions photochimiques et, d'autre part, à une perturbation de l'état électrique interne de la protéine. En présence des anesthésiques volatils, de type enflurane et halothane, il s'établit un équilibre acido-basique entre deux formes spectrales distinctes de la bactériorhodopsine : la forme pourpre bR₅₇₀ et la forme rouge bR₄₈₀ (pK_a apparent est de 7.3). Comparativement au pigment natif, le pigment modifié bR₄₈₀ possède une activité photochimique complète qui est essentiellement caractérisée par une déprotonation très rapide suivie par une reprotonation extrêmement lente du rétinal. De la même manière, les anesthésiques volatils altèrent la réponse photoélectrique normale de la forme bR₅₇₀ en accélérant le courant d'éjection de protons et en ralentissant le courant de retour à l'équilibre de charges initial. De plus, les aires relatives des différentes composantes électriques sont fortement réduites démontrant ainsi une grande inhibition, voir même une annulation totale, dans l'activité de pompage de protons du pigment modifié bR₄₈₀. Par ailleurs, cette déficience fonctionnelle de la protéine a été directement examinée par des mesures de la conductivité électrique du milieu qui ont révélé une absence complète de protons libérés en dehors de la membrane pourpre. Très probablement, ce découplage entre la photochimie et l'activité de pompage de protons peut être expliqué par une modification du trajet

emprunté et/ou une diminution significative des distances parcourues par le proton à l'intérieur de la bactériorhodopsine. L'effet de l'anesthésique volatil est complètement réversible, car son évaporation régénère immédiatement toutes les propriétés normales du pigment.

Merci à tous!

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
 CHAPITRE I	 1
INTRODUCTION	1
1.1 Généralités	1
1.2 Halobacterium halobium : physiologie et biochimie	2
1.3 La membrane pourpre : structure, composition et propriétés générales.....	6
1.4 Le pigment photosensible : la bactériorhodopsine	9
1.4.1 Composition et structure	9
1.4.2 Activité photochimique et rôle physiologique	15
1.4.3 Mécanisme d'action : modèle général résumant les principales données moléculaires communément établies	21
1.4.3.1 Photoisomérisation trans → cis du rétinal et déstabilisation subséquente de la base de Schiff : transitions bR → J → K → L	22
1.4.3.2 Déprotonation de la base de Schiff et expulsion extérieure d'un proton : transition L → M	26
1.4.3.3 Reprotonation de la base de Schiff et disparition d'un proton du côté cytoplasmique : transitions M → N → O	28
1.4.3.4 Recouvrement de l'état initial de la bactériorhodopsine transition : O → bR	30
1.5 Cadre général et objectifs de recherche	31
1.5.1 Les interactions lipides-protéine et l'équilibre entre différentes formes spectrales de la bactériorhodopsine	31
1.5.1.1 Aspects structural et fonctionnel du pigment bR480	35
1.5.2 Justification de l'approche et objectifs spécifiques	43
 CHAPITRE II.....	 47
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	47

2.1	Techniques spectroscopiques	47
2.1.1	Absorption	47
2.1.2	Mesures de la variation transitoire de la transmission optique : méthode de la photolyse éclair	47
2.1.2.1	Introduction	47
2.1.2.2	Principe de la méthode	48
2.1.2.3	Préparation des échantillons	51
2.1.2.4	Description de la procédure expérimentale et du dispositif de mesure utilisé	53
2.2	Mesures photoélectriques	58
2.2.1	Introduction	58
2.2.2	Nécessité de l'orientation des membranes pourpres	59
2.2.3	Méthodes d'orientation : un aperçu général	60
2.2.4	Méthode du gel orienté : principe de base	65
2.2.5	Préparation des échantillons de mesure : membranes pourpres orientées et immobilisées dans un gel polyacrylamide	68
2.2.6	Procédure expérimentale et système de mesure	69
2.3	Mesures de la variation transitoire de la conductivité électrique	74
2.3.1	Introduction	74
2.3.2	Méthodologie et fonctionnement de l'ensemble	76
2.4	Électrodes	78
2.4.1	Introduction	78
2.4.2	Technique de platinisation	79
2.4.2.1	Définition et avantages pratiques	79
2.4.2.2	Préparation préliminaire des électrodes	80
2.4.2.3	Procédure de platinisation	81
2.4.2.4	Conservation des électrodes	82
2.5	Produits chimiques	84
	CHAPITRE III	85
	THÉORIE DE LA RELAXATION PHOTOÉLECTRIQUE.....	85
3.1	Description cinétique du photocycle réactionnel de la bactériorhodopsine	85
3.2	Séquence linéaire de réactions chimiques de premier ordre : choix du modèle cinétique le plus approprié	87
3.3	Cinétiques de croissance et de décroissance des états intermédiaires du photocycle.....	91
3.4	Relation entre les déplacements de charge intraprotéiques et le photocourant macroscopique	93

CHAPITRE IV	100	
MÉTHODE NUMÉRIQUE D'ANALYSE DES DONNÉES		
EXPÉIMENTALES		100
4.1	Problématique et introduction	100
4.2	Description de la méthode DELP	102
4.2.1	Fondements théoriques	102
4.2.1.1	Représentation d'un signal expérimental par une série limitée de Legendre	107
4.2.1.2	Approximation d'une fonction lisse par une somme d'exponentielles	109
4.2.1.2.1	Phase 1 : Détermination des constantes de relaxation λ_l	112
4.2.1.2.2	Expression de la fonction de minimisation en fonction des polynômes de Legendre	114
4.2.1.2.3	Phase 2 : Détermination des amplitudes exponentielles relatives A_l	118
4.3.	Analyse critique	120
4.3.1	Discussion de la méthode DELP.....	120
4.3.2	Estimation d'erreur	124
4.3.3	Comparaison avec d'autres méthodes d'approximation	124
4.4	Conclusion	126
CHAPITRE V	127	
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....		127
5.1	Modulation réversible de l'équilibre spectral entre les formes bR570 et bR480	127
5.2	Comparaison des activités photochimiques des pigments bR570 et bR480	127
5.2.1	Résultats	127
5.2.2	Discussion	139
5.3	Comparaison des photocourants de déplacement de charge générés par les pigments bR570 et bR480	142
5.3.1	Éléments descriptifs du photocourtant typique de la bactériorhodopsine native	142
5.3.2	Résultats	146
5.3.3	Discussion	155
5.4	Comparaison des variations transitoires de la conductivité électrique générées par les pigments natif et modifié	161
5.4.1	Résultats	161
5.4.2	Discussion	169

CHAPITRE VI	174
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	174
6.1 Discussion générale	174
6.2 Conclusion	175
RÉFÉRENCES.....	179

LISTE DES TABLEAUX

	Page
1. Temps de relaxation des transitions optiques observées, à température ambiante, dans diverses conditions expérimentales	134
2. Temps de relaxation des photocourants générés par la bactériorhodopsine dans diverses conditions expérimentales	153
3. Réduction graduelle de l'efficacité de pompage de protons (EPP) en fonction de l'induction progressive de la forme bR ₄₈₀ . EPP* ≡ EPP normalisée à celle du pigment natif	158
4. Temps de relaxation des trois phases constitutives des signaux de conductivité présentés sur les figures 34, 35 et 36	168

LISTE DES FIGURES

	Page
Fig. 1 Morphologie d'une cellule d' <i>halobacterium halobium</i> et représentation des principaux systèmes membranaires impliqués dans les processus relatifs de transduction d'énergie.	5
Fig. 2 Diagramme de densité de diffraction montrant la structure cristalline hexagonale de la membrane pourpre	8
Fig. 3 Illustration schématique de la composition et de la structure bidimensionnelle de la membrane pourpre.	10
Fig. 4 Arrangement tridimensionnel des sept segments hélicoïdaux de la bR.	12
Fig. 5 Topographie des sept hélices α et du rétinal.	14
Fig. 6 Schéma simplifié du cycle photochimique de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière (bR ₅₇₀)	19
Fig. 7 Vectorialité et stoechiométrie de la pompe à protons de la bR ₅₇₀	20
Fig. 8 Modèle général du mécanisme moléculaire de pompage de protons de la bR native.	24
Fig. 9 Spectres d'absorption UV-visible des formes native (bR ₅₇₀) et modifiée (bR ₄₈₀) de la bactériorhodopsine.	34
Fig. 10 Évolution temporelle de la perturbation spectrale induite, par une lumière actinique, dans des échantillon de membranes pourpres et modifiées..	37
Fig. 11 Spectre de différence obtenu après irradiation d'un échantillon de membranes pourpres modifiées par ajout de 1% d'enflurane.	38
Fig. 12 Principales transitions du cycle photochimique de la bR ₄₈₀	39
Fig. 13 Activité de pompage de protons examinée, après une excitation laser, par mesure de la variation transitoire d'absorbance du milieu.	40
Fig. 14 Spectres d'action de l'activité de pompage de protons à travers des vésicules de membranes pourpres et modifiées.	42
Fig. 15 Principe de base de la photolyse éclair	50
Fig. 16 Schéma descriptif du montage expérimental de la photolyse éclair	61
Fig. 17 a Photocourant microscopique $i(t)$ engendré par les déplacements élémentaires de charge à travers la bR.	61
b Système membranaire orienté (i.e., diélectriquement polarisé) permettant la détection du photocourant macroscopique $I(t)$	57
Fig. 18 Schéma montrant l'orientation électrique d'une membrane pourpre dans une solution aqueuse à pH neutre.	67

Fig. 19	Illustration schématique résumant la procédure de préparation du gel orienté	70
Fig. 20	Montage expérimental employé pour mesurer les photocourants transitoires de la bR	73
Fig. 21	Diagramme simplifié illustrant le principe de mesure de la variation transitoire de la conductivité électrique du milieu extérieur.	75
Fig. 22	Diagramme simplifié du montage expérimental servant à la platinisation des électrodes de mesure.	83
Fig. 23	Photocourant transitoire produit par un seul déplacement élémentaire de charge à l'intérieur de la membrane.	95
Fig. 24	Illustration du fonctionnement de la méthode DELP à l'aide d'un exemple expérimental	105
Fig. 25	Exemples de représentation approchée (lissage) d'une trace théorique de deux exponentielles par une série de Legendre limitée.	110
Fig. 26	Evolution du spectre d'absorption d'un échantillon de membranes pourpres après additions successives d'enflurane.	128
Fig. 27	Transitoires optiques associés à la formation et à la disparition des intermédiaires M (M_{412} et M_{380}).	130
Fig. 28	Transitoires optiques représentant la disparition très rapide et la régénération progressive des pigments bR_{570} et bR_{480}	131
Fig. 29	Transitoires optiques montrant la formation et la disparition des intermédiaires O associés aux pigments natif et modifié.....	132
Fig. 30	Photocourant typique de la bR native mesuré par méthode du gel orienté.	145
Fig. 31	Photocourants transitoires mesurés, dans un tampon 10 mM Tris-HCl pH = 7.5, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par addition de 1% (v/v) d'enflurane.....	148
Fig. 32	Photocourants transitoires mesurés, dans l'eau pure, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% (v/v) d'enflurane.	150
Fig. 33	Photocourants transitoires mesurés, dans une solution saline 5 mM $CaCl_2$, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% (v/v) d'enflurane.....	151
Fig. 34	Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées, dans l'eau distillée, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 3% (v/v) d'enflurane.....	164
Fig. 35	Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées, dans une solution 1 mM NaCl, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% (v/v) d'enflurane.	165

Fig. 36	Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées, dans une solution tampon 1 mM Tris-HCl (pH = 8) et 1 mM NaCl, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% d'enflurane.	166
Fig. 37	Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées pour les pigments pourpre, bleu et régénéré.	170
Fig. 38	Illustration schématique du modèle proposé pour décrire les trois phases constitutives du signal de variation de la conductivité électrique du milieu.	173

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Alanine
ADP	adenosine-diphosphate
ATP	adenosine-triphosphate
BLM	Bicouche lipidique plane
bR	bactériorhodopsine
D	Aspartate
DELP	"Differential equations linear polynomial"
E	Glutamate
EPP	efficacité de pompage de protons
F	Phenylalanine
FTIR	"Fourier transform infrared resonance"
hv	énergie d'un photon de fréquence ν ; h est la constante de Planck
hR	halorhodopsine
mp	membrane pourpre
N	Asparagine
NADPH	"nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced"
R	Arginine
RMN	résonance magnétique nucléaire
S	Serine
T	Thréonine
TEMED	Tétramethyl éthylène diamine
UV	ultra-violet
W	Watt
Y	Tyrosine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Généralités

L'aptitude naturelle de certains organismes vivants, tels que les bactéries photosynthétiques, les cyanophytes, les algues rouges, vertes et brunes, ainsi que les plantes, à se servir efficacement de l'énergie du rayonnement solaire comme source additionnelle d'énergie pour activer des fonctions physiologiques primordiales, telles que la synthèse de l'ATP, l'acquisition externe des métabolites, les échanges ioniques transmembranaires, etc., a été découverte depuis fort longtemps [1].

Pour ce faire, les eubactéries¹ ont développé la photosynthèse classique, basée sur les photorécepteurs chlorophylliens et une chaîne de réactions d'oxydo-réduction en cascade, pour transformer l'énergie lumineuse sous forme d'énergie libre directement utilisable pour assurer un fonctionnement cellulaire normal; tandis que les archaebactéries² synthétisent des chromoprotéines membranaires (au moins cinq chromoprotéines à rétinal sont maintenant connues) [2] capables de

¹ Terme généralement employé pour désigner les espèces bactériennes n'appartenant pas à la grande famille des archaebactéries. Ces organismes anaérobiques limites, en forme de bâtonnets, se développent habituellement dans le sol, les lésions et les intestins humains, ainsi que sur les aliments chimiquement altérés. Parmi ces bactéries encore mal caractérisées, on retrouve particulièrement les cyanobactéries, les enterobactéries, et la majorité des bactéries gram-positives.

² Classe distincte d'organismes procaryotiques d'origine très primitive, composée essentiellement de bactéries méthanogènes, d'espèces halophiles et thermophiles extrêmes (e.g., *Halobacterium halobium*), de même que de bactéries capables de survivre dans des conditions acides. Microscopiquement, les archaebactéries se démarquent des eubactéries par des particularités génétiques et biochimiques différentes.

piéger et de convertir très rapidement l'énergie de la radiation lumineuse en énergie électrochimique sous forme d'un gradient ionique et d'un potentiel électrique transmembranaires; cette nouvelle source d'énergie ainsi créée sera ensuite consommée pour combler les besoins énergétiques de la cellule.

Parmi les archaebactéries les plus fréquemment rencontrées et aussi les plus étudiées, on retrouve les halobactéries qui sont des bactéries halophiles extrêmes [3-5], avec certains traits particuliers, dont l'activité photosynthétique est uniquement contrôlée par une seule protéine membranaire ayant beaucoup de ressemblance avec la rhodopsine du pigment rétinien des mammifères, la bactériorhodopsine (bR) [6-10]. Les halobactéries se composent à leur tour de plusieurs sortes de bactéries dont les principales constituent les trois grandes classes actuellement identifiées : *Halobacterium halobium*, *Halobacterium cutirubrum* et *Halobacterium salinarium* [10-12]. Cependant, depuis la découverte du pouvoir de photoconversion chez les halobactéries, seules des souches bactériennes du type *Halobacterium halobium* (R₁, R₁M₁, R₁L₃, R₁S₉, etc.) ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche intensifs dont les résultats les plus marquants ont permis de bien les caractériser et aussi de comprendre, jusqu'à un certain point, leur mode de fonctionnement [12]. Elles continuent d'être la cible privilégiée de nombreuses investigations visant à élucider le mécanisme d'action de la photosynthèse à base de bactériorhodopsine ou de protéines analogues.

1.2 *Halobacterium halobium* : physiologie et biochimie

Les bactéries de type *Halobacterium halobium* sont des micro-organismes photosynthétiques non chlorophylliens, de pigmentation rouge (caroténoïdes).

Généralement, elles se présentent sous forme de petits bâtonnets d'environ 0.5 µm de diamètre et 4-10 µm de longueur munis de nombreuses flagelles aux extrémités [12-13]. Elles s'étendent habituellement en quantités abondantes dans les marais et les lacs salants auxquels elles donnent une coloration rouge vif. On les retrouve également dans les eaux de la mer morte ainsi que dans les bassins où le sel cristallin est obtenu par évaporation solaire de l'eau de mer. De plus, leur activité de croissance ainsi que leur maintien structural et fonctionnel dépendent extrêmement de la quantité de sels (NaCl, MgCl₂, etc.) présents dans le milieu de culture; ainsi leur vitesse de multiplication peut atteindre une limite maximale pour des concentrations en NaCl proches de la saturation (~ 35%).

D'autre part, les *Halobacterium halobium* sont des bactéries aérobiques qui, dans des conditions physiologiques normales, utilisent la phosphorylation oxydative comme principale source d'énergie pour activer plusieurs fonctions cellulaires, comme par exemple la synthèse de l'ATP. Toutefois, dans des conditions de croissance où la pression d'oxygène ainsi que la quantité du substrat organique (NADPH) sont extrêmement limitées, et en présence de lumière intense, la bactérie synthétise des régions membranaires de coloration pourpre, appelées membranes pourpres (mp), pour convertir directement l'énergie du rayonnement lumineux en un gradient électrochimique de protons [14]. *In vivo*, l'énergie électrochimique ainsi établie est ensuite utilisée, au niveau de d'autres sites de la membrane cellulaire, comme source intermédiaire d'énergie pour faire activer plusieurs processus métaboliques physiologiquement indispensables [15]. Ainsi une bonne partie de cette énergie est d'abord dissipée pour synthétiser de l'ATP (à partir de l'ADP et du phosphate inorganique) par le biais de l'ATPase; cette réaction est réversible, car la dégradation interne des molécules d'ATP conduit à l'expulsion de protons en dehors de la membrane.

Parallèlement, la dissipation ultérieure du gradient de protons met en marche d'autres processus spécifiques importants [13]. En effet, un système protéique antiport permet de coupler la migration des ions H⁺ vers l'intérieur de la cellule à un efflux actif des ions sodium (Na⁺), selon un rapport stoechiométrique de ~ 2 H⁺/Na⁺. En fait, cet échange ionique transmembranaire permet d'une part à la cellule de maintenir un équilibre normal en ions Na⁺, et d'autre part il génère un gradient électrochimique d'ions Na⁺ qui est d'une grande utilité bioénergétique, puisque sa relaxation ultérieure se fait très lentement et active en même temps d'autres réactions cellulaires importantes. Plus particulièrement, la diffusion transmembranaire des ions sodium est directement couplée à un transport actif d'acides aminés vers l'intérieur de la cellule, conformément à une stoechiométrie de transport de un résidu/Na⁺. Entre autres, l'énergie du gradient sodium est également utilisée pour fournir l'énergie requise pour maintenir une concentration intracellulaire normale en ions Ca²⁺ libres, et ce selon un mécanisme encore mal défini. Elle sert aussi à contrôler la motricité rotationnelle des flagelles qui assurent la mobilité adéquate de la bactérie dans son environnement naturel. D'autre part, la composition du milieu intracellulaire est particulièrement marquée par une forte concentration en ions potassium (~ 3 M K⁺) [13]. Cette concentration interne augmente sensiblement sous l'effet de la lumière en réponse au potentiel électrique du gradient de protons, positif du côté extracellulaire (~ 200 mV), et aussi grâce à la grande perméabilité de la membrane cellulaire vis-à-vis des cations K⁺. Enfin, il faut également mentionner la présence intracellulaire d'autres types d'espèces ioniques, tels que les ions Cl⁻ et Mg²⁺, qui jouent, entre autres, un rôle significatif dans le maintien de l'équilibre ionique de la bactérie. La figure 1 représente schématiquement l'aspect morphologique normal d'une cellule d'*Halobacterium halobium*, ainsi que ses principaux processus physiologiques

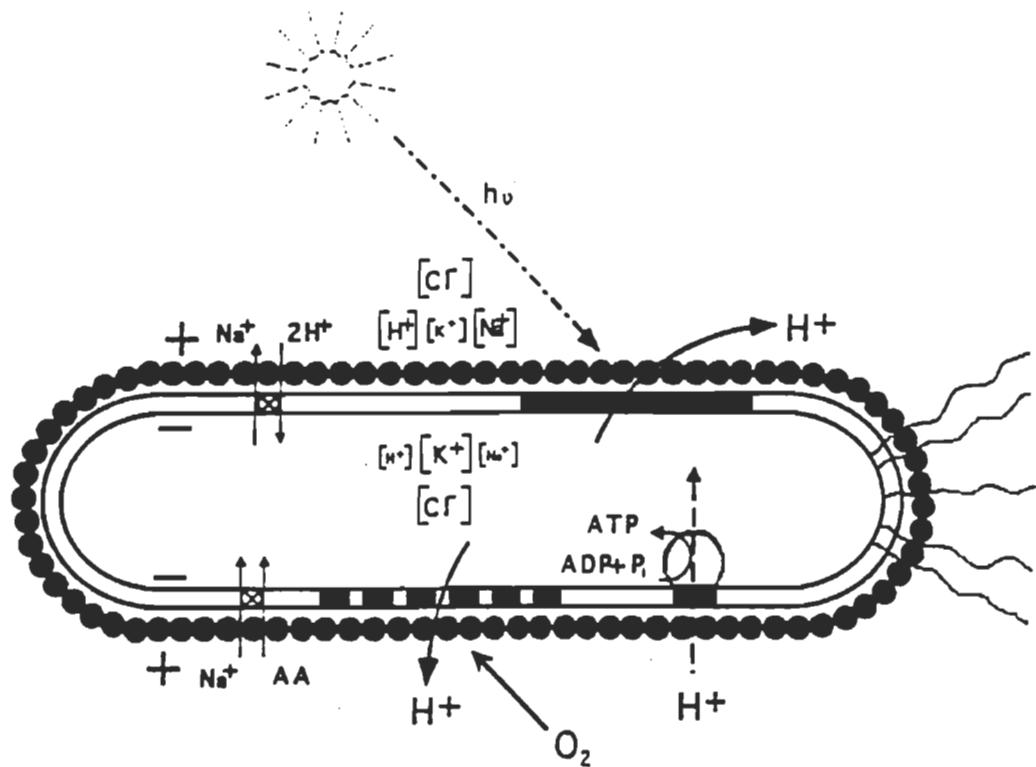


Figure 1 Morphologie d'une cellule d'*Halobacterium halobium* et représentation schématique des principaux systèmes membranaires impliqués dans la modulation de l'activité métabolique de la cellule. L'enveloppe cellulaire est formée de deux membranes; la paroi cellulaire (désignée par des cercles pleins) et la membrane cytoplasmique (désignée par deux lignes parallèles). Au niveau de la membrane cytoplasmique on retrouve la membrane pourpre (section noire), la chaîne respiratoire (ligne noire discontinue) ainsi que d'autres types de pompes ioniques (voir texte). Les espèces ioniques essentielles sont également indiquées selon leurs proportions relatives.

contrôlés, au niveau de la membrane cytoplasmique, par des pompes ioniques très spécialisées.

Par ailleurs, la remarquable stabilité et la robustesse des membranes pourpres isolées ainsi que la conservation de leur activité photosynthétique normale même en dehors de la membrane bactérienne ont fait de ce pigment non chlorophyllien le matériau biologique le plus simple et le plus pratique à utiliser pour tenter d'abord d'élucider le mécanisme moléculaire de pompage de protons de la bR, et ensuite de s'en servir comme modèle membranaire initial pour explorer le fonctionnement de d'autres pompes ioniques encore plus complexes (H^+/K^+ et Na^+/K^+ ATPases, NADH/NADP transhydrogénase, ATPase à Ca^{++} et à H^+ , halorhodopsine, rhodopsine, chaînes respiratoires). De ce fait, depuis le début des années quatre-vingt, les membranes pourpres ont reçues un intérêt grandissant dans le domaine de la bioénergétique et sont vite devenues des photosystèmes modèles pour mener plusieurs recherches pluridisciplinaires, à la fois théoriques et expérimentales, qui visent toutes à progresser sur le chemin de la compréhension du mystère moléculaire des photosystèmes biologiques transporteurs d'ions [16].

1.3 La membrane pourpre : structure, composition et propriétés générales

La membrane pourpre peut constituer jusqu'à plus de 50% de la membrane cytoplasmique d'*Halobacterium halobium* et des autres types d'halobactéries. Elle peut être facilement isolée à l'état très pur grâce au fait que l'enveloppe cellulaire des bactéries halophiles extrêmes est hautement sensible à la force ionique du milieu de culture [12]. En conséquence, lorsque ces cellules sont suspendues dans une solution de très faible teneur en sels, ou à la limite dans l'eau distillée, elles

éclatent complètement en libérant plusieurs fragments membranaires de grandeurs et couleurs variables [17]. Néanmoins, les régions pourpres de la membrane cellulaire restent bien intactes et conservent même leurs intégrités structurale et fonctionnelle. Ces fragments pourpres sont ensuite séparés des autres débris cellulaires par simple centrifugation différentielle pour finalement aboutir, après purification par gradients de densité de sucre, à des disques membranaires ovoïdaux d'environ 0.5 µm de diamètre et 48 Å d'épaisseur [13]. De plus, les membranes pourpres manifestent une résistance exceptionnelle face aux larges variations de la force ionique, de la température et de la composition du milieu de suspension. De ce fait, elles peuvent rester stables et actives même après plusieurs utilisations expérimentales, ou plusieurs années de conservation.

Il est maintenant tout à fait établi que la membrane pourpre est le siège de conversion de l'énergie lumineuse reçue par la bactérie en un gradient électrochimique de protons [14,15]. Ce rôle physiologique éminent est rendu possible par la présence dans la membrane d'une infrastructure ordonnée constituée d'un réseau bidimensionnel d'une seule protéine intrinsèque : la bacteriorhodopsine [10,18]. La structure tridimensionnelle de la membrane pourpre est aujourd'hui bien déterminée, avec une résolution meilleure que 7 Å (figure 2), grâce à la diffraction aux rayons X et aux diverses techniques de microscopie électronique à faible dose (méthode de "freeze-fracture" et autres). Ces techniques ont montré que les molécules de bacteriorhodopsine forment des trimères compacts (motif unitaire) régulièrement disposés dans le plan de la membrane, selon une structure hexagonale, quasi-cristalline et très rigide [10,19]. Cette régularité structurale de la membrane pourpre lui permet d'empiler un maximum de molécules de bacteriorhodopsine par unité de surface; soit plus de 100 000 molécules par fragment pourpre de dimensions moyennes. Les espaces

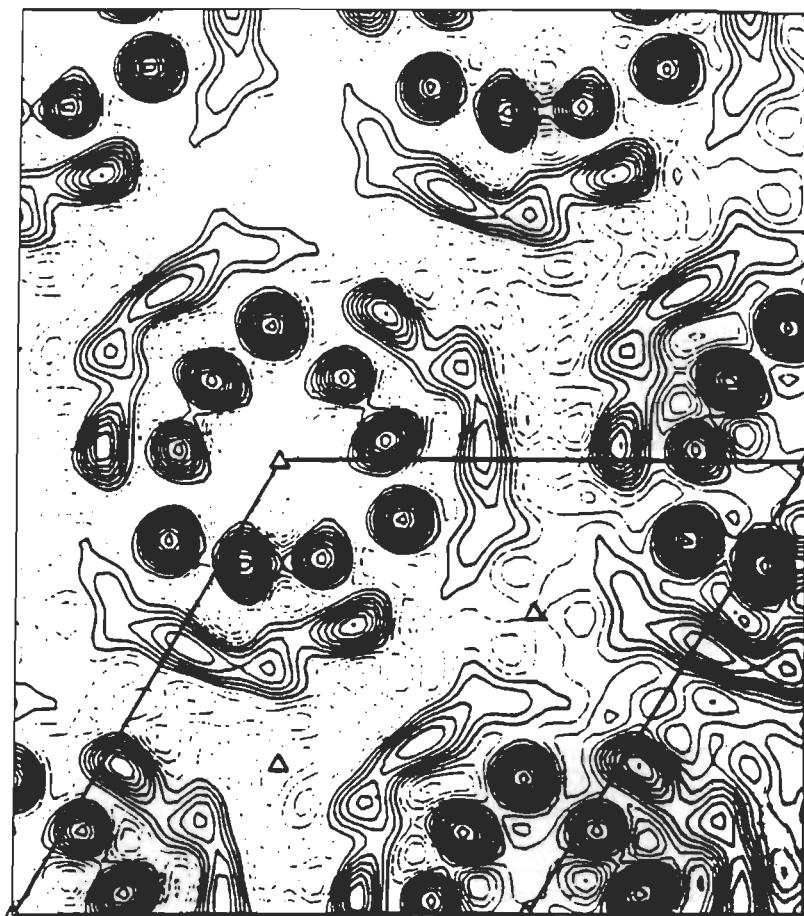


Figure 2 Diagramme de densité de diffraction montrant la structure cristalline hexagonale de la membrane pourpre d'*Halobacterium halobium* avec une résolution de 7 Å. En projection, on observe le réseau plan et la symétrie d'ordre 3 de la membrane. Les limites de la maille unitaire (de dimensions 62 Å x 62 Å) sont indiquées par des lignes pleines foncées et les axes de symétrie par de petits triangles. La figure fait clairement apparaître un trimère de bactériorhodopsine par maille élémentaire du réseau. D'après P.N.T. Unwin et R. Henderson, J. Mol. Biol. 94, 431-448, 1975.

libres entre les motifs protéiques du réseau hexagonal étant principalement occupés par des lipides polaires³[20,21] qui ne représentent que 25% de la masse membranaire totale, les 75% restants sont uniquement composés de molécules de bactériorhodopsine. Par ailleurs, la présence de lipides polaires différemment disposés de part et d'autre de la bicouche lipidique, ainsi que l'orientation asymétrique des monomères de bactériorhodopsine (négativement chargés) au sein de la membrane pourpre confèrent à cette dernière un moment dipolaire électrique permanent d'amplitude relativement élevée (~ 10⁶ Debye dans des conditions physiologiques normales) [22,23]. En fait, cette propriété électrostatique extraordinaire de la membrane pourpre, qui est à l'origine de plusieurs études et applications systématiques de ce pigment, découle d'une distribution inégale de la charge négative sur les deux surfaces de la membrane [24]. La figure 3 résume schématiquement tous les détails essentiels concernant l'organisation cristalline de la membrane pourpre.

1.4 Le pigment photosensible : la bactériorhodopsine

1.4.1 Composition et structure

La molécule de bactériorhodopsine (bR) est une petite protéine membranaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 248 acides aminés et de masse moléculaire de 26 kDa [10,25]. L'analyse de clichés de

³ La plupart des lipides polaires de la membrane pourpre portent une charge négative nette; ils sont majoritairement constitués de phospholipides (analogues du diphytanyl glycerol ether, de phosphatidyl glycerophosphate, de phosphatidyl glycerol et de phosphatidylglycerosulfate) qui représentent à peu près 90% des lipides totaux, et aussi d'un sulfate de glycolipide. Les lipides neutres comptent seulement pour moins de 6% de l'ensemble des lipides. Les molécules lipidiques de la membrane pourpre interviennent dans la régulation de l'activité de pompage de protons de la bR (voir section 1.5.1.).

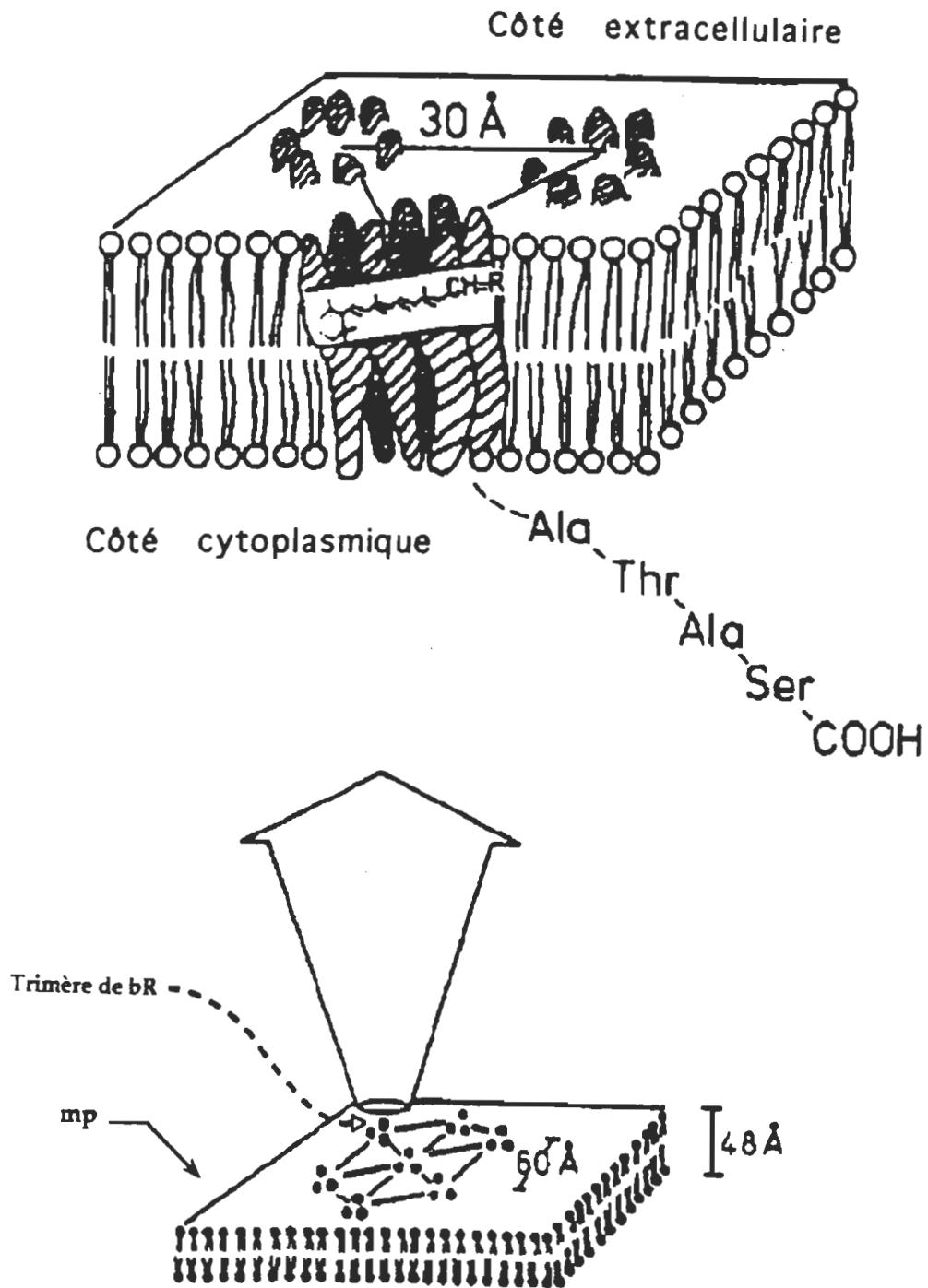
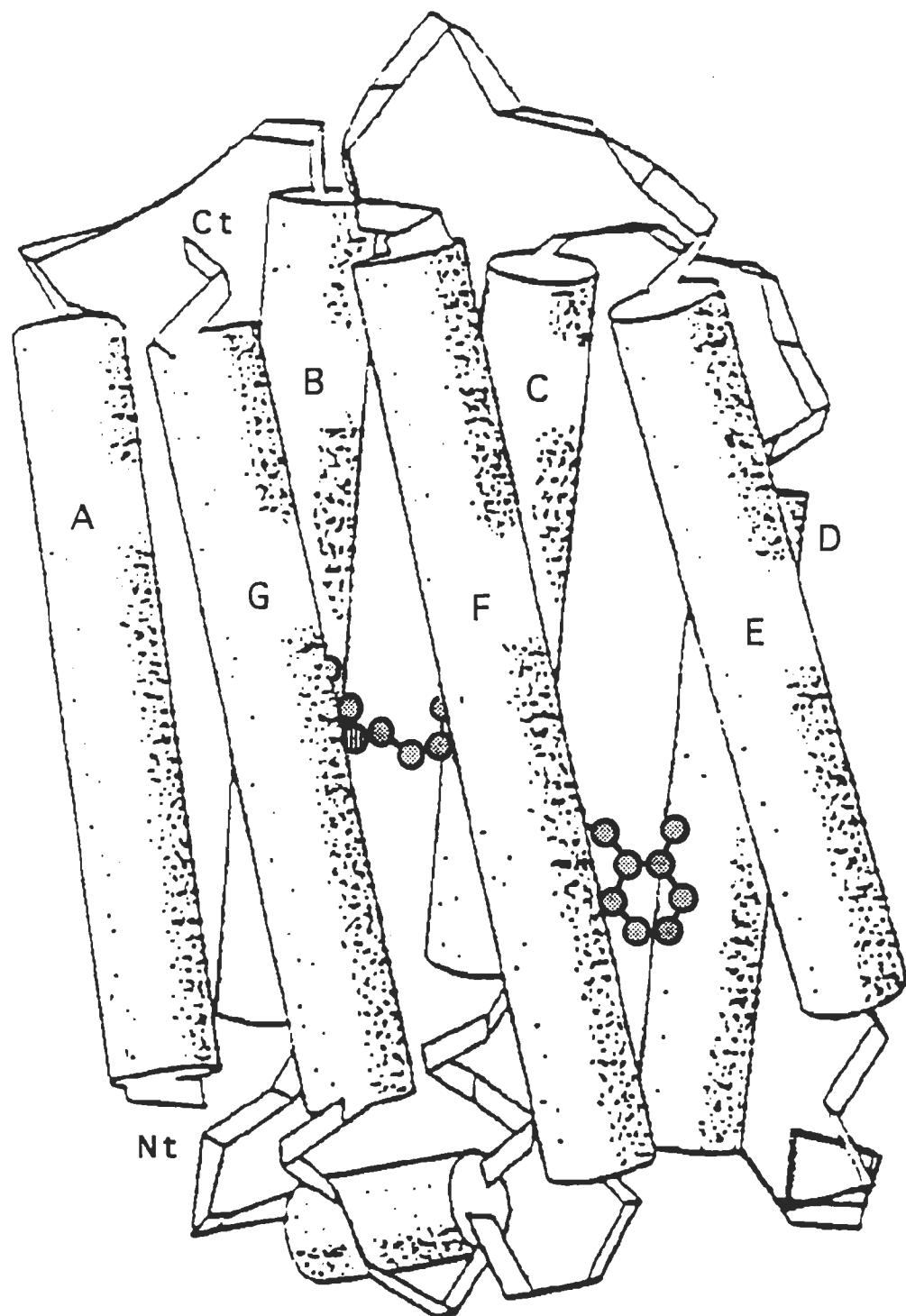


Figure 3 Illustration schématique de la composition et de la structure bidimensionnelle de la membrane pourpre. La figure indique aussi les caractéristiques géométriques du réseau cristallin.

diffraction électronique, obtenus pour différents angles d'inclinaison de la membrane pourpre par rapport au faisceau électronique incident, a permis de déterminer avec une résolution d'ordre atomique (3.5-7 Å) l'organisation tridimensionnelle de la bR et de suivre le parcours de sa chaîne polypeptidique à travers la membrane pourpre [26,27]. Ainsi, il est maintenant connu qu'elle a une structure tertiaire essentiellement constituée de sept segments transmembranaires à caractère hydrophobe d'environ 40 Å de long et distants de ~ 10 Å (habituellement dénommés de A à G). Trois d'entre eux sont perpendiculaires au plan de la membranes, tandis que les quatre autres sont légèrement inclinés d'un angle de 10 à 20 ° par rapport à la normale (figure 4). De plus, d'autres études complémentaires et indépendantes (dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X, etc.) ont démontré que ces segments ont une structure secondaire en hélice α et représentent 80% du poids de la protéine; les 20% restants forment de courtes chaînes polypeptidiques qui relient les hélices les unes aux autres en dehors de la membrane cellulaire [28,29]. La queue N-terminale, composée uniquement de trois acides aminés, est située du côté extracellulaire; l'extrémité C-terminale, composée de 17 résidus, étant du côté cytoplasmique (figure 4). Le tunnel transmembranaire délimité par les sept segments hélicoïdaux renferme un groupement prosthétique : le chromophore rétinal [26] qui est à la base de l'activité biologique normale de la molécule de bR [27].

Le rétinal, aldéhyde dérivé de la vitamine A, est composé d'un noyau aromatique (cycle β -ionone) et d'un système conjugué de plusieurs doubles liaisons (chaîne polyénique). Dans la bR, la terminaison aldéhyde du rétinal est attachée au groupement ϵ -aminé de la lysine-216 de l'apoprotéine



Extérieur

Figure 4 Arrangement tridimensionnel des sept segments hélicoïdaux de la bR. L'espace libre transmembranaire est occupé par le chromophore rétinal placé presque au milieu de la protéine. D'après R. Henderson et al., J. Mol. Biol. 213, 899-929, 1990.

(protéine sans chromophore) à l'aide d'un lien aldimine protoné, appelé base de Schiff: C=NH⁺⁻ [30,31]. Le lien de base de Schiff, combiné à d'autres interactions de nature non covalentes existant au niveau de la cavité du rétinal, est entièrement responsable de la coloration spécifique de la membrane pourpre. En outre, la longue chaîne polyénique du rétinal présente toute une série d'isoméries géométriques dont certaines sont directement impliquées dans la photochimie de protéines biologiques à base de rétinal. Les seules configurations mises en jeu dans la molécule de bactériorhodopsine native sont uniquement la forme tout-trans et la forme 13-cis [32]. Une vue topographique de la bactériorhodopsine ainsi que la conformation transoïdale plane des deux isomères possibles de son rétinal sont clairement représentées sur la figure 5. Toutefois, il ne faut pas oublier que des conformations cisoïdales et des formes non planes peuvent aussi bien intervenir, surtout en raison de contraintes stériques qu'en entraîne la liaison du rétinal libre à l'apoprotéine [33].

D'autre part, le polypeptide renfermant la lysine-216 qui forme une base de Schiff avec le rétinal a déjà été identifié (figure 5) [26,34]. Ce peptide est relié à l'hélice G (deuxième hélice α à partir de l'extrémité N-terminale de la bR), et présente une région hydrophile qui doit sûrement représenter le lien entre deux segments- α adjacents. Ceci permet donc de localiser le rétinal au niveau de la partie hydrophobe de la protéine à proximité de la surface de la membrane. Des mesures de dichroïsme linéaire, de diffraction des neutrons ainsi que d'autres techniques ont révélé que le grand axe de la molécule de rétinal fait un angle d'environ 20 ° par rapport au plan de la membrane et que le cycle β -ionone est à ~ 17 Å du côté extracellulaire tout près du centre de la

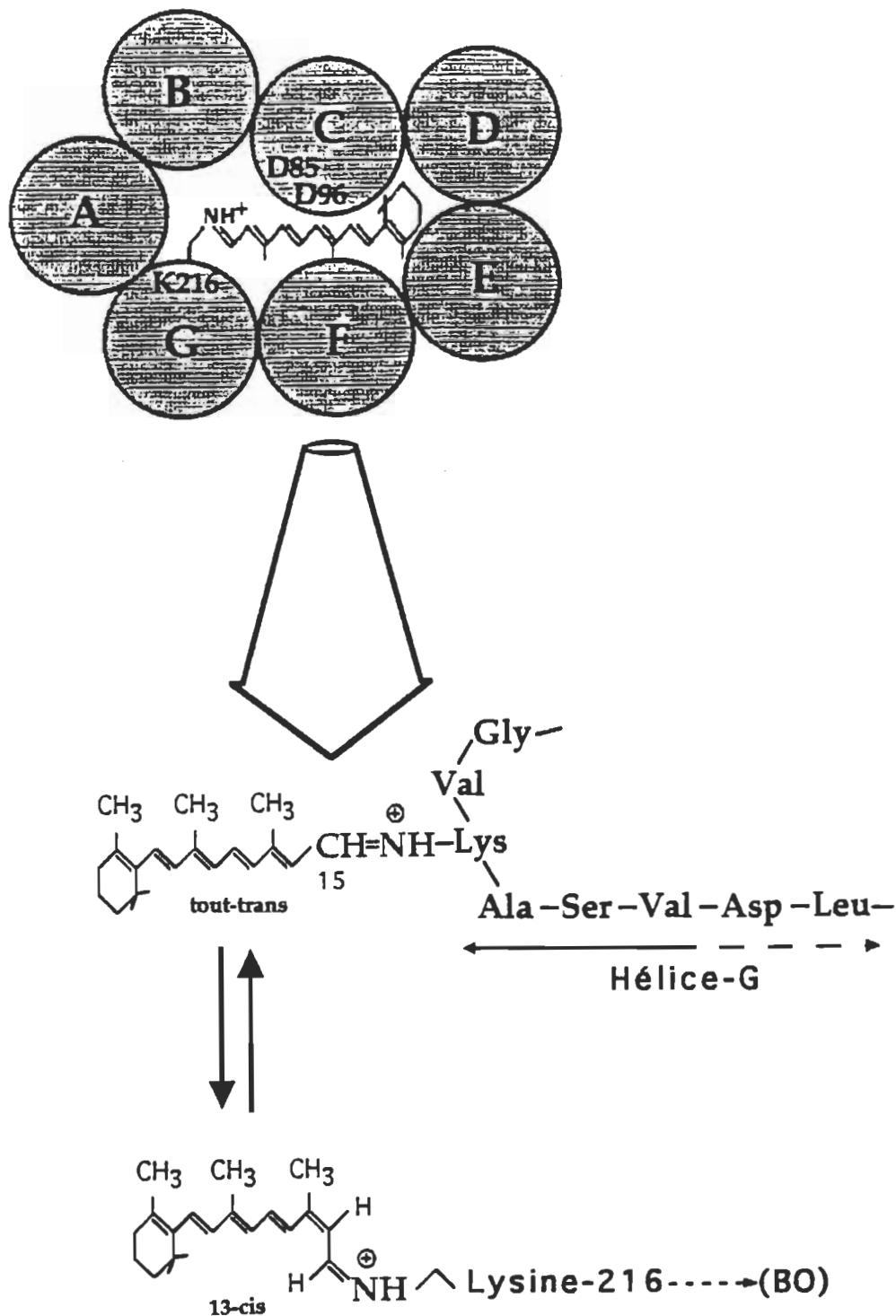


Figure 5 Topographie des sept hélices α et du rétinal. Le schéma illustre l'équilibre entre les deux isomères possibles du rétinal de la bactériorhodopsine. Ils sont solidement reliées à la lysine 216 de l'hélice G au moyen d'une base de Schiff protonée.

membrane [33,35,36]. Toutes ces données positionnent avec certitude la base de Schiff à une distance d'environ 10 Å au-dessus de la surface cytoplasmique [13,26].

1.4.2 Activité photochimique et rôle physiologique

Naturellement, la molécule de bactériorhodopsine existe en deux formes stables et interconvertibles : l'état adapté à l'obscurité (bR_{560}) ayant une absorption maximale autour de 560 nm; et l'état adapté à la lumière (bR_{570}) dont le maximum d'absorption est situé à 570 nm [37]. La dernière forme est produite par exposition continue à la lumière visible de faible intensité. Réciproquement, elle disparaît très lentement à la noirceur totale pour engendrer la forme bR_{560} selon une cinétique de conversion caractérisée par une demi-vie d'environ 30 min à température ambiante et pH neutre. De plus, la forme absorbant à 570 nm renferme uniquement la conformation tout-trans du rétinal; tandis que la forme adaptée à l'obscurité est un mélange presque équimolaire des deux isomères 13-cis et tout-trans du rétinal.

Contrairement à la rhodopsine du pigment rétinien, l'éclairement de la bactériorhodopsine par la lumière visible ne décolore pas le pigment et ne provoque pas la rupture de la liaison du rétinal à l'apoprotéine. Plus encore, cette molécule paraît complètement inerte quand elle est observée à l'oeil nu. Cependant, des études expérimentales plus approfondies utilisant des méthodes spectroscopiques, telles que la spectroscopie UV-visible, FTIR, RMN, résonance Raman, etc., ont démontré que la photoexcitation de la bactériorhodopsine, et plus exactement de la forme tout-trans du rétinal

protoné⁴ (agissant comme une véritable antenne capable de collecter l'énergie électromagnétique incidente), induit tout un cycle photochimique qui fait transitoirement apparaître une séquence discrète d'espèces chimiques distinctes, appelées intermédiaires, qui sont conventionnellement désignées en ordre alphabétique par les lettres : J, K, L, M, N et O [28,38]. Ce groupe restreint d'états intermédiaires a été largement observé et étudié par plusieurs équipes de recherche s'intéressant aux différentes propriétés de la bactériorhodopsine. Ainsi, ces quelques intermédiaires constituent maintenant les états les plus acceptés et les plus utilisés pour caractériser l'activité photochimique de la bR. D'autres formes spectrales dérivées de ces principaux intermédiaires sont également rapportées dans la littérature (I, K', KL, M₁, M₂, etc.) [39,40]; mais la confirmation unanime de leur vraie existence, la détermination exacte de leur origine, ainsi que leur caractérisation complète font actuellement l'objet de plusieurs débats et soulèvent de nombreuses controverses. Par conséquent, elles sont généralement négligées et rarement citées par les auteurs.

Les cinétiques standards d'apparition et de disparition des intermédiaires J, K, L, M, N et O ainsi que leurs caractéristiques spectroscopiques et thermiques⁵ sont actuellement bien déterminées [29,41]. Des spectres de différence FTIR et d'absorption UV révèlent des changements

⁴ En fait, à cause de l'emplacement central du rétinal au sein de la protéine, ses variations spectrales suite à l'absorption d'un photon reflètent globalement la majorité des modifications électrostatiques et conformationnelles qui se déroulent à l'intérieur de cette petite molécule. Ces perturbations microscopiques internes affectent sensiblement la façon suivant laquelle le rétinal interagit avec l'onde électromagnétique incidente (i.e., fluctuations de son moment dipolaire électrique transitoirement induit).

⁵ Généralement, les photointermédiaires sont identifiés par leurs longueurs d'onde d'absorption maximale exprimées en nm (λ_{\max} mesurées ou estimées) et indiquées en mode indice; e.g., J₆₁₀, K₆₀₀, L₅₅₀, M₄₁₀, N₅₆₀ et O₆₄₀. D'un autre côté, ces intermédiaires peuvent être séparément accumulés et stabilisés, dans des conditions photostationnaires, à des températures spécifiques relativement basses; à titre d'exemple, K, L, M et O peuvent être facilement piégés à des températures respectives de 77 °K, 200 °K, 260 °K et 300 °K.

réversibles dans l'état d'ionisation de certains acides aminés intraprotéiques durant l'activité photochimique de la bactériorhodopsine. Ils indiquent aussi des modifications concomitantes dans l'état de protonation et d'isomérisation du rétinal [42].

Plus précisément, l'absorption d'un photon visible par une molécule de bactériorhodopsine, se trouvant initialement dans l'état fondamental bR_{570} , engendre une première isomérisation du rétinal qui passe très rapidement de la conformation tout-trans à la conformation 13-cis. Cette photoisomérisation conduit à l'apparition du premier photoproduit détectable du cycle réactionnel de la bactériorhodopsine, l'intermédiaire J_{610} ⁶, selon une cinétique de formation caractérisée par une constante de temps de ~ 500 fs [34]. D'un point de vue énergétique, la photoconversion primaire assure la transformation et le stockage de l'énergie du rayonnement lumineux absorbé en énergie electrostatique [43-45]. Elle s'effectue par le biais d'une étroite séparation de charge extrêmement rapide au niveau de la base de Schiff. Globalement, dans des conditions physiologiques normales (pH neutre, température ambiante et force ionique modérée), la dissipation ultérieure de l'énergie libre emmagasinée lors de la première étape du photocycle catalyse une séquence linéaire et irréversible composée de plusieurs relaxations thermiques en cascade (habituellement considérées comme étant toutes des réactions chimiques simples d'ordre un ou pseudo-d'ordre un). Ces transitions thermiques engendrent la formation des intermédiaires K, L, M, N et O selon des vitesses de ~ 10 ps, ~1,5 μs, ~80 μs, ~3 ms et ~5 ms, respectivement [37,46]. De plus, parallèlement à l'accumulation de

⁶ La transition primaire du photocycle est photoréversible, car l'intermédiaire J_{610} peut être complètement converti à la forme initiale bR_{570} par simple excitation lumineuse.

l'intermédiaire M. Nous assistons premièrement à une déprotonation rapide de la base de Schiff; puis deuxièmement à l'expulsion d'un proton vers le milieu extracellulaire. L'étape de fermeture du photocycle ($M \rightarrow bR$), caractérisée par une reprotonation lente de la base de Schiff et une réisomérisation subséquente 13 cis → tout-trans du rétinal, est couplée à la reprise d'un proton extérieur du côté cytoplasmique [47,48].

Finalement, après un temps de relaxation total de 10-20 ms, la forme originale de la bactériorhodopsine est de nouveau régénérée et un proton a été vectoriellement transporté de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane [38,49]. En conséquence, contrairement aux autres systèmes membranaires transporteurs de protons, e.g., les complexes photosynthétiques à base de chlorophylle, la bR constitue un exemple simple et primitif de pompe à protons activée par la lumière qui n'est pas directement couplée à une chaîne de transferts d'électrons à travers la membrane [16]. La figure 6 illustre, selon un schéma réactionnel simple et restreint [46], les principales transitions spectroscopiques du cycle photochimique de la bR₅₇₀ observées dans des conditions standards; ainsi que les deux étapes d'échange de protons avec le milieu avoisinant.

Le rôle physiologique de la bactériorhodopsine comme pompe à protons directement activée par la lumière est clairement bien établi [18,47]. Son activité électrogénique normale est marquée par une stoechiométrie de transport de un proton par acte photocyclique (figure 7) [50]. Depuis plusieurs années, de nombreux efforts ont été effectués tant au niveau biologique que physico-chimique pour tenter de comprendre le mécanisme

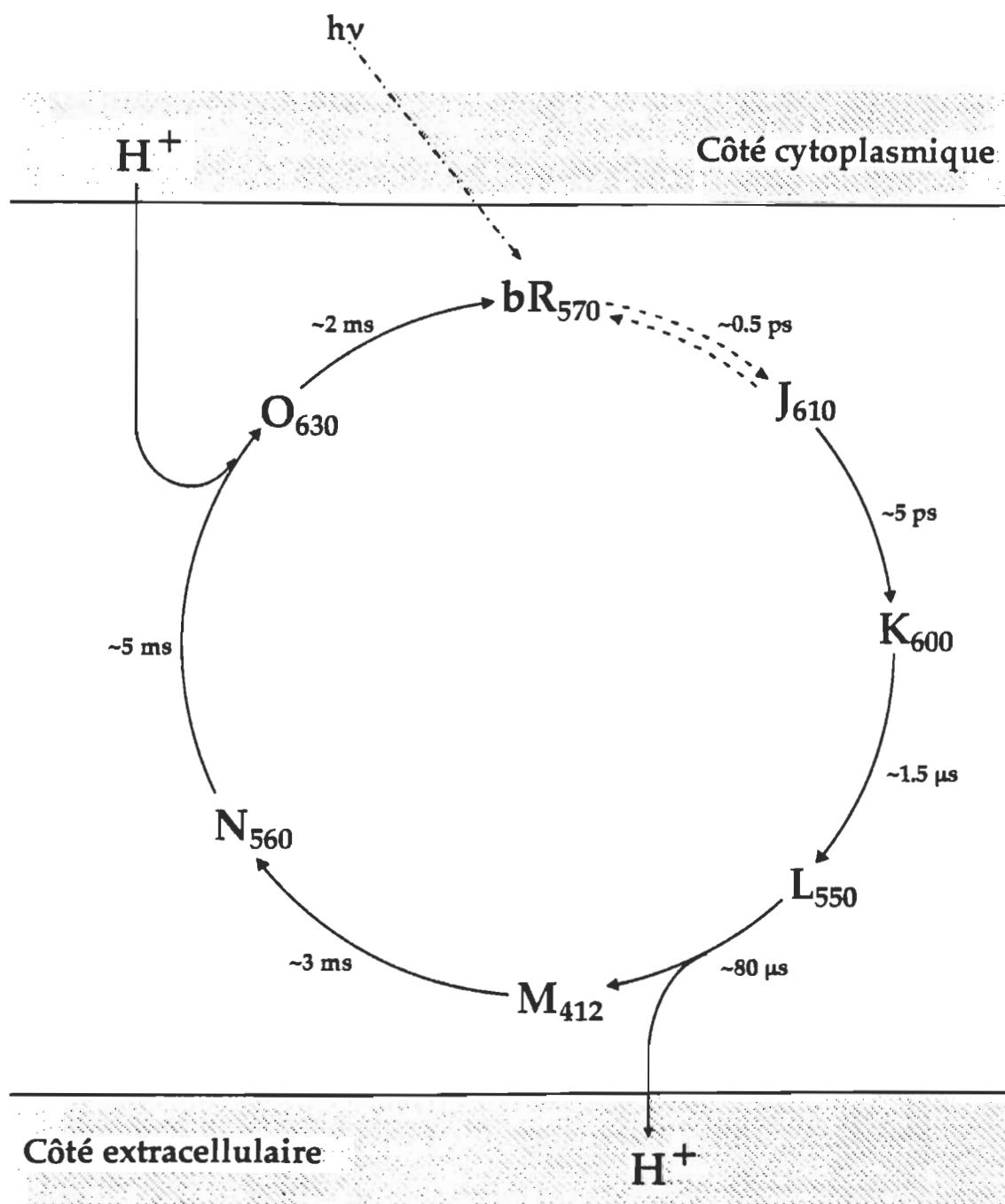


Figure 6 Schéma simplifié du cycle photochimique de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière (bR_{570}) obtenu à température ambiante et à pH normal ($6 < \text{pH} < 8$). D'après le modèle réactionnel qui a été initialement proposé par Lozier et al., 1975.

Bactériorhodopsine

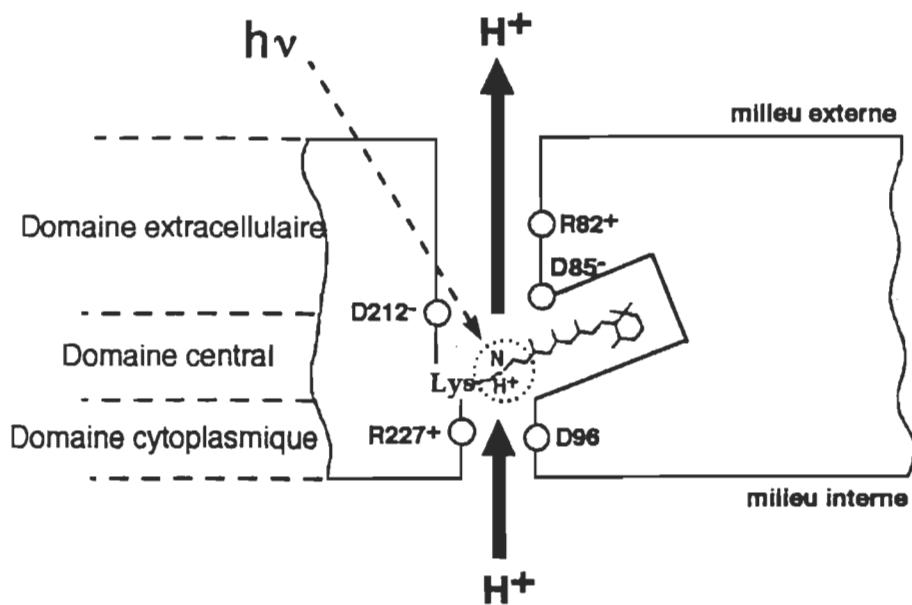


Figure 7 Vectorialité et stoechiométrie de la pompe à protons que constitue une molécule de bactériorhodopsine sous l'effet de la lumière visible. Le schéma illustre une tentative d'arrangement des sites stratégiques internes impliqués dans le processus de translocation du proton : rétinal et base de Schiff; les acides aminés D85, R82, D212, R227 et D96. Le canal de transport des protons est subdivisé en trois domaines adjacents : domaine central, domaine extracellulaire et domaine cytoplasmique.

d'action de la translocation vectorielle de protons de la molécule de bactériorhodopsine. Malgré la richesse et la beauté des renseignements structuraux et fonctionnels accumulés [26,27], le mécanisme exact du transport net de protons par la bR₅₇₀ demeure encore ambigu et manque toujours d'arguments mécanistiques à l'échelle moléculaire.

Des études spectroscopiques spécifiques (spectres FTIR, absorption UV, etc.) combinées à des expériences de mutation génétique ont permis de révéler la présence de plusieurs modifications transitoires à l'intérieur de la bactériorhodopsine durant son activité photochimique [26,28,51]. Il est maintenant clair que certains acides aminés intraprotéiques (D85, D96, D115, D212, R82, Y57, Y185, Y227, T46, S226, etc.) subissent des variations réversibles dans leur état de protonation en intervenant comme sites de fixation temporaires pour le proton transféré d'un bord à l'autre de la membrane (figure 7) [52,53]. On assiste également à d'autres types de modifications concomitantes, telles que l'isomérisation et la réisomérisation du rétinal, la déprotonation et la reprotonation de la base de Schiff, les changements conformationnels de l'apoprotéine, ainsi que les mouvements très restreints de certains groupements polaires internes (chaînes latérales de quelques acides aminés, molécules d'eau, etc.) [42,54,55].

1.4.3 Mécanisme d'action : modèle général résument les principales données moléculaires communément établies

À la lumière des informations actuellement disponibles, il est devenu possible de construire des modèles préliminaires pour décrire approximativement la trajectoire empruntée par le proton pompé par la

bactériorhodopsine. En outre, une modélisation simple et appropriée de la dynamique moléculaire de pompage permettrait également une explication microscopique des différentes transitions optiques qui lui sont directement rattachées. Le modèle généralement admis fait appel à une séquence linéaire de plusieurs réactions acido-basiques pour expliquer la propulsion active du proton à travers l'espace transmembranaire libre : canal à protons délimité par les sept hélices- α de la protéine. Dans ce canal on retrouve essentiellement la base de Schiff ainsi que des acides aminés ionisables reliés les uns aux autres par des ponts hydrogène. De plus, les réactions de protonation qui s'y produisent sont favorisées par divers changements conformationnels au sein de la protéine et se déroulent successivement dans trois domaines différents du canal à protons (figure 7) [42,54] :

- Domaine central occupé par la base de Schiff
- Domaine extracellulaire qui forme l'espace périphérique extracellulaire du canal à protons
- Domaine cytoplasmique formé par la partie périphérique du canal à protons située du côté cytoplasmique

1.4.3.1 Photoisomérisation trans → cis du rétinal et déstabilisation subséquente de la base de Schiff : transitions bR → J → K → L

L'énergie lumineuse initialement absorbée par la configuration tout-trans du rétinal engendre la première étape réactionnelle du cycle photochimique de la bactériorhodopsine. Selon la résolution spectroscopique actuelle, la photoréaction primaire s'effectue

essentiellement en deux phases différentes et successives (figure 8) [41,54,56].

Premièrement, la formation ultra-rapide (caractérisée par une constante de temps de ~ 0.5 ps) du premier photoproduit du cycle catalytique, l'intermédiaire J_{610} ⁷ [57,58], est observée. L'origine moléculaire exacte de cette transition optique est aujourd'hui loin d'une compréhension complète, et plusieurs explications demeurent encore possibles. Par exemple, une des alternatives plausibles stipule que l'énergie électromagnétique collectée par le centre photoactif de la protéine (rétinal plus la base de Schiff) suscite d'abord une redistribution extrêmement rapide de la densité électronique le long de la chaîne polyénique du rétinal (délocalisation des électrons π); puis ensuite elle réduit les interactions électrostatiques au niveau du site de fixation de la base de Schiff [54]. Certes, ceci a pour conséquence immédiate de baisser considérablement la barrière énergétique qui contrôle le processus d'isomérisation du rétinal. Toutefois, une autre explication attrayante du phénomène soutient que la phototransition primaire $bR \rightarrow J$ résulte d'une isomérisation partielle ultrarapide du rétinal qui se poursuit et se termine au cours de la transition subséquente $J \rightarrow K$ [56].

⁷ Le photointermédiaire J_{610} a été observé uniquement par spectroscopie optique, et jusqu'à maintenant aucune résolution électrique n'a été obtenue à partir des méthodes photoélectriques habituelles. Actuellement on ne dispose que de peu d'informations relativement à ses propriétés et ses caractéristiques.

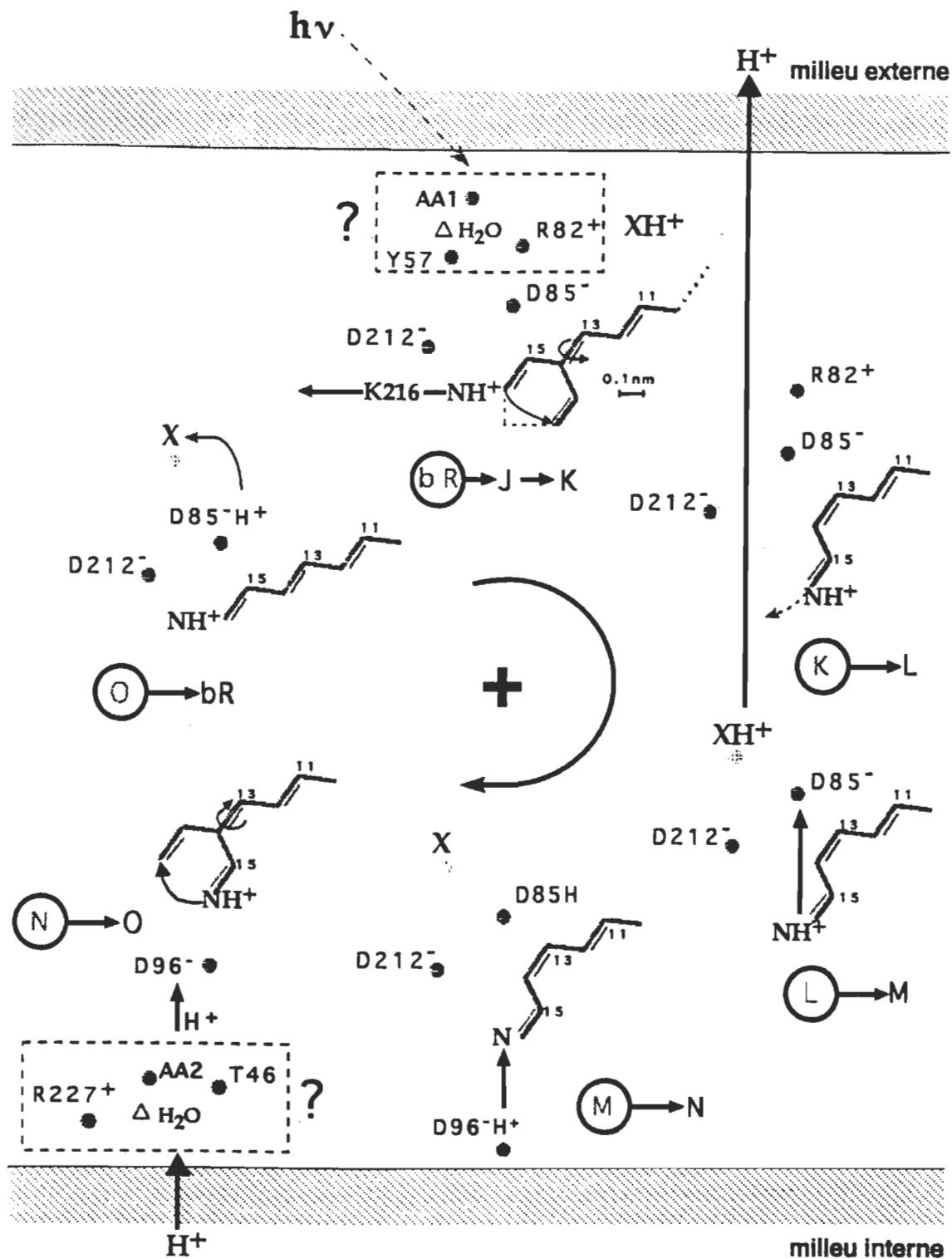


Figure 8 Modèle général du mécanisme moléculaire de pompage de protons de la bR native. Consulter le texte pour les détails et les explications concernant les différentes étapes du cycle de transfert du proton. AA1 et AA2 représentent deux groupes d'acides aminés (e.g., AA1 ≡ Y185; AA2 ≡ S226 et T89).

Deuxièmement, et suite à la perturbation électrique préalablement causée par la photoréaction précédente, la partie terminale du rétinal subit une isomérisation 13-cis qui est produite par un mouvement rotationnel autour de la double liaison 13C=14C [31,42,54]. Cette distorsion conformationnelle du rétinal conduit d'une part à l'apparition d'un nouveau produit photochimique, l'intermédiaire K, et d'autre part induit une séparation substantielle entre la charge cationique de la base de Schiff et la charge anionique de compensation (contre-ion) située à proximité du rétinal (figure 8). Cette charge négative est en fait portée par un complexe étendu formé par un groupement de quelques acides aminés polaires, tels que D85, D212, R82 et Y57, ainsi que des molécules d'eau avoisinantes [42,51,54]. La stabilité structurale de ce multipôle électrique est maintenue par un réseau de plusieurs liens hydrogène. En résumé, la photoisomérisation du rétinal apparaît comme étant le processus moléculaire crucial du photocycle qui assure, de façon très efficace, la transformation et le stockage de l'énergie rayonnante absorbée sous forme d'énergie électrostatique stable (au moins 11.6 KCal/mol de l'énergie du photon incident est électriquement convertie) [54]. Cette énergie sera ensuite canalisée pour catalyser les différentes réactions thermiques du photocycle qui conduisent en fin de compte à la translocation nette d'un proton de l'intérieur vers l'extérieur de la protéine. De plus, d'autres modifications internes de la bactériorhodopsine ont été également détectées par spectroscopie FTIR durant l'étape initiale du cycle réactionnel : bR → K [41,42,53,56].

La déformation abrupte du rétinal survenue lors de la formation de l'état K, provoque simultanément une torsion mécanique non-négligeable au niveau de certaines liaisons du système polyénique [56]. La relaxation subséquente du stress mécanique ainsi accumulé entraîne un éloignement additionnel de la base de Schiff, en direction de la face cytoplasmique, et affecte davantage sa stabilité électrique (figure 8). Par ailleurs, des perturbations électriques dans l'état de charge de certains acides aminés du canal à protons ont été également détectées durant cette transition; par exemple, certains auteurs rapportent que le résidu D96 ainsi qu'une tyrosine voisine subissent des ionisations réversibles partielles ou totales à ce stade même du photocycle [41,42]. Cette relaxation thermique du photocycle est spectroscopiquement associée à la formation de l'état intermédiaire L.

1.4.3.2 Déprotonation de la base de Schiff et expulsion extérieure d'un proton : transition L → M

Dans l'état L du photocycle, le nouvel emplacement stratégique de la base de Schiff favorise la déstabilisation de son proton (i.e., diminution de son pKa par environ 5 unités de pH) et provoque généralement sa déprotonation en faveur du site anionique le plus favorable, l'ion aspartate D85⁻ [42,54,52]. Dans ces conditions, l'ion hydrogène libéré par la base de Schiff sera directement transféré vers le résidu chargé D85⁻ qui joue ainsi le rôle du premier accepteur du proton (figure 8).

Dans des concentrations de protons relativement modérées ($6 \leq \text{pH} \leq 9$), il est parfaitement établi [59] que la protonation de l'acide aspartique D85 conduit immédiatement à la libération d'un proton du côté extracellulaire de la membrane pourpre. Des investigations spectroscopiques combinées à des expériences effectuées sur des protéines génétiquement mutées démontrent que le proton éjecté en dehors de la bactériorhodopsine provient directement de la dissociation d'un groupement protoné encore mal connu, communément désigné par XH, localisé dans le domaine extracellulaire du canal à protons (figure 8) [53]. L'identification précise de la structure du groupe XH est présentement incomplète; cependant, les données actuellement disponibles à ce sujet suggèrent une combinaison complexe formée d'au moins une molécule d'eau, des résidus R82 et Y57 ainsi que d'autres acides aminés polaires situés dans le domaine extracellulaire [42,54].

Pour préparer l'environnement qui favorise le mieux la réaction de reprotonation de la base de Schiff durant l'étape de recouvrement du photocycle, la protéine subit une distorsion structurale, selon un mécanisme complètement méconnu, qui agit comme catalyseur moléculaire permettant d'augmenter l'affinité de la base de Schiff vis-à-vis des protons (augmentation substantielle de son pK_a) [42]. En d'autres termes, cette modification conformationnelle interne modifie l'orientation de la base de Schiff et autorise ainsi son accessibilité au domaine cytoplasmique de la protéine à partir duquel elle pourrait être facilement reprotonée.

Les transitions individuelles successives qui viennent d'être décrites (déprotonation de la base de Schiff, expulsion d'un proton et modification conformationnelle de la protéine) représentent les trois phases constitutives du processus global de formation de l'état spectral majeur, l'intermédiaire M. Parfois, ces sous-états élémentaires peuvent être spectroscopiquement résolus [42,53,54] et sont habituellement symbolisés par M_1^0 , M_1^{-1} , et M_2 , respectivement.⁸

1.4.3.3 Reprotonation de la base de Schiff et disparition d'un proton du côté cytoplasmique : transitions M → N → O

Des mesures FTIR étroitement soutenues par des expériences de mutation génétique de la bacteriorhodopsine native révèlent que la reprotonation de la base de Schiff coïncide exactement avec la déprotonation de l'acide aspartique D96 localisé dans le domaine cytoplasmique du canal à protons (figure 8) [42]. Cette transition interne est spectroscopiquement couplée à la disparition de l'état M et à l'accumulation conjointe d'une nouvelle forme spectrale du photocycle, l'intermédiaire N($\lambda_{\max} = 560$ nm, $\tau \approx 3$ ms). D'autre part, l'échange de proton entre le résidu D96 et la base de Schiff se fait directement, sans aucune étape intermédiaire, à travers une chaîne linéaire de molécules d'eau reliées par des ponts hydrogène [42]. Ainsi, le résidu D96 joue le rôle du premier donneur de proton au cours de la réaction de reprotonation de la base de Schiff. De plus, la déstabilisation chimique de D96, qui se traduit par une réduction

⁸ Les symboles 0 et -1 portés en exposant réfèrent respectivement à l'état de charge de la protéine avant et après la libération du proton vers le milieu extérieur.

apparente de son pKa initial, provient d'une perturbation conformationnelle de la protéine provoquée par une nouvelle organisation de certains groupements polaires du domaine cytoplasmique, tels que R227, T46, S226, T89, Y185, etc., de même que des molécules d'eau [42,53,54]. En effet, ces résidus étant connectés les uns aux autres par des liens hydrogène, la substitution d'au moins un d'entre eux et/ou la déshydratation de la protéine peut affecter considérablement la cinétique du processus de reprotonation par au moins deux ordres de grandeur de sa valeur normale [42,60]. Par exemple, le remplacement des résidus T46 et S226 entraînerait un ralentissement significatif de cette transition. La relaxation subséquente de l'état N conduit d'une part à l'apparition d'une autre forme spectrale du photocycle, l'intermédiaire O ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$, $\tau \approx 5 \text{ ms}$), et d'autre part à la disparition d'un proton du côté cytoplasmique de la protéine. La résolution moléculaire de cette transition, faite par spectroscopies FTIR et résonance Raman, démontre la présence de deux processus internes de natures différentes : la reprotonation de l'ion aspartate D96⁻; et la réisomérisation thermique 13-cis → tout-trans du rétinal [28,42,52]. Des études cinétiques standards, effectuées dans des conditions physiologiques normales, indiquent que les deux processus ne se déroulent pas de façon parallèle dans le temps. En effet, habituellement la reprotonation de D96⁻ (généralement associée à la reprise d'un proton extérieur) précède la réisomérisation du rétinal. De plus, il n'est pas encore bien établi que le proton repris par la protéine soit directement destiné à la

neutralisation électrique⁹ de D96⁻. Des travaux récents suggèrent l'existence d'un site de fixation intermédiaire qui agit en fait comme premier accepteur du proton capté sur la face cytoplasmique [42,52,54]. Ce site est localisé dans le domaine cytoplasmique du canal à protons, à proximité de la surface intracellulaire, et sa structure exacte est encore ignorée. Une structure préliminaire basée sur un regroupement de molécules d'eau et de quelques résidus polaires du domaine cytoplasmique, tels que D96, Y227 et T46, est actuellement proposée [42,54].

1.4.3.4 Recouvrement de l'état initial de la bactériorhodopsine : transition O → bR

La relaxation finale du photocycle vers l'état initial de la bactériorhodopsine est couplée à la transition spectrale O → bR. La caractérisation microscopique de cette réaction est essentiellement marquée par une déprotonation de l'acide aspartique D85. À pH neutre, le proton libéré par D85 est directement capté par le complexe extracellulaire X (figure 8) [42,54]. D'autre part, la résonance Raman détecte également des relaxations mineures au niveau du rétinal et de l'apoprotéine durant l'étape de régénération de la forme originale de la bactériorhodopsine : bR₅₇₀ [51].

⁹ Il est important de noter ici le rôle déterminant que joue la charge négative du résidu D96 à la fois dans la catalyse du transfert du proton de l'extérieur vers l'intérieur de la protéine, et aussi dans la stabilisation de la configuration 13-cis du rétinal pendant cette transition.

1.5 Cadre général et objectifs de recherche

Dans les sections précédentes, les informations actuelles relatives à la bactériorhodopsine contenue dans sa membrane native intacte ont été exposées. Or, cette protéine est probablement un des exemples les plus frappants des modulations structurales et fonctionnelles qui peuvent être induites par les interactions intermoléculaires au sein d'une membrane biologique. En effet, la bactériorhodopsine possède une stabilité structurale et fonctionnelle proverbiale quand elle est contenue dans sa membrane native; elle peut conserver ses propriétés pendant des années d'entreposage et elle demeure stable sur une plage d'unités de pH allant de 2 à 12 et un intervalle de températures qui dépasse 100 °C [61]. Toutefois, des perturbations du réseau cristallin et des interactions lipides-protéine qui existent au sein de la membrane pourpre native modifient de façon importante mais réversible les propriétés de la bactériorhodopsine.

1.5.1 Les interactions lipides-protéine et l'équilibre entre différentes formes spectrales de la bactériorhodopsine

Il est maintenant admis que le maintien de la coloration pourpre typique de la bactériorhodopsine de pH 2 à 12 n'est pas une propriété intrinsèque de la protéine mais résulte plutôt d'interactions spécifiques entre la bactériorhodopsine et les lipides qui la solvatent. En effet, lorsque cette protéine est complètement délipidée et suspendue en milieu aqueux en l'absence de détergents, elle n'est plus pourpre mais plutôt rouge, avec un maximum d'absorption centré vers 480 nm [62]. Suspendue en présence de détergents, la bactériorhodopsine délipidée existe sous forme d'un équilibre acido-basique entre ces deux formes spectrales, bR570 et bR480, et le pKa

apparent de cet équilibre dépend du détergent utilisé pour suspendre la protéine purifiée [63].

Par ailleurs, le même phénomène est observable lorsque les lipides à chaînes ramifiées qui solvatent la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre sont substitués par des lipides à chaînes linéaires. En effet, les monomères de bactériorhodopsine contenus dans des vésicules de phosphatidyl choline à chaîne linéaire peuvent être réversiblement titrés de la forme bR570 à la forme bR480 avec un pKa apparent de 7,3 et cette "titrabilité" disparaît lorsque les vésicules sont contaminées par des alcanes ramifiés [64].

Le point majeur qui se dégage de ces observations est qu'en absence des interactions probablement fortes qui existent entre la protéine et les lipides qui la solvatent dans son milieu natif, elle peut exister sous au moins deux formes stables, la forme naturelle pourpre (bR570) et la forme artificielle rouge (bR480), cette dernière étant favorisée du côté alcalin du pKa apparent de l'équilibre. Il est intéressant de noter au passage que l'importance d'interactions fortes avec des lipides à chaînes ramifiées dans le maintien de la forme native de la bactériorhodopsine est également prévisible à partir d'études de simulation structurale de ce pigment [65].

Parallèlement aux expériences réalisées par délipidation de la bactériorhodopsine ou sa reconstitution dans des membranes artificielles, il existe une variété d'autres conditions expérimentales qui permettent l'observation de l'équilibre acide-base entre les deux formes spectrales de la bactériorhodopsine. Parmi celles-ci, la contamination des membranes

pourpres par les anesthésiques généraux est la plus connue. En 1985, Nishimura et al. [66] ont montré que l'ajout d'anesthésiques généraux comme l'enflurane ou l'halothane aux membranes pourpres provoquait l'apparition de la forme rouge du pigment. Plus tard, Messaoudi et al. [67] ont montré que ce phénomène consistait en l'établissement d'un équilibre acido-basique entre les formes pourpre (bR570) et rouge (bR480) dont le pKa apparent était de 7,5 et qu'il pouvait être reproduit autant avec des solvants comme l'hexane, les alcools ou l'acétone qu'avec des anesthésiques généraux. Un exemple de cette modification spectrale est donné sur la figure 9. Ces observations soulèvent bien sûr la question du mécanisme d'action des anesthésiques dans la perspective de l'identité des équilibres spectraux observés, soit par contamination avec des anesthésiques, soit par altération des interactions lipides-protéine. À cet égard, il est important de signaler que la diffraction des rayons X a permis de localiser la fixation des anesthésiques généraux à la membrane pourpre dans le domaine hydrophobe de l'interface lipide-protéine [68]. Ainsi, selon toute vraisemblance, l'apparition de la forme 480 nm de la bactériorhodopsine est une conséquence de la perte des interactions lipides-protéine fortes consécutive à la substitution des lipides naturels par d'autres amphiphiles ou leur déplacement transitoire par l'anesthésique ou le solvant.

Dans ce contexte, la première question qui se pose est celle de la nature de la forme bR480. Il apparaît en effet pertinent de voir dans quelle mesure la structure et la fonction de bR480 peuvent se comparer à celles du pigment natif bR570.

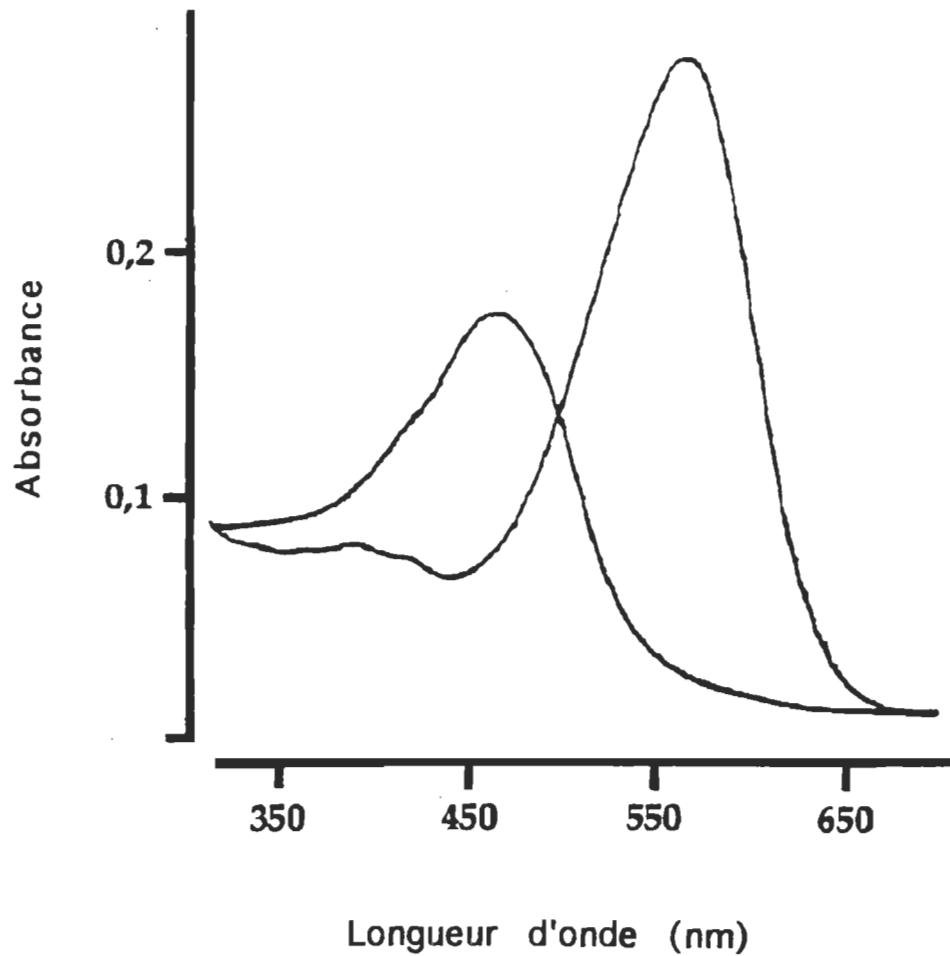


Figure 9 Spectres d'absorption UV-visible des formes native (bR_{570}) et modifiée (bR_{480}) de la bactériorhodopsine. Dans ce cas ci, le pigment rouge bR_{480} est induit par addition de ~ 0.5% (vol/vol) d'enflurane à des membranes pourpres ($4.2 \mu M$ bR) en suspension dans un tampon phosphate 50 mM ($pH = 7.8$) à température ambiante.

1.5.1.1 Aspects structural et fonctionnel du pigment bR₄₈₀

Des études de caractérisation ont déjà été réalisées sur la forme bR₄₈₀, préparée essentiellement par déstabilisation de la membrane pourpre à l'aide des anesthésiques volatils ou d'autres types de solvants organiques, afin de pouvoir clairement déterminer ses principales propriétés et d'en faire ensuite une comparaison avec celles de la forme native bR₅₇₀.

Du point de vue structural, il existe des variances minimes entre les deux formes de la bactériorhodopsine. Elles renferment toutes les deux un chromophore rétinal de configuration tout-trans relié à l'apoprotéine par l'intermédiaire d'une base de Schiff protonée [17,66,69]. Entre autres, le complexe bR₄₈₀ dispose d'une structure secondaire tout à fait identique à celle de l'état fondamental bR₅₇₀ [67,70]. Cependant, quant à la structure tertiaire, les sept segments hélicoïdaux du pigment modifié sont légèrement relaxés les uns par rapport aux autres comparativement à ceux du pigment naturel [70,71], ce qui signifie que dans la forme bR₄₈₀, les hélices transmembranaires sont moins bien alignées et que la protéine est déployée.

Du point de vue fonctionnel, une analyse cinétique préalable, faite à l'aide de mesures de la variation transitoire de la transmission optique, avait révélé que l'espèce bR₄₈₀ possède une activité photo-chimique complète très comparable à celle de la bactériorhodopsine naturelle [17,69]. En effet, l'excitation lumineuse ultra-rapide du

pigment bR₄₈₀ provoque une diminution abrupte ($\sim 5\mu\text{s}$) de la concentration initiale de molécules (i.e., chute rapide de l'absorbance mesurée à 480 nm), suivie par une régénération relativement lente de l'état stable suivant une cinétique biphasique caractérisée par deux vitesses très différentes¹⁰ (figure 10). En outre, l'activité photochimique de la forme bR₄₈₀ présente certaines ressemblances avec celle de la forme bR₅₇₀ : elle est principalement marquée par l'apparition temporaire d'une espèce spectrale déprotonée absorbant à 380 nm (figure 11) [62,66,69]. Par analogie avec l'état M₄₁₂ du photocycle normal, cette forme intermédiaire est habituellement désignée par M₃₈₀. En outre, la photoréaction primaire du pigment bR₄₈₀ s'accompagne aussi par la formation très rapide d'un photoproduit absorbant à 535 nm : l'état K₅₃₅ [62]. La figure 12 illustre les transitions optiques marquantes du photocycle réactionnel de la forme bR₄₈₀.

En ce qui concerne l'activité de pompage de protons de la forme bR₄₈₀, une investigation cinétique préliminaire [21,47] a déjà été effectuée, à l'aide de mesures de la variation transitoire du pH du milieu induite par une brève illumination, sur des échantillons de membranes pourpres complètement transformées par addition des anesthésiques (figure 13). Dans les limites de la résolution instrumentale permise, cette étude a pu démontrer une absence intégrale du signal optique habituellement couplé à l'apparition transitoire de protons en phase aqueuse. Ce résultat très surprenant a

¹⁰ À titre de comparaison, l'excitation lumineuse de la bR₅₇₀ par un flash laser identique, et dans les mêmes conditions expérimentales, engendre d'abord une disparition très rapide du pigment, puis après on assiste à un recouvrement progressif de la forme originale selon un processus cinétique marqué par une seule constante de vitesse (figure 10).

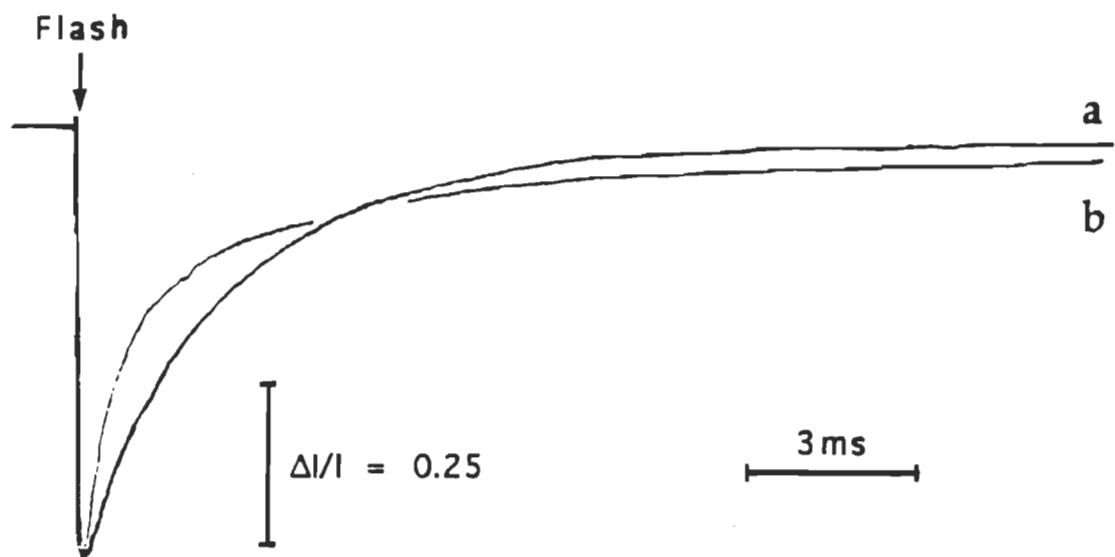


Figure 10 Évolution temporelle de la perturbation spectrale induite, par une lumière actinique, dans un échantillon de membranes pourpres ($10 \mu\text{M}$ bR) en suspension dans un tampon phosphate 50 mM ($\text{pH} = 7$) à température ambiante. Le signal optique a est observé à 570 nm en l'absence d'anesthésique. Le signal b est mesuré à 480 nm en présence de 0.1% (vol/vol) d'enflurane; sa trace a été normalisée et son amplitude réelle est à peu près deux fois inférieure à celle de la trace a. La petite flèche indique le moment du flash laser (532 nm , 10 ns , $\sim 20 \text{ mJ}$). D'après N. Henry et al., Photochemistry and Photobiology, 47, 85-90, 1988.

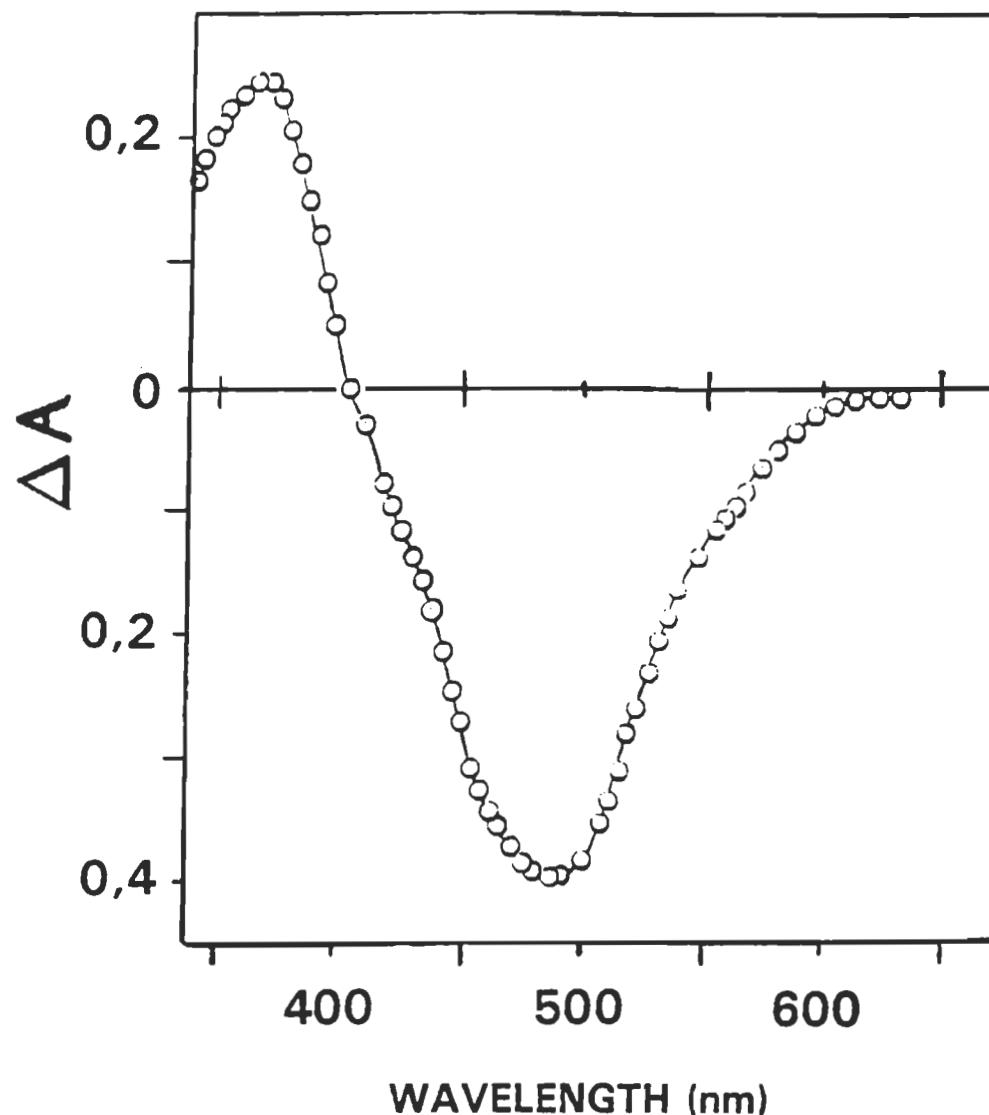


Figure 11 Spectre de différence d'absorptions montrant l'accumulation de l'état M₃₈₀ (pic positif) au détriment de la décomposition de la forme initiale bR₄₈₀ (pic négatif). La mesure a été effectuée en illumination continue (durée : 5 min; $\lambda_{\text{max}} : 450 \text{ nm}$; $\Delta\lambda : 50 \text{ nm}$; intensité : 30 W/m^2) et à 220°K sur un échantillon de membranes pourpres ($13.3 \mu\text{M}$ bR) en suspension dans un tampon phosphate 50 mM , $\text{pH} = 7$. La forme bR₄₈₀ était induite par ajout de 0.1% (v/v) d'halothane. D'après N. Henry et al., Photochemistry and Photobiology 47, 85-90, 1988.

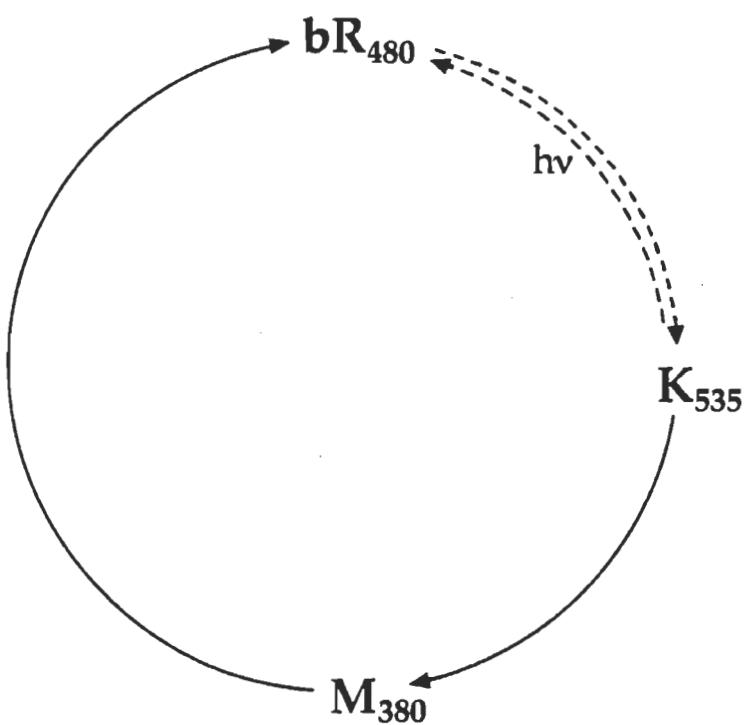


Figure 12 Schéma de la photochimie de la bactériorhodopsine modifiée bR_{480} . Les réactions lumineuses sont identifiées par $h\nu$.

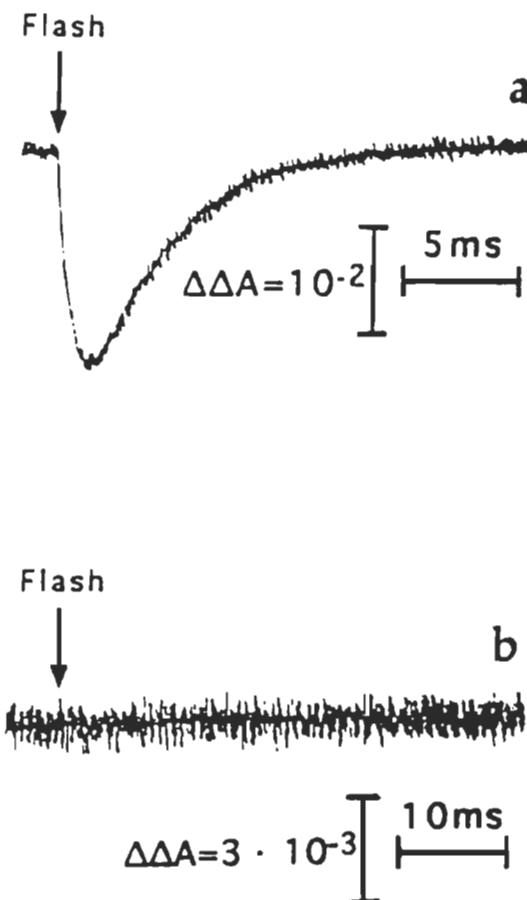


Figure 13 Activité de pompage de protons examinée, après une excitation laser, par mesure de la variation transitoire d'absorbance du paranitrophénol (indicateur de pH complètement soluble dans l'eau). Les mesures sont faites à 400 nm dans une solution aqueuse non tamponnée de membranes pourpres ($7.5 \mu\text{M}$ bR, $\text{pH} = 7$, 100 mM NaCl et $25 \mu\text{M}$ de paranitrophénol). La trace a correspond au signal mesuré sans anesthésique; la trace b représente le signal enregistré, dans les mêmes conditions que a, en présence de 0.4% (vol/vol) d'enflurane. Les flèches indiquent le flash laser (532 nm, 10 ns). D'après E. Harvey-Girard, Mémoire de maîtrise, UQTR, 1990.

été aussi confirmé par des mesures à l'état photostationnaire du spectre d'action de l'activité de pompage de protons (directement proportionnelle à la variation relative du pH du milieu externe) [72,73]. Ces mesures ont été réalisées sur des suspensions de vésicules de membranes pourpres entièrement modifiées (plus de 90% de la concentration initiale du pigment pourpre) par traitement aux anesthésiques¹¹ (figure 14) [21,74]. À la lumière de toutes les considérations expérimentales précédentes, il est donc possible de conclure que les formes interchangeables bR₅₇₀ et bR₄₈₀ sont deux pigments structuralement et photochimiquement comparables, mais, à priori, avec des compétences très différentes de pomper efficacement des protons.

Étant donné la pauvreté et la non diversité des informations actuellement disponibles au sujet de la forme bR₄₈₀, il est difficile de se prononcer de façon claire et définitive sur l'activité de pompage de protons de ce pigment en se basant uniquement sur les données préliminaires qui ont été obtenues jusqu'à maintenant. Pour tenter d'expliquer la disparition dramatique du transport net de protons dans la forme bR₄₈₀, une étude spectrophotométrique a été d'abord réalisée, au sein même de notre propre équipe, en vue de mesurer l'efficacité du pigment rouge à produire l'intermédiaire déprotoisé M¹² et de la

¹¹ Le pic d'activité du spectre d'action montré sur la figure 14 reste centré aux alentours de 570 nm (plus précisément à 550 nm) même en présence de faibles traces de l'espèce spectrale active bR₅₇₀. D'autre part, des expériences semblables faites sur des suspensions de vésicules traitées permettent de voir que l'efficacité de la lumière monochromatique 480 nm à produire des variations notables du pH du milieu externe (exprimée par le rapport $\Delta\text{pH}/A_{480}$ à une intensité lumineuse constante) diminue progressivement de 1 à 0.08 à mesure que la quantité relative du pigment bR₄₈₀ croît de 0 à plus que 0.9.

¹² Il faut bien rappeler ici que la formation de l'état spectral M (M₄₁₂ ou M₃₈₀) est directement associée à la déprotonation de la base de Schiff qui constitue à elle seule la réaction cruciale de l'activité de pompage de protons.

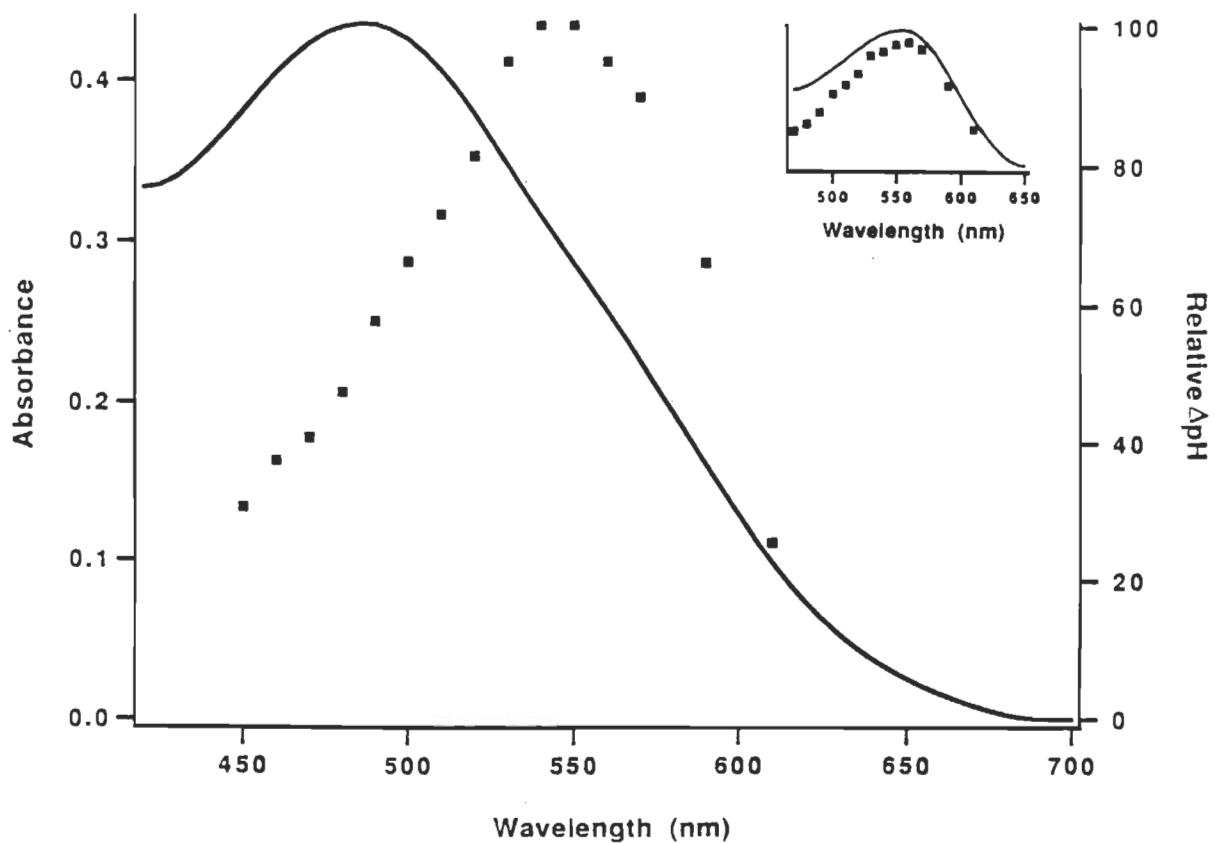


Figure 14 Le graphique principal illustre le spectre d'action de l'activité de pompage de protons à travers des vésicules de membranes pourpres. La ligne pleine représente le spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon en présence de 0.3% (vol/vol) d'enflurane. La courbe en carrés noirs indique la variation relative du pH du milieu ($\Delta\text{pH}/\Delta\text{pH}_{\text{max}}$) mesurée, en fonction de la longueur d'onde d'illumination, dans les mêmes conditions expérimentales. Le graphique secondaire montre des données de même type qui ont été mesurées sur le même échantillon après évaporation complète de l'anesthésique. D'après É. Harvey-Girard, Mémoire de maîtrise, UQTR, 1990.

comparer par après à celle du pigment natif. Cette étude a démontré que la forme bR₄₈₀, placée dans des conditions expérimentales adéquates, a pratiquement la même capacité de générer l'état spectral M que la forme bR₅₇₀ [69]. Ce résultat ne permet guère de résoudre le problème posé et par conséquent d'autres investigations plus approfondies sont donc exigées.

1.5.2 Justification de l'approche et objectifs spécifiques

L'ajout de petites quantités d'anesthésiques volatils, tels que l'enflurane ou l'halothane, à des échantillons de membranes pourpres induit pratiquement les mêmes effets que les autres procédés d'altération ci-haut mentionnés [66,74]. En effet, la modification du pigment natif par addition d'anesthésiques généraux obéit à un équilibre acido-basique dont la position dépend bien évidemment du pH du milieu. De plus, dans des conditions réactionnelles suffisamment stables (température et pression constantes, compositions chimiques invariables), ce genre de transformation chimique conduit généralement à un équilibre rapide (en une durée moyenne d'environ 1 h) entre la forme pourpre bR₅₇₀ et la forme rouge bR₄₈₀ (état basique). D'autre part, l'accumulation de l'état bR₄₈₀ en proportions significatives (jusqu'à plus de 90% de la concentration initiale du pigment bR₅₇₀) est grandement favorisée par le choix d'un milieu moyennement alcalin ($\text{pH} \geq 8$), une température et une force ionique modérées¹³, de même que l'injection de quantités adéquates du type d'anesthésique utilisé [66].

¹³ Pour réduire l'effet écran imposé par la couche électrique à la surface de la membrane pourpre et ainsi faciliter l'interaction des molécules d'anesthésiques à l'intérieur de la bicoque lipidique sans toutefois empêcher leur solubilisation, il est avantageux de travailler à force ionique modérée (10 mM) ainsi qu'à une température moyenne (20-30°C).

La génération de la forme bR₄₈₀, à partir de l'état naturel bR₅₇₀, sous l'action des anesthésiques volatils est un processus intéressant qui présente de nombreux avantages pratiques. Premièrement, dans des conditions physico-chimiques favorables, la production de bR₄₈₀ se fait habituellement selon des rendements très élevés qui peuvent facilement atteindre des valeurs limites proches de 100%. Deuxièmement, le traitement par anesthésiques constitue un mode de dopage qui est relativement facile et rapide¹⁴. Enfin, l'effet des anesthésiques est un phénomène complètement réversible capable de régénérer, en quelques dizaines de minutes seulement, le pigment original lorsque l'échantillon traité est abandonné à l'atmosphère libre ou bien soumis temporairement à un vide modéré [69]. Tous ces éléments réunis ensemble font en sorte que les anesthésiques volatils sont l'outil de travail le plus commode et le plus élégant à utiliser pour produire efficacement l'espèce modifiée bR₄₈₀.

Pour toutes ces raisons, ils seront le seul moyen pratique que nous adopterons tout au long de ce travail pour préparer des échantillons renfermant diverses concentrations du pigment bR₄₈₀, et ce en jouant à la fois sur le pH, la force ionique de la solution ainsi que sur la quantité et le type d'anesthésique ajouté.

Pour explorer davantage le fonctionnement apparemment anormal de la pompe à protons de la bactériorhodopsine modifiée, essayer d'apporter une explication plausible et compréhensible à ce phénomène encore mal compris et caractériser différents aspects reliés à l'activité photocyclique de la

¹⁴ Il suffit de suspendre les membranes pourpres dans une solution aqueuse contenant une quantité appropriée d'anesthésique et d'agiter régulièrement pendant au moins une heure de temps.

forme bR₄₈₀, nous avons entrepris d'étudier comment les anesthésiques volatils affectent la relation *activité-fonction de* la bactériorhodopsine native. Pour ce faire, on s'est d'abord penché sur ce qui se passe au niveau du centre de la protéine (centre photoactif) en examinant de façon spécifique les cinétiques de formation et de disparition de l'intermédiaire optique M; ces cinétiques correspondent respectivement aux réactions de déprotonation et de reprotonation de la base de Schiff qui sont deux étapes fondamentales et indispensables au mécanisme de transport de protons. Deuxièmement, pour caractériser le comportement électrique interne du pigment artificiel (bR₄₈₀) durant son cycle photochimique, nous avons procédé à la détection des photocourants transitoires engendrés par les déplacements élémentaires de charges (protons, chaînes latérales chargées, etc.) à l'intérieur de la protéine. Après une analyse cinétique approprié des données électriques enregistrées, il est possible de déterminer, de façon indirecte, l'efficacité de pompage de protons de la forme bR₄₈₀ pour ensuite la comparer à celle de la forme naturelle bR₅₇₀. Enfin, pour pouvoir déceler la libération transitoire de protons par la molécule de bactériorhodopsine et ainsi examiner directement l'activité de pompage de protons du pigment bR₄₈₀ par rapport à celle du pigment natif, nous avons opté pour des mesures de la variation transitoire de la conductivité électrique du milieu extérieur. Cette étude permet également d'observer le comportement des protons pompés en dehors de la membrane.

En fait, notre investigation electrocinétique, basée sur des mesures de photocourant et de photoconductivité transitoires, constitue une approche directe et efficace pour répondre clairement à la question fondamentale suivante : y a-t-il vraiment conservation du couplage interne entre l'activité

photochimique et la fonction de pompage de protons lors du passage de l'état bR₅₇₀ à l'état bR₄₈₀? En d'autres termes, la question qui se pose ici consiste à savoir si l'équilibre spectral qui se forme entre les états pourpre et rouge de la bactériorhodopsine est nécessairement un équilibre entre une forme physiologiquement active (état couplé) et une forme complètement inactive (état découplé), respectivement. Il est probablement opportun de signaler que la caractérisation électrocinétique de la forme rouge de la bactériorhodopsine n'a jamais encore été tentée. Pour la première fois, nous réaliserons ainsi des mesures électrocinétiques sur une forme réversiblement modulable de la bactériorhodopsine. Par ailleurs, dans le cadre de ce travail, des informations supplémentaires sur le mécanisme moléculaire de pompage de protons ainsi que sur l'action des anesthésiques volatils avec les membranes pourront vraisemblablement être obtenues.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Techniques spectroscopiques

2.1.1 Absorption

Les spectres d'absorption sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à balayage automatique (Pye Unicam SP8-100) opérant avec une résolution spectrale de 0.2 nm. Il peut couvrir un vaste intervalle de longueurs d'onde allant de 190 à 800 nm. De plus, cet appareil est muni de deux porte-échantillons, pour accueillir les cellules de mesure et de référence, qui sont situés tout près de l'optique de détection (photomultiplicateur) afin de pouvoir collecter la totalité de la lumière transmise par l'échantillon étudié. Cette précaution permet de réduire au maximum les pertes de transmission causées par le phénomène de diffusion lumineuse et ainsi augmenter la précision des enregistrements obtenus.

2.1.2 Mesures de la variation transitoire de la transmission optique : méthode de la photolyse éclair

2.1.2.1 Introduction

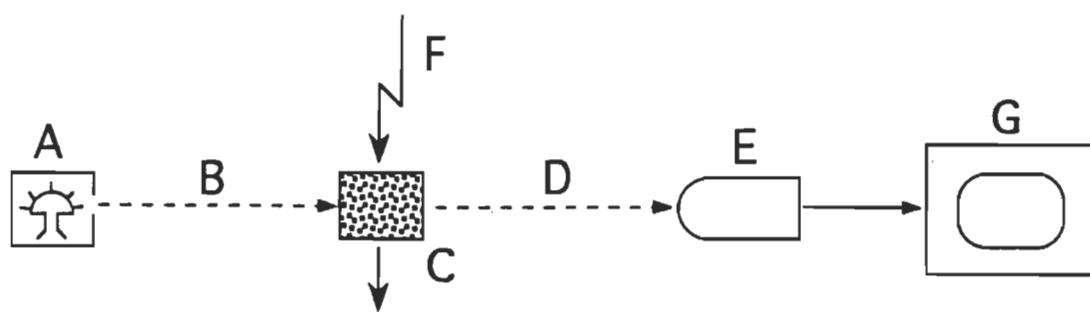
Pour examiner de très près le comportement cinétique des réactions consécutives de déprotonation et de reprotonation de la base de Schiff au cours de l'activité photochimique de la

bactériorhodopsine, la démarche la plus simple et la plus directe consiste à suivre dans le temps les phases d'apparition et de disparition de la composante spectrale M. Pour ce faire, on procède par mesure de la variation transitoire de la transmission optique, observée à une longueur d'onde appropriée, durant une seule réaction photocyclique. Cette analyse cinétique permet d'une part de comparer les cycles photochimiques des deux formes spectrales de la bactériorhodopsine (bR_{570} et bR_{480}), et d'autre part de comprendre de façon quantitative le scénario suivant lequel les propriétés optiques de la forme bR_{570} sont altérées au fur et à mesure que l'induction de la forme bR_{480} évolue (sa concentration relative passe graduellement de 0 à 1). C'est pour cette raison-là que nous avons décidé d'utiliser des échantillons de membranes pourpres où les deux espèces coexistent mais à différentes proportions. D'autre part, ce type de mesures permet également de caractériser davantage le cycle photochimique du nouveau pigment bR_{480} .

2.1.2.2 Principe de la méthode

La photolyse éclair est une technique spectroscopique qui permet d'analyser la relaxation cinétique, en temps réel, d'une molécule photosensible (e.g., bR , hR , etc.) dont l'état fondamental était initialement perturbé par une brève excitation lumineuse. Son principe de base repose principalement sur l'utilisation de deux radiations lumineuses perpendiculaires, projetées par deux sources rayonnantes différentes, qui illuminent une population importante de molécules photosensibles identiques.

La première radiation est une lumière actinique qui assure le déclenchement de la réaction photochimique que l'on désire étudier. Cette impulsion lumineuse doit être suffisamment intense pour pouvoir exciter le maximum possible de molécules présentes, et sa durée doit être d'autant plus brève que le phénomène à résoudre est rapide. La deuxième radiation, habituellement appelée faisceau d'analyse, est une illumination monochromatique continue, transportant une radiance stable (du moins pendant la durée limitée de la mesure) et appropriée, qui permet d'inspecter les transformations chimiques qui ont été initiées, au sein de l'échantillon, par la photoexcitation primaire. L'information optique contenue dans le faisceau d'analyse ayant traversé l'échantillon de mesure (faisceau transmis) sera perçue, sous forme de variations transitoires de transmittance, à l'aide d'un système de détection adéquat (photodiode ou photomultiplicateur). Les cinétiques et les amplitudes relatives des transitoires observées à une longueur d'onde déterminée nous informent directement sur la nature des phénomènes microscopiques qui se déroulent à l'échelle de la molécule photoactive. Évidemment, s'il n'y avait pas de réaction, il n'y aurait pas de variation dans l'intensité du faisceau transmis; la réciproque n'est pas nécessairement vraie. Le signal émergent du détecteur optique sera ensuite amplifié et converti en tension électrique, grâce à un amplificateur électronique, en vue d'être visualisé sur l'écran d'un oscilloscope rapide. Les données cinétiques brutes ainsi obtenues seront acheminées vers un ordinateur de traitement où elles seront stockées et analysées afin d'en extraire les paramètres physiques recherchés. La figure 15 donne un schéma descriptif du principe de base qui vient d'être expliqué.



Légende du schéma

- A = Source d'énergie rayonnante.
- B = Flux continu de lumière monochromatique traversant le centre du compartiment C.
- C = Échantillon de molécules photosensibles à investiguer.
- D = Lumière transmise transportant l'information optique désirée qu'il faut proprement détectée.
- E = DéTECTEUR optique.
- F = Éclair actinique qui induit la réaction photochimique qu'on veut étudier.
- G = Système électronique d'enregistrement, de stockage et d'analyse des signaux mesurés.

Figure 15 Principe de base de la photolyse éclair.

2.1.2.3 Préparation des échantillons

Les membranes pourpres dont nous nous sommes servi tout au long de ce travail proviennent de la souche mutante S9 d'*Halobacterium halobium*. Leur préparation en proportions importantes (20-50 mg de membranes pourpres par litre de milieu de culture) a été faite selon la procédure classique précédemment décrite par Baribeau et Boucher [17,62]. Une fois que les opérations d'isolement et de purification ont été terminées, les membranes pourpres pures obtenues sont resuspendues dans une solution saline, dite solution de Kushner¹⁵, pour être soigneusement conservées pendant plusieurs années (0-3 ans).

Avant chaque utilisation expérimentale, une certaine quantité de membranes pourpres est d'abord prélevée de la solution d'entreposage. Nous procérons ensuite à une série de lavages à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace de la contamination saline. La procédure d'élimination des sels consiste généralement en une série de quatre centrifugations consécutives effectuées à 4° C et à une vitesse de 40 000 g (19 000 rpm avec le rotor Sorvall SS-34). Les deux premières durent 25 minutes chacune, la troisième 45 minutes et la dernière environ 90 minutes. Après chaque centrifugation, seul la phase solide sédimentée (culot de mps) est conservée; la phase liquide (surnageant) renfermant les sels non désirés est entièrement rejetée. Ensuite, le culot

¹⁵ La solution de Kushner, en référence à la personne qui l'avait utilisée pour la première fois, est préparée selon la recette chimique suivante (exprimée en g/l) : NaCl (250); KCl (2); MgSO₄•7H₂O (0.2). Son pH étant ajusté à la valeur 7 par addition de NaOH.

est de nouveau suspendu dans l'eau distillée et l'opération de sémination est encore relancée. Ce scénario de nettoyage est répété un certain nombre de fois (4 fois en ce qui nous concerne) jusqu'à ce que la teneur en sels du surnageant devienne extrêmement négligeable. La suspension de membranes pourpres obtenue est totalement désalée et présente une concentration élevée en bR (plus de 130 µM bR). Elle sera ultérieurement utilisée comme solution stock pour préparer des échantillons de mesure de compositions diversifiées (divers pH, forces ioniques, concentrations de bR, etc.), et ce, selon les besoins dictés par les études expérimentales projetées.

Toutes les mesures optiques ont été effectuées, à température ambiante (20-25° C), sur des échantillons homogènes totalement adaptés à la lumière (par exposition continue à la lumière blanche issue d'un projecteur optique). Comme c'est déjà précisé dans le chapitre précédent, les anesthésiques volatils que nous avons utilisés pour induire la formation du pigment modifié sont exclusivement l'enflurane ($\text{CHF}_2\text{OCF}_2\text{CHFCI}$) et l'halothane (CF_3CHClBr)¹⁶ dont les coefficients de partition dans un mélange octanol/eau sont respectivement 126 et 199 à 25°C. En pratique, pour produire la forme bR₄₈₀, nous injectons rapidement, au moyen d'une seringue 100 µl graduée en 100 unités, une faible quantité (jusqu'à 30 µl) de l'anesthésique désiré à ~3 ml d'une suspension aqueuse de membranes pourpres contenue dans une cellule spectrophotométrique. La cellule

¹⁶ L'halothane a une action beaucoup plus forte que celle de l'enflurane et son utilisation requiert donc des concentrations beaucoup plus faibles. Cependant, une longue incubation des membranes pourpres en présence de cet anesthésique ainsi que des concentrations relativement grandes peuvent bloquer la transformation inverse : bR₄₈₀ → bR₅₇₀.

est complètement fermée afin d'éviter une éventuelle évaporation de l'anesthésique. Pour favoriser la solubilisation de l'anesthésique dans la phase aqueuse (où il est difficilement soluble) et par conséquent augmenter son interaction avec les fragments pourpres, nous agitons manuellement et de façon régulière (à toutes les 2 min) la suspension à modifier jusqu'à ce qu'elle tourne au rouge, indiquant ainsi la formation de l'espèce bR₄₈₀. La période de temps nécessaire pour réaliser une telle transformation varie généralement de 1 à 2 heures. La modulation de l'équilibre bR₅₇₀ ⇌ bR₄₈₀ se fait en agissant sur la concentration de l'anesthésique injectée et/ou sur les conditions physico-chimiques du milieu de suspension. La concentration relative de la forme bR₄₈₀ est évaluée à partir du spectre d'absorption UV-visible mesuré directement sur l'échantillon transformé. À la fin de la manipulation, l'anesthésique est complètement évacué et la forme bR₅₇₀ est régénérée en abandonnant la cellule de mesure ouverte à l'air ambiant (pendant une soixantaine de minutes) ou en lui appliquant un vide modéré (~ 20 mm Hg) pendant une courte durée variant de 10 à 20 minutes.

2.1.2.4 Description de la procédure expérimentale et du dispositif de mesure utilisé

L'expérimentation de photolyse débute par l'ajustement précis¹⁷ de la longueur d'onde désirée pour notre faisceau d'analyse.

¹⁷ La largeur de la raie spectrale choisie pour la lumière d'analyse doit être suffisamment étroite pour aboutir à une meilleure résolution optique de sa longueur d'onde. En pratique, son réglage se fait tout simplement par réduction de l'ouverture de la fente d'émission du monochromateur (qui lui est directement proportionnelle).

Ce dernier est produit par un système d'illumination continue composé d'une lampe-à-arc au Xénon (150 W) et d'un monochromateur à réseau (Photon Technology Inc., Princeton, N.J.). La lumière monochromatique projetée est totalement focalisée, au moyen d'une lentille convergente, sur le centre de la cellule de mesure (renfermant l'échantillon à analyser). Cette dernière étant constituée d'une cuvette en quartz à double paroi de $1 \times 1 \times 4.5 \text{ cm}^3$ qui est fermement scellée afin d'éviter l'évaporation de l'anesthésique volatil durant le temps de la mesure. De plus, elle est installée sur un porte-échantillon métallique traversé par une canalisation permettant la circulation d'un liquide réfrigérant. La température du liquide est maintenue constante (à une valeur comprise entre 20 et 27 °C) grâce à un bain thermostaté (marque Brinkman Landa RC3 modèle T2). À la sortie du compartiment échantillon/porte échantillon, le faisceau transmis traverse d'abord une autre lentille de collimation avant d'atteindre une combinaison de deux filtres optiques disposés juste à l'entrée de l'unité de détection. Le premier filtre est un filtre holographique Raman caractérisé par une forte atténuation (10^5) à 532 nm; le deuxième est un monochromateur à filtre (marque Oriel) ayant un bon facteur de transmission. À la fin du parcours, la lumière transmise est interceptée par un détecteur optique composé d'une photodiode rapide (temps de montée de 50 ns) connectée à un amplificateur de courant approprié. Le signal électrique ainsi produit est directement acheminé vers un oscilloscope digital (vitesse d'échantillonnage maximale de 500 ns/point; marque Nicolet 4094, Nicolet Instruments Corp., Mississauga, Ont.) en vue d'être enregistré, digitalisé et finalement mémorisé. Une fois que la mesure est

complétée, les données cinétiques qui ont été recueillies sur l'oscilloscope sont transférées, au moyen d'interfaces GPIB IEE-488, vers un ordinateur où elles seront numériquement stockées et analysées.

L'irradiation actinique est générée par le déclenchement d'un laser pulsé de type Neodymium/YAG (raie de 532 nm; "Q-switched"; fréquence doublée; durée de l'impulsion:10 ns; énergie développée: ~ 20 mJ) de la compagnie JK Laser System 2000. Le faisceau laser, d'un diamètre moyen de 4 mm, arrive exactement au centre de l'échantillon à angle droit par rapport au faisceau d'analyse. Son éclair se fait à travers une des parois dépolies de la cuvette de mesure afin de bien diffuser la lumière actinique, et ainsi exciter le plus possible de molécules. Le flash laser assure d'une part l'initiation de la réaction photochimique qu'on désire étudier, et d'autre part le déclenchement, par l'intermédiaire d'un couplage optique approprié, de la séance d'enregistrement de l'oscilloscope. Cette synchronisation instrumentale permet de suivre l'évolution du phénomène d'intérêt à partir du moment de déclenchement du balayage automatique qui est donc considéré comme étant le temps zéro du signal. Il est à noter ici que l'oscilloscope a une période de prédéclenchement ajustée de telle sorte que l'on puisse connaître l'intensité du faisceau transmis juste avant le tir laser. La même opération de mesure est répétée un certain nombre de fois de sorte que la trace finale soit une moyenne de plusieurs enregistrements transitoires pratiquement identiques. La figure 16 schématisse l'essentiel du dispositif expérimental utilisé pour

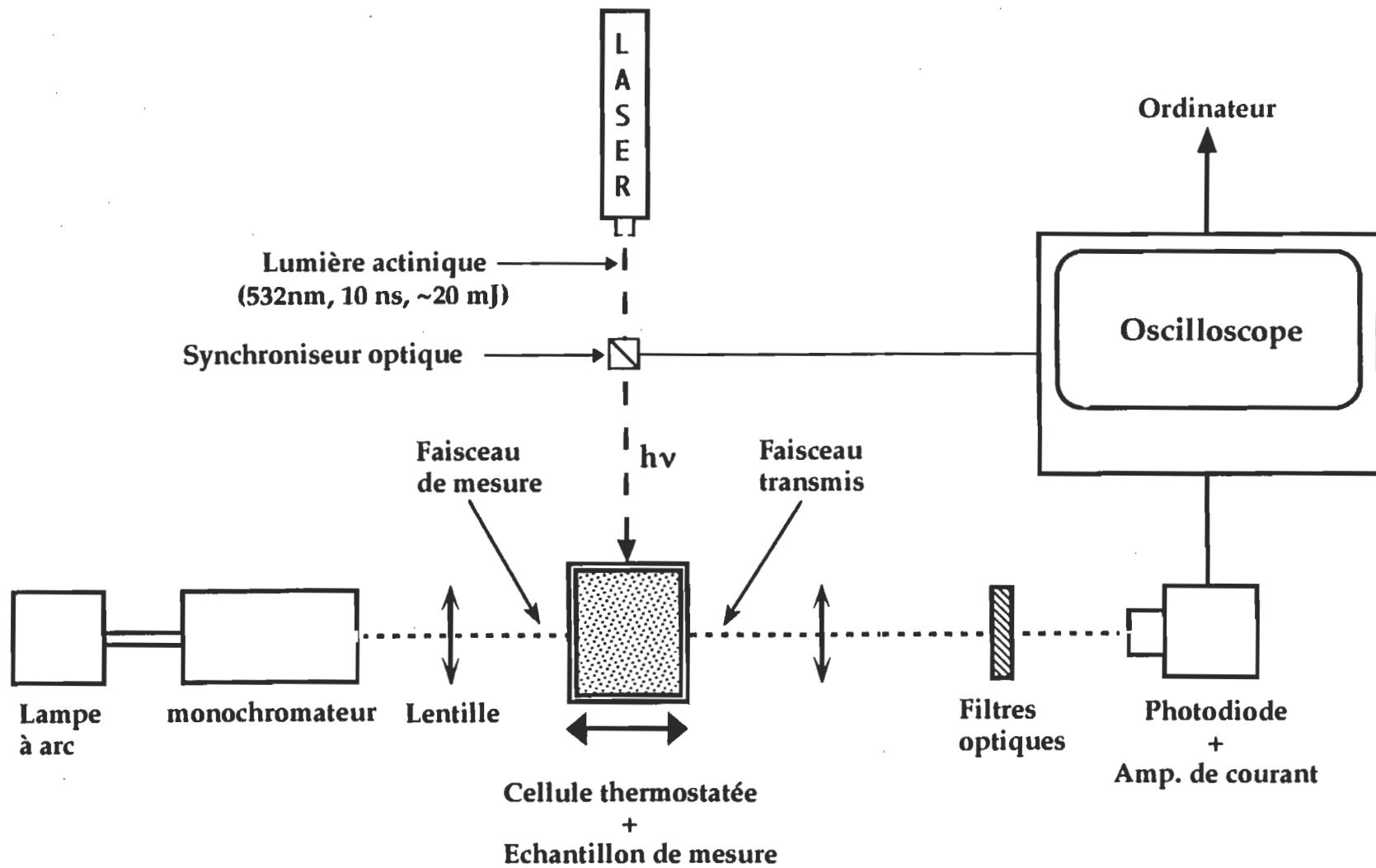


Figure 16 Schéma descriptif du montage expérimental de la photolyse éclair (voir texte pour les détails).

les mesures de photolyse éclair, et montre également un exemple typique de courbes transitoires obtenues.

Remarque. Généralement, dans des études cinétiques de ce genre, quelques précautions initiales doivent être prises afin d'accroître la sensibilité et la précision des mesures, et ainsi éviter certains problèmes pratiques nuisibles et limitants. Tout d'abord l'intensité de l'illumination continue doit être suffisamment stable (du moins durant la courte période de l'observation expérimentale) et sa longueur d'onde doit être spectralement bien résolue pour pouvoir suivre correctement, sans la contribution des interférences provenant de sources parasites, le phénomène spécifique qu'on désire observer. C'est pour cette raison-là que nous avons opté pour l'utilisation d'un monochromateur de grande qualité renforcé par des filtres optiques appropriés. D'autre part, l'intensité du faisceau d'analyse doit être ajustée à un niveau optimum, ceci permet de prévenir contre un effet actinique secondaire qui est susceptible d'engendrer des molécules photocycliques à l'état photostationnaire. De plus, le choix de la bonne intensité permet d'une part d'éviter une restriction de la sensibilité du détecteur optique, et d'autre part d'oeuvrer en dehors de la zone de bruit électronique du système de mesure (c.à.d., adopté un bon rapport signal sur bruit).

Deuxièmement, pour bien résoudre dans le temps la réaction photochimique qui nous intéresse, et aussi pour mieux estimer son temps d'initiation, il est fort important que l'excitation laser ainsi que la réponse en fréquence globale du système soient toutes les deux extrêmement rapides comparativement à la vitesse d'évolution du

phénomène à observer. En outre, plus l'impulsion actinique serait rapide (par rapport à la réaction à étudier), moins longtemps sa lumière résiduelle, passant à travers les filtres optiques, se chevaucherait à la lumière transmise par l'échantillon. En d'autres termes, le signal proprement dit serait facilement discernable et son observation ne nécessiterait aucune déconvolution numérique. Enfin, plus l'excitation est courte, moins l'évolution cinétique du phénomène serait masquée par un éventuel aveuglement de la photodiode.

2.2 Mesures photoélectriques

2.2.1 Introduction

L'irradiation de la bactériorhodopsine native par la lumière visible se traduit globalement par le transport net d'un proton de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane pourpre. Le mécanisme exact par lequel s'effectue le couplage absorption de photons-pompage actif du proton n'est pas encore complètement élucidé, et ce malgré la connaissance précise de la structure tertiaire de la bR (avec une résolution maximale de 3.5 Å) ainsi que la réalisation de nombreux travaux de recherche entièrement dévoués à cet aspect très fondamental [26,42]. Toutefois, en se basant sur le modèle structural actuellement admis pour la bR, les études déjà effectuées¹⁸ ont permis d'identifier certains éléments stratégiques hautement impliqués dans le fonctionnement interne de cette pompe à protons (voir la section 1.4.3).

¹⁸ En utilisant diverses techniques telles que les spectroscopies FTIR et UV, la mutation dirigée, des mesures photoélectriques et de variation transitoire de pH, etc.

Dans ce contexte, pour tenter de mieux comprendre les détails moléculaires de la translocation électrogénique de protons par la molécule de bR, il est donc nécessaire et tout à fait logique de suivre étape par étape les déplacements microscopiques de charge à l'intérieur de la protéine pendant son activité photochimique. Ceci nous conduit vers un autre type de caractérisation du photocycle réactionnel de la bR : la caractérisation électrique. En fait, l'activité photoélectrique de la bactériorhodopsine reflète la séparation de charge initiale au niveau du chromophore (photo-isomérisation), les réactions d'ionisation de certains acides aminés internes ainsi que quelques changements conformationnels se produisant au sein de la protéine. En outre, ce type d'investigation permettrait aussi de nous informer sur le rendement de l'échange de protons entre la bR et son milieu environnant : efficacité de pompage de protons.

2.2.2 Nécessité de l'orientation des membranes pourpres

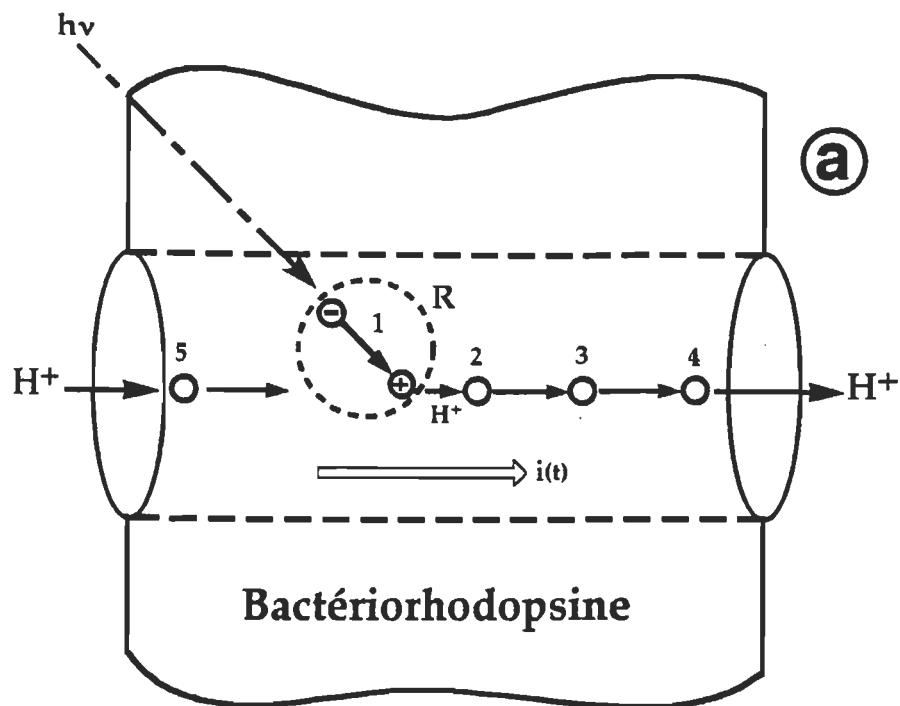
Pour explorer les mouvements microscopiques de charge induits à travers la protéine par une courte excitation lumineuse, la façon la plus simple et la plus élégante de le faire serait tout simplement de suivre l'évolution, en temps réel, du courant électrique transitoire $i(t)$ (figure 17a) qui leur est directement associé [59,75-77]. Compte tenu de sa petitesse ainsi que d'autres limitations expérimentales, il est laborieux, voir même impossible, de mesurer ce courant infinitésimal en se servant uniquement d'une seule protéine ou d'un seul fragment pourpre [51,78].

Depuis la fin des années soixante-dix, plusieurs méthodes expérimentales ont été élaborées par divers groupes de recherche dans le but de déceler les étapes transitoires reliées à la modification de l'état électrique interne de la bR suite à une perturbation lumineuse [51]. En pratique, ces manifestations photoélectriques, conventionnellement appelées signaux photoélectriques, sont détectées sous forme de photocourants (ou de photovoltages [78], dépendamment du type de méthode expérimentale utilisée). Afin d'éviter la neutralisation mutuelle des photocourants individuels $i(t)$ (i.e., créés par chaque molécule), et de faire ainsi une sommation étendue à toutes les contributions électriques relatives à chacune des molécules de bR excitées, les mesures photoélectriques sont réalisées à l'aide de systèmes membranaires composés d'un très grand nombre de membranes pourpres identiquement orientées¹⁹ (milieux anisotropes) [79]. Les échantillons sont placés, selon une disposition bien précise, dans un milieu approprié compris entre deux électrodes métalliques diamétralement opposées. Ces dernières sont reliées à un système électronique externe permettant la détection du signal photoélectrique désiré $I(t)$: photocourant macroscopique (figure 17b).

2.2.3 Méthodes d'orientation : un aperçu général

Il est maintenant évident que l'enregistrement de la réponse photoélectrique transitoire de la bactériorhodopsine (i.e., manifestation macroscopique des mouvements de charge intraprotéiques) impose

¹⁹ La définition physique du terme orientation signifie que les membranes pourpres sont parallèlement disposées les unes par rapport aux autres (i.e., alignement) de telle sorte que leurs côtés cytoplasmiques (ou extracellulaires) font tous face vers la même direction.



R : Site photorécepteur (rétinal+base de Schiff protonée)

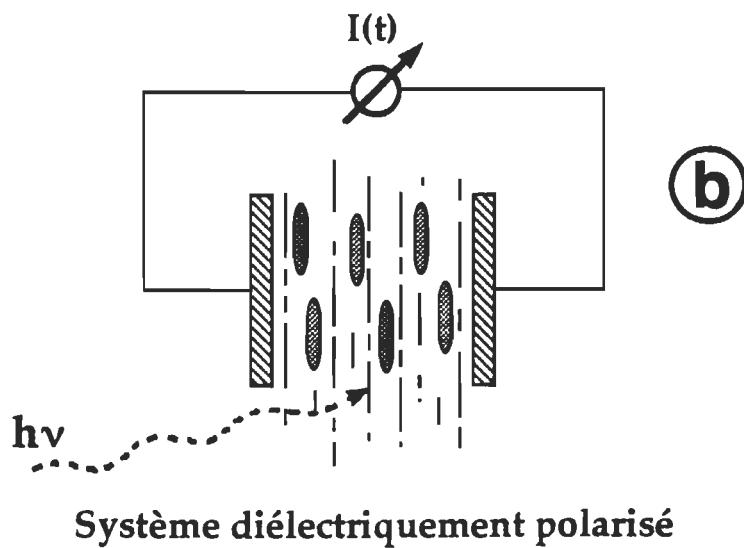


Figure 17a Photocourant microscopique $i(t)$ engendré par les déplacements élémentaires de charge (H^+) durant une seule activité photochimique de la bR. Les petits cercles représentent les sites de fixation du proton à travers son parcours transmembranaire.

b Système membranaire orienté (i.e., diélectriquement polarisé) permettant la détection du photocourant macroscopique $I(t)$ produit par la superposition de plusieurs photocourants identiques $i(t)$.

l'utilisation de plusieurs membranes pourpres orientées [51,79]. Les diverses techniques actuellement employées pour cet effet sont toutes basées sur le caractère électrostatique et/ou hydrophobe des membranes pourpres. Dans la pratique, seules quelques méthodes intéressantes peuvent être envisagées dépendamment de la manière avec laquelle l'orientation des membranes pourpres peut être réalisée. En effet, certains principes d'orientation sont fondés sur l'application d'un champ électrique statique (10-30 V/cm) dans une suspension aqueuse de membranes pourpres au moyen de deux électrodes métalliques dont les formes géométriques peuvent être très variées [23,80-86]. Ces deux électrodes sont disposées parallèlement à une distance relative allant de quelques micromètres jusqu'à quelques centimètres²⁰. D'autres techniques d'orientation se servent principalement des propriétés d'adsorption des membranes pourpres (à cause de leur asymétrie structurale) pour les faire étaler, selon une orientation donnée, sur des substrats solides très minces (lamelles en Teflon, filtres membranaires, cloisons sélectives imprégnées de lipides et bicouches lipidiques planes (BLM)) [49,81,87-95] ou sur des interfaces hydrophobes/hydrophiles séparant deux phases fluides non-miscibles (air/eau, solvant organique/eau, etc.) [28,29,44,96].

La minceur des couches membranaires adsorbées limite considérablement la valeur de la densité optique associée et réduit donc de beaucoup la sensibilité des mesures optiques qui deviennent pratiquement impossibles. Par ailleurs, les mesures photoélectriques basées sur le phénomène d'adsorption à la surface d'un substrat, sur l'application d'une

²⁰ Les fragments pourpres peuvent être orientés temporairement (2-6 s) par brève exposition à l'effet de la tension électrique ou continuellement par fixation de leur orientation dans un gel polyacrylamide; l'électrodéposition des membranes sur une électrode anodique combinée à une forte déshydratation permet également d'obtenir des échantillons orientés de façon permanente.

tension électrique orienteuse et/ou sur la déshydratation des membranes, présentent des restrictions et des inconvénients majeurs qui réduisent largement leurs précisions ainsi que leurs domaines d'applications pratiques. En fait, le contact prolongé des membranes pourpres avec un support solide ou avec un solvant organique, leur déshydratation ainsi que le maintien d'une tension électrique extérieure peuvent sérieusement affecter l'activité photoélectrique normale de même que l'efficacité de pompage de protons. Ces contraintes peuvent aussi donner naissance à d'autres effets nuisibles tels que l'électrolyse, l'électrophorèse, la dégradation des membranes pourpres, l'inhomogénéité et la non stabilité des échantillons de mesure ainsi que la contribution de d'autres phénomènes électriques extérieurs (variation de la conductivité électrique externe due à la libération transitoire de protons, courants de déplacement des contre-ions interfaciaux, etc.). En outre, l'état d'orientation des membranes pourpres par les techniques mentionnées est variable et dépend énormément de la nature du milieu avoisinant (pH, force ionique, température, etc.). Dans ces conditions, l'orientation peut subir des fluctuations non négligeables durant le temps de mesure et risque de ne pas être tout à fait la même (sensiblement modifiée) chaque fois que l'on change les paramètres physico-chimiques de l'expérimentation.

À la lumière de toutes ces considérations, il est donc facile de conclure que les approches d'orientation ci-haut mentionnées sont expérimentalement limitées et que certaines d'entre elles sont plus adaptées que d'autres dépendamment du type d'application projetée. Dans ce contexte, la méthode du gel orienté nous apparaît comme étant la méthode la plus efficace et pratiquement la plus flexible pour étudier de façon satisfaisante l'activité électrique, l'activité de pompage de protons ainsi que le mécanisme interne

de la bR. Cette méthode offre toute une foule de possibilités et d'avantages pratiques qui peuvent être résumés comme suit [83,84] :

- a. la force ionique du mélange aqueux utilisé pour la préparation du gel (essentiellement une solution d'acrylamide et de bis-acrylamide) est suffisamment faible et permet donc une bonne orientation des membranes pourpres. De ce fait, le maximum d'orientation, qui peut être examiné par la technique du dichroïsme électrique, est toujours atteint pour une valeur relativement faible du champ électrique statique appliqué; soit $\sim 15 \text{ V/cm}$.
- b. Le gel est optiquement transparent dans tout le domaine du visible; il est aussi électriquement inactif et ne génère aucun signal photoélectrique propre.
- c. Le polymère de polyacrylamide n'affecte ni le photocycle de la bR ni son activité de pompage de protons; c'est-à-dire la matrice de fixation du gel est chimiquement inerte et sa résistance vis-à-vis du courant de protons est parfaitement nulle.
- d. Les membranes pourpres sont extrêmement stables dans le gel et leurs propriétés photoélectriques ainsi que leur rendement de transport de protons sont maintenus à un niveau constant pendant plusieurs années.
- e. Les paramètres physico-chimiques de la solution de suspension peuvent être modifiés facilement sans influencer le degré d'orientation des membranes pourpres ni l'homogénéité de l'échantillon.
- f. À la différence des autres méthodes, il est pratiquement possible de faire des mesures dans des milieux ayant des compositions très variées : valeurs extrêmes du pH, forces ioniques très élevées (jusqu'à 1M), etc.

- g. Finalement, la méthode du gel orienté permet de faire des mesures directes et précises des signaux photoélectriques et des variations transitoires de la transmission optique. Elle peut être facilement étendue pour étudier d'autres protéines transporteuses d'ions se trouvant dans des membranes biologiques.

2.2.4 Méthode du gel orienté : principe de base

Comme d'autres membranes biologiques, la membrane pourpre (mp) porte normalement sur chacune de ses deux surfaces une charge électrique négative et permanente qui est de l'ordre de -0.01 à -0.002 charges/ \AA^2 , ce qui équivaut à environ $2\text{e}^-/\text{bR}$ [22,23,51,97]. Cette caractéristique de la mp est due à la nature polaire des têtes lipidiques et des acides aminés extrinsèques. De plus, la répartition superficielle de sa charge négative est toujours asymétrique et présente ainsi un moment dipolaire électrique permanent qui est estimé à $\sim 10^7$ Debye [22,23]. Ce caractère dipolaire est à la base de toutes les procédures d'orientation des membranes pourpres à l'aide d'un champ électrique. En effet, dans un champ électrique extérieur, une membrane pourpre libre (i.e., dans une solution aqueuse assez diluée) est soumise à deux types de contraintes physiques : une translation électrophorétique due à la force électrique engendrée par l'interaction entre le champ appliqué et la charge électrique de la mp; un mouvement de rotation exercé par un couple de forces résultant de l'interaction entre le moment dipolaire ($\vec{\mu}$) et la grandeur vectorielle du champ(\vec{E}). Le terme d'orientation ($\vec{\mu} \wedge \vec{E}$) tend à aligner les fragments pourpres perpendiculairement à la direction du champ d'orientation. De cette manière, les membranes pourpres passent d'une disposition aléatoire et tout à fait désordonnée à une autre bien orientée

(figure 18), et ce en moins de 100 ms dans les situations standards (pH à peu près neutre, force ionique et température modérées, concentration moyenne des mps, etc.). Afin d'augmenter le degré d'orientation des membranes pourpres ainsi que de minimiser l'effet perturbateur du phénomène d'électrophorèse²¹, il est donc essentiel de choisir d'abord le champ électrique optimum qui interagit le plus adéquatement possible avec les membranes pourpres, et ensuite d'ajuster en conséquence le temps de polymérisation du gel polyacrylamide.

Remarque. Contrairement aux systèmes purement capacitifs, la méthode du gel orienté est spécialement adaptée pour faire des mesures de photocourants (et aussi des mesures optiques). Or, sachant d'une part que l'amplitude d'un photocourant élémentaire (i.e., associé avec une seule transition du photocycle) est directement proportionnelle au produit entre la charge pompée, la distance microscopique parcourue et le coefficient de vitesse de la transition (chapitre 3) et d'autre part que l'amplitude d'un photovoltage élémentaire est uniquement proportionnelle à la charge électrique déplacée²², il est donc facile de réaliser pourquoi les mesures de photovoltage offrent une sensibilité pratiquement constante sur une large échelle de temps (i.e., rapport signal/bruit pratiquement constant) et sont particulièrement adéquates pour détecter les photoprocessus lents. Les mesures de photocourant quant à elles, sont très efficaces pour suivre les réactions rapides mais elles le sont moins lorsqu'il s'agit de signaux relativement lents (jusqu'à quelques dizaines de millisecondes) générant des

²¹ Ce phénomène peut conduire, entre autres, à la formation d'échantillons inhomogènes et/ou à l'aggrégation des membranes.

²² Ceci découle de la propriété intégrale des systèmes capacitifs qui permet d'écrire : $V(t) \sim \int i(t) dt$

Principe de base de la méthode du gel orienté

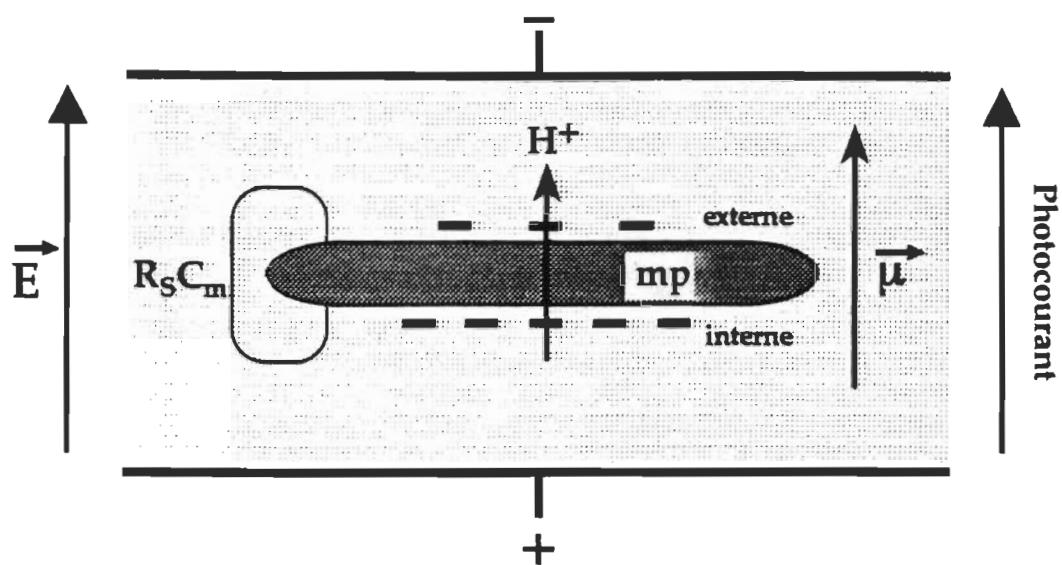


Figure 18 Schéma montrant l'orientation électrique d'une membrane pourpre (mp) dans une solution aqueuse à pH neutre. E : champ électrostatique d'orientation produit par deux plaques métalliques de charges opposées; μ : moment dipolaire électrique permanent de la mp; R_sC_m : constante de temps de la relaxation ionique autour de la mp. Le diagramme représente aussi la direction normale de transport du proton (H^+) ainsi que la polarité positive du photocourant $i(t)$.

amplitudes difficilement détectables. Cependant, étant donné que les deux types de mesures photoélectriques conduisent à des informations cinétiques équivalentes et que le photosystème auquel nous nous intéressons particulièrement, la bR, évolue selon des processus successifs ayant des amplitudes et des vitesses très différentes, il est donc commode et plus direct d'effectuer des mesures de photocourant en se servant des avantages pratiques de la méthode du gel orienté. De plus, les cinétiques du photocourant sont directement reliées à celles des intermédiaires du photocycle de la bR.

2.2.5 Préparation des échantillons de mesure : membranes pourpres orientées et immobilisées dans un gel polyacrylamide

Avant d'exécuter le protocole de préparation du gel orienté, une suspension aqueuse de membranes pourpres complètement désalées a d'abord été préparée de la même manière que celle déjà décrite dans la section 2.1.2.3. Cette solution stock est ensuite ajustée à la concentration désirée en bR par addition d'un volume approprié d'eau distillée. Dans un premier temps, une petite quantité ($\sim 200 \mu\text{l}$) de la suspension mère sera diluée deux fois par une solution aqueuse renfermant tous les ingrédients nécessaires à la fabrication d'un gel polyacrylamide [83,84]. La composition initiale de ce mélange comprend 30% d'acrylamide, 0.8% de bis-acrylamide, ~10% de persulfate d'ammonium et 20% de TEMED; les deux derniers produits de cette composition sont responsables de la polymérisation du gel. Le tout est injecté rapidement dans une cellule étroite en verre ($0.8 \times 15 \times 35 \text{ mm}^3$) dotée de deux électrodes latérales en platine. L'orientation des membranes pourpres est initiée presqu'au même moment

que le processus de polymérisation par application d'un champ électrique statique ($\sim 15 \text{ V/cm}$) entre les deux électrodes. Une fois la polymérisation terminée (1-2 minutes à température ambiante) la tranche de gel ainsi formée est récupérée puis elle est rinsée à l'eau distillée à plusieurs reprises afin d'éliminer toute trace résiduelle de TEMED. De petits échantillons ($0.8 \times 6 \times 7 \text{ mm}^3$) seront ensuite découpés et conservés dans l'eau distillée pour les mesures ultérieures.

Avant chaque mesure, l'échantillon est d'abord incubé dans la solution électrolytique désirée, pendant au moins deux heures, afin de permettre un équilibrage entre les membranes pourpres et le liquide d'immersion. Le gel sera ensuite installé dans une cellule appropriée avant d'être transféré vers le système de mesure. Pour induire la forme bR₄₈₀, le milieu d'incubation est additionné d'une petite quantité de l'anesthésique choisi. L'ensemble est parfaitement fermé et agité de façon régulière pendant au moins une heure de temps. La concentration relative en bR₄₈₀ sera estimée par mesure du spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon modifié. Enfin, toutes les mesures photoélectriques seront réalisées à température ambiante sur des échantillons adaptés à la lumière. Le protocole de préparation du gel orienté est schématiquement illustré sur la figure 19.

2.2.6 Procédure expérimentale et système de mesure

Avant chaque expérimentation, l'échantillon de mesure (i.e., petit gel avec des membranes orientées) est soigneusement disposé au centre d'une cellule en verre ($1 \times 10 \times 15 \text{ mm}^3$) remplie d'une faible quantité de la solution électrolytique ayant précédemment servi à l'incubation des membranes

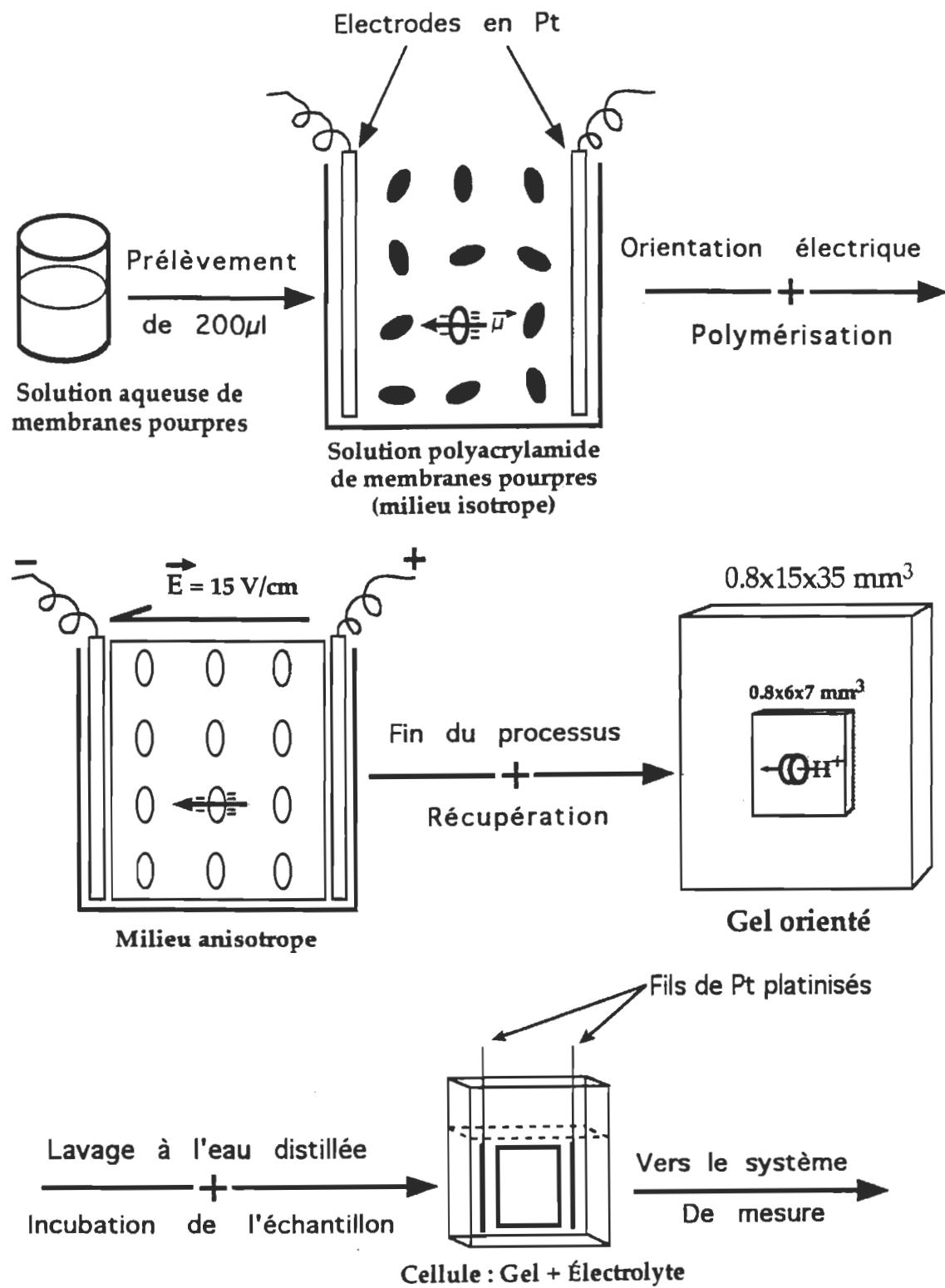


Figure 19 Illustration résumant la procédure de préparation du gel orienté.

pourpres. Ensuite, deux fils de platine platinisé (de 0.5 mm de diamètre et 2.5 cm de hauteur) sont introduits dans la cellule de part et d'autre du petit morceau de gel; ils permettent de collecter les courants de déplacement de charge générés par les fragments pourpres. Les extrémités extérieures des deux électrodes de Pt sont connectées, par l'intermédiaire de fils électriques très courts, aux terminaisons d'entrée d'un convertisseur courant-voltage (Analog Modules, Inc.; modèle 342A; large bande-passante : 0-100 MHz; gain élevé : 100 kV/A; bruit très réduit : $2.5 \text{ pA}/\sqrt{\text{Hz}}$). Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit, le signal électrique à la sortie de l'amplificateur de courant est directement transmis vers un autre amplificateur de tension doté d'un filtre passe-bas à fréquence de coupure ajustable (bande passante : 0-2 MHz; gain : 1-50 000; Stanford Research Systems Inc., Sunnyvale, CA). La tension électrique finale produite par tout le système de détection est acheminée vers un oscilloscope rapide (4094 ou 4094C, Nicolet Instrument Corp., Mississauga, Ont.) dans le but d'être enregistrée, digitalisée et mémorisée. Les données numériques ainsi obtenues seront ensuite transférées vers un ordinateur pour être stockées et analysées.

Pour protéger le signal d'intérêt contre les perturbations électromagnétiques engendrées par l'environnement extérieur, il s'est avéré nécessaire de blinder l'ensemble du système de mesure jusqu'à l'entrée de l'oscilloscope à l'aide d'une boîte métallique suffisamment épaisse (cage de Faraday). Pour réussir une atténuation électrique efficace, il faut absolument que l'étage de détection, l'oscilloscope et la cage de Faraday soient tous mis à la terre en un seul et unique point de masse. De plus, il est important que l'espace intérieur de la cavité de blindage soit optimisé et qu'elle comporte le moins possible d'orifices et de fils électrique communiquant avec l'extérieur,

car ceci pourrait introduire des fluctuations électromagnétiques parasites. C'est pour cette raison que nous avons alimenté les amplificateurs avec des piles placées elles aussi à l'intérieur de la cage de blindage; cette dernière précaution permettra également d'éliminer le bruit issu de la ligne d'alimentation habituelle.

La cage de Faraday est munie d'une petite ouverture circulaire (4.5 mm de diamètre) permettant d'une part une irradiation perpendiculaire de l'échantillon et d'autre part une protection efficace des électrodes contre la lumière. Le courant de déplacement de charge est initié par une brève excitation lumineuse (532 nm; 10 ns; 20 mJ) générée par un laser pulsé (le même laser déjà décrit dans la section 2.1.2.4). L'impulsion laser déclenche du même coup, au moyen d'un couplage optique très rapide, le processus d'acquisition des données au niveau de l'oscilloscope. Durant toute l'expérimentation, la cellule de mesure est installée sur un support métallique maintenu à température ambiante. Dans des conditions expérimentales optimales, notre système de mesure offre une grande sensibilité ainsi qu'une résolution temporelle maximale de $\sim 0.1 \mu\text{s}$. En outre, ce système permet de mesurer des photocourants transitoires ayant des constantes de temps allant de $0.1 \mu\text{s}$ jusqu'à 0.2 s sans aucune interférence provenant du milieu extérieur (électrodes, solution de suspension, amplificateurs électroniques, etc.). La figure 20 représente schématiquement le montage expérimental utilisé pour l'enregistrement des photocourants transitoires $I(t)$.

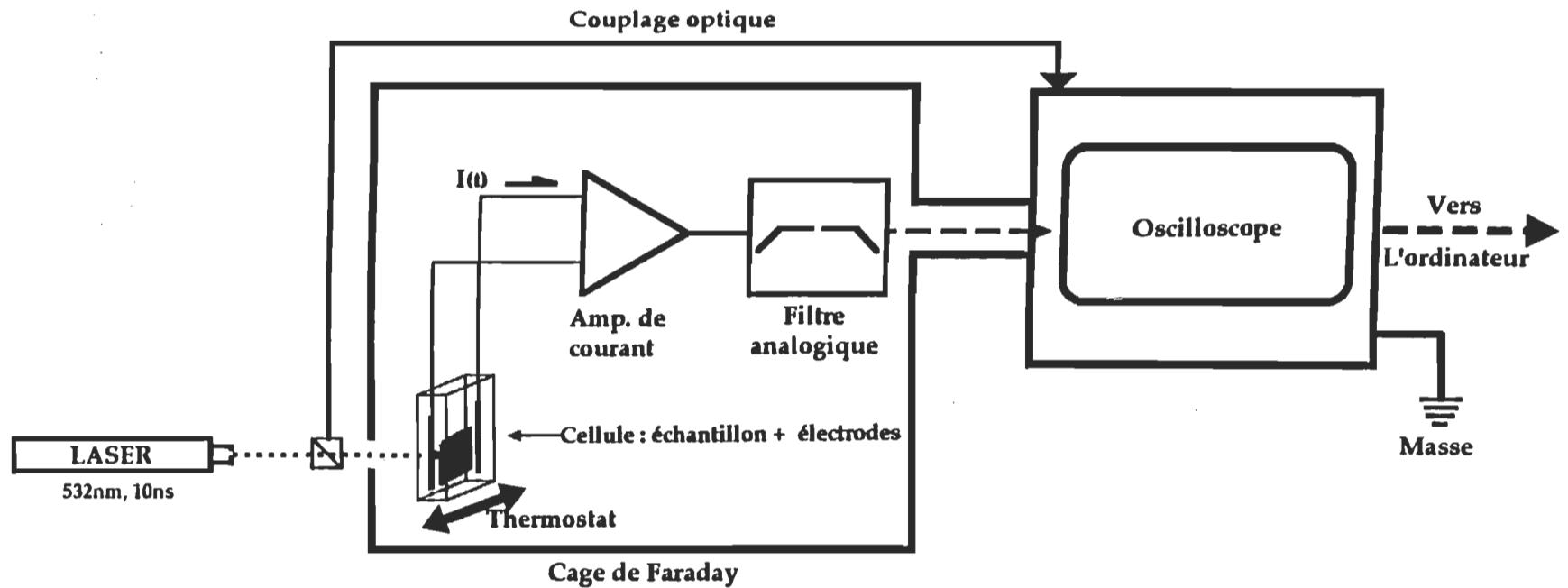


Figure 20 Montage expérimental employé pour mesurer les photocourants transitoires générés par les déplacements élémentaires de charge à l'intérieur de la bactériorhodopsine.

N.B. La composante électrique due à la relaxation - RC du système est observée uniquement lors de la première phase négative du photocourant rapide. Elle dépend des conditions physico-chimiques et elle est généralement bien séparée des composantes électriques propres à la bactériorhodopsine.

2.3 Mesures de la variation transitoire de la conductivité électrique

2.3.1 Introduction

Le cycle photochimique de la bactériorhodopsine se divise essentiellement en deux étapes différentes et successives (figure 21). La première étape est rapide ($\sim 80 \mu\text{s}$) et conduit à la déprotonation de la base de Schiff puis à la libération d'un proton du côté extracellulaire. Elle correspond à la formation de l'intermédiaire optique M. La deuxième étape est relativement lente ($\sim 10 \text{ ms}$); elle correspond à la reprotonation de la base de Schiff et ensuite à la disparition d'un proton du côté cytoplasmique. Elle est associée à la décroissance de l'état M.

Entre ces deux étapes différentes, le proton expulsé effectue un court séjour en dehors de la membrane pourpre [50,98]. Or, la présence d'une telle entité électriquement chargée (proton) altérerait sûrement l'état électrique de la solution extérieure et provoquerait donc une perturbation transitoire de la conductivité du milieu [99-102].

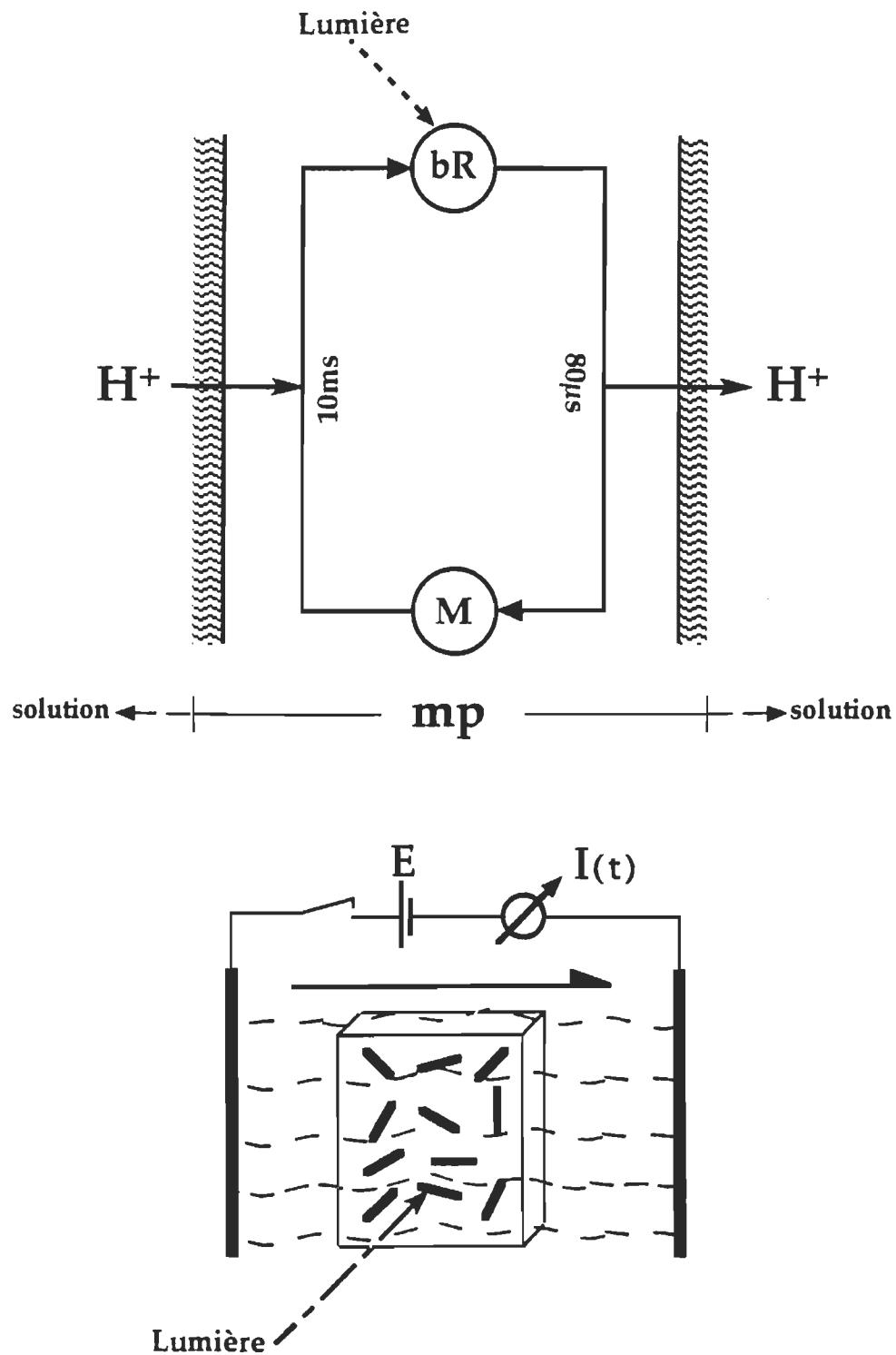


Figure 21 Diagramme simplifié illustrant le principe de mesure de la variation transitoire de la conductivité électrique du milieu extérieur. E : tension électrique appliquée; $I(t)$: courant transitoire directement proportionnel à la variation de la conductivité électrique du milieu.

L'évolution cinétique du signal électrique associé à la variation de la conductance est une façon directe de recueillir des informations additionnelles sur l'efficacité de pompage de protons de la bR et aussi sur le comportement du proton éjecté à l'extérieur de la membrane (sa localisation spatiale).

2.3.2 Méthodologie et fonctionnement de l'ensemble

La réalisation pratique de ce genre de mesures est basée sur le fait que la réponse photoélectrique d'une solution de membranes pourpres complètement désorientées (milieu isotrope) est identiquement nulle quel que soit l'intervalle de temps considéré. La mesure de la variation transitoire de la conductivité électrique nécessite l'application d'un champ électrique constant d'intensité adéquate afin de pouvoir détecter les protons libérés en solution par les molécules de bactériorhodopsine. Cependant, l'utilisation d'une tension électrique entraînerait l'orientation des membranes pourpres et par conséquent autoriserait la contribution au signal de conductivité du photocourant propre à la protéine. De plus, la conductivité électrique d'un milieu est très sensible aux fluctuations de la température d'où l'utilité d'utiliser des valeurs stables et appropriées. Pour surmonter tous ces problèmes, nous avons eu l'idée d'utiliser des membranes pourpres non-orientées immobilisées dans un gel de polyacrylamide (gel non-orienté). La procédure de préparation du gel non-orienté est tout à fait similaire à celle déjà exposée dans la section 2.2.5 excepté que l'orientation électrique a été omise.

Avant chaque mesure expérimentale, un petit gel ($6 \times 7 \times 0.8 \text{ mm}^3$) est d'abord plongé dans une solution électrolytique contenue dans une petite cellule en verre ($10 \times 15 \times 1 \text{ mm}^3$) où règne un champ électrique statique dont l'intensité est contrôlée au moyen d'un potentiomètre. Le champ est appliqué, pendant une durée de 10 secondes à peu près, à l'aide de deux fils de platine platinisés (0.5 mm de diamètre) distants de 8 mm et la durée d'application varie de 5 à 10 sec. De plus, la force ionique de la solution aqueuse est convenablement ajustée pour éviter que le courant électrique à l'état continu puisse saturer le système de détection électronique. Les variations de conductance seront initiées par un flash laser et ensuite enregistrées, sous forme de courants électriques transitoires, par un système de mesure identique à celui qu'on a adopté pour la mesure des photocourants de la bR (voir section 2.2.6). Afin d'accroître le rapport signal sur bruit, les échantillons de mesure ont une concentration assez élevée en bactériorhodopsine (concentration typique de $64.5 \mu\text{M}$ bR). Pour induire la forme rouge bR₄₈₀ on suit exactement le même protocole qui a été décrit dans la section 2.2.5. Toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante constante ($\sim 24^\circ \text{C}$) sur des échantillons complètement adaptés à la lumière. La figure 21 donne une illustration schématique du principe de mesure des variations transitoires de la conductance électrique du milieu extérieur.

2.4 Électrodes

2.4.1 Introduction

Les électrodes constituent une partie essentielle du dispositif de mesure des photocourants transitoires. Leurs surfaces assurent la jonction entre deux milieux conducteurs de natures différentes : un milieu métallique à conduction électronique (circuit extérieur); et un milieu liquide à conduction ionique (solution électrolytique). Idéalement, ce passage d'une phase à l'autre devrait se faire directement sans aucune étape intermédiaire. En pratique cependant, surtout lorsque l'électrode est chargée ou traversée par un courant électrique, il se développe habituellement des tensions de polarisation à l'interface solide-liquide. Ce phénomène interfacial est en fait dû à l'apparition d'une zone de gradient de charges très mince, appelée double couche électrique ou couche diffuse de Goüy-Chapman, dont les propriétés physico-chimiques sont nettement différentes de celles de l'électrode et de la solution.

Du point de vue électrique, la couche diffuse peut être considérée comme étant électriquement équivalente à l'association de deux composantes de polarisation : une capacitance C_p et une résistance R_p . Le regroupement en parallèle de ces deux éléments constitue ce qu'on appelle l'impédance de polarisation de l'électrode Z_p . Généralement, l'effet de polarisation est largement dominé par le comportement capacitif de la couche diffuse qui peut donc être représentée, en première approximation, par une simple capacitance C_p . Généralement, l'impédance Z_p n'étant pas négligeable devant la résistance électrolytique, elle pourrait donc sérieusement affecter

l'efficacité et la précision de nos propres mesures²³. De plus, nous nous sommes aperçus que Z_p est instable et varie sensiblement avec la composition de la solution aqueuse, la température et de manière générale, avec le temps. Pour parvenir à réduire considérablement la contribution du phénomène de polarisation (i.e., faire tendre la valeur de Z_p vers zéro) il est donc nécessaire d'utiliser des électrodes métalliques préalablement platinisées [103].

2.4.2 Technique de platinisation

2.4.2.1 Définition et avantages pratiques

La platinisation est un moyen pratique et efficace d'accroître de façon très appréciable la surface électriquement active d'une électrode métallique (or, platine, cuivre, nickel, acier inoxydable) sans pour autant augmenter ses dimensions physiques. La technique consiste tout simplement à électrodéposer, de façon uniforme, un revêtement granulaire très fin de platine noir sur la surface d'une électrode. En fait, ce type de placage offre deux principaux avantages. Premièrement, il augmente significativement l'aire de la surface de contact entre l'électrode et la solution électrolytique par un facteur moyen de l'ordre de 10^4 , ce qui réduit également, par un facteur équivalent, la densité du courant électrique circulant à l'interface. Deuxièmement, on assiste à une large augmentation de la capacitance C_p et une diminution concomitante de la résistance R_p ; donc une réduction importante de l'impédance de polarisation Z_p .

²³ Notamment dans le domaine des basses fréquences (i.e., < 1kHz) comme le montre la relation suivante : $Z_p \approx (jwC_p)^{-1}$, où j est le nombre imaginaire pur et w est la pulsation angulaire.

2.4.2.2 Préparation préliminaire des électrodes

En ce qui nous concerne, la fabrication d'électrodes de mesure nécessite l'emploi de fil de platine d'une grande pureté. Ce choix privilégié repose sur deux raisons principales : d'une part le platine est un matériau chimiquement inerte et relativement moins cher, et d'autre part une électrode en forme de fil est beaucoup plus rigide et plus facile à manipuler qu'une mince feuille en platine. Le fil qu'on s'est procuré provient de la compagnie OMEGA. Sa pureté est supérieure à 99.9% et son diamètre est égal à 0.5 mm.

Dans un premier temps, le fil commandé est découpé en une section de ~ 2 cm de long (longueur nécessaire à la fabrication d'une seule électrode). Dans un deuxième temps, pour réussir une meilleure platinisation, la surface métallique à traiter doit être complètement débarrassée des traces de graisse et de saleté, ainsi que de toutes autres formes de contamination. Pour ce faire, nous procédons à une série de nettoyages préliminaires selon la procédure suivante :

1. La future électrode est d'abord frottée à l'aide du papier sablé extrêmement fin (AO Emery #M180) puis elle est bien lavée à l'eau distillée.
2. Après, l'électrode est directement trempée, pendant quelques secondes (5-10 sec), dans une solution aqua-regia 50%. Cette immersion permet d'une part de nettoyer davantage la surface de l'électrode, et d'autre part de créer une structure légèrement rugueuse afin que la pellicule de platine noir puisse adhérer

facilement et fortement à la surface. Ensuite, nous rincons l'électrode plusieurs fois à l'eau distillée.

3. L'étape précédente est immédiatement suivie par trois rinçages successifs. Nous rincons d'abord avec de l'acétone; ensuite avec une solution organique composée de deux volumes d'éthanol, un volume d'acétone et une volume de méthanol; et enfin avec de l'éthanol très pur.
4. Le protocole de préparation du fil se termine par un rinçage abondant à l'eau distillée avant d'entamer la procédure de platinisation.

2.4.2.3 Procédure de platinisation

La platinisation du fil de platine s'effectue en faisant parcourir un courant électrique approprié entre celui-ci et une contre-électrode en platine, tous deux étant plongés dans une solution électrolytique contenant des ions de platine. La composition chimique de la solution de platinisation que nous avons employée est de 3% de chlorure platinique (H_2PtCl_6) et 0.025% d'acétate de plomb. En outre, de bons résultats ont été obtenus en utilisant une densité de courant surfacique de 10 mA/cm^2 (valeur optimale).

Le fil d'électrode est immergé, sur une distance de 8 mm, à l'intérieur de la solution de platinisation. Nous enroulons ensuite l'anode, constituée d'une feuille de platine très flexible, autour du fil de façon à construire un condensateur cylindrique. L'ensemble, électrodes et solution, est contenu dans un petit bêcher bien propre où

va se dérouler l'opération de platinisation. Le fil en platine est directement relié à la borne négative d'une source de courant régulier (fabrication locale) et la cathode, via un électromètre sensible, à la borne positive du générateur. Le processus de platinisation dure de 20 à 25 minutes. L'emploi d'un régulateur de courant se révèle nécessaire puisque la résistance du fil de platine et de la solution varient énormément au cours de la platinisation. De plus, le régulateur permet d'obtenir, en fournissant un courant constant, une platinisation régulière et, par conséquent, un dépôt métallique homogène et velouté. La source de courant est dotée d'une résistance variable permettant d'ajuster au préalable la valeur de l'intensité de courant (10 mA/cm^2 dans notre cas). Une fois la platinisation terminée, nous répétons exactement la même procédure décrite ci-dessus pour platiniser une deuxième électrode. Un diagramme simplifié du montage expérimental utilisé apparaît à la figure 22.

2.4.2.4 Conservation des électrodes

La paire d'électrodes ainsi fabriquée doit être trempée dans une solution saline 0.9% NaCl. Les deux fils sont ensuite court-circuités entre eux, pendant une période d'environ 72 heures, afin de neutraliser la tension d'asymétrie résiduelle qui s'était développée durant la platinisation. Par la suite, elles seront séparées et conservées dans l'eau distillée à température ambiante pour une future utilisation. Après chaque expérimentation, les deux fils de platine platinisés sont d'abord lavés à l'éthanol et ensuite à l'eau distillée. Ils seront de nouveau entreposés dans une cellule spéciale remplie d'eau distillée.

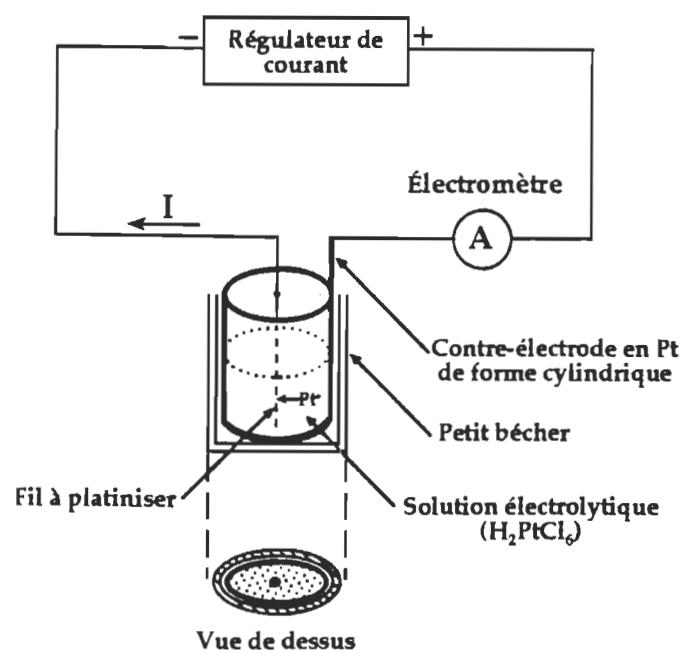


Figure 22 Diagramme simplifié du montage expérimental servant à la platinisation des électrodes de mesure.

2.5 Produits chimiques

Au cours de ce travail, les produits chimiques utilisés pour la préparation des gels polyacrylamides ainsi que les solvants organiques standards proviennent de Fisher Scientific Co. Montréal. Les produits employés pour la platinisation sont ceux de la compagnie OMEGA. Pour les anesthésiques volatils, l'enflurane (nom commercial : Ethrane; 2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl difluoromethyl éther) est de Anaquest (Pointe-Claire, Québec); l'halothane (nom commercial : Somnothane; 2-bromo-2-chloro-1,1,1 trifluoroethane) est de Hoechst Canada Inc. (Montréal, Québec).

CHAPITRE III

THÉORIE DE LA RELAXATION PHOTOÉLECTRIQUE DE LA BACTÉRIORHODOPSINE

3.1 Description cinétique du photocycle réactionnel de la bactériorhodopsine

Pour décrire correctement l'évolution cinétique de l'activité photochimique complète de la bactériorhodopsine et rendre compte des divers états intermédiaires observés dans différentes conditions expérimentales, la conception d'un schéma réactionnel général s'impose. De plus, la complexité additionnelle que présente le photocycle dans des circonstances physiologiquement inhabituelles (valeurs extrêmes du pH du milieu, force ionique très faible, températures anormales, etc.) rend très difficile l'élaboration d'un modèle cinétique global qui s'accorde suffisamment bien avec une large gamme de conditions expérimentales.

Depuis la fin des années soixante-dix, plusieurs modèles ont été proposés pour tenter de résoudre le problème complexe concernant le mécanisme réactionnel de l'activité photochimique de la bactériorhodopsine [39,40,51,81]. Parmi les nombreuses solutions qui ont été rapportées, se distingue principalement le modèle cinétique simple composé d'une suite linéaire et irréversible de plusieurs réactions chimiques d'ordre un [46,48]. D'autres suggestions plus complexes considèrent des photocycles parallèles, des photocycles avec une ou plusieurs branches latérales reliant divers états intermédiaires les uns aux autres ou directement à l'état initial bR₅₇₀, des photocycles linéaires avec une ou plusieurs

réactions réversibles, etc [28,40,42]. Par ailleurs, la totalité des modèles cinétiques suggérés jusqu'à maintenant s'appuie essentiellement sur des données cinétiques obtenues grâce à des mesures optiques transitoires faites à différentes longueurs d'onde. En outre, ils sont tous basés sur une hypothèse fondamentale qui consiste à considérer que les transitions élémentaires du photocycle sont toutes des réactions chimiques simples du premier ordre (ou pseudo-premier ordre) sans aucune dégénérescence cinétique (chaque transition optique est caractérisée par son propre coefficient de vitesse).

Plusieurs procédures rigoureuses ont été développées pour tester l'efficacité et la précision relative de chacun des modèles proposés, et permettre ainsi de choisir celui qui s'ajuste le mieux avec la majorité des observations expérimentales [40]. Ces méthodes d'analyse reposent généralement sur un traitement numérique simultané de plusieurs groupes de données cinétiques provenant d'enregistrements optiques effectués à une multitude de longueurs d'onde. La validité du modèle analysé est déterminée à l'aide d'une foule d'hypothèses et de critères physiquement bien établis qui s'appliquent directement aux résultats numériques obtenus : les constantes de vitesse k_i et d'extinction $\epsilon_i(\lambda)$ [40 et les références qui y sont citées].

À la lumière des connaissances acquises dans ce domaine, il est encore trop tôt pour parler de modèle cinétique précis et définitif qui répond parfaitement, et sans aucune limitation, à toutes les exigences expérimentales et physiques imposées, et ce malgré les efforts et les tentatives qui ont été déployés jusqu'à maintenant. Cette insuffisance des modèles existants peut être facilement expliquée soit par la non exactitude des hypothèses de base; soit par l'absence

d'informations supplémentaires et indépendantes²⁴ [42], e.g., variations dans la structure de l'apoprotéine et dans l'état de protonation de certains acides aminés internes au cours du photocycle. Cependant, dans des conditions physiologiques normales, la relaxation cinétique du photocycle reste relativement simple et peut être convenablement représentée par une séquence linéaire de plusieurs réactions chimiques élémentaires [46]. En dépit de sa simplicité, cette modélisation cinétique constitue une bonne approximation initiale de l'activité photochimique de la bR₅₇₀, et conduit généralement à des résultats satisfaisants. Dans l'espoir d'élucider un jour l'évolution cinétique exacte du photocycle de la bactériorhodopsine, cette représentation simple et préliminaire continue d'être le schéma cinétique le plus largement utilisé.

3.2 Séquence linéaire de réactions chimiques de premier ordre : choix du modèle cinétique le plus approprié

Comme nous l'avons déjà souligné, dans des conditions physiologiques normales, une description cinétique raisonnable du photocycle peut être tout simplement définie par une chaîne linéaire et irréversible²⁵ de plusieurs réactions chimiques de premier ordre :



²⁴ Le photocycle est non seulement une manifestation macroscopique de l'état du rétinal, mais aussi il reflète différentes étapes dans le processus de translocation du proton par la molécule de bactériorhodopsine.

²⁵ Dans ce modèle, on admet que les dissipations énergétiques couplées aux différentes conversions thermiques du photocycle sont suffisamment importantes et se font selon une distribution discrète assez dispersée pour pouvoir totalement négliger les vitesses de toutes les réactions inverses. Cette approximation thermodynamique repose sur des résultats cinétiques obtenus dans différentes conditions expérimentales, et conduit à une simplification des équations théoriques qui découlent du modèle cinétique adopté.

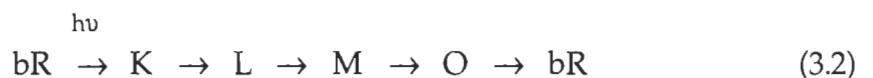
Malgré ses limitations, ce schéma réactionnel préliminaire constitue une assez bonne approximation pour rendre compte des différentes transitions optiques du photocycle. De plus, il est pratiquement fondé sur des résultats cinétiques provenant de diverses mesures optiques et électriques. D'autre part, des études complémentaires employant des spectres FTIR, résonance Raman, etc. ont également contribué à l'élaboration de ce modèle [41,42,56].

Compte tenu des contraintes instrumentales imposées par les systèmes de mesure utilisés, telles que la durée et la longueur d'onde d'excitation lumineuse, la réponse en fréquence globale du système expérimental, ainsi que d'autres facteurs physico-chimiques déterminants, la résolution temporelle de la photoréaction très rapide du photocycle ($\tau \leq 0.5$ ps) se trouve considérablement limitée [57,58,104]. Par conséquent, la première composante rapide effectivement détectée par le système ne coïncide pas exactement avec la toute première transition du photocycle ($bR \rightarrow J$).

Dans des conditions de mesure standards (caractérisées par une résolution moyenne), la résolution du cycle photochimique de la bactériorhodopsine est généralement effectuée à partir de l'intermédiaire K, dont l'amplitude du signal associé est considérée comme étant proportionnelle au nombre de protéines initialement excitées : fraction photocyclique. D'autre part, la détection optique de la composante spectrale N₅₆₀ est sensiblement limitée par le chevauchement prononcé de son spectre d'absorption (centré autour de 560 nm) avec celui de l'état fondamental bR₅₇₀. De plus, cette difficulté expérimentale est également accentuée par l'accumulation extrêmement limitée et relativement lente de la forme N₅₆₀ durant la relaxation photochimique normale de la bactériorhodopsine [28,42,46,54]. Aussi, la détection électrique de cet intermédiaire est nettement affectée par l'étroit

rapprochement entre sa constante de temps ($\tau_N \approx 3$ ms) et celle de l'intermédiaire O₆₄₀ ($\tau_0 \approx 5$ ms) dans des conditions normales [51]. De ce fait, la résolution de la forme N₅₆₀ par les méthodes cinétiques habituelles (optiques ou électriques) nécessite un système de détection très performant doté d'une sensibilité et d'une résolution instrumentales suffisamment élevées. Par ailleurs, le processus chimique exact responsable de l'accumulation transitoire de l'état N au cours du photocycle n'est pas complètement élucidé, et peut être donc argumenté de différentes façons. Habituellement, dans le modèle linéaire simple, l'apparition de l'état N est interprétée comme une véritable réaction monomoléculaire du photocycle qui est uniquement couplée à la décroissance thermique de la forme mère, l'intermédiaire M [46,48]. Du point de vue moléculaire, cette transition (M → N) est principalement associée à la déprotonation du résidu D96. Or, d'autres suggestions considèrent que l'état N reflète une simple interférence spectrale se produisant au cours du photocycle normal. Ce phénomène peut être dû soit à l'établissement d'un équilibre rapide entre l'état M et un deuxième sous-état adjacent (identifié donc comme étant la forme N) [37,42,46]; soit à un branchement concurrentiel court-circuitant la réaction de formation de l'état M à l'état initial de la bactériorhodopsine (bR₅₇₀) [17,40]. Ces deux alternatives s'appuient sur le fait que le spectre d'absorption de l'état intermédiaire M, estimé à une température ambiante, se présente généralement sous forme de deux bandes distinctes et asymétriques : une bande principale centrée à 410 nm; et une bande secondaire placée autour de 560 nm [46]. De plus, le rapport des maxima d'absorption des deux formes qui coexistent varie en fonction de la température. La formation de l'état N peut aussi être attribuée à d'autres sortes de réactions secondaires qui conduisent généralement à une complication du photocycle et de la description cinétique qui lui est associée.

Dans le cadre particulier de nos propres études expérimentales, effectuées généralement dans des conditions expérimentales standards (température ambiante, pH modéré, etc.), la résolution et la précision instrumentales adoptées permettent d'observer uniquement les quatre formes intermédiaires : K, L, M et O. Dans ces conditions, le schéma cinétique définitif qui sera ultérieurement utilisé pour décrire le photocycle réactionnel se réduit à :



La première transition est photochimique et conduit donc à l'apparition du premier photoproduit réellement détectable, l'intermédiaire K. Les transitions subséquentes (initiées par la relaxation de l'état K) constituent une suite linéaire de quatre réactions thermiques en cascade. Par ailleurs, la résolution très limitée de la phase de formation de la composante K (uniquement possible par des mesures électriques en ce qui nous concerne) permet une détermination approximative du nombre de protéines en activité photocyclique.

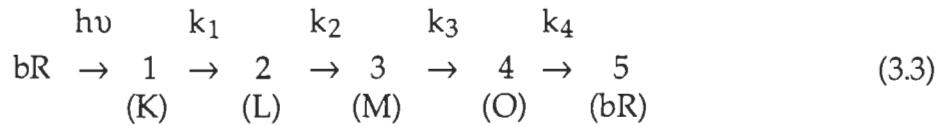
Remarque 1 Parfois, pour parfaire la description cinétique ci-dessus et couvrir la majorité des observations spectroscopiques qui ont été rapportées, certains auteurs sont portés à substituer, dans leurs procédures d'analyses théoriques, l'état intermédiaire habituel M₄₁₀ par deux autres sous-états interconvertibles M₁ et M₂ (voir section 1.4.3.2). Ces deux formes séquentielles absorbent pratiquement à la même longueur d'onde que la forme M₄₁₀ [28] et sont associées à deux processus moléculaires de natures et vitesses différentes [42,54]. Leur caractérisation est présentement soumise à plusieurs études expérimentales, et d'ici-là seul l'état

standard M₄₁₀ continue d'être l'intermédiaire le plus universellement accepté et utilisé.

Remarque 2 La composante spectrale L₅₅₀ est généralement mal résolue surtout en raison de sa longueur d'onde d'absorption étroitement proche de celles de bR₅₇₀ et N₅₆₀. En outre, cet intermédiaire semble être généré par une légère perturbation moléculaire qui n'est pas encore très bien identifiée [41,42,56]. Par conséquent, sa détection optique (ou électrique) nécessite une résolution instrumentale assez pointue. Dans certains cas, les procédures d'analyse numérique font appel à deux sous composantes L₁ et L₂ pour bien adapter le modèle cinétique linéaire aux données expérimentales [40].

3.3 Cinétiques de croissance et de décroissance des états intermédiaires du photocycle

Pour établir une loi théorique qui exprime le nombre de molécules de bacteriorhodopsine se trouvant, à un instant t quelconque du photocycle, dans un état spectral bien déterminé, nous adopterons la séquence réactionnelle 3.2 où toutes les réactions sont irréversibles et de premier ordre. Selon ce schéma, sous l'effet de la lumière l'état stable bR₅₇₀ se convertit instantanément, comparativement à la résolution globale du système expérimental, à la forme intermédiaire K. Cette phototransition très rapide est largement affectée par la vitesse de détection du système et de ce fait elle est pratiquement irrésolue. Dans ces conditions, notre résolution se limite uniquement à la relaxation thermique du photoproduit K vers l'état initial bR via les autres intermédiaires L, M et O. Chaque transition intermédiaire étant caractérisée par son propre coefficient de vitesse k_i:



Par la suite, $n_i(t)$ désignera le nombre de particules occupant l'état intermédiaire i (i.e., $1\equiv K$; $2\equiv L$; $3\equiv M$; $4\equiv O$; $5\equiv bR$) à un instant t quelconque. En supposant qu' au moment du flash laser toutes les molécules de bactériorhodopsine initialement présentes se trouvent dans l'état fondamental bR , seul un certain nombre $N_o (>0)$ d'entre elles seront photoconverties à l'état excité K . Les conditions aux limites du problème s'écrivent donc comme suit :

$$n_k(t=0) = N_o \quad (3.4)$$

$$n_i(t=0) = 0 \quad (i = 2, 3, 4, 5) \quad (3.5)$$

$$n_1(t) + n_2(t) + n_3(t) + n_4(t) + n_5(t) = N_o \quad (t \geq 0) \quad (3.6)$$

La vitesse de variation de $n_i(t)$, $i = 1,2,3,4,5$, est donnée par :

$$\frac{dn_1(t)}{dt} = -k_1 n_1(t) \quad (3.7)$$

$$\frac{dn_i(t)}{dt} = +k_{i-1} n_{i-1}(t) - k_i n_i(t) \quad (i = 2,3,4) \quad (3.8)$$

$$\frac{dn_5(t)}{dt} = +k_4 n_4(t) \quad (3.9)$$

La résolution de ce système de cinq équations différentielles peut être effectuée selon la méthode mathématique standard [105]. Tout calcul fait, l'expression générale qui donne le nombre de molécules de bR se trouvant dans le i -ième état au temps t est :

$$n_k(t) = N_o e^{-k_k t} \quad (3.10)$$

$$n_i(t) = N_o k_1 k_2 \dots k_{i-1} \sum_{j=1}^i \frac{e^{-k_j t}}{a_{ij}} \quad (i = 2,3,4) \quad (3.11)$$

$$n_5(t) = N_o \left[1 - k_1 k_2 \dots k_4 \sum_{j=1}^4 \frac{e^{-k_j t}}{k_j a_{4j}} \right] \quad (3.12)$$

avec $a_{ij} \equiv (k_1 - k_j)(k_2 - k_j) \dots (k_{j-1} - k_j)(k_{j+1} - k_j) \dots (k_i - k_j) = \prod_{\substack{v=1 \\ v \neq j}}^i (k_v - k_j) \quad (3.13)$

3.4 Relation entre les déplacements de charge intraprotéiques et le photocourant macroscopique

Pour expliquer l'origine microscopique du photocourant transitoire mesuré par la méthode du gel orienté, une approche théorique simple et satisfaisante basée sur des fondements physiques sera présentée ici [39,79,81,82]. L'élaboration de la relation mathématique finale repose essentiellement sur les hypothèses fondamentales suivantes qui sont pratiquement possibles et très justifiables :

1. Le photocourant enregistré est uniquement dû aux mouvements internes d'un seul proton : proton pompé par la bR.
2. La bactériorhodopsine est considérée comme étant un milieu diélectrique homogène.
3. La vitesse de déplacement du proton lors d'un transfert élémentaire est supposée être quasi-infinie par rapport à celle de la transition optique à laquelle elle est associée (i.e., $k_i \ll v_i$; v_i étant la vitesse du proton).
4. Relativement à un fragment pourpre, les électrodes de mesure ont des dimensions géométriques infiniment grandes.

5. L'orientation des fragments pourpres à l'intérieur du gel est supposée être uniforme et pratiquement complète.

De façon générale, chaque transition spectrale $i \rightarrow i+1$ du photocycle est associée à un déplacement élémentaire l_i du proton mobile au sein du milieu diélectrique de la membrane. Ce transfert de charge ultra-rapide induit la circulation d'une charge électrique à travers le circuit de détection extérieur (figure 23).

L'expression de la charge électrique ainsi induite (q_{ind}) peut être facilement établie en appliquant par exemple le théorème d'électrodynamique de Ramo-Shockley [82]:

$$q_{\text{ind}} = \int_0^{\infty} dq_{\text{ind}} \quad (3.14)$$

ou encore

$$q_{\text{ind}} = \int_0^{\infty} \frac{q}{e} v_i(t) dt \quad (3.15)$$

soit

$$q_{\text{ind}} = \frac{q}{e} l_i \quad (3.16)$$

où l_i : déplacement algébrique total du proton durant la transition $i \rightarrow i+1$
 e : épaisseur de la membrane pourpre
 q : charge électrique du proton ($\sim 1.602 \cdot 10^{-19}$ C)
 $v_i(t)$: vitesse instantanée du mouvement du proton au cours de la transition $i \rightarrow i+1$

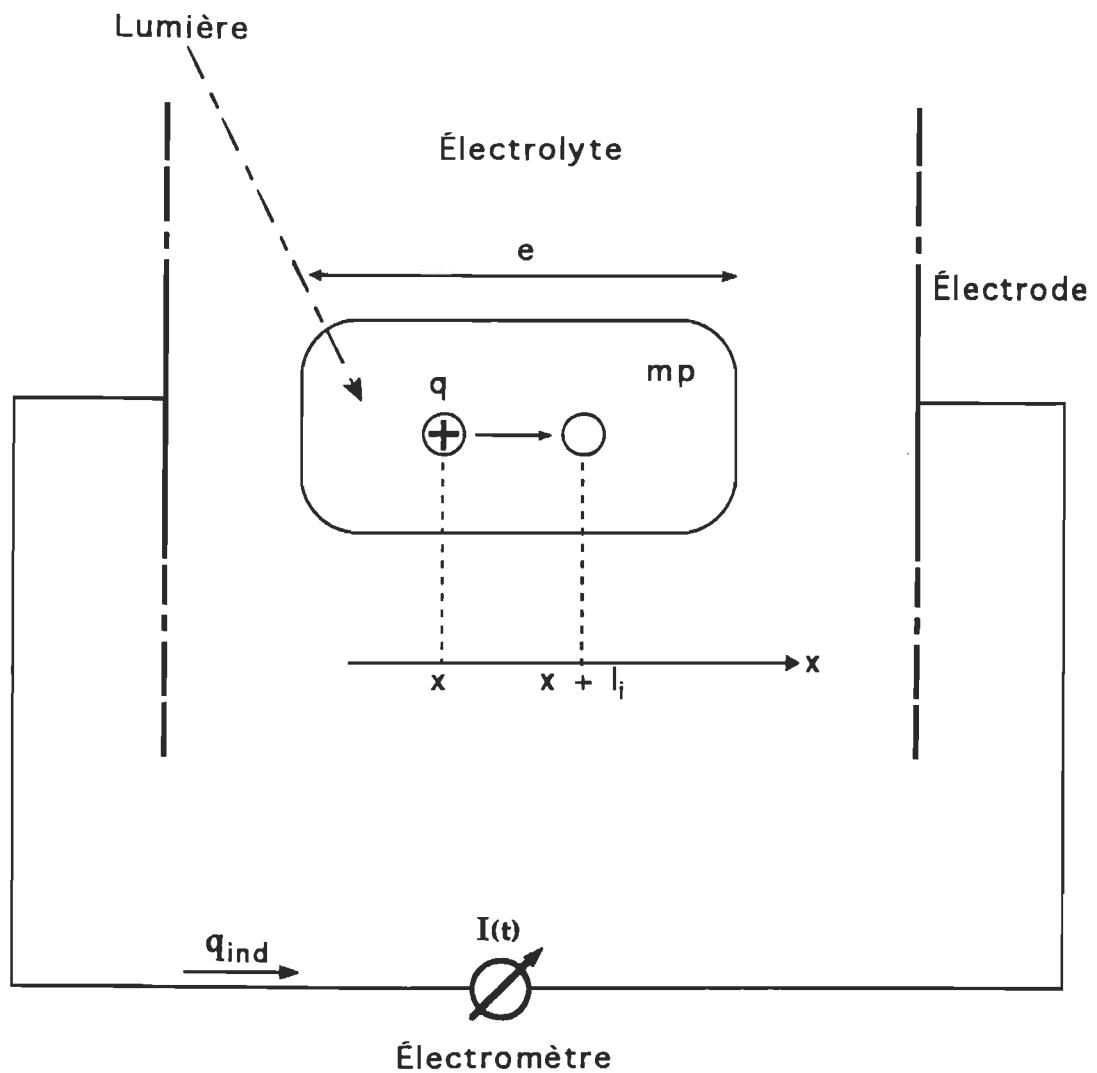


Figure 23 Photocourant transitoire produit par un seul déplacement élémentaire de charge à l'intérieur de la membrane. Le mouvement de la charge q (proton) dans le diélectrique membranaire induit la circulation d'une charge q_{ind} à travers le circuit de mesure extérieur (électrolyte, électrodes et électromètre).

N.B. La sommation intégrale des charges partielles dq_{ind} , induites dans le circuit externe entre les temps t et $t+dt$, porte sur toute la durée de la transition en question dont les instants initial et final sont respectivement désignés par les symboles 0 et ∞ .

Par conséquent, l'expression théorique du photocourant macroscopique global traversant le circuit électrique extérieur s'écrit sous la forme :

$$I(t) = \sum_{i=1}^4 q \frac{l_i}{e} k_i n_i(t) \quad (3.17)$$

où le terme $k_i n_i(t)$ définit le nombre de transitions élémentaires du type $i \rightarrow i+1$ par unité de temps (i.e., activité de la réaction photochimique considérée).

En remplaçant les fonctions $n_i(t)$ par leurs expressions explicites données par les formules (3.10)-(3.11), on aboutit finalement à :

$$I(t) = \frac{qN_o}{e} \sum_{i=1}^4 A_i e^{-k_i t} \quad (3.18)$$

avec $A_1 = l_1 k_1 + l_2 \frac{k_1 k_2}{a_{21}} + l_3 \frac{k_1 k_2 k_3}{a_{31}} + l_4 \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{a_{41}}$

$$A_2 = l_2 \frac{k_1 k_2}{a_{22}} + l_3 \frac{k_1 k_2 k_3}{a_{32}} + l_4 \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{a_{42}}$$

$$A_3 = l_3 \frac{k_1 k_2 k_3}{a_{33}} + l_4 \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{a_{43}}$$

$$A_4 = l_4 \frac{k_1 k_2 k_3 k_4}{a_{44}} \quad (3.19)$$

Pour simplifier encore plus l'équation (3.18), il est opportun de faire l'approximation pratique suivante : les coefficients de vitesse k_i décroissent considérablement lorsqu'on passe de la réaction de rang i à la réaction subséquente de rang $i+1$, i.e. : $k_1 \gg k_2 \gg k_3 \gg k_4$.

Dans ces conditions l'expression (3.18) se réduit à :

$$I(t) \approx \frac{qN_o}{e} [l_1 k_1 e^{-k_1 t} + l_2 k_2 e^{-k_2 t} + l_3 k_3 e^{-k_3 t} + l_4 k_4 e^{-k_4 t}] \quad (3.20)$$

Selon l'équation ci-dessus, le photocourant transitoire mesuré peut être utilisé pour extraire plusieurs paramètres descriptifs intéressants :

1. Les temps de relaxation de chacune des transitions optiques du photocycle : $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$ peuvent être directement déduites à partir des constantes de vitesse k_i observées.
2. Des informations relatives à un déplacement élémentaire de charge durant une transition donnée peuvent être obtenues à partir des coefficients d'amplitude A_i .

En outre, l'amplitude A_i de chaque composante électrique étant proportionnelle à sa constante de vitesse k_i , ceci signifie que les transitions relativement lentes sont les plus difficiles à détecter en utilisant ce genre de mesure expérimentale.

L'analyse pratique des photocourants transitoires nous a montré que la résolution de la photoréaction primaire $bR \rightarrow K$ ($\tau \leq 5\text{ps}$) est extrêmement limitée par la réponse en fréquence totale du système de mesure. D'un autre côté, les

réactions lentes du photocycle, produisant des composantes électriques de faibles amplitudes, sont très dépendantes de la sensibilité instrumentale et par conséquent elles sont généralement difficiles à détecter. Dans ces conditions, on peut facilement comprendre que, dépendamment de la résolution temporelle et de la sensibilité adoptées pour chaque mesure, il est donc possible de résoudre le photocourant transitoire associé à une transition spécifique. Enfin, la relation 3.20 sera ultérieurement utilisée pour faire l'évaluation numérique des données photoélectriques recueillies [106].

CHAPITRE IV

MÉTHODE NUMÉRIQUE D'ANALYSE DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES

4.1 Problématique et introduction

Les réponses expérimentales de forme exponentielle interviennent fréquemment dans plusieurs domaines de la science qui s'étalent de la physique jusqu'à la biologie. Habituellement, les données cinétiques accumulées renferment plusieurs informations descriptives du phénomène expérimentalement étudié. Ainsi, pour extraire les paramètres désirés, toute méthode numérique rapide et efficace permettant d'analyser ces signaux à l'aide d'une sommation de fonctions exponentielles serait donc d'une grande utilité.

Généralement, l'approche la plus simple et la plus répandue d'aborder ce genre de problème repose sur l'ajustement direct d'une combinaison linéaire d'exponentielles au signal à analyser, en utilisant, par exemple, la technique des moindres carrés comme critère d'approximation. Cependant, cette façon de faire conduirait à un système d'équations non-linéaires qui est très difficile à résoudre analytiquement. En plus, si le signal renferme des composantes exponentielles dont les constantes de relaxation sont extrêmement rapprochées, alors une légère modification dans les valeurs des données expérimentales produirait une importante variation au niveau de la solution finale qui serait donc instable et mathématiquement indéterminée : cet effet est un simple exemple du phénomène

général de mauvaise adaptation numérique du système d'équations [107-109], et il est habituellement très difficile à éviter.

L'approche numérique qui sera décrite ici vise à surmonter toutes ces difficultés et à "assurer" une meilleure résolution du problème général de l'approximation multi-exponentielle. Elle est essentiellement basée sur l'utilisation des polynômes de Legendre et les équations différentielles et elle sera donc désignée dans la suite par l'abréviation DELP.

La méthode DELP permet d'approcher un signal expérimental quasi continu, généralement défini par une large série de données expérimentales régulièrement échantillonnées dans le temps, par une somme partielle d'un certain nombre de composantes exponentielles indépendantes : fonction multi-exponentielle. De façon globale, la démarche à suivre sera divisée en trois étapes principales et successives :

1. Dans la première étape, le signal original est soigneusement représenté par une version lissée écrite sous forme d'une combinaison linéaire finie des premiers termes de la suite des polynômes de Legendre;
2. La deuxième étape est consacrée uniquement à la détermination des constantes de relaxation exponentielles selon le critère suivant : nous chercherons à établir l'équation différentielle linéaire à coefficients constants dont une de ses solutions est la meilleure approximation possible de la fonction lissée préalablement déterminée; et
3. Enfin, la dernière étape consiste à déterminer toutes les amplitudes exponentielles à partir des résultats cinétiques de l'étape précédente.

D'autre part, l'approche DELP fait exclusivement intervenir des procédures numériques linéaires bien établies. Elle évite ainsi les techniques non linéaires standards [110,111] généralement basées sur des itérations multiples et une estimation préliminaire des valeurs des paramètres recherchés, avec toutefois le risque de ne pas toujours converger ou de conduire à des solutions erronées correspondant à des minimums locaux de la fonction d'erreur minimisée. En plus, le signal lissé est simplement défini par un petit nombre de coefficients de Fourier plutôt que par une longue chaîne de valeurs numériques, ce qui représente un très grand avantage au niveau de l'exécution digitale de la méthode. En conséquence, en scindant le problème initial en trois sous-problèmes différents, l'inévitable mauvaise adaptation numérique qui affecte habituellement ce genre de traitement se trouve maintenant isolée et bien contrôlée.

À la lumière de tout ceci, et comparativement aux méthodes itératives classiques, la méthode DELP peut être donc qualifiée de rapide et efficace; elle est particulièrement adaptée pour analyser des signaux expérimentaux d'allure multi-exponentielle qui peuvent être modélisés par une suite de plusieurs réactions consécutives de premier ordre : décrivant par exemple un processus physico-chimique (filiation radioactive, réactions photoactives, etc.), la consommation et la distribution d'un médicament dans les différents compartiments du corps ou encore le comportement stochastique des canaux ioniques dans le domaine de la neuroscience. C'est pour toutes ces raisons-là que nous avons opté pour l'emploi de la procédure DELP pour analyser numériquement les photocourants transitoires obtenus par la méthode du gel orienté. Elle sera également utilisée pour l'évaluation cinétique des signaux de la variation transitoire de la transmission optique.

4.2 Description de la méthode DELP

Dans un premier temps, nous rappellerons brièvement quelque notions théoriques indispensables portant sur les polynômes et les séries de Legendre [112]. Ensuite, nous expliquerons la technique de lissage général [105,108] d'une suite de valeurs expérimentales par une série de Legendre tronquée à un ordre approprié. La dernière section sera consacrée au problème d'ajustement d'une combinaison linéaire de plusieurs exponentielles à la représentation lissée du signal original : technique d'approximation d'une fonction lisse par une somme d'exponentielles. Comme nous l'avons déjà mentionné lors de l'introduction, l'étape d'approximation sera elle aussi divisée en deux parties principales qui déterminent successivement les constantes de relaxation et les facteurs de pondération de toutes les fonctions exponentielles.

Tous ces points seront traités en détail dans les prochaines sections.

4.2.1 Fondements théoriques

Soit $f(x)$ une fonction régulière quelconque exactement développable, moyennant certaines conditions de convergence, en une série infinie de polynômes de Legendre²⁶ sur l'ouvert $]-1,1[$

$$f(x) = \sum_{r=0}^{\infty} c_r P_r(x) \quad (4.1)$$

²⁶ Adrien-Marie Legendre (1752-1833). Pour un développement complet des polynômes de Legendre, reportez-vous aux références 105, 108, 113, 114 et 115.

À titre d'exemple, les expressions explicites des cinq premiers polynômes de Legendre (non-orthonormés) sont :

$$\begin{aligned}
 P_0(x) &= 1 \\
 P_1(x) &= x \\
 P_2(x) &= \frac{1}{2}(3x^2 - 1) \\
 P_3(x) &= \frac{1}{2}(5x^3 - 3x) \\
 P_4(x) &= \frac{1}{8}(35x^4 - 30x^2 + 3)
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

En pratique, il suffit de connaître la forme explicite des deux premiers polynômes de la suite de Legendre, P_0 et P_1 , pour facilement déduire les autres à partir de la relation de récurrence suivante reliant trois polynômes consécutifs :

$$rP_r(x) = (2r - 1)xP_{r-1}(x) - (r - 1)P_{r-2}(x) \tag{4.3}$$

Les polynômes de Legendre constituent une base orthogonale obéissant à la relation intégrale suivante :

$$\int_{-1}^1 P_r(x)P_l(x) dx = \left(r + \frac{1}{2}\right)^{-1} \delta_{lr} \tag{4.4}$$

où δ_{lr} est l'indice de Kronecker²⁷.

²⁷ $\delta_{lr} = 1$ pour $l = r$ et $\delta_{lr} = 0$ pour $l \neq r$.

La représentation graphique des cinq premiers polynômes de Legendre sur l'intervalle [-1,1] est illustrée sur la figure 24 (iii).

En vertu de la relation d'orthogonalité (4.3), les coefficients c_r du développement en série infinie de Legendre de la fonction $f(x)$ sont donc calculés comme suit :

$$c_r = \left(r + \frac{1}{2}\right) \int_{-1}^1 f(x) P_r(x) dx \quad (4.5)$$

Soit maintenant une nouvelle fonction $F(x)$ qui est suffisamment irrégulière sur [-1,1] pour ne plus être considérée comme rigoureusement développable en une série infinie de Legendre du type (4.1). Cependant, on peut toujours la représenter de façon approchée, en utilisant par exemple le principe des moindres carrés, par une série de Legendre limitée. En d'autres termes, on cherche à déterminer une série finie de la forme

$$\sum_{r=0}^N c_r P_r(x), \quad N \text{ étant un entier arbitraire}, \quad (4.6)$$

tel que la somme des carrés des déviations

$$G = \int_{-1}^1 \left[F(x) - \sum_{r=0}^N c_r P_r(x) \right]^2 dx \quad (4.7)$$

soit minimale relativement aux paramètres c_0, c_1, \dots, c_N .

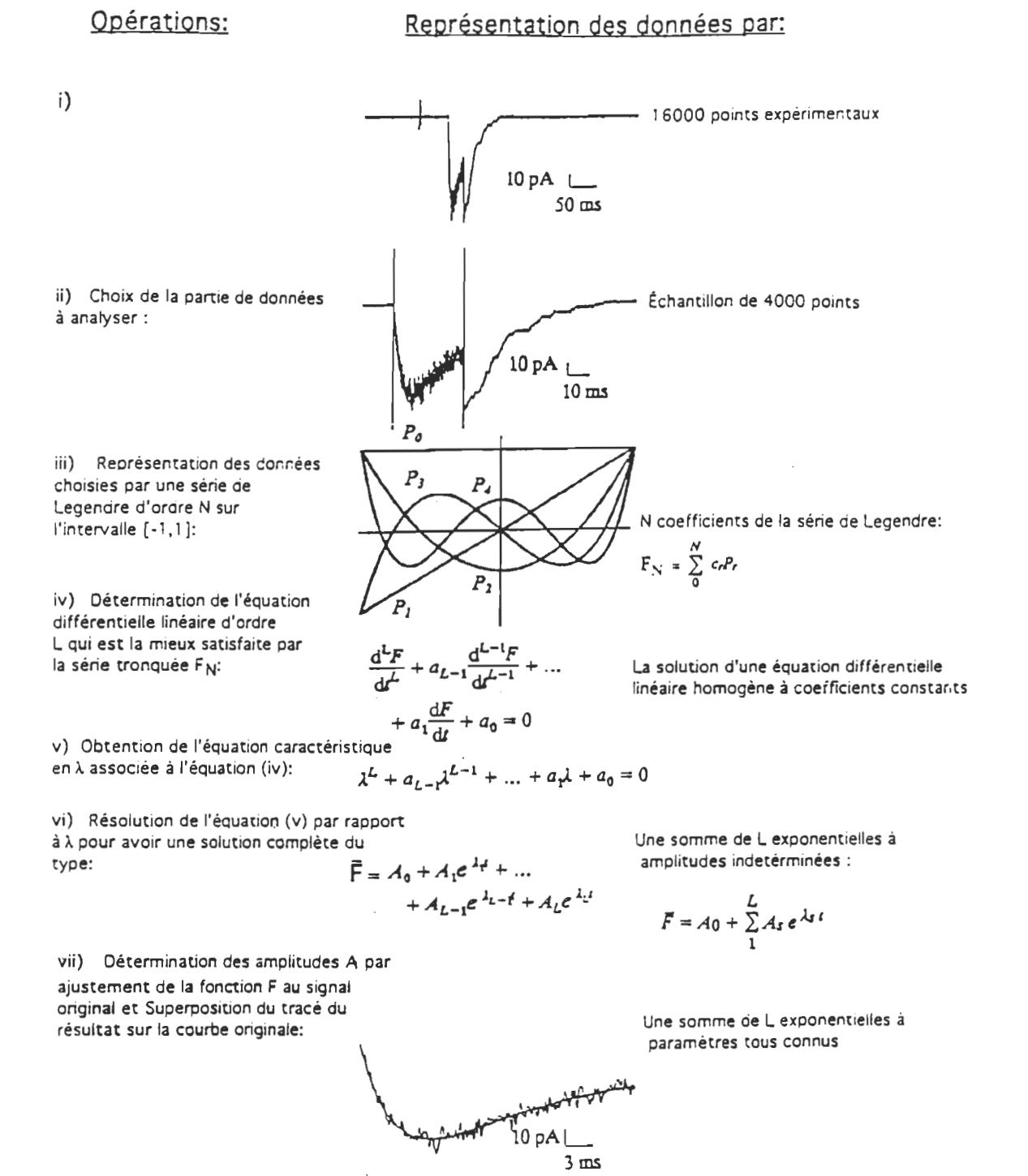


Figure 24 Illustration du fonctionnement de la méthode DELP à l'aide d'un exemple expérimental.

L'utilisation des formules d'orthogonalité ci-haut citées permet de réduire l'équation (4.7) à

$$G = \int_{-1}^1 [F(x)]^2 dx - 2 \sum_{r=0}^N c_r \int_{-1}^1 F(x) P_r(x) dx + \sum_{r=0}^N \left(r + \frac{1}{2}\right)^{-1} c_r^2 \quad (4.8)$$

L'application de la condition de minimisation [111,116] :
 $\frac{\partial G}{\partial c_r} = 0, 0 \leq r \leq N$ conduit immédiatement à l'expression :

$$c_r = \left(r + \frac{1}{2}\right) \int_{-1}^1 F(x) P_r(x) dx \quad (4.9)$$

On remarque bien que l'équation (4.9) a la même forme que l'équation (4.5) précédemment établie, et qu'elle est aussi indépendante de l'ordre N de la série. Sur cette base, nous pouvons donc dire que les coefficients c_r de la série de Legendre finie d'ordre N , représentant de façon approximative la fonction $F(x)$ sur l'intervalle $[-1,1]$, sont tout simplement les $(N + 1)$ premiers termes de la série de Legendre infinie associée à $F(x)$. Cette propriété se généralise [108] également à toutes les autres séries de polynômes orthogonaux.

Remarque : il existe d'autres suites de fonctions orthogonales [114] définies sur l'intervalle fini $[-1,1]$ qui peuvent elles aussi être utilisées ici pour générer le même développement. La famille orthogonale la plus classique est la série de Fourier. Ces séries sont volontairement abandonnées ici en raison de leur mauvaise convergence pour des fonctions de nature exponentielle.

4.2.1.1 Représentation d'un signal expérimental par une série limitée de Legendre

En pratique, l'enregistrement typique d'un phénomène physique en cours se présente sous forme d'une trace quasi continue définie par une longue suite d'observations expérimentales qui ont été régulièrement échantillonnées et digitalisées par un dispositif électronique approprié. Le signal final ainsi obtenu peut être considéré comme la superposition de deux signaux indépendants : un signal propre appelé signal d'intérêt, et un signal perturbateur conventionnellement appelé bruit.

Généralement, le signal bruit est caractérisé par des fréquences qui sont toutes hautement supérieures à la fréquence du signal d'intérêt, et dans ces conditions les premiers coefficients de la série de Legendre infinie "représentant" le signal expérimental global sont surtout déterminés par le signal d'intérêt tandis que les autres d'ordres plus élevés sont très représentatifs du bruit. Ainsi, nous comprenons bien qu'une série de Legendre tronquée à un ordre N approprié serait un excellent lissage du signal original. Cependant, il est très difficile de se prononcer avec précision sur le terme à partir duquel la série de Legendre devrait être coupée [110]; il est complètement dépendant de la nature du signal à analyser.

La détermination de la version lissée d'un signal expérimental se fait selon la procédure suivante :

- a. Supposons tout d'abord que le signal expérimental, mesuré dans le temps, est défini par une fonction réelle $F(x)$ qui prend ses valeurs sur l'intervalle $[-1,1]$. Les valeurs prises par cette fonction aux différentes positions discrètes x_m de son support de définition sont données par :

$$F(x_m) = z_m \quad m = 0, 1, \dots, M \quad (4.10)$$

où $x_m = -1 + 2 \frac{m}{M}$

z_m = valeur mesurée

et $M \approx$ nombre total de points expérimentaux

- b. Les coefficients c_r de la série de Legendre représentative de $F(x)$ sont calculés en approximant la formule intégrale (4.9) par une règle d'intégration numérique appropriée; par exemple, la règle du trapèze [108,111] conduit à l'expression approximative :

$$c_r = \frac{2}{M} \left(r + \frac{1}{2} \right) \left\{ \frac{1}{2} z_0 P_r(-1) + \sum_{m=1}^{M-1} z_m P_r(x_m) + \frac{1}{2} z_M P_r(1) \right\} \quad (4.11)$$

Toutefois, il est à noter que cette intégration numérique peut aussi se faire par la méthode d'intégration de Simpson [111] qui est nettement plus efficace pour des valeurs de M relativement petites.

- c. Finalement, la représentation lissée, notée $F_N(x)$, de la fonction expérimentale proposée s'écrit donc :

$$F_N(x) = \sum_{r=0}^N c_r P_r(x) \quad (4.12)$$

où les coefficients c_r sont donnés par la formule (4.11) et l'entier N est choisi de sorte que la représentation lissée soit la plus raisonnable possible.

Cette procédure de lissage est tout à fait générale et c'est une façon simple et efficace pour filtrer correctement n'importe quel type de signal bruyant. Cependant, la méthode DELP s'intéresse uniquement à l'étude des signaux d'allure exponentielle qui seront donc les seuls à considérer tout au long de ce travail. À titre d'illustration, la figure 25 compare un signal multi-exponentiel parfaitement non bruyant à ses représentations par des séries de Legendre tronquées à l'ordre 5, 6 et 7.

4.2.1.2 Approximation d'une fonction lisse par une somme d'exponentielles

Nous nous proposons d'approcher dans l'intervalle $[-1,1]$ un signal expérimental $F(x)$, que nous supposons exclusivement composé d'un nombre fini L d'exponentielles, par une expression mathématique du type :

$$\bar{F}(x) = A_0 + A_1 e^{\lambda_1 x} + A_2 e^{\lambda_2 x} + \dots + A_L e^{\lambda_L x} \quad (4.13)$$

La fonction $\bar{F}(x)$ est une combinaison linéaire de L composantes exponentielles, chacune étant définie par son amplitude A_l et sa constante de relaxation λ_l , et d'une composante constante A_0 .

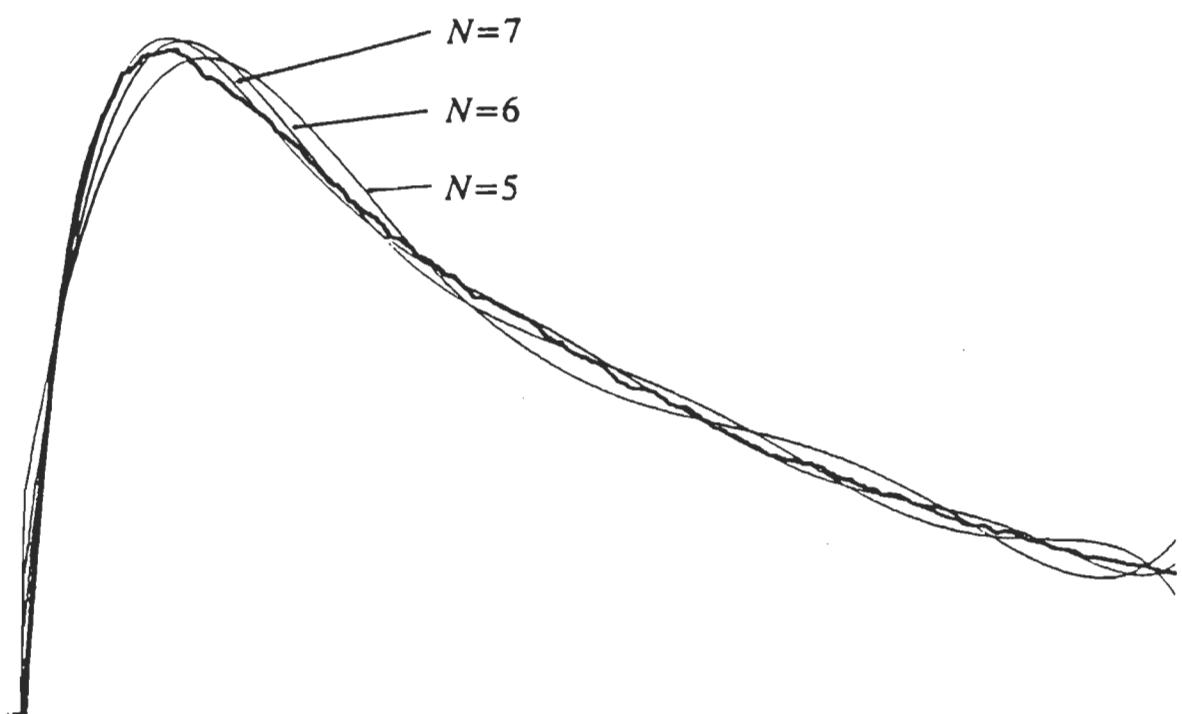


Figure 25 Exemples de représentation approchée (lissage) d'une trace théorique de deux exponentielles par une série de Legendre limitée. Les trois développements en série représentés ici ont été tronqués aux rangs $N=5$, $N=6$ et $N=7$.

Notre objectif sera donc de déterminer les $(2L + 1)$ paramètres $A_0, A_1, \dots, A_L, \lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_L$ de sorte que la fonction $\bar{F}(x)$ soit la meilleure approximation possible de la version lissée $F_N(x)$ du signal original. C'est un problème délicat qui peut conduire à une sérieuse mauvaise adaptation numérique du système. En plus, si nous exprimons le processus d'approximation selon une procédure classique (minimisation d'une certaine fonction d'erreur par rapport à tous les paramètres), les équations obtenues seront extraordinairement non-linéaires par rapport aux inconnues λ_l et dans une telle situation la recherche de la bonne solution peut s'avérer très compliquée. La méthode DELP proposée ici essaie d'aller au-delà de toutes les difficultés habituelles aux méthodes directes [108] généralement rencontrées, et se distingue surtout par deux avantages principaux :

- Les constantes de relaxation exponentielles λ_l sont les racines d'une équation polynomiale dont les coefficients a_l sont déterminés de façon univoque comme solutions d'un système d'équations linéaires. De cette manière, la fameuse mauvaise adaptation numérique se trouve maintenant isolée et ramenée au problème bien défini de résolution d'une équation polynomiale [111,116].
- Les coefficients a_l ainsi que les amplitudes exponentielles A_l apparaissent comme étant des solutions uniques de deux problèmes de minimisation, au sens des moindres carrés, distincts.

Ces deux points seront traités individuellement à l'intérieur de deux phases séparées. Dans la première phase, une équation

polynomiale sera établie et ensuite résolue pour les paramètres λ_l . Dans la seconde phase, les amplitudes A_l seront déterminées par une procédure classique à partir des vitesses λ_l .

4.2.1.2.1 Phase 1 : Détermination des constantes de relaxation λ_l

La théorie des équations différentielles [105] nous apprend qu'une combinaison linéaire de L composantes exponentielles est une solution d'une équation différentielle linéaire homogène à coefficients constants et d'ordre L . Par conséquent, la fonction $\bar{F}(x)$ est une solution de l'équation différentielle

$$\frac{d^L \bar{F}}{dx^L}(x) + a_1 \frac{d^{L-1}}{dx^{L-1}} \bar{F}(x) + \dots + a_L \bar{F}(x) = a_L A_0 \quad (4.14)$$

quelles que soient les valeurs des paramètres réels A_0, \dots, A_L .

Bien entendu, les λ_l ($l = 1, \dots, L$) de $\bar{F}(x)$ sont les solutions de l'équation caractéristique :

$$\lambda^L + a_1 \lambda^{L-1} + \dots + a_{L-1} \lambda + a_L = 0 \quad (4.15)$$

Si maintenant on suppose que la fonction lissée $F_N(x)$ peut être très bien approximée par une fonction multi-exponentielle du type $\bar{F}(x)$, alors il est tout à fait évident que $F_N(x)$ devient elle aussi une solution approximative de l'équation différentielle (4.14). Ainsi, le problème de déterminer la meilleure approximation possible pour

$F_N(x)$ est automatiquement remplacé par le problème de trouver une équation différentielle du type (4.14) qui sera raisonnablement vérifiée par $F_N(x)$. Cependant, la recherche de l'équation différentielle appropriée fait intervenir des dérivations numériques qui peuvent grandement amplifier les irrégularités du signal et par conséquent perturber la détermination de la bonne solution. Pour les éviter, il suffit tout simplement d'utiliser une forme intégrale de l'équation différentielle (4.14).

En effet, en intégrant L fois de suite l'équation (4.14), on aboutit à l'équation intégrale

$$\bar{F}(x) + a_1 I^1 \bar{F}(x) + \dots + a_{L-1} I^{L-1} \bar{F}(x) + a_L I^L \bar{F}(x) = R(x) \quad (4.16)$$

où I désigne l'opération d'intégration indéfinie définie par

$$I f(x) = \int_{-1}^x f(x') dx' \quad (4.17)$$

et $R(x)$ est un polynôme de degré L dont les coefficients sont les constantes d'intégration arbitraires et la quantité $a_L A_0$.

L'équation intégrale de type (4.16) qui est la mieux satisfaite par la fonction $F_N(x)$ sur le segment $[-1,1]$ est telle que l'expression

$$H = \int_{-1}^1 \left[F_N + \sum_{l=1}^L a_l I^l F_N - R(x) \right]^2 dx \quad (4.18)$$

soit minimale par rapport à la variation des L paramètres a_l et des $(L + 1)$ coefficients du polynôme $R(x)$. La sommation intégrale H est appelée fonction de minimisation.

4.2.1.2.2 Expression de la fonction de minimisation en fonction des polynômes de Legendre

Considérons de nouveau la fonction $f(x)$ développable en une série de Legendre infinie; soit

$$f(x) = \sum_{r=0}^{\infty} c_r P_r(x) \quad (4.19)$$

L'intégration de $f(x)$ peut également s'écrire sous forme d'une série de Legendre infinie. En effet, en utilisant la relation

$$(2r + 1) \int P_r(x) dx = K + P_{r+1}(x) - P_{r-1}(x) \quad (4.20)$$

on a donc $I f(x) \equiv \int f(x') dx' = K + \sum_{r=1}^{\infty} \left(\frac{c_{r-1}}{2r-1} - \frac{c_{r+1}}{2r+3} \right) P_r(x), \quad (4.21)$

K étant une constante d'intégration arbitraire.

Plus généralement, la l ième intégration de $f(x)$ s'écrit

$$I^l f(x) \equiv p_{l-1}(x) + \sum_{r=l}^{\infty} C_r P_r(x) \quad (4.22)$$

où les coefficients C_r sont déterminés par la relation de récurrence suivante :

$$C_{0r} = c_r$$

$$C_{lr} = \frac{C_{l-1, r-1}}{2r-1} - \frac{C_{l-1, r+1}}{2r+3} \quad r \geq l \quad (4.23)$$

et $p_{l-1}(x)$ est un polynôme d'intégration arbitraire de degré $l-1$.

Pour des raisons de simplicité, il convient de poser

$$p_{l-1}(x) \equiv 0 \quad (4.24)$$

En d'autres termes, nous imposons à la série de Legendre infinie associée à $I^l f(x)$ de débuter à partir de l'ordre l ; i.e., on impose la condition :

$$C_{lr} = 0 \quad 0 \leq r \leq l - 1 \quad (4.25)$$

Ainsi, l'intégration d'une série de Legendre est une autre série de Legendre facile à calculer. Le polynôme $R(x)$ peut encore s'écrire sous la forme

$$R(x) = \sum_{r=0}^L S_r P_r(x) \quad (4.26)$$

ou encore

$$R(x) = \sum_{r=0}^{\infty} S_r P_r(x) \quad (4.27)$$

avec

$$S_r = 0 \quad r > L$$

En reportant les nouvelles expressions (4.22) et (4.27) dans l'équation (4.18), on obtient directement

$$H = \int_{-1}^1 \left\{ \sum_{r=0}^{\infty} \left(C_{0r} + \sum_{l=1}^L a_l C_{lr} - S_r \right) P_r(x) \right\}^2 dx \quad (4.28)$$

Après simplification, H devient :

$$H = \sum_{r=0}^{\infty} \left(C_{0r} + \sum_{l=1}^L a_l C_{lr} - S_r \right) \left(r + \frac{1}{2} \right)^{-1} \quad (4.29)$$

A priori, l'expression (4.29) devrait être minimisée par rapport à $(2L + 1)$ paramètres : les L coefficients a_l et les $(L+1)$ paramètres non nuls S_0, \dots, S_L . Cependant, en examinant de plus près la sommation H , on remarquera bien que ses $(L+1)$ premiers termes sont tous des carrés de différences qui peuvent donc être facilement annulés par un simple choix des coefficients S_r ($0 \leq r \leq L$) indépendamment des valeurs que prennent les paramètres a_l . On peut donc les écarter du processus de minimisation sans aucunement affecter la détermination ultérieure des a_l . Dans ces conditions, la série à être effectivement minimisée est

$$H_1 = \sum_{r=L+1}^{\infty} \left(C_{0r} + \sum_{l=1}^L a_l C_{lr} \right)^2 \left(r + \frac{1}{2} \right)^{-1} \quad (4.30)$$

Après développement et réorganisation des termes, H_1 devient :

$$(4.31) \quad H_1 = \sum_{r=L+1}^{\infty} \frac{C_{or}^2}{\left(r+\frac{1}{2}\right)} + 2 \sum_{l=1}^L \left(\sum_{r=L+1}^{\infty} \frac{C_{lr} C_{or}}{\left(r+\frac{1}{2}\right)} \right) a_l + \sum_{l=1}^L \sum_{m=1}^L \left(\sum_{r=L+1}^{\infty} \frac{C_{lr} C_{mr}}{\left(r+\frac{1}{2}\right)} \right) a_l a_m$$

L'équation (4.31) ainsi obtenue est une expression quadratique par rapport aux paramètres a_l , et elle est donc facile à minimiser. Toutefois, il est commode d'écrire l'équation (4.31) sous une forme plus réduite et plus simple en définissant les nouvelles constantes

$$(4.32) \quad \Gamma_{lm} = \sum_{r=L+1}^{\infty} \frac{C_{lr} C_{mr}}{\left(r+\frac{1}{2}\right)}$$

avec $1 \leq l \leq L$ et $0 \leq m \leq L$.

Enfin, l'application des conditions de minimisation à $H_1 : \frac{\partial H_1}{\partial a_l} = 0, 1 \leq l \leq L$, conduit au système suivant :

$$(4.33) \quad \sum_{m=1}^L \Gamma_{lm} a_m = -\Gamma_{l0}, \quad 1 \leq l \leq L$$

Ce système de L équations linéaires à L inconnues peut être facilement résolu (par exemple, à l'aide d'une méthode d'inversion de matrice) pour directement donner les coefficients a_l de l'équation caractéristique (4.15). La résolution de cette équation caractéristique détermine bien évidemment les constantes de relaxation exponentielles λ_l recherchées.

Jusqu'ici, dans l'expression de l'équation intégrale (4.16) en fonction des coefficients de Legendre, nous avons simplement considéré une fonction $f(x)$ développable en une série de Legendre infinie. Mais le signal expérimental lissé $F_N(x)$ ne peut être représenté que par une série de Legendre finie d'ordre N . Dans ces conditions, les sommes infinies (4.32) définissant les constantes Γ_{lm} contiennent seulement un nombre fini de termes non nuls et doivent donc être limitées à un ordre approprié; soit non au-delà de $r = N - L$.

4.2.1.2.3 Phase 2 : Détermination des amplitudes exponentielles relatives A_l

En fait, les amplitudes exponentielles A_l ont déjà été déterminées de façon implicite et indirecte lors de la section 4.2.1.2.2. En effet, elles sont directement reliées aux valeurs des paramètres S_r qui annulaient les $(L+1)$ premiers termes dans l'expression H . Cependant, la relation mathématique est assez complexe et il est plus simple de calculer les paramètres A_l à partir d'une procédure de minimisation standard [111].

Au sens des moindres carrés, la fonction à minimiser est définie par l'expression suivante

$$X = \int_{-1}^1 \left(A_0 + \sum_{l=1}^L A_l e^{\lambda_l x} - F(x) \right)^2 dx \quad (4.34)$$

Dans l'expression (4.34) tous les paramètres λ_l sont dorénavant fixés à leurs valeurs déjà calculées dans la phase précédente; par conséquent, la minimisation de la fonction X repose uniquement sur les $(L + 1)$ paramètres A_l . En plus, la forme quadratique de X par rapport aux variables A_l facilite énormément leur méthode de détermination qui se fait donc selon une procédure standard faisant intervenir les trois opérations suivantes :

1. Évaluation des $(L + 1)^2$ constantes Δ_{lm} ($0 \leq l, m \leq L$) définies par :

$$\Delta_{lm} = \int_{-1}^1 e^{(\lambda_l + \lambda_m)x} dx \quad (4.35)$$

où λ_0 est posée comme étant égale à zéro. Le calcul des quantités Δ_{lm} se fait tout simplement à l'aide de l'identité :

$$\int_{-1}^1 e^{xa} dx = \frac{e^a - e^{-a}}{2}, \text{ } a \text{ étant une constante arbitraire non-nulle} \quad (4.36)$$

2. Calcul des $(L + 1)$ intégrations numériques [105,115]

$$\delta_l = \int_{-1}^1 e^{\lambda_l x} F(x) dx \quad 0 \leq l \leq L \quad (4.37)$$

3. Résolution du système d'équations linéaires [105]

$$\sum_{m=0}^L \Delta_{lm} A_m = \delta_l \quad 0 \leq l \leq L \quad (4.38)$$

par rapport aux inconnues A_m .

Ainsi, les parties 4.2.1.2.1 et 4.2.1.2.3 ont toutes les deux servi au calcul des $(2L + 1)$ paramètres $A_0, \dots, A_L, \lambda_1, \dots, \lambda_L$ qui déterminent la meilleure approximation possible du signal expérimental analysé.

Sur la figure 24, on résume à l'aide d'une illustration schématique simplifiée les principales opérations constitutives de la méthode DELP ainsi que son fonctionnement de base. Dans un premier temps (Étape 1), on fait le choix de la trace expérimentale à être analysée (d'allure multi-exponentielle). Par la suite, on effectue toute une série d'opérations (Étapes 2 à 6) dont le résultat final est la superposition, sur une échelle de temps différente, de l'approximation théorique (fonction multi-exponentielle calculée) et du signal expérimental initial.

4.3. Analyse critique

4.3.1 Discussion de la méthode DELP

À la lumière des détails rapportés dans le développement des sections précédentes, on peut donc conclure que la méthode qui vient d'être présentée est une approche très convenable pour analyser des signaux exponentiels très bruyants expérimentalement générés par de longues suites de données expérimentales (1 000-16 000 points). En outre, certaines des composantes exponentielles constituant le signal expérimental peuvent avoir des vitesses de relaxation extrêmement rapprochées ou être même déjà rendues à leurs phases d'équilibre.

Plus précisément, la méthode DELP est particulièrement bien adaptée au traitement des signaux d'allure exponentielle qu'il est possible de modéliser par une série de réactions consécutives de premier ordre. En cas d'une modélisation cinétique plus compliquée, d'autres méthodes, telles que les méthodes matricielles, s'avèrent plus avantageuses.

Le choix privilégié d'une série orthogonale de polynômes de Legendre comme principale base de développement polynomial, peut être justifié par plusieurs raisons. Tout d'abord, l'utilisation d'une série polynomiale a énormément simplifié la forme générale de l'équation intégrale (4.16) et, par conséquent, a permis d'éviter la détermination inutile du polynôme d'intégration $R(x)$ grâce à un choix judicieux du rang de sommation à partir duquel la série (4.29) devrait commencer (soit $r = L + 1$). Du même coup, la forme polynomiale permet d'établir une simple relation intégrale entre deux séries adjacentes.

D'autre part, comparativement à d'autres classes de polynômes orthogonaux, les polynômes de Legendre se révèlent comme étant les plus convenables pour le genre de problèmes qui nous intéressent ici. Aussi, en plus de leurs propriétés d'orthogonalité, ils ont la particularité d'être définis par des expressions explicites très simples qui sont numériquement faciles à manipuler. Par ailleurs, la représentation d'un signal expérimental $F(x)$ par une série limitée de polynômes orthogonaux arbitraires fait automatiquement intervenir une certaine fonction de poids $W(x)$ dont la forme explicite dépend uniquement du type de série considéré. Aussi, contrairement aux autres suites de polynômes orthogonaux, la fonction $W(x)$ associée aux polynômes de Legendre prend simplement la valeur unité partout dans l'intervalle $[-1,1]$,

ce qui justifie une fois de plus la préférence accordée aux polynômes de Legendre [par exemple, dans le cas des polynômes Chebyshev [114], $W(x) = (1 - x^2)^{-1/2}$]. Cependant, la représentation raisonnable d'un signal expérimental par une série limitée de polynômes de Legendre dépend considérablement de l'estimation faite pour l'ordre de coupure N de la série. En général, c'est la nature du signal à être analysé qui impose le nombre de termes à conserver dans sa série représentative, et il n'y a donc pas de recette générale spécialement adaptée pour lever cette difficulté. Mais, dans le cadre de l'application envisagée ici, il est toujours possible d'établir une relation empirique convenable entre le nombre de composantes exponentielles contenues dans le signal et le nombre de polynômes de Legendre qu'on devrait garder dans la représentation en série. En effet, pour un signal légèrement bruyant, une approximation par une combinaison linéaire de L composantes exponentielles nécessite au moins l'utilisation de $3L$ polynômes de Legendre dans la série de Legendre représentative du signal. Par exemple, dans le cas particulier d'un signal parfaitement propre, seulement les six premiers termes de la série de Legendre associée suffisent pour engendrer une approximation exponentielle exactement identique à la version originale. En présence de bruit, une augmentation assez significative du nombre de termes intervenant dans la représentation en série produit seulement une très légère amélioration au niveau de la précision de calcul des résultats (coefficients exponentiels). En pratique, c'est habituellement les 6-10 premiers termes de Legendre qui respectent raisonnablement l'allure du signal (composé de 2 à 3 exponentielles).

Jusqu'ici, il a été implicitement supposé que le nombre L de composantes exponentielles composant le signal à traiter était préalablement

déterminé avant même de commencer l'approximation exponentielle. Cependant, ce nombre est généralement inconnu et il est donc nécessaire d'établir une façon pratique pour bien l'estimer de sorte que l'hypothèse initiale de notre approximation soit toujours respectée pour pouvoir appliquer correctement la méthode DELP. Par exemple, l'approximation par trois exponentielles d'une trace expérimentale ne comportant que deux composantes conduirait à un comportement presque instable de la matrice $[\Gamma]$ dont les coefficients sont les quantités Γ_{lm} déjà définies : on peut parler d'une matrice presque singulière. Mais, pour un signal légèrement bruyant, des répétitions successives de la procédure d'approximation laisseraient relativement invariantes les deux premières exponentielles de la solution alors que la troisième composante serait nettement affectée avec, toutefois, une amplitude relativement petite et une constante de relaxation presque nulle.

Sur cette base, nous pouvons simplement conclure que la façon convenable pour lever l'indétermination du nombre L serait tout banalement de tester plusieurs nombres $M \geq L$ et d'observer parallèlement le comportement de la matrice $[\Gamma]$. En fait, $[\Gamma]$ peut subir un comportement similaire à celui qui vient d'être mentionné pour d'autres raisons différentes. Ainsi, des λ_l extrêmement proches ou ayant des valeurs presque nulles, ou bien des amplitudes A_l relativement petites peuvent produire un tel effet. Dans le cas des signaux très bruyants, le seul critère pratique qu'on peut adopter pour estimer raisonnablement la valeur du paramètre L serait d'examiner la consistance et la reproductibilité des paramètres A_l et λ_l lorsqu'on analyse de façon alternée des groupes similaires de données expérimentales.

4.3.2 Estimation d'erreur

Nous allons maintenant examiner les principales sources d'erreur rattachées à la méthode DELP et qui sont susceptibles d'affecter significativement les valeurs exactes qu'on espérerait avoir comme solutions pour les constantes de relaxation λ_l . Comme il a été démontré dans le texte principal, les quantités C_{lr} définissant la série de Legendre intégrée l fois sont uniques et dépendent de façon strictement linéaire du signal original. D'autre part, les constantes a_l associées à l'équation différentielle (4.14) sont les seules solutions possibles d'un système d'équations linéaires dont les coefficients Γ_{lm} sont directement reliés aux valeurs C_{lr} . Ainsi, il est aisément de voir que des erreurs portées au signal original se retrouvent automatiquement au niveau de la solution finale, et de ce fait, l'approximation exponentielle au sens de la méthode DELP serait plus avantageuse qu'une simple approche directe au sens des moindres carrés.

4.3.3 Comparaison avec d'autres méthodes d'approximation

La façon la plus exacte pour faire un comparaison satisfaisante entre la méthode DELP et les autres méthodes d'approximation multi-exponentielle fréquemment rencontrées en sciences physique, chimique et biologique serait tout simplement d'analyser une variété de groupes de données, préalablement synthétisées avec différents niveaux de bruit, par chacune des méthodes envisagées, et de comparer ensuite les valeurs trouvées pour les paramètres qu'on cherche à déterminer aux valeurs exactes déjà connues. Mais, cette façon de procéder permet simplement de conclure que certaines méthodes sont plus ou moins efficaces que d'autres dépendamment du

groupe de données à être analysé. Dans ces conditions, une comparaison encore plus significative et plus spécifique devrait donc porter sur des suites de données expérimentales présentant beaucoup de ressemblance avec celles qu'on a réellement l'intention d'examiner. Cependant, ce genre de traitement suppose bien entendu une synthèse préliminaire de suites typiques de données semblables à celles qu'on aura l'occasion de rencontrer en pratique, une bonne connaissance des fondements de chacune des méthodes, et surtout des programmes informatiques correspondants pour pouvoir réaliser les traitements numériques.

Dans le cadre du présent travail, nous nous contenterons seulement de donner une brève comparaison qualitative. En effet, très souvent, des méthodes itératives standards comme, par exemple, la méthode de Golub et Pereyra [117] et la méthode de "Pattern Search" [118] peuvent efficacement être utilisées pour analyser des signaux sommes d'exponentielles. En plus, la première méthode est plus puissante que les autres méthodes itératives et peut même être légèrement favorisée par rapport à la méthode DELP lorsqu'il s'agit de signaux très bruyants avec des vitesses de relaxation raisonnablement séparées; mais, en cas de signaux dont les vitesses de relaxation sont extrêmement rapprochées, la méthode DELP s'avère la meilleure de toutes.

Depuis quelques années, des méthodes linéaires non-itératives (autres que DELP) ont été également utilisées pour les mêmes objectifs. À titre

d'exemple, on peut citer la méthode de Padé-Laplace²⁸ [119], la méthode de Mironov [120], la méthode de Proney et la méthode des moments [108].

4.4 Conclusion

La méthode DELP est une façon précise et efficace pour analyser des signaux multi-exponentiels issus d'un processus physique, chimique ou biologique qu'on peut raisonnablement modéliser par une suite de plusieurs réactions successives de premier ordre. Plus précisément, la principale originalité de DELP réside dans sa nouvelle formulation du problème d'approximation qu'on pense bien pouvoir décrire par une loi différentielle : elle essaie de déterminer directement l'équation différentielle linéaire (à coefficients constants) régissant le phénomène en cours d'observation. Ainsi, les paramètres de minimisation du problème sont maintenant représentés par les coefficients a_l de l'équation différentielle en question plutôt que par les coefficients d'une somme d'exponentielles. D'autre part, pour aboutir à la solution finale en termes de constantes de relaxation et d'amplitudes exponentielles, la méthode utilise d'abord une représentation du signal original par une série orthogonale limitée de Legendre, ceci a l'avantage d'éliminer le bruit systématique et surtout de simplifier la manipulation de l'ensemble des données expérimentales, et ensuite subdivise le problème de recherche en deux phases successives basées chacune sur des algorithmes numériques linéaires qu'on peut facilement se procurer dans toute collection raisonnable d'algorithmes numériques standards.

²⁸ Pour des discussions comparatives des mérites relatifs aux méthodes de Padé-Laplace et de "non-linear least-squares", voir les références 121 et 122.

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

5.1 Modulation réversible de l'équilibre spectral entre les formes bR₅₇₀ et bR₄₈₀

En présence de concentrations croissantes d'anesthésiques volatils, la forme pourpre de la bactériorhodopsine (bR₅₇₀) est progressivement transformée en forme rouge (bR₄₈₀). Comme le montre clairement la figure 26, lors de cette transition réversible on assiste à la modification spectrale progressive du pigment. Il est à noter aussi que cette transition dépend sensiblement du pH du milieu; en effet, comme on l'a mentionné précédemment, la réaction $bR_{570} \leftrightarrow bR_{480}$ induite par les anesthésiques est également un équilibre acido-basique dont le pKa apparent est de 7.5. Ainsi, il est donc possible de faire des mesures de transmission transitoire dans des échantillons renfermant des proportions distinctes des deux pigments en état d'équilibre.

5.2 Comparaison des activités photochimiques des pigments bR₅₇₀ et bR₄₈₀

5.2.1 Résultats

Comme nous l'avons déjà mentionné lors du premier chapitre, les formes bR₅₇₀ et bR₄₈₀ possèdent toutes les deux des activités photochimiques cycliques faisant apparaître les intermédiaires déprotonés M₄₁₂ et M₃₈₀,

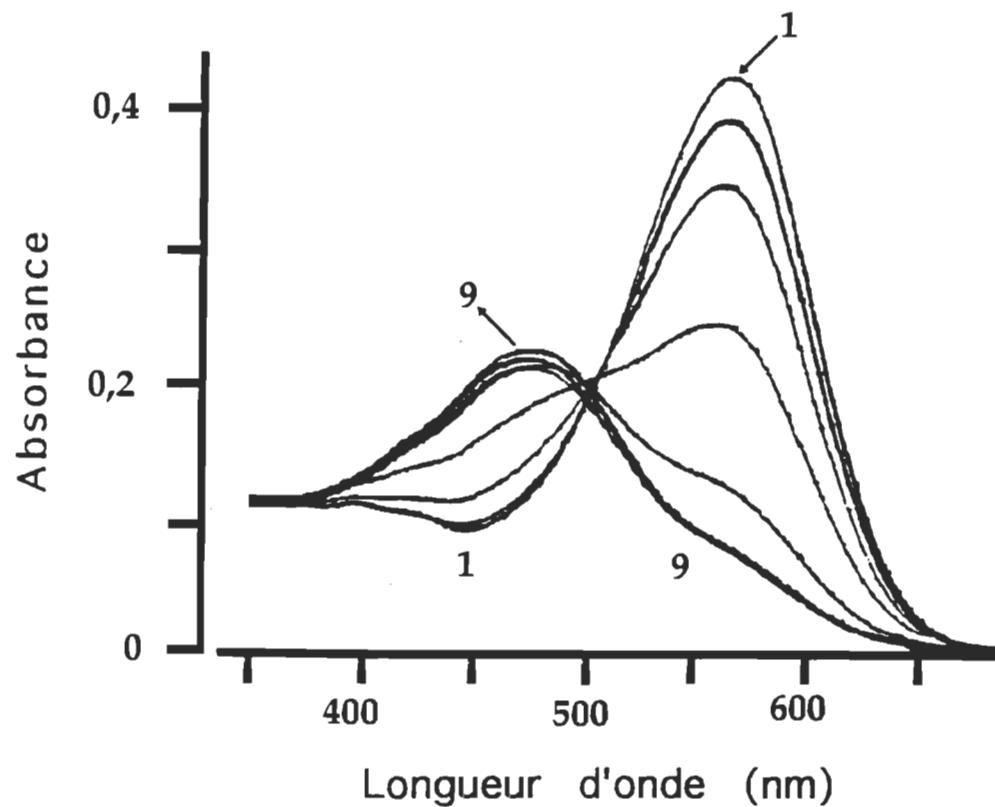


Figure 26 Évolution du spectre UV-visible d'un échantillon de membranes pourpres, complètement immobilisées dans un gel de polyacrylamide, après additions successives d'enflurane variant de 0% (spectre 1) jusqu'à 1% (spectre 9). Le gel de mesure étant suspendu dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 à température ambiante.

respectivement. Cependant, elles présentent en apparence des compétences extrêmement différentes de pomper activement des protons à travers la membrane. Pour approfondir cette question, la première approche serait nécessairement une analyse détaillée des transitoires de transmission optique dans les régions spectrales correspondant aux intermédiaires clés et bien observables M_{412} et M_{380} . À partir de telles données cinétiques, il sera possible de caractériser l'activité photochimique du pigment modifié (bR_{480}) par rapport à celle du pigment natif (bR_{570}).

Les résultats expérimentaux présentés ici proviennent de mesures optiques effectuées, à température ambiante, sur une suspension aqueuse de membranes pourpres contenant des quantités égales des pigments bR_{570} et bR_{480} . La figure 27 donne des exemples typiques des transitoires optiques enregistrées pour la croissance et la décroissance des états intermédiaires M . En effet, les traces a et b sont respectivement associées à la variation transitoire de transmission, observée à 412 nm, durant les phases de formation et de disparition de l'état M_{412} appartenant au photocycle de la forme bR_{570} . Les transitoires c et d représentent les variations de transmission mesurées à 380 nm lors de l'accumulation et de la disparition de l'état modifié M_{380} , respectivement. Quant au recouvrement du pigment initial (bR_{570} ou bR_{480}) suite à une brève excitation laser, il est illustré sur la figure 28 à l'aide de deux traces optiques représentant l'évolution cinétique globale du cycle photochimique observé à 570 nm (trace du haut) et à 470 nm (trace du bas). Par ailleurs, le comportement cinétique de l'intermédiaire O durant le photocycle réactionnel est également affecté par la présence des anesthésiques volatils, et ce de manière très consistante avec les résultats cinétiques se rattachant à l'intermédiaire M (figure 29). En effet, la trace a de

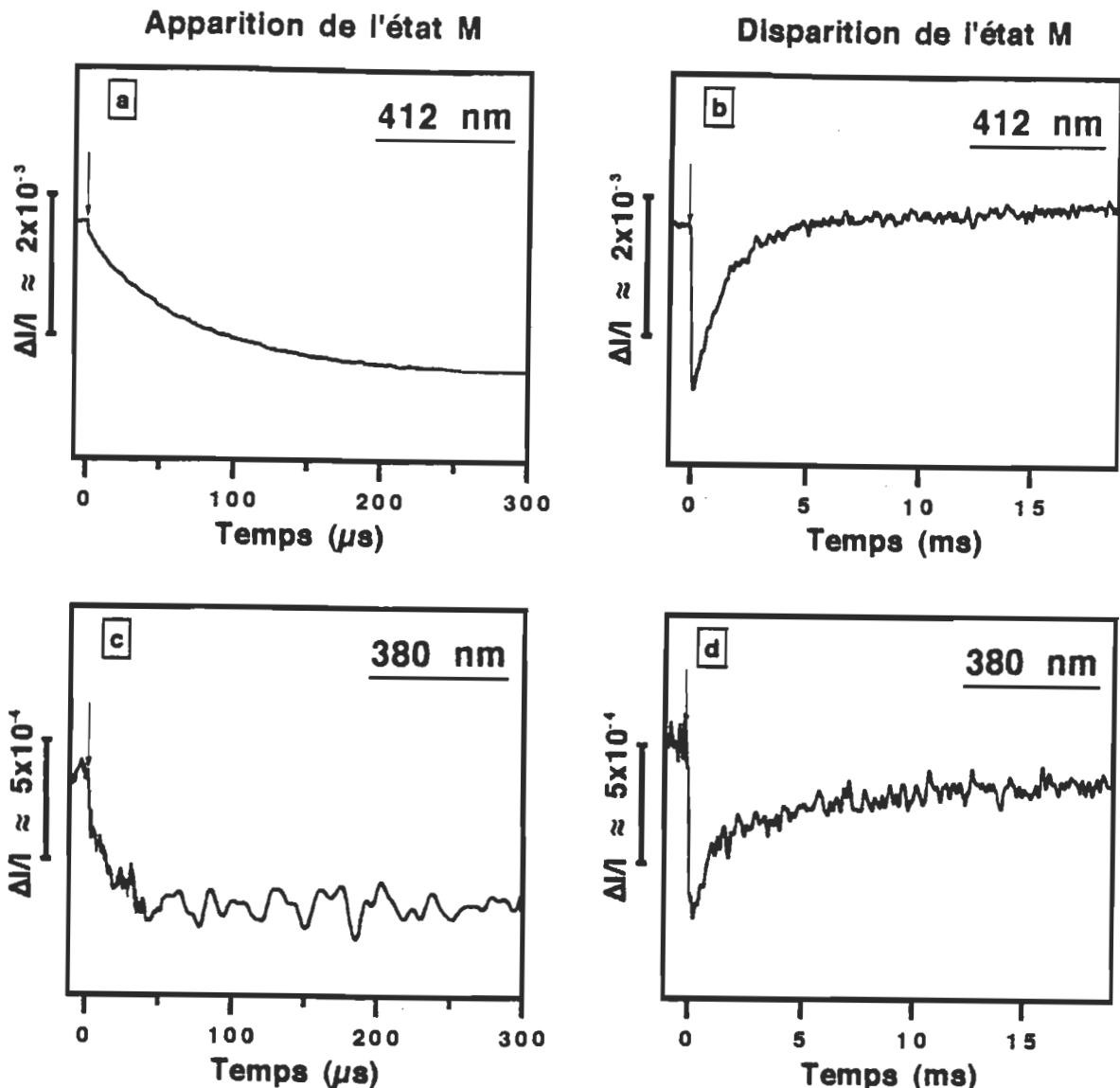


Figure 27 Transitoires optiques associées à la formation (traces a et c) et à la disparition (traces b et d) des intermédiaires M (M_{412} et M_{380}). Les mesures ont été effectuées, à température ambiante, sur un mélange équimolaire des pigments natif et modifié. La forme bR_{480} est induite par ajout de 0.4% (v/v) d'enflurane à des membranes pourpres ($8.6 \mu\text{M}$ bR) en suspension dans un tampon phosphate 10mM, pH = 6.8. Les longueurs d'onde de mesure sont indiquées sur la figure. La flèche désigne le moment du flash laser ($t=0$).

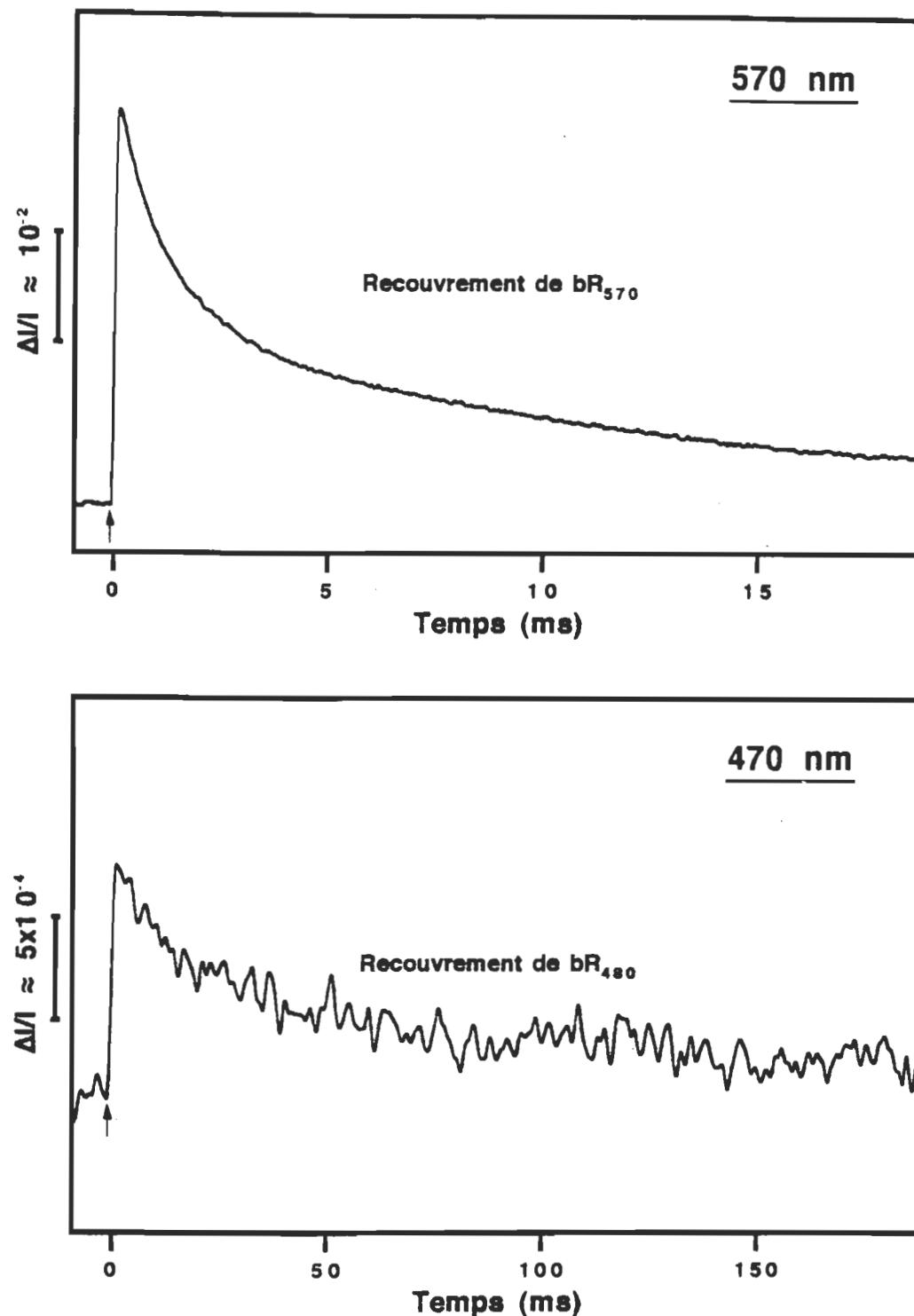


Figure 28 Transitoires optiques représentant la disparition très rapide et la régénération progressive des pigments bR_{570} (trace du haut) et bR_{480} (trace du bas) suite à une excitation lumineuse ponctuelle (flèche). Les signaux ont été enregistrés sur deux échelles de temps différentes dans des conditions expérimentales identiques à celles de la figure 27.

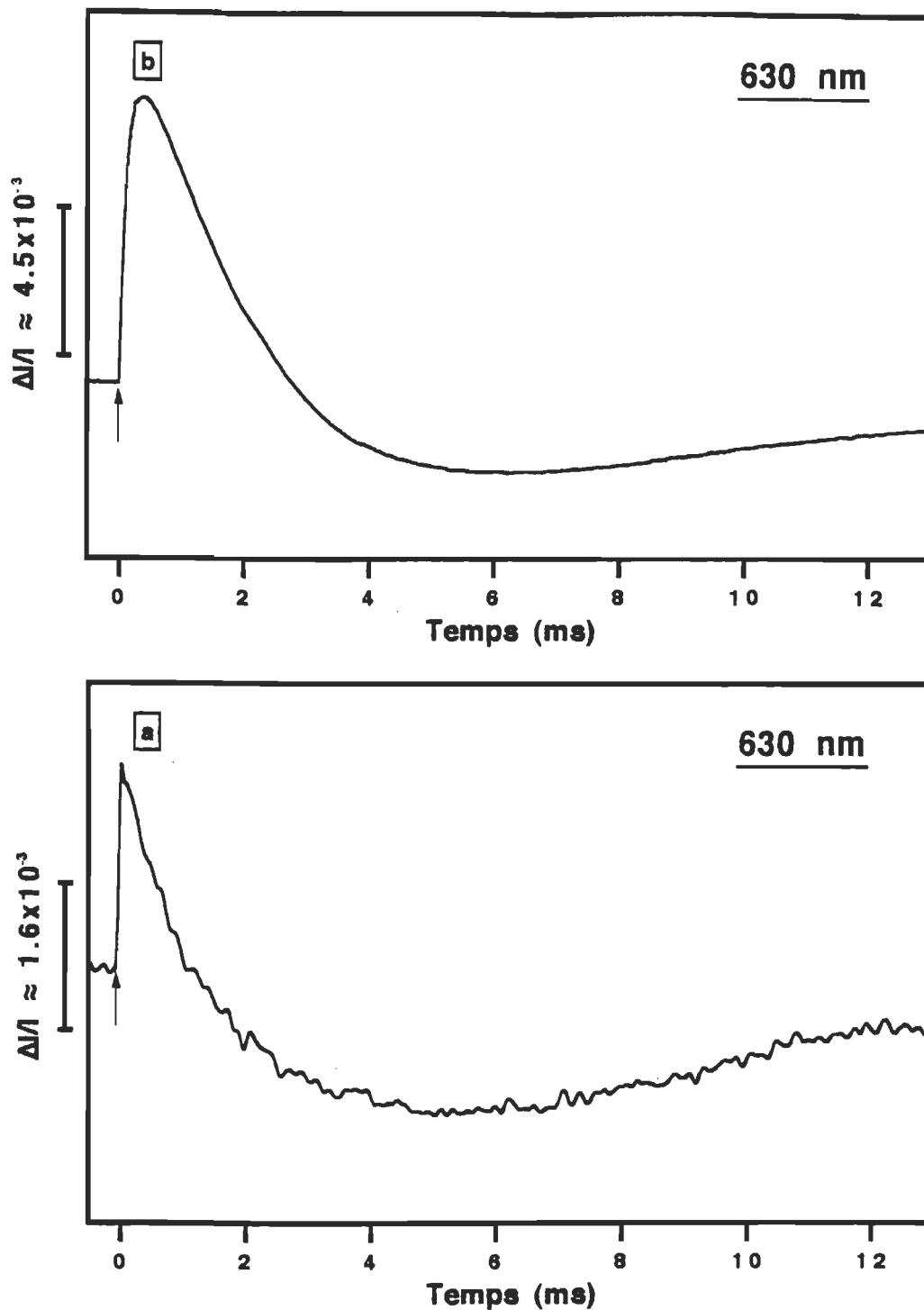


Figure 29 Transitoires optiques montrant la formation et la disparition des intermédiaires O associés aux pigments natif (trace b) et modifié (trace a). La trace a a été mesurée dans des conditions expérimentales identiques à celles de la figure 27; la trace b correspond à 0% d'anesthésiques. La longueur d'onde de mesure et le moment du flash laser sont indiqués pour chacune des courbes.

la figure 29 montre la variation transitoire de transmission détectée à 630 nm dans des conditions expérimentales identiques à celles des figures 27 et 28. À titre de comparaison, la trace b illustre, sur la même échelle de temps, le signal optique relatif à l'état O₆₃₀ dans le cas d'un échantillon de membranes pourpres non modifiées (i.e., absence totale d'anesthésiques).

Dans la série de mesures rapportées ci-dessus, les constantes de relaxation associées aux réactions de formation et de disparition des intermédiaires M et O de même que les temps de recouvrement des formes originales bR₅₇₀ et bR₄₈₀ sont regroupés dans le Tableau 1. Des caractéristiques cinétiques analogues obtenues dans d'autres conditions expérimentales sont aussi indiquées dans le même tableau. Ces constantes de temps ont été déterminées de façon numérique selon la procédure d'analyse qui a déjà été exposée en détail dans le chapitre 4. D'une manière générale, les relevés expérimentaux associés aux données cinétiques supplémentaires du tableau 1 présentent tous des profils exponentiels similaires à ceux montrés sur les figures 27, 28 et 29. Les amplitudes absolues des signaux mesurés peuvent varier d'une expérience à l'autre dépendamment de la concentration initiale de membranes pourpres et du degré d'induction du pigment modifié, avec à chaque fois une réduction significative des amplitudes optiques générées par la forme bR₄₈₀ comparativement à celles de la forme bR₅₇₀. En outre, l'enflurane, et parfois l'halothane, est habituellement ajouté à des suspensions aqueuses de membranes pourpres pour induire la forme bR₄₈₀. Dans le cas de l'eau pure par exemple (résultats non présentés), des concentrations relativement importantes de l'anesthésique choisi²⁹ sont

²⁹ L'halothane est un anesthésique général beaucoup plus puissant et plus efficace que l'enflurane et de ce fait il requiert des quantités nettement plus faibles que celles utilisées pour l'enflurane (Tableau 1)

TABLEAU 1

**Temps de relaxation des transitions optiques observées, à température ambiante,
dans diverses conditions expérimentales**

Conditions expérimentales (bR_{570}/bR_{480})	Intermédiaire M		Intermédiaire O		Pigment initial bR
	Apparition τ (amplitude)*	Disparition τ (amplitude)	Apparition τ (amplitude)*	Disparition τ (amplitude)	Recouvrement τ (amplitude)*
Tampon phosphate pH = 6.8 (1/0)	<u>412 nm</u> 75 μ s (0.9) 16 μ s (0.1)	<u>412 nm</u> 6.5 ms (1)	<u>630 nm</u> ~ 2.15 ms (1)	<u>630 nm</u> ~ 7.3 ms (1)	<u>570 nm</u> ~ 7 ms (0.57) ~ 3.16 ms (0.43)
Tampon phosphate pH = 6.8 + 0.4% d'enflurane (0.5/0.5)	<u>412 nm</u> 14.6 μ s (1) <u>380 nm</u> ~ 6 μ s (1)	<u>412 nm</u> 1.26 ms (1) <u>380 nm</u> 1 ms (0.71), 20 ms (0.28)	<u>630 nm</u> ~ 1.1 ms (1)	<u>630 nm</u> 6.13 ms (1)	<u>570 nm</u> 2.25 ms (0.82), 6 ms (0.18) <u>470 nm</u> ~ 47 ms (1)
Tampon Tris-HCl pH = 8.7 (1/0)	<u>412 nm</u> 108 μ s (0.8) 25 μ s (0.2)	<u>412 nm</u> 8 ms (0.66) 2.3 ms (0.34)	<u>630 nm</u> 2.22 ms (1)	<u>630 nm</u> 7.5 ms (1)	<u>570 nm</u> 8.3 ms (0.61) 3.4 ms (0.39)
Tampon Tris-HCl pH = 8.7 + 2% d'enflurane (~ 0/~ 1)	<u>380 nm</u> ~ 1 μ s (1)	<u>380 nm</u> ~ 133 ms (1)	---	---	<u>470 nm</u> ~ 133 ms (1)

* Les valeurs entre parenthèses représentent les amplitudes relatives des composantes exponentielles après normalisation à l'amplitude absolue du signal optique mesuré à la longueur d'onde correspondante.

requises pour former des quantités notables du pigment bR₄₈₀; habituellement 15 à 30% de la concentration initiale du pigment natif bR₅₇₀ demeure pourpre même en présence de larges concentrations d'anesthésique. Dans un milieu moyennement alcalin ($\text{pH} \sim 8.7$), le pigment pourpre peut être presque complètement converti en pigment rouge sous l'action de concentrations d'anesthésique plus petites que celles employées dans le cas de l'eau (e.g., ~0.5% d'enflurane ou 0.1% d'halothane).

Remarque. Il est intéressant de noter ici que les amplitudes des transitoires optiques générées par le pigment bR₄₈₀ sont beaucoup plus réduites (par au moins un facteur de 4) que celles reliées au pigment bR₅₇₀. Ceci s'explique tout simplement par la formation limitée de l'intermédiaire M₃₈₀ durant le photocycle de bR₄₈₀. Il y a deux interprétations possibles à ce phénomène. Premièrement, le rapport des variations d'absorbance des formes M et bR (i.e., $\Delta A_M / \Delta A_{bR}$) est plus petit pour bR₄₈₀ que pour bR₅₇₀ [69]. Deuxièmement, le photoproduit K correspondant à la forme bR₄₈₀ présente un maximum d'absorbance autour de 535 nm [62] et par conséquent l'excitation laser (532 nm; 10 ns) du pigment modifié provoque un équilibre photostationnaire entre l'état bR₄₈₀ et l'état K₅₃₅; ceci a donc pour effet de réduire notablement le nombre de molécules photocycliques et limiter le rendement de formation de l'intermédiaire M₃₈₀. Troisièmement, à la longueur d'onde du flash laser (532 nm), l'absorbance du pigment bR₄₈₀ est beaucoup moins importante que celle du pigment bR₅₇₀ (figure 9); ceci réduit notablement le rendement de la photoréaction primaire du photocycle modifié.

En présence d'anesthésiques volatils une accélération remarquable de l'étape de formation des intermédiaires M (M_{412} et M_{380}) est généralement observée (tableau 1). En effet, dans le cas des membranes pourpres natives (0% d'anesthésique), cette réaction est normalement caractérisée par deux temps de relaxation différents (~65 µs; ~25 µs) [77]. Cependant, sous l'effet d'enflurane ou d'halothane, une seule composante cinétique nettement plus rapide (au moins 5 fois plus rapide que la cinétique normale) est généralement déterminée comme meilleure approximation exponentielle possible du signal. Dans des conditions expérimentales fixes, cette vitesse de réaction augmente sensiblement avec la quantité d'anesthésique ajoutée. De ce fait, et en vertu de la vitesse moyenne du système de détection utilisé, la résolution optique de cette transition accélérée est donc grandement limitée. D'autre part, l'analyse comparative des données cinétiques figurant dans le tableau 1 révèle clairement que le processus de formation de l'état M_{380} , produit principalement par le pigment rouge, progresse beaucoup plus rapidement que celui de l'état M_{412} observé, dans les mêmes conditions de température et de pH, sur la même échelle de temps.

Par ailleurs, en présence des anesthésiques volatils, les étapes de décroissance des intermédiaires M_{412} et M_{380} affichent des comportements cinétiques complètement opposés. En effet, en absence d'anesthésiques, la disparition de l'intermédiaire optique M_{412} se déroule selon un schéma biphasique ($M \rightarrow O \rightarrow bR$) [37,77]. Au fur et à mesure qu'on injecte de faibles quantités d'anesthésique et tant que la portion de bR_{480} formée demeure négligeable par rapport à celle de bR_{570} (e.g., en présence de 0.3% d'enflurane dans l'eau : $bR_{570}/bR_{480}=0.9/0.1$), nous assistons à une accélération progressive, mais légèrement plus prononcée dans l'ensemble, des deux

composantes de décroissance de l'état M_{412} . De plus, l'état normal M_{412} est le seul produit intermédiaire observable dans de telles conditions. Mais du moment que la quantité de bR_{480} devient appréciable, voir même prédominante, la décroissance de l'intermédiaire modifié M_{380} peut être détectée et en l'occurrence la disparition de M_{412} s'effectue de façon monophasique, avec une vitesse nettement plus accélérée. En fait, dans un mélange où les deux formes spectrales coexistent (e.g., comme c'est le cas de l'échantillon correspondant aux figures 27, 28 et 29), la disparition de l'état M_{380} présente également un caractère biphasique qui est marqué par une large constante de temps. Fort probablement, la composante la plus rapide des deux provient tout simplement de la contribution cinétique de l'état M_{412} , produit uniquement par la quantité résiduelle de bR_{570} , dans la région spectrale centrée autour de 380 nm. En outre, plus la concentration d'anesthésique ajouté est grande et/ou le milieu est alcalin, plus les temps de relaxation de l'état M_{380} deviennent lents avec apparition d'une composante majeure de ~50 ms. Parfois, en présence de forts pourcentages de bR_{480} , la disparition de l'état M_{380} est gouvernée par une seule et large composante exponentielle dont la constante de temps peut atteindre une valeur de l'ordre de 100 ms (e.g., en présence d'halothane, la constante du temps de ce signal est tellement grande qu'il est parfois difficile de le détecter expérimentalement). Cette composante très lente, et qui est habituellement mal résolue, concorde très étroitement avec la seule et unique cinétique généralement observée à 470 nm lors du recouvrement du pigment bR_{480} (470 nm est la longueur d'onde à laquelle la régénération du pigment bR_{480} peut être proprement mesurée sans aucune autre contribution spectrale). En présence d'anesthésiques, le recouvrement de la forme bR_{570} , mesuré à 570 nm, présente encore un comportement à double cinétique qui est caractérisé

par des vitesses accélérées par rapport à celles qui sont normalement observées. Quant à l'état intermédiaire O, les données cinétiques présentées dans le tableau 1 démontrent que, dans un mélange équimolaire des deux pigments, la vitesse de formation de l'état O, détecté exclusivement aux alentours de 630 nm, coïncide bel et bien avec la vitesse de décroissance rapide de l'état M₃₈₀ observé dans les mêmes conditions. De façon générale, dans un échantillon de membranes pourpres où la forme bR₄₈₀ est induite par traitement modéré à l'enflurane, l'état O₆₃₀ est formé de manière très rapide mais en quantité beaucoup plus limitée que d'habitude. D'un autre côté, la disparition de l'intermédiaire O₆₃₀ s'effectue avec une cinétique très comparable à celle de la composante la plus lente du recouvrement du pigment bR₅₇₀. De telles évidences cinétiques portent fortement à croire que l'état O mesuré à 630 nm découle entièrement de l'activité photochimique de la quantité restante de bR₅₇₀. Enfin, dans une expérience de test, l'enflurane a été remplacée par l'halothane et nous n'avons constaté dans ce cas aucune accumulation de l'intermédiaire O dans l'intervalle spectral allant de 560 à 650 nm (Tableau 1).

À partir de cette étude comparative des activités photochimiques des pigments bR₄₈₀ et bR₅₇₀, il est donc facile de conclure que la déprotonation du rétinal de la forme bR₄₈₀ se produit plus rapidement que celle associée à la forme native bR₅₇₀. Inversement, la réaction de reprotonation du rétinal de bR₄₈₀ évolue beaucoup plus lentement par comparaison à celle observée dans le cas normal. Ce résultat permet d'expliquer pourquoi l'activité de pompage de protons transvesiculaire du pigment modifié est fortement inhibée dans des conditions photostationnaires (voir figure 14). Toutefois, ces altérations cinétiques ne justifient nullement l'absence de libération transitoire de

protons dans le milieu extérieur tel qu'il a été déjà démontré par des mesures de la variation transitoire du pH de la solution (voir figure 13). Probablement, cette disparition du signal pourrait être due, entre autres, aux limitations de vitesse et de sensibilité que présente le système de détection optique utilisé.

5.2.2 Discussion

Comme nous l'avons déjà souligné lors de l'introduction (premier chapitre), une comparaison antérieure des activités de pompage de protons des pigments pourpre et rouge, basée sur des mesures optiques en mode transitoire (figure 13) et photostationnaire (figure 14), avait démontré une absence complète de variation de pH du milieu extérieur durant l'activité photochimique du pigment modifié bR₄₈₀ [21]. De ce fait, il est donc réaliste de penser que la transition spectrale bR₅₇₀ → bR₄₈₀ se traduit, sur le plan fonctionnel de la protéine, par la disparition de l'état actif initial au détriment d'un nouvel état totalement inactif; et vice versa si on inverse la conversion spectrale. Or, ces données préliminaires prises toutes seules ne permettent pas d'établir avec précision si la neutralisation de l'activité de pompage de protons du pigment modifié est en fait un véritable blocage de la pompe protéique ou tout simplement un effet apparent dû à d'autres types d'altérations, telles qu'un ralentissement cinétique du cycle de transport du proton (pouvant également conduire à une réduction considérable de l'activité de pompage normale). Cependant, quelque soit l'origine du phénomène observé, le spectre d'action présenté sur la figure 14, où la forme bR₅₇₀ est presque totalement convertie en forme bR₄₈₀, indique qu'en régime photostationnaire l'efficacité de la forme bR₄₈₀ à pomper des protons étant

strictement négligeable devant celle de la forme bR₅₇₀. De plus, des études récentes ont démontré que les deux formes bR₅₇₀ et bR₄₈₀, placées dans des conditions favorables, possèdent des compétences comparables de produire les états déprotonés M₄₁₂ et M₃₈₀, respectivement [69]. Etant donné que le pigment rouge a pratiquement la même capacité que le pigment natif de générer la forme déprotonée M durant son photocycle, l'analyse cinétique des réactions de croissance et de décroissance des intermédiaires M₄₁₂ et M₃₈₀ est un aspect dynamique du cycle photochimique qui est susceptible de fournir une explication plausible et intéressante (du moins partielle) de la défectuosité de la pompe. En outre, il est maintenant établi [69] que les formes spectrales M₄₁₂ et M₃₈₀ sont respectivement engendrées par les formes mères bR₅₇₀ et bR₄₈₀.

De façon générale, les données obtenues à partir de telles investigations cinétiques, et comme le montre en partie les résultats présentés dans le Tableau 1, révèlent que la conversion progressive du pigment natif en pigment modifié se manifeste dans un premier temps (large prédominance du pigment bR₅₇₀) par une accélération des réactions de formation et de disparition de l'état M₄₁₂. En présence de quantités relativement importantes de la forme bR₄₈₀, le signal optique associé à la forme M₃₈₀ devient détectable et on note une réduction de sa vitesse de décroissance par un facteur d'au moins 4 par comparaison à celle associée à l'état natif M₄₁₂. D'autre part, examinées à 412 nm, les vitesses de disparition de la forme déprotonée M sont multipliées par au moins un facteur de 3 relativement aux cinétiques normales de l'état natif M₄₁₂. Sachant que l'activité de pompage de protons est limitée par la vitesse de la transition M→bR, nous pouvons donc conclure que, dans des échantillons où les deux formes de la bactériorhodopsine

coexistent, la translocation de protons par la forme bR₅₇₀ est au moins 12 fois plus rapide que celle de la forme bR₄₈₀. Ce résultat s'accorde parfaitement bien avec les observations expérimentales qui ont été rapportées par Uruga et al [74]. En effet, dans des conditions de pH qui limitent l'induction du pigment bR₄₈₀ et sous l'effet de la lumière jaune, la contamination d'échantillons pourpres par de faibles quantités d'anesthésiques provoque une accélération de la réaction photocyclique globale et augmente la cadence de pompage de protons du pigment. Au contraire, en présence de larges concentrations d'anesthésiques, il y a formation du pigment rouge et conséquemment l'activité de pompage ainsi que la vitesse du photocycle sont nettement atténuées. De ce fait, les spectres d'action de la variation de pH du milieu extérieur, mesurés dans des mélanges équimolaires des deux formes spectrales, devront être dominés par le pigment bR₅₇₀. Aussi, dans des échantillons modifiés où la concentration de bR₅₇₀ est très minoritaire, nous devrions normalement s'attendre à ce que le spectre d'action soit marqué par l'activité de pompage du pigment bR₄₈₀. Or, comme le confirme les données présentées sur la figure 14 (où bR₅₇₀ / bR₄₈₀ ≈ 5 / 95), cette prédominance de l'état bR₄₈₀ n'est pas observée. En conséquence, il est insensé et tout à fait erroné de tirer des conclusions définitives sur l'état de pompage de bR₄₈₀ en se basant uniquement sur de telles considérations cinétiques.

Par ailleurs, notre analyse cinétique précédente démontre également que les réactions de formation des intermédiaires M (M₄₁₂ et M₃₈₀) sont nettement plus rapides en présence des anesthésiques, et ce comparativement aux réactions analogues observées lors du photocycle normal. En d'autres termes, l'action des anesthésiques sur la bactériorhodopsine native se traduit, entre autres, par une accélération très significative du processus de

déprotonation du chromophore et devrait, en principe, conduire à une apparition concomitante très rapide d'un proton du côté extracellulaire. Effectivement, dans des échantillons de membranes pourpres natives, un tel phénomène a déjà été observé sous forme d'une variation transitoire de pH du milieu environnant. Cependant, dans des conditions expérimentales similaires, la transformation substantielle du pigment pourpre en pigment rouge par addition d'anesthésique provoque une disparition intégrale de la variation de pH (figure 13). Dans de pareilles conditions, cette absence mystérieuse du signal peut être reliée soit à des modifications spécifiques au sein de la protéine qui influent directement sur son activité de pompage de protons , soit tout simplement au fait que la résolution ainsi que la sensibilité du système (rapport signal sur bruit) sont tellement inadéquates qu'il est donc impossible de déceler le signal produit par le pigment modifié.

Pour examiner le caractère fonctionnel du pigment modifié sous un autre angle et d'une manière encore plus élaborée, nous avons donc procédé à des mesures de photocourants transitoires à l'aide d'un système de mesure électrique beaucoup plus sophistiqué.

5.3 Comparaison des photocourants de déplacement de charge générés par les pigments bR570 et bR480

5.3.1 Éléments descriptifs du photocourant typique de la bactériorhodopsine native

Tel que mentionné auparavant et selon l'argumentation standard généralement employée dans l'ensemble de la littérature, le pompage de

protons par la molécule de bactériorhodopsine peut être considéré comme la manifestation macroscopique de plusieurs déplacements élémentaires et successifs, se déroulant à travers toute la protéine dans la direction normale au plan de la membrane, d'une seule particule chargée positivement : le proton [41,51]. En principe, le courant électrique associé au déplacement de cette charge entre deux points donnés de la protéine peut être détecté expérimentalement dans la mesure où il est possible de produire un échantillon orienté au sein duquel tous les mouvements microscopiques identiques s'effectueront dans le même sens [51]. À cette fin, nous avons utilisé la méthode du gel orienté, tel que déjà décrit à la section 2.2.4.

Cette méthode de mesure a été développée au cours de la dernière décennie par le groupe de recherche de Lajos Keszthelyi à Szeged en Hongrie [23,77]. Plus tard, elle a été adaptée, bien quelques années avant nous, par le laboratoire de Thomas Ebrey à l'Université d'Urbana en Illinois afin d'établir une corrélation entre les transitions spectroscopiques du photocycle de la bactériorhodopsine (i.e., apparition des intermédiaires optiques K, L, M, O) et les modifications électriques accompagnant son activité de pompage de protons [84,123]. La figure 30 illustre de façon générale l'évolution temporelle du courant de déplacement de charge enregistré, au moyen de la méthode du gel orienté, lors du cycle photochimique de la bactériorhodopsine native. En fait, le photocourant global associé à l'activité photoélectrique complète du pigment pourpre se subdivise en trois photocourants partiels se répartissant sur trois échelles de temps différentes. Conformément à la nomenclature qui a déjà été utilisée par Liu en 1990 [123], ces photocourants consécutifs sont communément désignés par B_1 , B_2 et B_3 (figure 30).

Plus précisément, le photocourant B_1 est très rapide, de large intensité et de signe négatif (par rapport à la direction normale de pompage de protons) [79,82], il est habituellement associé aux transitions optiques $bR \rightarrow K \rightarrow L$ du photocycle [77] et ses caractéristiques cinétiques dépendent largement de la vitesse de réponse du système de mesure électrique (électrodes, électrolyte, fils de connexion et amplificateurs) [51]. Tandis que la montée abrupte et mal résolue du photosignal B_1 correspond uniquement à la formation de l'intermédiaire K (i.e., première séparation de charge due à la photoisomérisation du rétinal), la descente subséquente s'effectue selon deux processus cinétiques différents qui sont respectivement reliés à la transition optique $K \rightarrow L$ (associée à une petite détente additionnelle du rétinal protoné vers une position d'équilibre finale) et à la relaxation électrique du circuit de détection [51,56]. Par ailleurs, l'amplitude de la première phase négative de B_1 correspondant à l'apparition très rapide du photoproduit K est considérée comme étant proportionnelle au nombre de protéines excitées : fraction photocyclique [41]. En outre, la résolution très limitée de cette composante électrique initiale ne permet donc qu'une détermination approximative du nombre de molécules photoactives contribuant à la réponse électrique détectée.

Quant à l'origine moléculaire du deuxième photocourant B_2 , elle est étroitement reliée au processus interne d'éjection du proton par la bactériorhodopsine [42,54]. En effet, ce signal de polarité positive (figure 30) est engendré par le déroulement de deux transferts protoniques dans le sens normal de la pompe : d'abord la déprotonation de la base de Schiff en faveur du résidu avoisinant D85; et ensuite la déprotonation du groupement XH menant à la libération d'un proton du côté extracellulaire. D'après les

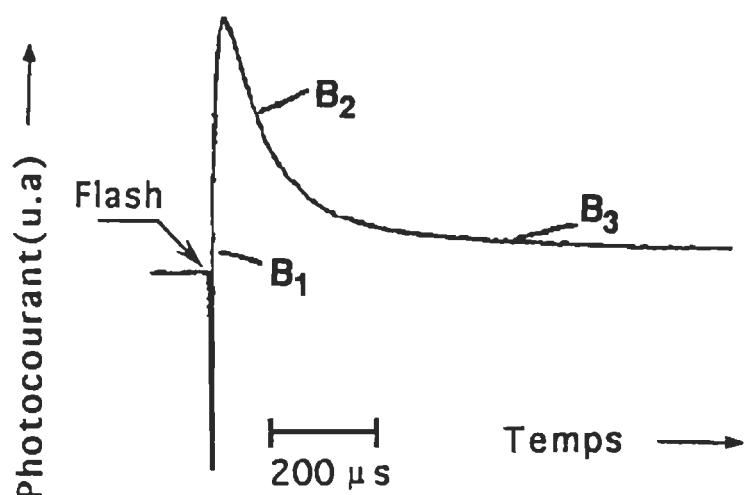


Figure 30 Photocourant typique de la bactériorhodopsine native mesuré par méthode du gel orienté. B_1 , B_2 et B_3 étant les trois phases constitutives du signal total (voir texte pour les détails).

évidences actuelles [79,123], la réponse électrique B_2 est optiquement couplée à la transition $L \rightarrow M$ du photocycle .

Le dernier photocourant B_3 est identifié comme le courant associé aux quatre processus successifs suivants [42,54] : la reprotonation de la base de Schiff à partir du résidu D96; la reprise d'un proton du côté cytoplasmique; la réisomérisation cis-trans du rétinal protoné; et la reprotonation du groupement X par le résidu D85 Ces quatre transitions s'effectuent également dans le sens positif de la pompe mais avec des cinétiques relativement lentes par rapport à celles de B_1 et B_2 ; ceci permet donc d'expliquer la polarité positive de B_3 de même que la réduction significative de son intensité (figure 30). Enfin, le signal B_3 est généralement assigné à la dernière transition optique $M \rightarrow O \rightarrow bR$ du photocycle [77,83].

5.3.2 Résultats

La figure 31 compare les photocourants transitoires mesurés au moyen de la méthode du gel orienté sur les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 1% d'enflurane. Les mesures ont été effectuées, à température ambiante, dans un tampon Tris-HCl 10mM pH = 7.5. Comme nous venons juste de le voir, le photocourant macroscopique mesuré durant toute la perturbation électrique cyclique de la bactériorhodopsine se compose de trois phases électriques différentes B_1 , B_2 et B_3 (figure 31).

L'examen des données présentées sur la figure 31 montre que l'amplitude apparente et l'aire géométrique du photocourant B_1 généré par le pigment modifiée sont notablement réduites comparativement à celles du

pigment natif. Tout d'abord, cette altération est une conséquence directe de la formation limitée de l'intermédiaire K durant la photoconversion primaire du pigment bR₄₈₀ (ce qui est normal et bien justifié par les raisons citées ci-haut dans la section 5.2). En outre, elle peut être argumentée par une diminution substantielle de la distance intraprotéique parcourue par le proton durant la phase B₁ et/ou par le fait que les transitions optiques bR→K→L sont tellement accélérées sous l'effet de l'anesthésique qu'il devient presque impossible de détecter correctement les composantes de B₁ à l'aide de la résolution temporelle utilisée. Normalement, la chute du photocourant B₁ associé à la forme bR₅₇₀ comporte deux composantes exponentielles dont les constantes de temps moyennes se situent entre 270 ns et 1.5 μs. En présence d'anesthésique, cette phase est accélérée et évolue généralement avec une seule constante de relaxation d'environ 180 ns.

Le courant de libération du proton, i.e., le photocourant B₂ (figure 31), engendré par le pigment modifié bR₄₈₀ est nettement plus accéléré que celui du pigment natif bR₅₇₀. Ce résultat est tout à fait en accord avec les données optiques précédentes qui démontrent une accélération remarquable de la réaction de déprotonation du rétinal (bR→M). En effet, le signal B₂ associé à l'état natif bR₅₇₀ est généralement caractérisé par deux relaxations exponentielles ayant des constantes de temps typiques d'environ ~90 μs et ~25 μs à température ambiante et dans un milieu modérément alcalin (e.g. pH = 7.5). Dans ces conditions, et en présence de concentrations croissantes d'anesthésique, de plus en plus de pigment bR₄₈₀ est généré et nous assistons parallèlement à cela à une accélération graduelle des deux composantes cinétiques de B₂. Au-delà d'un certain seuil de la conversion spectrale (i.e.,

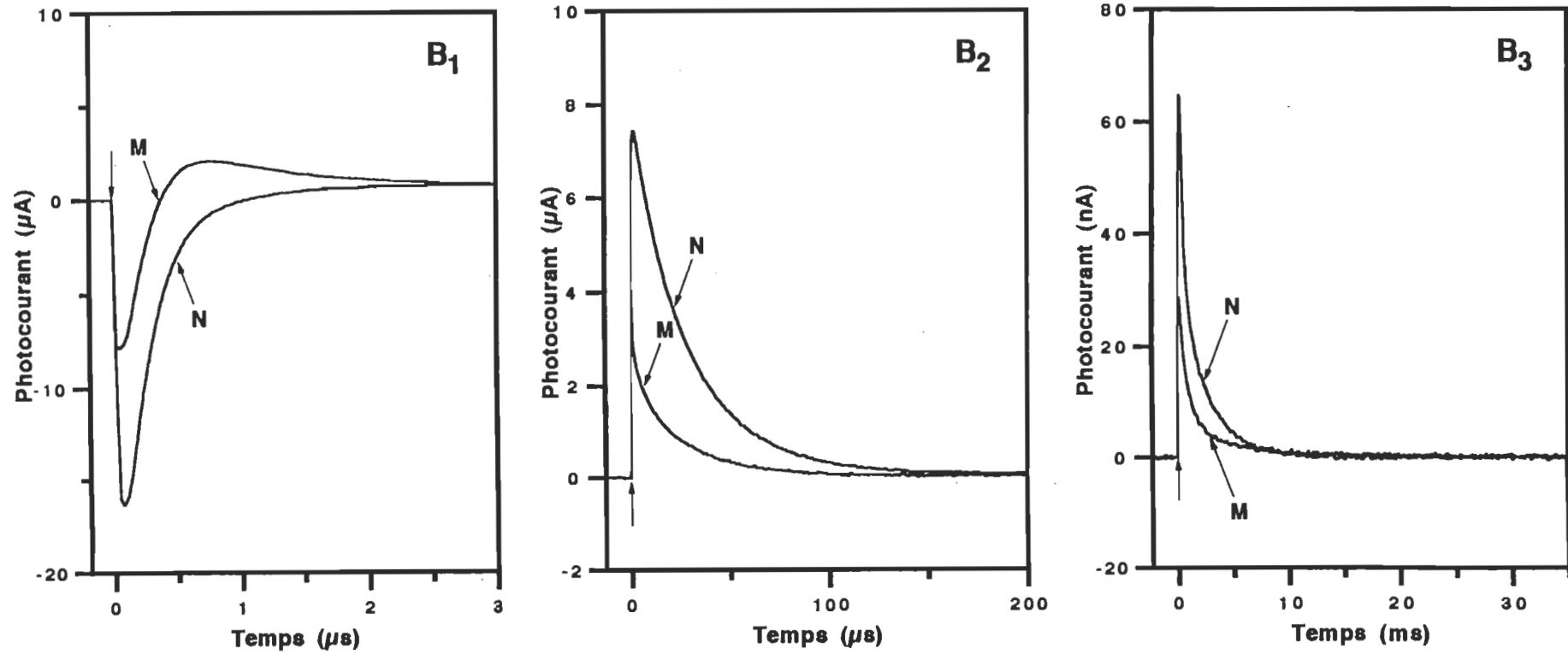


Figure 31 Photocourants transitoires mesurés, à température ambiante et à trois échelles de temps différentes, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par addition de 1% (v/v) d'enflurane. L'échantillon de mesure étant constitué d'un gel polyacrylamide de membranes pourpres orientées ($\sim 38 \mu\text{M}$ bR) suspendu dans un tampon 10 mM Tris-HCl pH = 7.5.

après formation de quantités non négligeables de bR₄₈₀), il y a apparition d'une nouvelle composante très rapide dans le signal B₂. Dans ce cas ci, le photocourant B₂ produit par l'état bR₄₈₀ renferme trois composantes constitutives avec des constantes de temps moyennes de 27, 6 et 0.7 µs. Comme pour B₁, l'amplitude et l'aire géométrique du signal modifié B₂ sont largement réduites par comparaison à celles du signal natif. Après transformation complète du pigment bR₅₇₀ en bR₄₈₀, l'aire géométrique totale délimitée par la trace B₂ représente moins de 20% de sa valeur originale.

Le courant de reprotonation et de retour à l'équilibre électrique initial, i.e., le photocourant B₃ (figure 31), est également très affecté par l'apparition du pigment rouge bR₄₈₀. Son amplitude et sa vitesse d'évolution sont considérablement réduites par rapport à celles du photocourant normal. Ces modifications s'accordent bien elles aussi avec les données optiques déjà obtenues pour la transition M→bR du photocycle (i.e., réaction de reprotonation du rétinal). En présence de grandes proportions de bR₄₈₀, l'aire géométrique du photocourant B₃ est abaissée jusqu'à moins de 15% de sa valeur originale. Après conversion complète du pigment pourpre (e.g., par traitement à l'halothane), le signal B₃ devient pratiquement non-détectable.

Les figures 32 et 33 comparent les photocourants natifs et modifiés (par traitement à l'enflurane) mesurés par la méthode du gel orienté dans l'eau pure (figure 32) ainsi que dans une solution saline 5 mM CaCl₂ (figure 33). Malgré la nature légèrement acide des deux milieux de mesure (pH = 6-6.5), les échantillons modifiés renferment des quantités substantielles de pigment rouge bR₄₈₀ et les photocourants enregistrés dans ces conditions sont altérés de manière comparable à celle observée à des pH un peu plus élevés

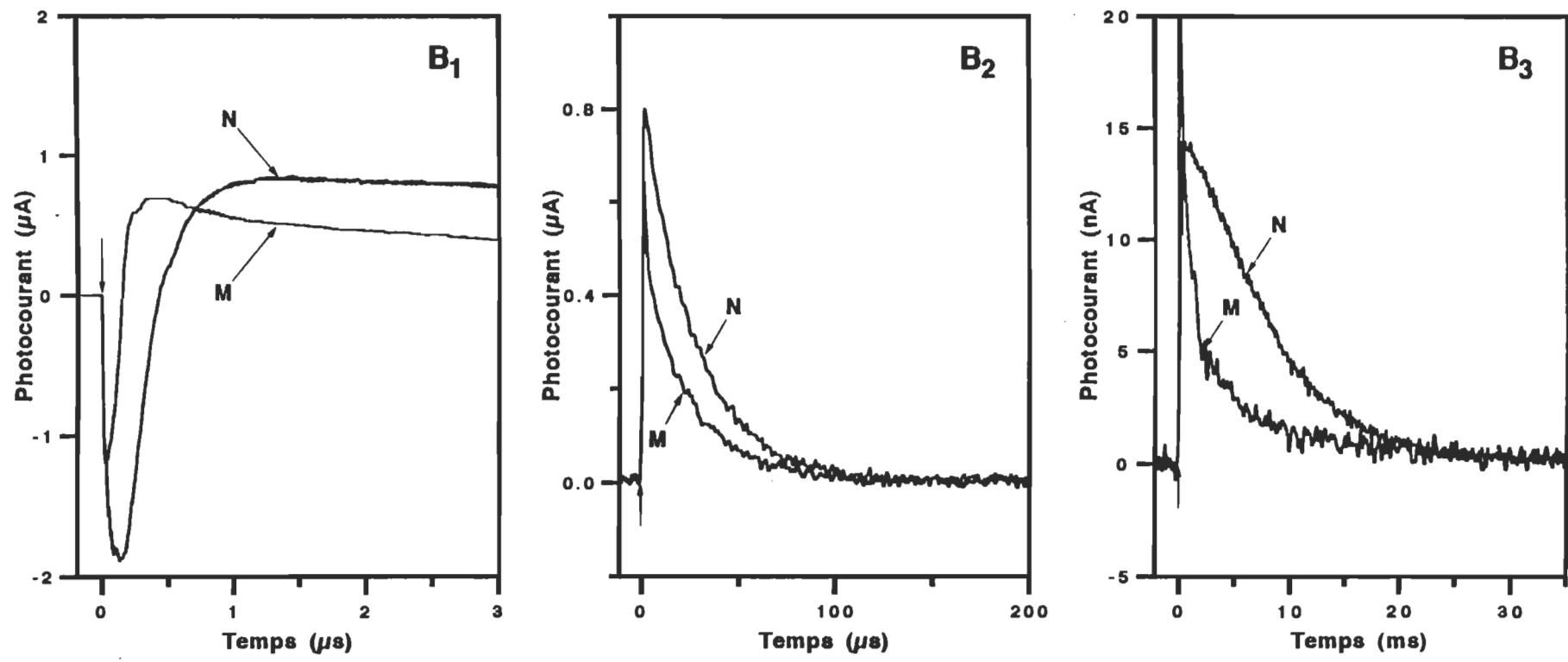


Figure 32 Photocourants transitoires mesurés, à température ambiante et à trois échelles de temps différentes, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% (v/v) d'enflurane. L'échantillon de mesure étant constitué d'un gel polyacrylamide de membranes pourpres orientées suspendu dans de l'eau pure.

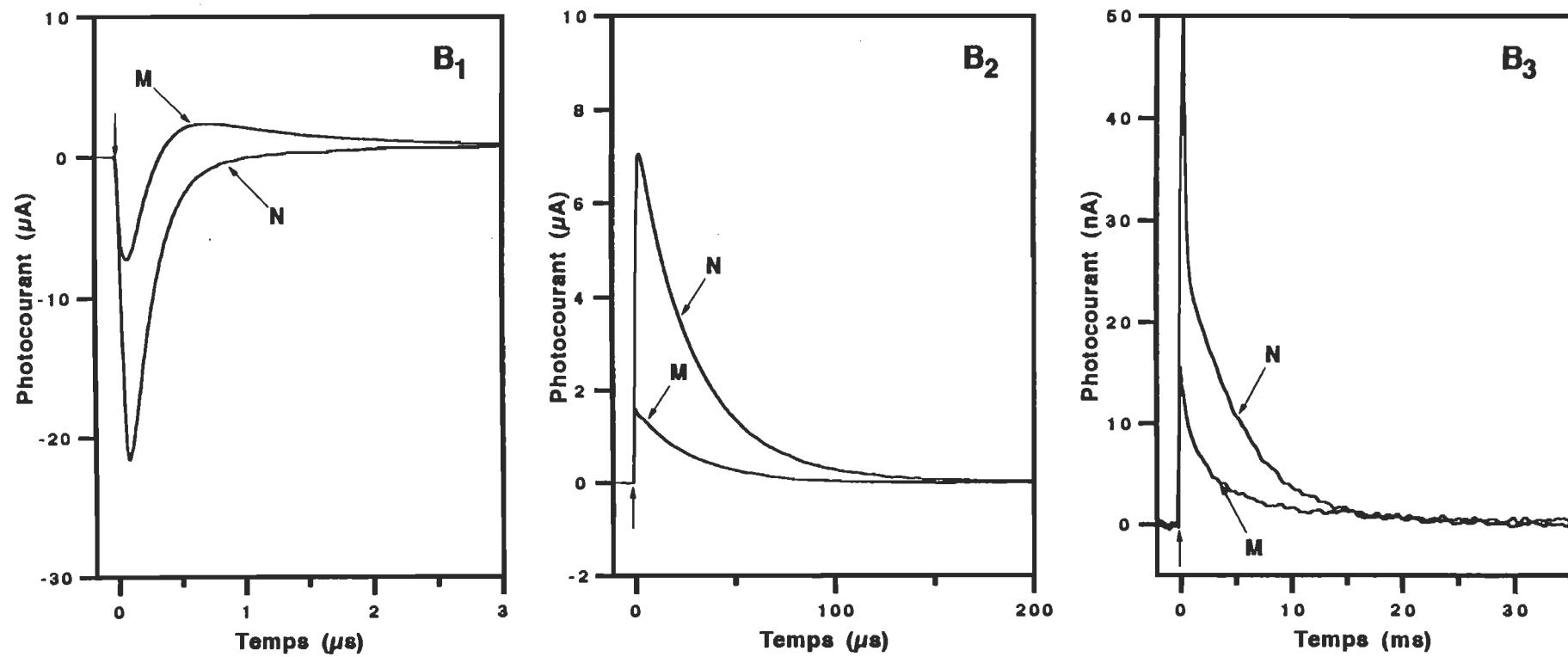


Figure 33 Photocourants transitoires mesurés, à température ambiante et à trois échelles de temps différentes, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% (v/v) d'enflurane. L'échantillon de mesure se constitue d'un gel polyacrylamide de membranes pourpres orientées suspendu dans une solution saline 5 mM CaCl₂.

(e.g., pH ~ 7.5). Les données présentées sur les figures 31, 32 et 33 montrent clairement que l'effet de l'anesthésique sur le pigment pourpre se traduit par une réduction très significative des aires géométriques des transitoires B_2 et B_3 qui sont étroitement reliées au transport net de charge à travers la protéine. En outre, cette réduction est d'autant plus intense que la force ionique du milieu électrolytique est élevée (cas de CaCl_2) [124,125]. Cette constatation expérimentale signifie bel et bien que les molécules de l'anesthésique ne perturbent pas la distribution volumique des contre ions à l'intérieur de la couche diffuse³⁰ mais qu'elles interagissent directement avec le fragment pourpre et affectent réellement les déplacements élémentaires de charge au sein de la bactériorhodopsine. Les temps de relaxation des photocourants présentés sur les figures 31 à 33 sont rassemblés dans le Tableau 2. On y trouve aussi les constantes de temps des composantes B_1 , B_2 et B_3 mesurées dans d'autres conditions expérimentales sur des échantillons pourpres et modifiés (par ajout d'enflurane ou d'halothane). Comme c'est déjà démontré dans le chapitre théorique, l'intensité du photocourant macroscopique associé à une transition donnée de la bR est proportionnelle à la vitesse de transfert des charges mobiles, à la distance intraprotéique traversée par le proton durant la transition ainsi qu'au nombre de protéines photocycliques (i.e., nombre de protons susceptibles de se déplacer). De ce fait, la corrélation cinétique entre les composantes électriques et les transitions optiques (dont les signaux associés sont uniquement proportionnels au nombre de molécules subissant une transition) n'est pas totalement consistante et bien respectée, notamment dans des milieux de

³⁰ En d'autres termes, l'anesthésique n'influe pratiquement pas sur le courant extérieur dû à un éventuel déplacement des cations situés à proximité de la membrane pourpre.

TABLEAU 2

Temps de relaxation des photocourants transitoires générés par la bactériorhodopsine dans diverses conditions expérimentales

Conditions expérimentales (bR ₅₇₀ / bR ₄₈₀)	TYPE DE PHOTOCOURANT		
	Photocourant B ₁ (τ)*	Photocourant B ₂ (τ)	Photocourant B ₃ (τ)
Eau pure (1 / 0)	270 ns, 2.5 μs (0.85), (0.15)	60 μs, 28 μs (0.11), (0.89)	8.8 ms, 1.8 ms (0.84), (0.16)
Eau pure + 2% d'enflurane (0.5 / 0.5)	~195 ns (1)	28 μs, 7 μs, 0.8 μs (0.20), (0.20), (0.60)	~22 ms, 4 ms (0.70), (0.30)
Eau pure + 0.3% d'halothane (0.25 / 0.75)	~180 ns (1)	26 μs, 7 μs, 0.7 μs (0.22), (0.02), (0.76)	-----
5 mM CaCl ₂ (1 / 0)	~253 ns, ~2.2 μs (0.90), (0.10)	84 μs, 26 μs (0.42), (0.58)	5.7 ms, 2.2 ms (0.80), (0.20)
5 mM CaCl ₂ + 2% d'enflurane (0.3 / 0.7)	~190 ns (1)	27 μs, 7 μs, 0.8 μs (0.47), (0.18), (0.35)	~22 ms, 3.8 ms (0.09), (0.91)
Tampon Tris-HCl pH = 7.5 (1 / 0)	~290 ns, 1.6 μs (0.92), (0.08)	93 μs, 27 μs (0.05), (0.95)	~3 ms, 2.4 ms (0.4), (0.6)
Tampon Tris-HCl pH = 7.5 + 1% d'enflurane (0.15 / 0.85)	~270 ns (1)	~26 μs, 6 μs, 0.5 μs (0.46), (0.17), (0.37)	14.5 ms, 2.9 ms (0.19), (0.81)
Tampon Tris-HCl pH = 8.7 (1 / 0)	~250 ns, ~1 μs (0.94), (0.06)	~96 μs, 26 μs (0.12), (0.88)	5.8 ms, 1.4 ms (0.87), (0.13)
Tampon Tris-HCl pH = 8.7 + 0.5% d'enflurane (0.1 / 0.9)	~170 ns (1)	26 μs, 4 μs, 0.7 μs (0.27), (0.46), (0.27)	~16 ms, 1.2 ms (0.20), (0.80)

* Les valeurs entre parenthèses représentent les amplitudes relatives des composantes exponentielles après normalisation à l'amplitude absolue du photocourant transitoire mesuré (i.e., B₁, B₂ ou B₃).

mesure à pH élevé et/ou à faible force ionique [123-125]. Cette inconsistance apparente trouve vraisemblablement son origine dans le fait que les intermédiaires optiques observés peuvent être générés aussi bien par des déplacements internes de charge que par des modifications conformationnelles de l'apoprotéine.

En conformité avec les résultats cinétiques obtenus à partir de mesures transitoires de la transmission optique (section 5.2.1), les données photoélectriques figurant dans le Tableau 2 démontrent que les photocourants associés au pigment modifié bR₄₈₀ sont marqués par une accélération remarquable des réactions de déprotonation de la base de Schiff (i.e., K→L→M ; bR→K étant mal résolue) et un ralentissement du processus de reprotonation (M→O→bR). De façon générale, l'action de l'anesthésique provoque la disparition de la composante lente normalement détectée dans le photocourant natif B₂ (50 - 100 μs) au détriment de deux nouvelles composantes constitutives ayant des constantes de relaxation de ~0.5 et ~8 μs, respectivement. Inversement, la relaxation du signal B₃ est décélérée et se distingue par la présence d'une longue constante de temps pouvant atteindre une valeur de 25 ms. Par ailleurs, et comme on le verra plus en détail lors de la prochaine discussion, la somme totale des aires algébriques des photocourants B₁, B₂ et B₃ (normalisée à la valeur absolue de l'aire de la composante B₁) demeure constamment positive tout en diminuant de façon progressive au fur et à mesure que le degré d'induction du pigment rouge augmente. Cette constatation signifie que l'activité de pompage de protons de l'échantillon traité par l'anesthésique est toujours existante mais qu'elle est de plus en plus inhibée, jusqu'à être pratiquement nulle, en présence de concentrations croissantes de la forme bR₄₈₀. L'évaporation complète de

l'anesthésique absorbé par l'échantillon de mesure, faite sous l'action d'un vide modéré ou par incubation prolongée (~ 1 h) du gel dans une solution aqueuse dépourvue d'anesthésique, régénère la coloration pourpre des membranes et restaure les cinétiques et les amplitudes normales de la réponse photoélectrique de la bactériorhodopsine.

5.3.3 Discussion

Les résultats photoélectriques précédents montrent que, par comparaison au pigment naturel bR₅₇₀, l'évolution cinétique de l'activité photoélectrique du pigment rouge se caractérise par une forte accélération du photocourant B₂ (avec aussi apparition d'une troisième composante rapide) et une décélération du photocourant B₃³¹. La phase de descente du photocourant B₁ subit également une nette accélération (la montée de B₁ étant mal résolue du fait de la limitation instrumentale). Ainsi, les mesures photoélectriques démontrent une altération cinétique comparable à celle précédemment observée lors des mesures optiques. D'autre part, les amplitudes relatives ainsi que les surfaces géométriques associées aux signaux modifiés B₁, B₂ et B₃ sont significativement réduites comparativement à celles des photocourants natifs. Plus précisément, l'aire de la trace B₁ est diminuée par au moins un facteur de deux, celle de B₂ par un facteur de 5, et celle de B₃ (quand elle est détectable) par un facteur encore plus grand. Tandis que l'aire du signal B₁ est proportionnelle au nombre de molécules photocycliques [41], les aires délimitées par les transitoires B₂ et B₃ correspondent aux quantités de charges libres (protons) qui ont été déplacées

³¹ Le photosignal B₃ est généralement difficile à détecter en raison de la lenteur du processus moléculaire responsable (i.e., sa vitesse est proportionnelle à l'intensité du photocourant mesuré : voir chapitre 3).

durant les réactions de déprotonation et de reprotontonation, respectivement [51,79,82]. En outre, ces grandeurs géométriques dépendent de façon explicite du nombre de molécules photo-actives (initialement excitées) ainsi que de la distance intraprotéique parcourue par le proton lors de sa transition. Dans ces conditions, la baisse d'intensité du photocourant B_1 s'explique essentiellement par une diminution du nombre de molécules photocycliques (pour des raisons dues aux contraintes expérimentales déjà précisées). Cependant, la réduction encore plus forte des aires délimitées par B_2 et B_3 reflète une nette altération au niveau de l'activité normale de pompage de protons. Cette modification fonctionnelle peut être raisonnablement argumentée par le fait que les distances protoniques sont largement réduites, notamment si on évoque que la forme bR_{480} possède une structure tertiaire légèrement plus relaxée que celle de la forme native bR_{570} [70,71].

Premièrement, pour examiner de façon systématique l'intensité de la translocation électrogénique de protons en fonction du degré de modification du pigment pourpre, il est donc nécessaire d'établir une relation explicite permettant d'évaluer l'activité de pompage de protons. En effet, à la lumière des explications précédentes, il est bien facile de percevoir que l'efficacité de pompage de protons (désignée ici par EPP et qu'on peut exprimer en nombre de protons transportés par nombre total de molécules photocycliques : H^+/bR) est une propriété intrinsèque qui est directement proportionnelle au rapport R entre la somme des aires algébriques des transitoires B_1 , B_2 et B_3 et le module de l'aire négative de la composante B_1 [41,51,82]; soit:

$$EPP\left(\frac{H^+}{bR}\right) \sim \sum_{j=1}^3 \frac{A_j}{|A_1|} \quad (5.1)$$

où A_j est l'aire algébrique du photosignal B_j ($j=1,2,3$).

N.B.:

- a. La valeur de l'aire A_j peut être calculée soit par intégration numérique³²; soit, de façon approximative, par la relation : amplitude du courant I_j x constante de temps τ_j de la transition.
- b. La valeur absolue $|A_1|$ étant proportionnelle au nombre total de molécules photocycliques de bactériorhodopsine, une activité de pompage normale s'exprime par un terme EPP de valeur strictement positive et relativement grande ($EPP > 0$). Cette valeur diminue progressivement au fur et à mesure que la conversion $bR_{570} \rightarrow bR_{480}$ évolue. Le Tableau 3 montre une diminution de l'efficacité de pompage de protons (EPP) en fonction de l'induction croissante du pigment rouge bR_{480} . Ces valeurs ont été calculées à l'aide de la relation (5.1) en utilisant les données photoélectriques que nous avons déjà mesurés. De plus, pour faciliter la comparaison, le terme EPP associé au pigment modifié a été normalisé à celui du pigment natif. Les résultats présentés dans le Tableau 3 démontrent une réduction considérable de l'activité de pompage de protons du pigment modifié qui décroît jusqu'à moins que 5% de sa valeur originale. L'hypothèse la plus plausible pour rendre compte de ce phénomène serait de considérer que le trajet intraprotéique normalement suivi par le proton est fortement altéré

³² $A_j = \int_0^\infty I_j(t) dt$, où et ∞ représentent le début et la fin de la transition, respectivement.

TABLEAU 3

Réduction graduelle de l'efficacité de pompage de protons (EPP)
en fonction de l'induction progressive de la forme bR₄₈₀.
EPP* ≡ EPP normalisée à celle du pigment natif.

Conditions expérimentales (bR ₅₇₀ / bR ₄₈₀)	EPP*
Pigment natif (1 / 0)	1
5 mM CaCl ₂ + 2% d'enflurane (0.3 / 0.7)	0,33
Eau pure + 0.3% d'halothane (0.25 / 0.75)	0.19
Tampon Tris-HCl pH 7.5 + 2% d'enflurane (0.15 / 0.85)	0.12
Tampon Tris-HCl pH 8.7 + 0.5% d'enflurane (0.1 / 0.9)	0.05
Tampon Tris-HCl pH 8.7 + 2% d'enflurane (~ 0 / ~1)	< 0.05

de telle sorte qu'il lui est maintenant impossible d'apparaître à la surface de la membrane.

Par ailleurs, il est probablement opportun de rappeler ici que la réponse photoélectrique du pigment bR₄₈₀ présente certaines similitudes avec celle engendrée par d'autres formes altérées de la bactériorhodopsine telles que les deux formes génétiquement modifiées D85 → E et D96 → N [126] ainsi que la forme basique induite par une forte alcalinité du milieu (pH > 9) [123,124,127,128]. En effet, la conversion du pigment pourpre en pigment rouge se traduit essentiellement par la substitution des deux composantes normales du photocourant B₂ (i.e., $\tau_1 \approx 80 \mu\text{s}$ et $\tau_2 \approx 25 \mu\text{s}$) par trois nouvelles composantes nettement plus rapides ($\sim 26 \mu\text{s}$, $\sim 7 \mu\text{s}$ et $\sim 0.6 \mu\text{s}$). Or, les photoréponses B₂ produites par les formes alcaline et mutée (D85 → E) sont également marquées par la présence de deux composantes cinétiques rapides : $\sim 0.6 \mu\text{s}$ et $\sim 7 \mu\text{s}$, dont les amplitudes relatives sont significativement réduites. En outre, du point de vue fonctionnel, la forme alcaline de la bactériorhodopsine (pH>9) ne montre aucune capacité notable de pomper activement les protons [127], tandis que la manipulation génétique du pigment natif provoque soit un retard, soit un découplage de la fonction physiologique par rapport à l'activité photochimique correspondante [129]. Par ailleurs, la disparition très lente de l'intermédiaire M durant le photocycle de bR₄₈₀ de même que la difficulté pratique de détecter le petit signal B₃ associé à la reprotonation du rétinal sont des phénomènes comparables à ceux qui ont été observés lors de la mutation génétique D96 → N de la bactériorhodopsine native [126]. De plus, il est intéressant de noter que les mutations R82 → A et Y57 → F de la bactériorhodopsine sont également caractérisées par une accélération de l'étape de déprotonation et une

inhibition de l'activité de translocation de protons [130,131]. Plus précisément, dans le premier cas, la substitution du résidu R82 chargé positivement (voir figure 7) par un résidu électriquement neutre inverse l'ordre chronologique de fonctionnement de la pompe (i.e., la reprise d'un proton extérieur précède la libération d'un proton intérieur). Dans le second cas, la modification Y57→F s'accompagne par l'établissement d'un équilibre spectral entre les formes bR₅₇₀ et bR₄₈₀ et entraîne ainsi une accélération de la réaction de déprotonation et une altération de l'efficacité de pompage de protons. En tenant compte de toutes ces constatations fonctionnelles, on peut donc conclure que ces mutations ainsi que le traitement par anesthésiques induisent des perturbations comparables au niveau de l'activité de pompage de protons, et qu'il s'agit bien dans les deux cas de perturbations de la dynamique de déplacement des protons à travers leur canal de transport transmembranaire (figure 7).

D'autre part, si nous considérons que la formation du pigment rouge par ajout d'anesthésique constitue l'établissement d'un équilibre acide base, il est donc réaliste d'admettre que la forme basique bR₄₈₀ renferme un groupement négatif additionnel. Nos mesures montrent que l'apparition de cette nouvelle charge négative au sein de la protéine influe considérablement sur l'efficacité de pompage de protons ainsi que sur le maximum d'absorption, et il est ainsi raisonnable de penser qu'elle se situe à l'intérieur du canal à protons tout près du rétinal. Très probablement, la position stratégique de ce site chargé va lui permettre d'altérer la trajectoire normale du proton et par conséquent inhiber son transfert vers le milieu extérieur, et ce, en agissant comme centre d'attraction électrostatique. À cet égard, des études récentes ont identifié le résidu R82 comme étant le groupement

potentiellement responsable de ce type d'anomalie fonctionnelle de la bactériorhodopsine [127,131]. En ce qui concerne la forme bR_{480} induite par anesthésique, l'implication de R82 est tout aussi vraisemblable compte tenu de la relaxation tertiaire de la protéine (favorisant une influence encore plus forte du milieu extérieur) et aussi du fait que R82 possède un pK_a relativement élevé qui empêcherait sa déprotonation à pH neutre dans la membrane native intacte et de là, la formation de l'état bR_{480} .

5.4 Comparaison des variations transitoires de la conductivité électrique générées par les pigments natif et modifié

5.4.1 Résultats

Comme nous l'avons déjà expliqué lors du deuxième chapitre, la mesure de la variation transitoire de la conductivité électrique du milieu extérieur constitue un moyen additionnel pour visualiser et comparer les activités de pompage de protons des deux formes spectrales de la bactériorhodopsine (bR_{570} et bR_{480}). Au premier abord, on peut imaginer que le déclenchement de l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine provoquerait une augmentation et ensuite une diminution transitoires de la conductivité électrique du milieu dues à la libération et la re-capture du proton lors du photocycle, respectivement. Toutefois, il s'agit là d'une vision simpliste du phénomène réel qui ne tient nullement compte du fait que les membranes pourpres sont des structures chargées où les événements microscopiques de la double couche ionique formée à l'interface de la membrane peuvent dicter le comportement

macroscopique de la conductivité. En réalité, l'interprétation exacte des mesures en conductivité transitoire, dans le cas de la bactériorhodopsine, demeure encore ambiguë et fait présentement l'objet de nombreuses discussions. Dans l'état actuel des informations acquises relativement à ce sujet, il est encore très difficile d'identifier de façon précise le mécanisme moléculaire qui est à l'origine du signal transitoire de conductivité détecté, suite à une photoexcitation ponctuelle. Dans ce contexte, pour expliquer les variations de conductivité mesurées dans diverses conditions expérimentales, les modèles actuellement proposés considèrent aussi bien des échanges ioniques entre la phase aqueuse et la double couche électrique entourant le fragment pourpre [100-102] que des changements dans l'état de polarisabilité de la membrane [99]. Cependant, à cet égard, des travaux récents portant sur le "traçage" des protons pompés au moyen d'indicateurs de pH libres et/ou fixés à différents sites de la surface de la bactériorhodopsine, contenue dans sa membrane native, permettent maintenant d'interpréter plus facilement les mesures de conductivité transitoire [50,98]. Ces travaux démontrent sans équivoque l'occurrence d'une diffusion primaire des protons pompés le long de toute la superficie de la membrane pourpre. Ce phénomène de délocalisation est immédiatement suivi par une migration des protons surfaciques vers le centre de la solution. En vertu de ces nouvelles données, il est actuellement évident que l'expulsion d'un proton durant la première phase rapide du photocycle ($bR \rightarrow M$) peut difficilement coïncider, dans le temps, avec l'apparition d'un proton au sein de la phase aqueuse. En effet, selon ces récentes constatations expérimentales, les protons libérés sont d'abord piégés, pendant un court laps de temps, à l'intérieur de la double couche électrique avant d'être autorisés à diffuser lentement vers le cœur de la solution électroneutre (solution électrolytique proprement dite).

Dans des solutions électrolytiques caractérisées par de faibles forces ioniques, l'épaisseur de la double couche électrique étant suffisamment étendue pour que ces distributions ioniques soient sérieusement affectées par l'apparition de protons du côté extracellulaire, suite à une brève excitation lumineuse [100,101]. De ce fait, et en réponse à la perturbation électrique ainsi produite, "nous assistons à un "exode" massif des ions les plus mobiles de la solution électroneutre vers l'intérieur de la double couche électrique. Ce mouvement de charges provoque donc une diminution significative et transitoire de la conductivité électrique de la solution globale et c'est ce phénomène là qui est vraisemblablement responsable de la chute de conductivité détectée dans des suspensions de membranes pourpres à faibles forces ioniques [102].

À l'aide de membranes pourpres non-orientées et fixées dans un gel polyacrylamide, le même phénomène que celui qui est décrit ci-dessus a été observé dans des solutions aqueuses constituées respectivement d'eau pure (figure 34), de 1 mM de NaCl (figure 35) et de 1 mM de NaCl dans 1 mM de tampon Tris-HCl pH = 8 (figure 36). En gros, les traces de conductivité présentées sur les figures 34 à 36 sont essentiellement composées de trois phases cinétiques différentes. La première phase se caractérise par une diminution exponentielle rapide et importante de la conductivité électrique initiale du milieu causée par une accumulation d'ions extérieurs au sein de la couche d'hydratation de la membrane. Immédiatement après, la conductivité croît progressivement, change de signe et atteint finalement une valeur positive. Au cours de la dernière phase, le signal de conductivité retourne vers sa valeur originale après une longue période de relaxation (plusieurs centaines de millisecondes). Les temps de relaxation associés aux trois phases

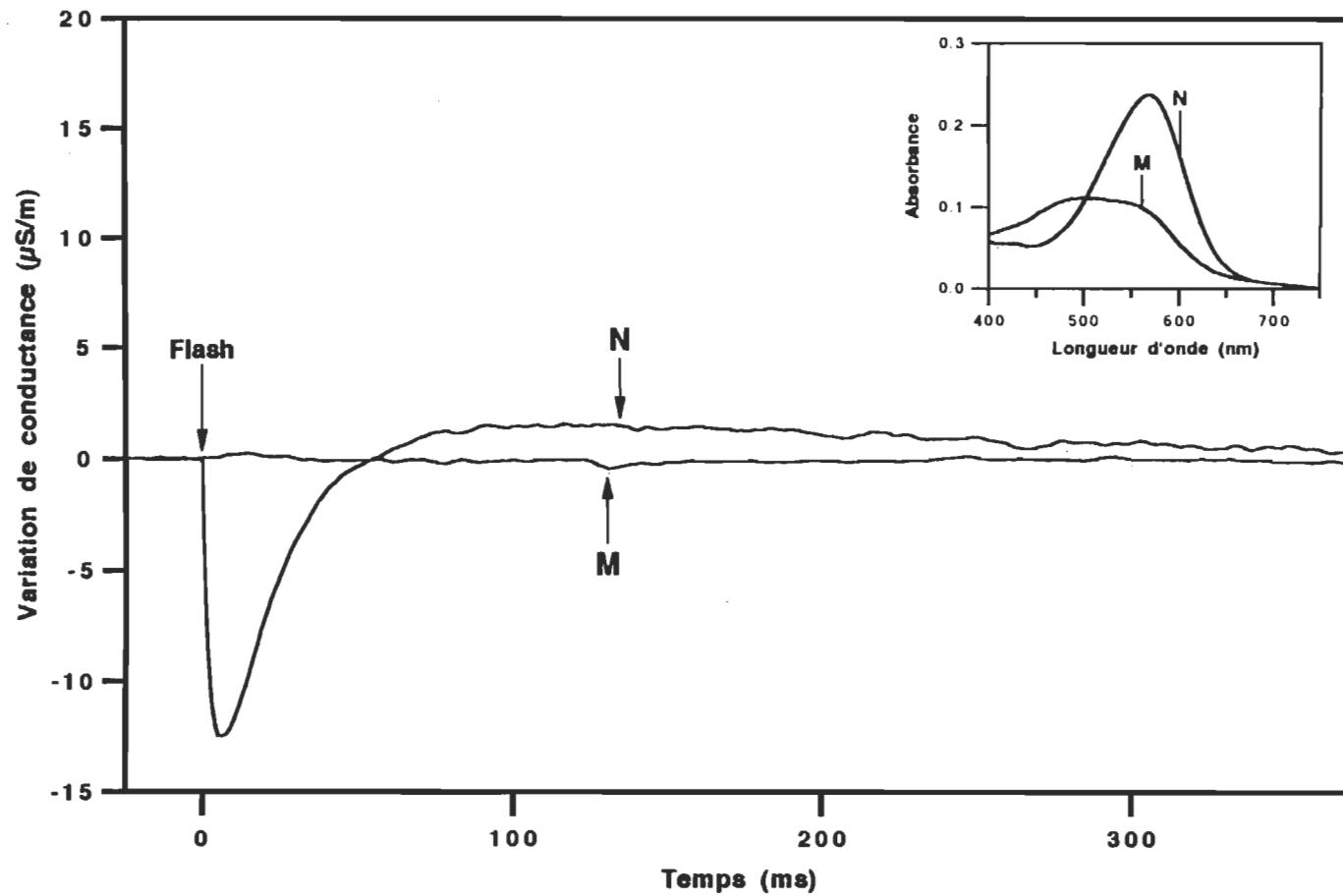


Figure 34 Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées, à température ambiante, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 3% (v/v) d'enflurane. L'échantillon de mesure étant constitué d'un petit gel polyacrylamide de membranes pourpres non-orientées ($64.5 \mu\text{M}$ bR) suspendu dans une solution d'eau distillée. La figure périphérique montre les spectres d'absorption relevés avant (N) et après (M) la modification spectrale.

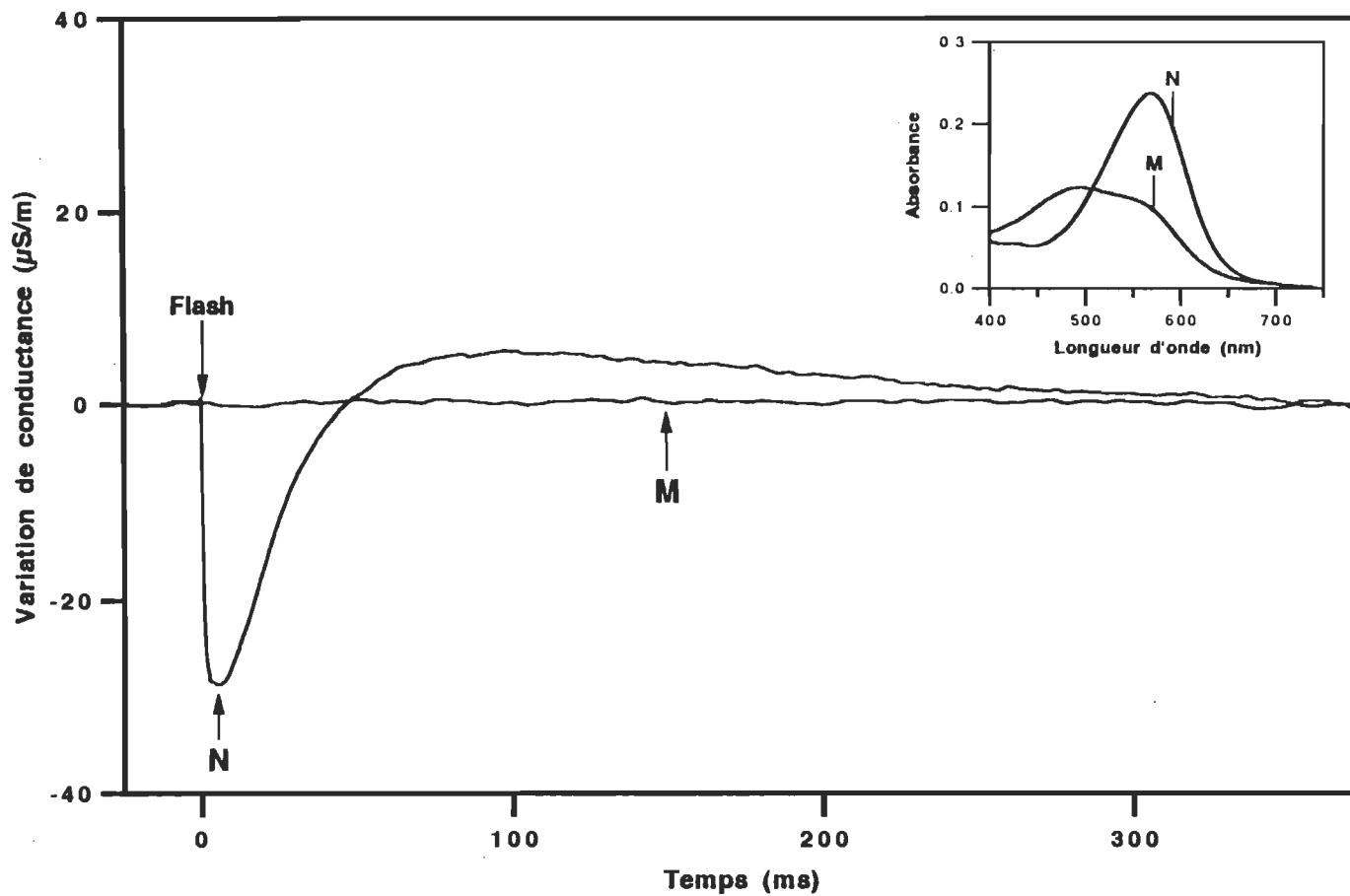


Figure 35 Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées, à température ambiante, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% (v/v) d'enflurane. L'échantillon de mesure étant constitué d'un petit gel polyacrylamide de membranes pourpres non-orientées (64.5 μM bR) placé dans une solution saline 1 mM NaCl. La figure périphérique montre les spectres d'absorption relevés avant (N) et après (M) la modification spectrale.

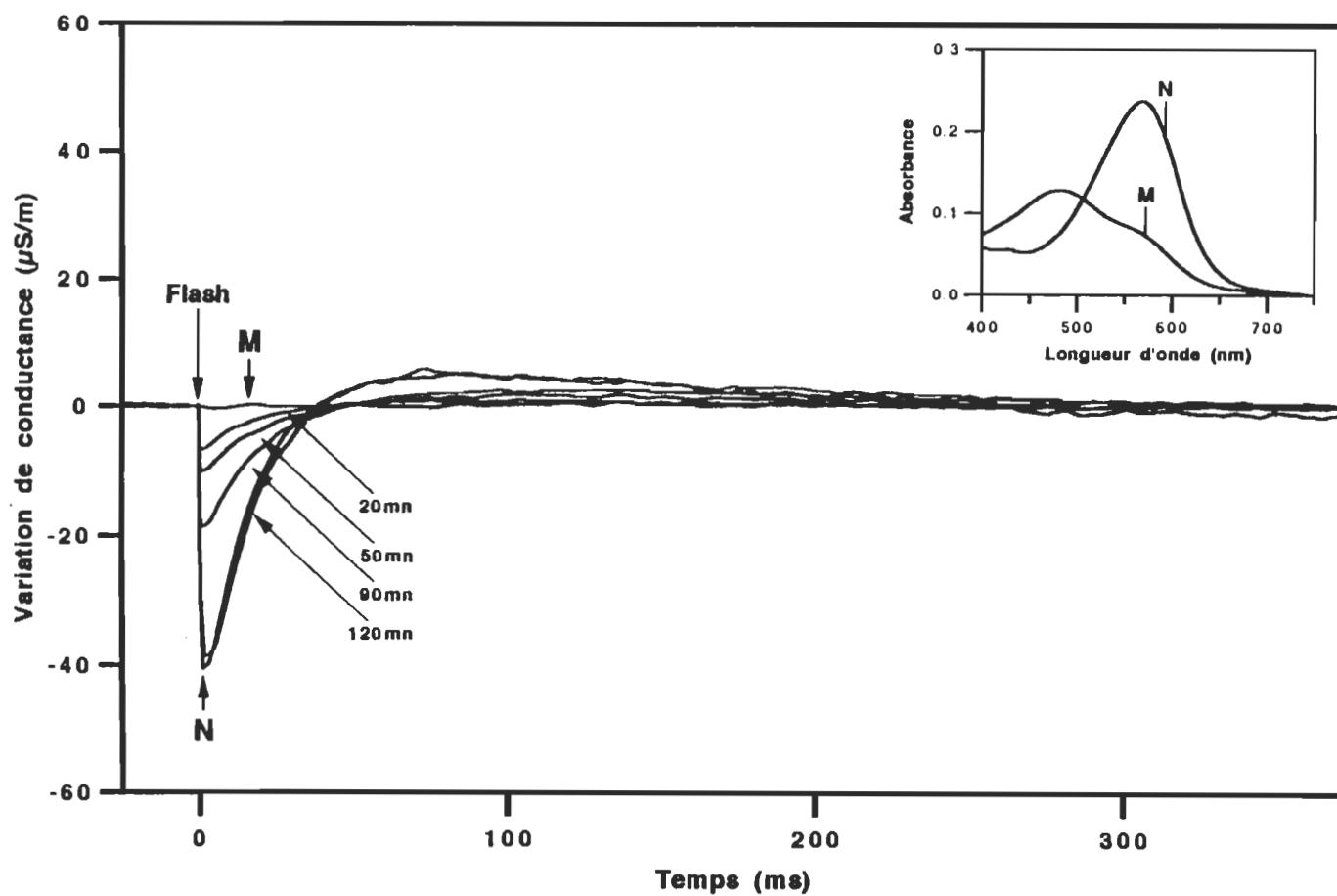


Figure 36 Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées, à température ambiante, pour les pigments natif (N) et modifié (M) par ajout de 2% d'enflurane. L'échantillon de mesure étant constitué d'un gel polyacrylamide renfermant des membranes non-orientées ($64.5 \mu\text{M}$ bR) ainsi que d'une solution tampon 1 mM Tris-HCl (pH = 8) et 1 mM NaCl. Les signaux de conductivité détectés après plusieurs temps d'évaporation de l'anesthésique (i.e., 20, 50, 90 et 120 minutes) sont également indiqués. La figure périphérique montre les spectres d'absorption mesurés avant (N) et après (M) la modification spectrale.

constitutives de chacune des traces illustrées sur les figures 34 à 36 sont rassemblés dans le Tableau 4. Ces constantes de temps ont été déterminées à l'aide d'une procédure d'analyse numérique identique à celle déjà adoptée pour les photocourants transitoires et les signaux optiques.

Après transformation du pigment pourpre en pigment rouge par traitement à l'enflurane (les spectres d'absorption présentés sur les trois figures illustrent bien le pourcentage de conversion du pigment initial), de nouvelles mesures de conductivité, effectuées dans les mêmes conditions expérimentales que ci-dessus, révèlent une absence totale de variation transitoire de la conductivité du milieu (traces désignées par la lettre M dans les figures 34 à 36). Ces données comparatives indiquent clairement que les déplacements ioniques à l'interface de la membrane sont fortement inhibés par induction de quantités substantielles du pigment bR₄₈₀. Bien entendu, ce résultat pourrait être raisonnablement argumenté par une modification importante du trajet intraprotéique emprunté par le proton qui fait que ce dernier reste complètement enfermé à l'intérieur de la membrane (i.e., pompé à l'intérieur de la bR). Pour mieux fonder cette hypothèse et tenter d'apporter une explication plus plausible et incontestable du phénomène, il est opportun de réaliser des mesures complémentaires de conductivité transitoire sur la forme bleue de la bactériorhodopsine, dont le maximum d'absorption se situe aux alentours de 610 nm [132], et de les comparer par après à celles effectuées sur la bR₄₈₀. En effet, il est aujourd'hui clairement établi que le pigment bleu, habituellement induit par déionisation de la membrane pourpre selon un mécanisme moléculaire encore mal déterminé, ne possède aucune activité de transport net de protons et constitue ainsi une pompe totalement

TABLEAU 4

Temps de relaxation des trois phases constitutives des signaux de conductivité présentés sur les figures 34, 35 et 36.

Conditions de mesure	PARTIE DU SIGNAL		
	Phase 1 (rapide)	Phase 2 (lente)	Phase 3 (très lente)
Eau pure	~ 2 ms	20.4 ms	380 ms
1 mM NaCl	558 µs	20 ms	220.75 ms
Tampon Tris-HCl 1 mM, pH 8 + 1 mM NaCl	454.7 µs	15.87 ms	270 ms

inefficace [133] (non déprotonation du rétinal durant le photocycle). Pour ce faire, le pigment bleu a d'abord été préparé en proportion significative (~90%) par dé-ionisation d'un échantillon de membranes pourpres non orientées et fixées dans un gel de polyacrylamide au moyen d'un champ électrique continu d'intensité élevée. Ensuite, des mesures de variation de la conductivité ont été effectuées en suivant le même protocole expérimental précédemment utilisé. Les données expérimentales présentées sur la figure 37 révèlent une absence complète du signal de conductivité et confirme ainsi, et selon toute attente, que la bactériorhodopsine bleue est un pigment qui est totalement inactif. De ce fait, et en combinant les résultats de conductivité précédents relatifs aux pigments rouge et bleu, il est donc facile de conclure que l'activité de pompage de protons de la forme bR_{480} se trouve considérablement réduite, et de là pratiquement inexisteante, par rapport à celle de la forme naturelle bR_{570} . Ce phénomène est également réversible puisque l'évaporation de l'enflurane, à l'air libre par exemple, régénère progressivement la forme originale de la bactériorhodopsine et restaure le profil initial du signal de conductivité. Aussi, la suspension du pigment bleu dans une solution saline de $CaCl_2$ régénère la forme pourpre de la bR ainsi que la forme normale du signal de conductivité (figure 37). La figure 36 montre aussi les profils du signal de conductivité enregistrés, sur le même échantillon, après 20, 50, 90 et 120 minutes d'évaporation.

5.4.2 Discussion

Comme nous venons de le voir, l'inhibition de la translocation des protons du pigment modifié de même que l'hypothèse précédemment émise

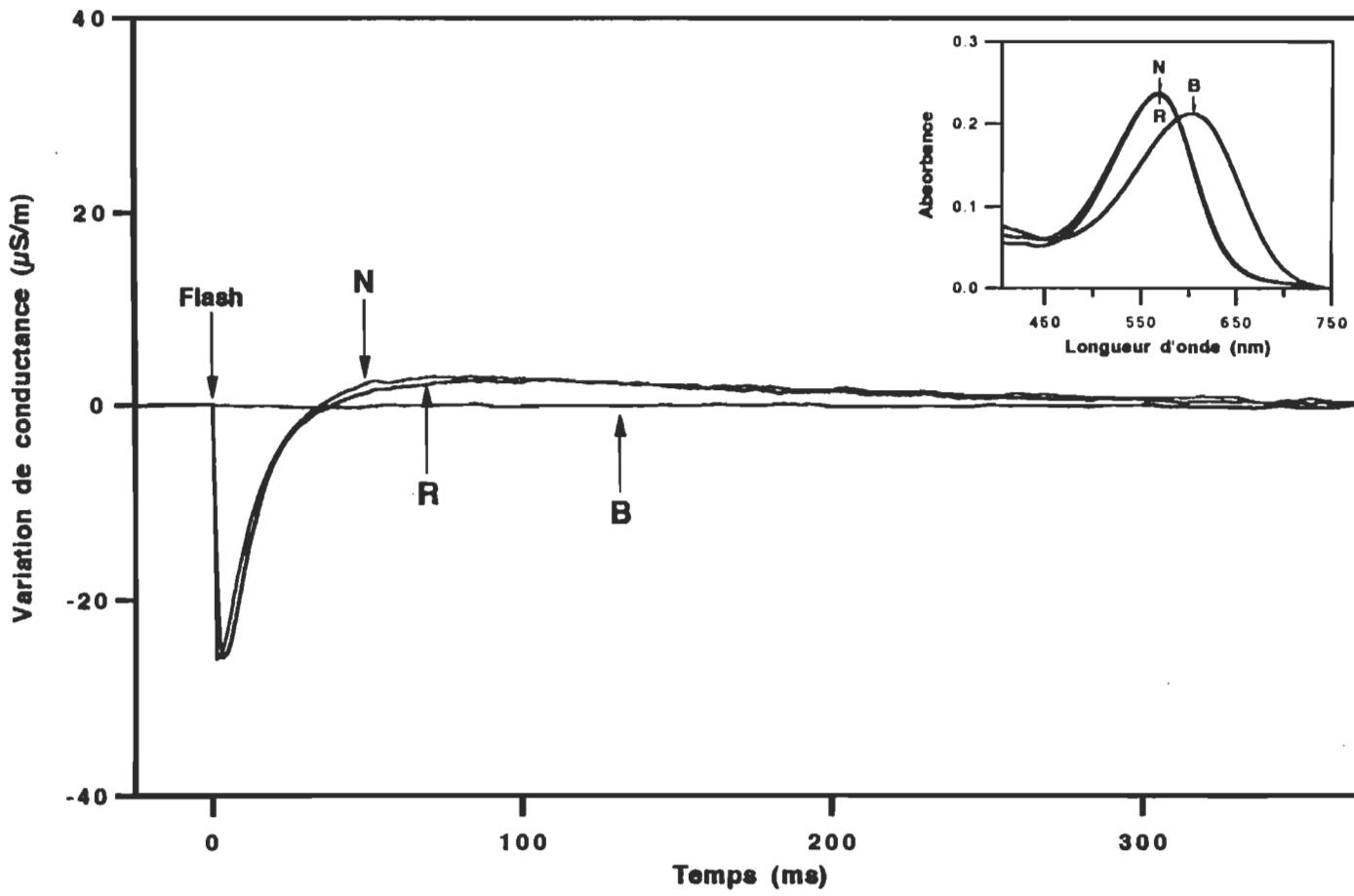


Figure 37 Variations transitoires de la photoconductivité électrique mesurées, à température ambiante, pour les pigments pourpre (N) et bleu (B). Les membranes non-orientées ($\sim 64.5 \mu\text{M}$ bR) sont immobilisées dans un gel polyacrylamide immergé dans une solution d'eau pure. Le signal de conductivité détecté après régénération complète du pigment pourpre est également indiqué (R). La figure périphérique représente les spectres d'absorption mesurés pour les pigments pourpre (N), bleu (B) et regénéré (R).

pour l'expliquer (5.3.3) sont de nouveau confirmées par les mesures de conductivité. En effet, la variation transitoire de la conductivité électrique de la solution reflète les perturbations de charges causées, au sein de la double couche électrique, par l'expulsion transitoire de protons en dehors de la membrane. Quand l'espèce bR₄₈₀ est formée, il y a disparition totale du signal de conductivité indiquant que la déprotonation du rétinal n'est pas suivie par l'apparition d'un proton à la surface de la membrane (figures 34 à 36). En fait, l'argumentation microscopique que nous avons proposée pour expliquer le profil général du signal de conductivité (quand il est détectable) repose en grande partie sur les travaux récemment effectués par le groupe d'Oesterhelt [50] et consiste en trois phénomènes ioniques différents. Brièvement, la libération rapide d'un proton³³ par la protéine entraîne une accumulation subséquente d'ions extérieurs à l'intérieur de la couche diffuse afin de contrebalancer l'excédent de charges positives; ce processus d'interface régit la première variation négative du signal de conductivité (première phase). Par la suite, une fois que le proton expulsé a développé sa propre couche d'hydratation (i.e., formation d'une entité globalement électroneutre), il devient apte à diffuser librement vers le centre de la solution aqueuse ; ceci constitue une interprétation potentielle de l'augmentation progressive du signal de conductivité vers sa valeur positive (deuxième phase). Enfin, la reprotonation lente du rétinal entraîne une diminution substantielle de la concentration de protons du côté cytoplasmique. Bien entendu, ce déficit de charge déclenche la migration de protons de remplacement de la solution extérieure vers le voisinage de la membrane ; ce

³³ Tout d'abord, il est digne de préciser ici que les protons éjectés sont d'une part soumis à une forte force de rappel exercée par le champ électrique local régnant à proximité de la membrane (couche compacte) et d'autre part ils subissent une série de transferts consécutifs tout au long de la surface membranaire (réactions d'ionisation de groupements polaires) ; ce qui donne lieu à un autre phénomène d'interface: la diffusion surfacique de protons [50,98].

phénomène correspond à la descente exponentielle du signal vers sa valeur initiale. La figure 38 illustre de façon schématique le modèle suggéré pour interpréter, au niveau microscopique, les variations de conductivité électrique mesurées. Enfin, la combinaison de l'argumentation précédente et des résultats en conductivité obtenus sur le pigment bleu permet de conclure que l'absence totale de signal de conductivité dans le cas du pigment rouge reflète bel et bien une inhibition considérable dans son activité de pompage de protons.

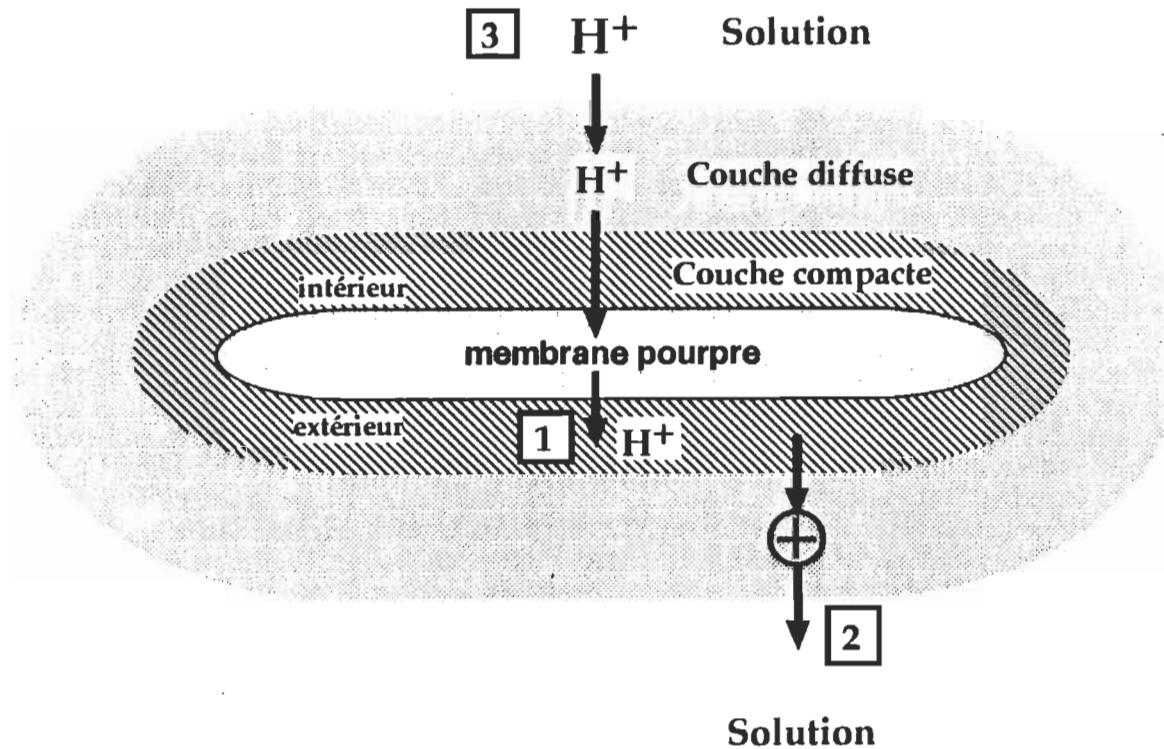


Figure 38 Illustration schématique du modèle proposé pour décrire les trois phases constitutives du signal de variation de la conductivité électrique du milieu. Couche compacte = couche formée par les ions adsorbés à la mp; couche diffuse = couche électrique formée par les ions hydratés.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

6.1 Discussion générale

En dépit des nombreuses constatations expérimentales et des argumentations attrayantes qui leurs ont été attribuées, il est encore impossible de définir de façon univoque le mécanisme moléculaire régissant l'interaction des molécules d'anesthésique avec la membrane pourpre. Il se pourrait que l'anesthésique volatil agisse surtout au niveau de la surface membranaire, à caractère polaire, pour réduire sa densité superficielle de charge, augmenter l'adsorption des contre ions voisins et ainsi éliminer sa couche de compensation ionique [134]. Un tel effet déshydratant des anesthésiques généraux pourrait être en accord avec certaines de nos données expérimentales, car il a déjà été démontré que la déshydratation directe de la membrane pourpre provoque une accélération du photocourant B_2 et une inhibition concomitante de l'activité de pompage de protons [86]. Cependant, en considérant le deuxième point de cette explication potentielle suggérée pour l'action des anesthésiques (i.e., augmentation du nombre de cations associés à la membrane), il devient impossible de rendre compte de la réduction importante du signal B_2 mesuré dans une solution 5 mM CaCl₂. D'autre part, la facilité des anesthésiques à rompre des liens hydrogène [135] ne peut pas non plus être considérée comme étant à l'origine de l'altération considérable que subit la pompe à protons du pigment bR₄₈₀. En effet, l'existence d'une telle réaction exigerait une intervention directe de l'anesthésique à l'intérieur du canal à protons tout près du rétinal ; or, la préservation d'interactions normales entre le rétinal et, au moins, les

acides aminés aromatiques avoisinants lors de la transition spectrale $bR_{570} \rightarrow bR_{480}$ [136] exclut totalement la présence d'un tel phénomène.

Enfin, il est essentiel de noter ici que l'occurrence de l'équilibre acido-basique entre les deux formes de la bactériorhodopsine ($bR_{570} \leftrightarrow bR_{480}$) peut être également catalysée par d'autres facteurs biochimiques tels que la délipidation complète de la membrane pourpre [63], la reconstitution de la bactériorhodopsine native dans des membranes modèles [48,64] ainsi que le traitement par des solvants organiques³⁴ [67]. De plus, il existe des différences mineures entre les structures tertiaires des formes bR_{480} induites par délipidation et par traitement à l'anesthésique [70,71]. D'autre part, les anesthésiques généraux dissous ont tendance à s'accumuler au voisinage de la surface membranaire et à pénétrer ensuite à l'intérieur de la phase lipidique (domaine des hydrocarbones) [68,137]. Dans ces conditions, il est donc facile de percevoir que la perturbation réversible de l'anesthésique, se traduisant par une conversion spectrale du pigment pourpre en pigment rouge ainsi que par une réduction très remarquable de l'efficacité de pompage normale, est en fait due à une destabilisation moléculaire qui prend essentiellement naissance au niveau du domaine hydrophobe de la membrane.

6.2 Conclusion

La bactériorhodopsine native, contenue dans la membrane pourpre, est une protéine photosensible qui sert à convertir l'énergie électromagnétique du rayonnement lumineux en énergie électrochimique sous forme d'un gradient de

³⁴ Le traitement des membranes pourpres par des anesthésiques ou par d'autres solvants organiques (alcanes, alcools, acétone, etc.) est un phénomène qui respecte bien la règle de solubilité des lipides, et ce de manière indépendante de l'orientation des fragments membranaires [67,74].

protons et d'un potentiel électrique transmembranaires. Lorsque le rétinal absorbe un photon visible, il déclenche une réaction photochimique cyclique qui se manifeste par l'apparition séquentielle de plusieurs états intermédiaires spectralement discernables. Ce photocycle réactionnel est normalement couplé à la translocation vectorielle d'un proton de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane pourpre. L'ajout d'anesthésiques volatils comme l'enflurane ou l'halothane à des échantillons de membranes pourpres engendre l'établissement d'un équilibre acido-basique entre les formes bR₅₇₀ et bR₄₈₀ de la bacteriorhodopsine. Cette transition spectrale est complètement réversible.

Tout au long de ce travail, on nous avons constaté que l'action d'un agent anesthésiant (enflurane ou halothane) sur la membrane pourpre se traduit par une modulation réversible des propriétés optiques et électriques de la bacteriorhodopsine native. Plus précisément, il a été clairement démontré que le pigment modifié bR₄₈₀ présente une activité photochimique complète comparable à celle du pigment naturel avec toutefois des particularités cinétiques et spectrales très spécifiques. Il possède également une activité photoélectrique propre qui est essentiellement marquée par une accélération du photocourant B₂, avec apparition d'une nouvelle composante rapide de ~0.6 μs, et un ralentissement très significatif du photocourant B₃. Par comparaison au photocycle normal, la vitesse de déprotonation du rétinal absorbant à 480 nm subit une accélération très notable ($\tau < 6 \mu s$), tandis que la réaction de reprotonation a été extrêmement ralentie et peut même s'effectuer sur une échelle de temps de plusieurs centaines de millisecondes. Cependant, notre constatation expérimentale la plus remarquable révèle que l'induction de la forme bR₄₈₀ par addition d'anesthésique produit une inhibition considérable de l'activité de pompage de protons. Ce résultat surprenant, établi à partir de mesures de photocourant et de photoconductivité

électrique, exprime donc que la conversion spectrale $bR_{570} \rightarrow bR_{480}$ s'accompagne au niveau moléculaire par un découplage entre l'activité photochimique du pigment et sa fonction de pomper efficacement des protons : inaktivité de la pompe.

À partir des connaissances actuelles, il est encore très difficile de concevoir un mécanisme précis et définitif régissant l'effet perturbateur des anesthésiques. Cependant, étant donné leur grande affinité à se dissoudre dans la partie hydrophobe de la membrane biologique, l'argumentation qui nous paraît la plus raisonnable et la plus vraisemblable pour expliquer les résultats obtenus repose principalement sur l'idée de la destabilisation des interactions lipides-protéine. En effet, nous pensons bien que la solubilisation de l'anesthésique dans la membrane augmente sensiblement sa fluidité causant ainsi une diminution substantielle de la pression latérale exercée sur la protéine par les lipides endogènes environnants. Ce phénomène conduit à un affaiblissement des interactions lipides-protéine et provoque ainsi une relaxation de la structure tertiaire de la bactériorhodopsine [64,71]. Cette décontraction de la protéine favoriserait la titration des acides aminés enfouis dans le canal à protons et entraînerait de ce fait la déprotonation de certains groupements stratégiques localisés à proximité du rétinal : formation de nouveaux sites négatifs ou électroneutres, et ce, dans un domaine de pH s'étendant du neutre aux valeurs modérément alcalines. Cette altération des propriétés spécifiques du canal à protons se traduit, d'une part, par un glissement du spectre d'absorption de la bactériorhodopsine vers le domaine ultra-violet (i.e., $570 \rightarrow 480$ nm) et, d'autre part, par une déprotonation encore plus rapide du rétinal (accélération des composantes B_1 et B_2).

Par ailleurs, l'infrastructure protéique nécessaire au bon fonctionnement de la pompe à protons étant maintenant très altérée, nous observons une grande inhibition de la mobilité des protons libres susceptibles de se déplacer à travers la membrane. En conséquence, nous assistons à une accélération de la réaction de déprotonation ainsi qu'à une atténuation de la charge électrique nette transportée dans le sens positif de la pompe (diminution très significative des aires relatives des photosignaux B_2 et B_3). En fin de compte, ces altérations mécanistiques sont à l'origine de la réduction considérable de l'activité de pompage de protons qui devient donc complètement découplée de l'activité photochimique associée. Vue sous cet aspect, la forme bR_{480} apparaît comme un pigment inactif en terme de pompage de protons mais possèdant toutefois une activité électrique propre. Cette dernière propriété ouvre ainsi la voie à son application dans des domaines comme la reconnaissance artificielle des couleurs, le filtrage ou la modulation optique bichromatique. Elle offre également de nouvelles perspectives pour tenter d'explorer le mécanisme moléculaire de pompage de protons.

RÉFÉRENCES

- [1] Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- [2] Dencher, N.A. (1983) The five retinal-protein pigments of halobacteria : bacteriorhodopsin, halorhodopsin, P 565, P 370, and slow-cycling rhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **38**, 753-767.
- [3] Kushner, D.J. (1968) Halophilic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **10**, 73.
- [4] Larsen, H. (1962) Halophilism. *in* I.C. Gunsalas and R.Y. Stanier (Eds.), *The bacteria : a treatise on structure and function*. New York, Academic Press, p. 297.
- [5] Larsen, H. (1967) Biochemical aspects of extreme halophilism. *Adv. Microb. Physiol.* **1**, 97.
- [6] Stoeckenius, W. and R.A. Bogomolni (1982) Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 587-616.
- [7] Wallace, B.A. (1982) Comparaison of bacteriorhodopsin and rhodopsin molecular structure. *in* L. Packer (Ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 88, Toronto, Academic Press, pp. 447-462.
- [8] Oesterhelt, C. and W. Stoeckenius (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature (London) New Biol.* **233**, 149-152.
- [9] Oseroff, A.R. and R.H. Callender (1974) Resonance Raman spectroscopy of rhodopsin in retinal disk membranes. *Biochemistry* **13**, 4243-4248.
- [10] Stoeckenius, W., R.H. Lozier and R.A. Bogomolni (1979) Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 215-278.
- [11] Kushner, D.J., S.T. Bayley, J. Boring, M. Kates and N.E. Gibbons (1964) Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem.* **10**, 483.
- [12] Stoeckenius, W. and R. Rowen (1967) A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *J. Cell. Biol.* **34**, 365.
- [13] Bogomolni, R.A. (1980) Conversion of light energy into a proton electrochemical potential by bacteriorhodopsin. *Bioelectrochem.* **25**, 83-95.

- [14] Oesterhelt, D. (1975) The purple membrane of *Halobacterium halobium* : A new system for light energy conversion. *in CIBA Found Symp. Energy Transform. in Biol. Syst.* **31**, 147-167.
- [15] Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2853-2857.
- [16] Nagle, J.F. and H.J. Morowitz (1978) Molecular mechanism for the proton transport in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 298-302.
- [17] Baribeau, Johanne (1987) Les interactions lipides-protéines dans la membrane pourpre : une approche analytique. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières.
- [18] Skulachev, V.P. (1976) Conversion of light energy into electric energy by bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **64**, 23-25.
- [19] Henderson, R. and P.N.T. Unwin (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature (London) New Biol.* **257**, 28-32.
- [20] Kates, M., S.C. Kushwaha and G.D. Sprott (1982) Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. *Meth. Enzymol.* **88**, 98-111.
- [21] Harvey-Girard, Érik (1990) Proton pumping by the 480 nm spectral form of bacteriorhodopsin. Master thesis in french, Université du Québec à Trois-Rivières.
- [22] Kimura, Y., M. Fujiwara and A. Ikegami (1984) Anisotropic electric properties of purple membranes and their change during the photoreaction cycle. *Biophys. J.* **45**, 615-625.
- [23] Keszthelyi, L. (1980) Orientation of membrane fragments by electric field. *Biochim. Biophys. Acta* **598**, 429-436.
- [24] Blaurock, A.E. and G.I. King (1977) Asymmetric structure of the purple membrane. *Science* **196**, 1101-1104.
- [25] Khorana, H.G., G.E. Gerber, W.C. Herlihy, C.P. Gray, R.J. Anderegg, K. Nihei and K. Biemann (1979) Amino acid sequence of bacteriorhodopsine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5046-5050.
- [26] Henderson, R., J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zenlin, E. Beckmann and K.H. Downing (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin base on high-resolutionelectron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929.

- [27] Kouryama, T., K. Kinoshita and A. Ikegami (1988) Structure and function of bacteriorhodopsin. *Adv. Biophys.* **24**, 123-175.
- [28] Oesterhelt, D., C. Bräuchle and N. Hampp (1991) Bacteriorhodopsin : a biological material for information processing. *Quarterly Rev. Biophys.* **24**(4), 425-478.
- [29] Hwang, S.B., J.I. Korenbrot and W. Stoeckenius (1977b) Structural and spectroscopic characteristics of bacteriorhodopsin in air-water interface films. *J. Membr. Biol.* **36**, 115-135.
- [30] Nakanishi, K., V. Balogh-Nair, M. Arnaboldi, K. Tsujimoto and B. Honig (1980) An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple colour. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7945-7947.
- [31] Liu, S.Y., T. Ebrey, J. Zingoni, R. Couch, J.-M. Fang and K. Nakanishi (1987) Fast photoelectric responses from artificial pigments of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **51**, 134a.
- [32] Pettei, M.J., A.P. Yudd, K. Nakanishi, R. Henselman and W. Stoecknus (1977) Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **16**, 1955.
- [33] Thomas, D.D. and L. Stryer (1980) Transverse location of the retinal chromophore of bacteriorhodopsin in the purple membrane. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **39**, 1847.
- [34] Bräuchle, C., N. Hampp and D. Oesterhelt (1991) Optical applications of bacteriorhodopsin and its mutated variants. *Adv. Mater.* **3**, 420-428.
- [35] Barabás, K., A. Dér, Zs. Dancsházy, P. Ormos, M. Marden and L. Keszthelyi (1983) Electro-optical measurements on aqueous suspension of purple membranes from *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* **43**, 5-11.
- [36] Heyn, M. P. (1977) Transient and linear dichroism studies on bacteriorhodopsin: Determination of the orientation of the 568 nm All-trans retinal chromophore. *J. Mol. Biol.* **117**, 607-620.
- [37] Hofrichter, J., E.R. Henry and R.A. Lozier (1989) Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane by time-resolved absorption spectroscopy. *Biophys. J.* **56**, 693-706.
- [38] Kuschmitz, D. and B. Hess (1981) On the ratio of the proton and photochemical cycles in bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **20**, 5950-5957.

- [39] Holz, M., M. Lindau and M.P. Heyn (1988) Distributed kinetics of the charge movements in bacteriorhodopsin : Evidence for conformational substates. *Biophys. J.* **53**, 623-633.
- [40] Nagle, J.F., L.A. Parodi and R.H. Lozier (1982) Procedure for testing kinetic models of the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **38**, 161-174.
- [41] Keszthelyi, L. (1988) Primary charge motions and light-energy transduction in bacteriorhodopsin. *Biophys. Chem.* **29**, 127-136.
- [42] Lanyi, L.K. (1993) Proton translocation mechanism and energetics in the light-driven pump bacteriorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1183**, 241-261.
- [43] Honig, B., T. Ebrey, R.H. Callender, U. Dinur and M. Ottolenghi (1979) Photoisomerisation, energy storage, and charge separation : A model for light energy transduction in visual pigments and bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2503-2507.
- [44] Trissl, H.-W. (1983) Charge displacements in purple membranes adsorbed to a heptane/water interface. Evidence for a primary charge separation in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **723**, 327-331.
- [45] Trissl, H.-W. and M. Montal (1977) Electrical demonstration of rapid light-induced conformational changes in bacteriorhodopsin. *Nature* **226**, 655-657.
- [46] Lozier, R.H., R.A. Bogomolni and W. Stoeckenius (1975) Bacteriorhodopsin : A light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* **15**, 955-962.
- [47] Drachev, L.A., A.D. Kaulen and V.P. Skulachev (1984) Correlation of photochemical cycle, proton release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **178**, 331-336.
- [48] Lozier, R.H., W. Neiderberger, R.A. Bogomolni, S.-B. Hwang and W. Stoeckenius (1976) Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, *Halobacterium halobium* cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **440**, 545-556.
- [49] Moran, A., E. Tal, E. Eytan and N. Nelson (1980) Study of proton pumps by phospholipid-impregnated millipore filters. *FEBS Lett.* **110**, 62-64.
- [50] Heberle, J., J. Riesle, G. Thiedemann, D. Oesterhelt and N.A. Dencher (1994) Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature* **37**, 379-382.

- [51] Trissl, H.-W. (1990) Photoelectric measurements of purple membranes. *Photochem. Photobiol.* **51**, 793-818.
- [52] Mathies, R.A., S.W. Lin, J.B. Ames and W.T. Pollard (1991) From femtoseconds to biology - Mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 491-518.
- [53] Gutman, M. and E. Nachliel (1990) The dynamic aspects of proton transfer processes. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 391-414.
- [54] Balashov, S.P. and T.G. Ebrey (1994) Bacteriorhodopsin : molecular mechanisms of transmembrane proton transfer. *The Spectrum* **7**(3), 1-9.
- [55] Scégé, J., A. Dér, L. Zimányi and L. Keszthelyi (1982) Restriction of motion of protein side chains during the photocycle of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7273-7277.
- [56] Keszthelyi, L. P. Ormos and Gy. Váró (1982) Fast components of the electric response signal of bacteriorhodopsin protein. *Acta Phys. Acad. Sci. Hung.* **53**, 143-157.
- [57] Dobler, B.J., W. Zinth, W, Kaiser and D. Oesterheld (1988) Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **144**, 215-220.
- [58] Groma, G.J., F. Raksi, G. Szabo and G. Varo (1988) Picosecond and nanosecond components in bacteriorhodopsin light-induced electric response signal. *Biophys. J.* **54**, 77-80.
- [59] Gavah, C., P. Seta and E. Bienvenue (1982) Photogenerated movement of protons through bacteriorhodopsin in relation to the analysis of photoelectrical responses. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **74**, 365-375.
- [60] Váró, G., L. Keszthelyi and L. Eisenstein (1987) The role of water in the proton pumping mechanism of bacteriorhodopsin. in Retinal Proteins, VNU Science Press, pp. 251-258.
- [61] Lukashev, e.P. and B. Robertson (1995) Bacteriorhodopsin retains its proton pumping function after being heated to 140°C. *Bioelectrochem. Bioenergetics* **37**, 157-160.
- [62] Baribeau, J. and F. Boucher (1985) Isolation, purification and partial characterisation of stable forms of monomeric bacteriorhodopsin in lauryl sucrose. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 305-312.
- [63] Baribeau, J. and F. Boucher (1987) Is the purple color of bacteriorhodopsin maintained by lipid-protein interactions? *Biochim. Biophys. Acta* **890**, 275-278.

- [64] Pomerleau, V., É. Harvey-Girard and F. Boucher (1995) Lipid-protein interaction in the purple membrane : structural specificity within the hydrophobic domain. *Biochim. Biophys. Acta* **1234**, 221-224.
- [65] Edholm, O., O. Berger and F. Jahnig (1995) Sturcture and fluctuations of bacteriorhodopsin in the purple membrane : A molecular dynamic study. *J. Mol. Biol.* **218**, 94-111.
- [66] Nishimura, S., T. Mashimo, K. Hiraki, T. Hamanaka, Y. Kitô and I. Yoshiya (1985) Volatile anesthetics cause conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **818**, 421-424.
- [67] Messaoudi, S., K.-H. Lee, D. Beaulieu, J. Baribeau and F. Boucher (1992) Equilibria between multiple spectral forms of bacteriorhodopsin. Effect of delipidation, anesthetics and solvents on their pH dependence. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 45-52.
- [68] Nakagawa, T., T. Hamanaka, S. Nishimura, T. Uruga and Y. Kito (1994) The specific binding site of the volatile anesthetic diiodomethane to purple membrane by X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* **238**, 297-301.
- [69] Henry, N., N. Beaudoin, J. Baribeau and F. Boucher (1988) Further characterization of anesthetic-treated purple membranes. *Photochem. Photobiol.* **47**, 85-90.
- [70] Messaoudi, S., I. Daigle and F. Boucher (1993) Structural features underlying the anesthetic-induced equilibrium between three spectral species of bacteriorhodopsin : bR₅₇₀, bR₄₈₀ and bR₃₈₀. *J. Mol. Struct.* **297**, 19-27.
- [71] Pande, C., R.H. Callender, J. Baribeau, F. Boucher and A. Pande (1989) Effect of lipid-protein interaction on the color of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 257-262.
- [72] Racker, E. (1973) A new procedure for reconstitution of biologically active phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **55**, 224-230.
- [73] Hwang, S.B. and W. Stoeckenius (1977) Purple membrane vesicles : morphology and proton translocation. *J. Membr. Biol.* **33**, 325-350.
- [74] Uruga, T., Y. Hamanaka, Y. Kitô, I. Uchida, S. Nishimura and T. Mashimo (1991) Effects of volatile anesthetics on bacteriorhodopsinin purple membrane, *Halobacterium halobium* cells and reconstituted vesicles. *Biophys. Chem.* **41**, 157-168.
- [75] Drachev, L.A., A.A. Jasaitis, A.D. Kaulen, A.A. Kondrashin, E.A. Liberman, I.B. Nemecek, S.A. Ostroumov, A. Yu. Semenov and V.P. Skulachev (1974a)

- Direct measurements of electric current by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin. *Nature* **249**, 321-324.
- [76] Hwang, S.B., J.I. Korenbrot and W. Stoeckenius (1977a) Transient photovoltages generated by charge displacements in intermediates of the bacteriorhodopsin photoreaction cycle. *in Bioenergetics of Membranes*, L. Packer, G.C. Papageorgiou, A. Trebst (Eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 137-145.
 - [77] Keszthelyi, L. and P. Ormos (1980) Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **109**, 189-193.
 - [78] Hwang, S.B., J.I. Korenbrot and W. Stoeckenius (1978) Transient photovoltages in purple membrane multilayers. Charge displacement in bacteriorhodopsin and its photointermediates. *Biochim. Biophys. Acta* **509**, 300-317.
 - [79] Keszthelyi, L. and P. Ormos (1989) Protein electric response signals from dielectrically polarized systems. *J. Membr. Biol.* **109**, 193-200.
 - [80] Hwang, S.B., J.I. Korenbrot and W. Stoeckenius (1977c) Proton transport by bacteriorhodopsin through an interface film. *J. Membr. Biol.* **36**, 137-158.
 - [81] Fahr, A., P. Läuger and E. Bamberg (1981) Photocurrent kinetics of purple-membrane sheets bound to planar bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* **60**, 51-62.
 - [82] Keszthelyi, L. and P. Ormos (1983) Displacement current on purple membrane fragments oriented in a suspension. *Biophys. Chem.* **18**, 397-405.
 - [83] Dér, A., P. Hargittai and J. Simon (1985) Time-resolved photoelectric and absorption signals from oriented purple membranes immobilized in gel. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 295-300.
 - [84] Liu, S.Y. and T.G. Ebrey (1988) Photocurrent measurements of the purple membrane oriented in a polyacrylamide gel. *Biophys. J.* **54**, 321-329.
 - [85] Váró, G. (1981) Dried oriented purple membrane samples. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **32**, 301-310.
 - [86] Váró, G. and L. Keszthelyi (1983) Photoelectric signals from dried oriented purple membranes of *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* **43**, 47-51.
 - [87] Bamberg, E., H.J. Apell, N.A. Dencher, W. Sperling, H. Stieve and P. Läuger (1979) Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes. *Biophys. Struct. Mech.* **5**, 277-292.

- [88] Blok, M.C. and K. Van Dam (1978) Association of bacteriorhodopsin-containing phospholipid vesicles withphospholipid-impregnated millipore filters. *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 48-61.
- [89] Blok, M.C., K.J. Hellingwerf and K. Van Dam (1977) Reconstitution of bacteriorhodopsin in a milipore filter system. *FEBS Lett.* **76**, 45-50.
- [90] Danscházy, Zs. and B. Harvaly (1976) Incorporation of bacteriorhodopsin into a bilayer lipid membrane : a photoelectric-spectroscopic study. *FEBS Lett.* **72**, 136-138.
- [91] Drachev, L.A., A.D. Kaulen, A. Yu. Semenov, I.I. Severina and V.P. Skulachev (1979) Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins. *Analyt. Biochem.* **96**, 250-262.
- [92] Drachev, L.A., A.D. Kaulen, S.A. Ostroumov and V.P. Skulachev (1974b) Electrogenesis by bacteriorhodopsin incorporated in a planar phospholipid membranes. *FEBS Lett.* **39**, 43-45.
- [93] Drachev, L.A., A.D. Kaulen, V.P. Skulachev and V.M. Voytsitsky (1982) Bacteriorhodopsin-mediated photoelectric responses in lipid/water systems. *J. Membr. Biol.* **65**, 1-12.
- [94] Herrmann, T.R. and G.W. Rayfield (1976) A measurement of the proton pump current generated by bacteriorhodopsin in black lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **443**, 623-628.
- [95] Herrmann, T.R. and G.W. Rayfield (1978) The electrical response to light of bacteriorhodopsin in planar membranes. *Biophys. J.* **21**, 111-125.
- [96] Boguslavsky, K.I., A.A. Kondrashin, I.A. Kozlov, S.T. Metelsky, V.P. Skulachev and A.G. Volkov (1975) Charge transfer between water and octane phases by soluble mitochondrial ATPase (F_1), bacteriorhodopsin, and respiratory chain enzymes. *FEBS Lett.* **50**, 223-226.
- [97] Taneva, S.G., N. Jordanova and I.B. Petnachin (1992) Electro-optical investigation of lipid-depleted purple membranes. *Biophys. Chem.* **44**, 91-97.
- [98] Alexiev, U., R. Mollaaghbab, P. Scherrer, H.G. Khorana and M.P. Heyn (1995) Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 372-376.
- [99] Toth-Boconadi, R., S. G. Taneva and L. Keszthelyi (1994) Non-proton ion release in purple membrane. *Biophys. J.* **67**, 2490-2492.

- [100] Marinetti, T. (1987a) Counterion collapse and the effect of diamines on bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **216**, 155-158.
- [101] Marinetti, T. (1987b) Abrupt onset of large scale nonproton ion release in purple membranes caused by increasing pH or ionic strength. *Biophys. J.* **51**, 875-881.
- [102] Marinetti, T. and D. Mauzerall (1983) Absolute quantum yields and proof of proton and nonproton transient release and uptake in photoexcited bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 178-180.
- [103] Feltham, A.M. and M. Spiro (1971) Platinized platinum electrodes. *Chem. Rev.* **71**, 177-193.
- [104] Simmeth, R. and G.W. Rayfield (1990) Evidence that the photoelectric response of bacteriorhodopsin occurs in less than 5 picoseconds. *Biophys. J.*, **57**, 1099-1101.
- [105] Davies, J.D. (1982) Mathematical methods for mathematicians, physical scientists and engineers. Ellis Horwood Limited.
- [106] Martin, J.L. and D.J. Maconochie (1989) The direct fitting of a differential equation to exponential data. *J. Physiol. (London)* **418**, 9P7.
- [107] Curtis, F.G. and P.O. Wheatley (1989) Applied numerical analysis. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.
- [108] Hamming, R.W. (1973) Numerical methods for scientists and engineers. McGraw-Hill, Inc.
- [109] Kincaid, D.R. and E.W. Cheney (1991) Numerical analysis : mathematics of scientific computing. Brooks/Cole Publishing, Inc.
- [110] Hayes and H.J. Geoffrey (1970) Numerical approximation to functions and data. The Athlone Press (London).
- [111] Press, W.H., S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling and B.P. Flannery (1992) Numerical recipes in fortran. Cambridge University Press.
- [112] Abramowitz, M. and I.A. Stegun (1970) Handbook of mathematical functions. Dover.
- [113] Mineur, H. (1966) Techniques de calcul numérique. Dunod, Paris.
- [114] Sansone, G. (1959) Orthogonal Functions. Interscience Publishers, Inc., New York.
- [115] Whittaker, E.T. and G.N. Watson (1984) A course of modern analysis. Cambridge University Press.

- [116] James, M.L., G.M. Smith and J.C. Wolford (1985) Applied numerical methods for digital computation. Harper & Row Publishers, Inc.
- [117] Golub, G.H. and V. Pereyra (1972) The differentiation of pseudo-inverse and nonlinear least squares problems whose variables separate. *SIMA J. Numerical Analysis* **10**, 413-432.
- [118] Colquhoun, D. (1971) Lectures on Biostatistics. Oxford, Clarendon Press.
- [119] Yeramian, E. and P. Claverie (1987) Analysis of multiexponential functions without hypothesis as to the number of components. *Nature* **326**, 169-174.
- [120] Mironov, S.L. (1991) A simple non-iterative procedure for fitting of multiexponential functions. *J. Neuroscience Methods* **38**, 243-246.
- [121] Clayden, N.J. (1992) Pade-Laplace analysis in the fitting of multi-exponential nuclear magnetic resonance relaxation decay curves. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **88**(17), 2481-2486.
- [122] Matheson, I.B.C. (1989) The non-equivalence of Pade-Laplace and non-linear least squares data fitting : a Pade-Laplace bias towards slower processes. *Computers Chem.* **13**, 385-386.
- [123] Liu, S.Y. (1990) Light-induced currents from oriented purple membrane I. Correlation of the microsecond component (B2) with the L-M photocycle transition. *Biophys. J.* **57**, 943-950.
- [124] Liu, S.Y., M. Kono and T.G. Ebrey (1991) Effect of pH buffer molecules on the light-induced currents from oriented purple membrane. *Biophys. J.* **60**, 204-216.
- [125] Liu, S.Y., R. Govindjee and T. Ebrey (1990) Light-induced currents from oriented purple membrane II. Proton and cation contributions to the photocurrent. *Biophys. J.* **57**, 951-963.
- [126] Butt, H.J., K. Fendler, E. Bamberg, J. Tittor and D. Oesterhelt (1989) Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump. *EMBO J.* **8**, 1657-1663.
- [127] Kono, M., S. Misra and T.G. Ebrey (1993) pH dependence of light-induced proton release by bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **331**, 31-34.
- [128] Ormos, P., S. Hristova and L. Keszthelyi (1985) The effect of pH on proton transport by bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **809**, 181-186.
- [129] Heberle, J., D. Oesterhelt and N. Dencher (1993) Decoupling of photo- and proton cycle in the Asp85→Glu mutant of bacteriorhodopsin. *EMBO J.* **12**, 3721-3727.

- [130] Balashov, S.P., R. Govindjee, M. Kono, E. Imasheva, E. Lukashev, T.G. Ebrey, E.K. Crouch, D.R. Menick and Y. Feng (1993) Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark adaptation, proton release, and the photochemical cycle. *Biochemistry* **32**, 10331-10343.
- [131] Govindjee, R., M. Kono, S.P. Balashov, E. Imasheva, M. Sheves and T.G. Ebrey (1995) Effects of substitution of tyrosine 57 with asparagine and phenylalanine on the properties of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **34**, 4828-4838.
- [132] Mowery, P.C., R.H. Lozier, Q. Chae, Y.-W. Tseng, M. Taylor and W. Stoeckenius (1979) Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **18**, 4100-4107.
- [133] Drachev, L.A., A.D. Kaulen, L.V. Khitrina and V.P. Skulachev (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **117**, 461-470.
- [134] Ueda, I. (1991) Interfacial effects of anesthetics on membrane fluidity. *in* Drug and Anesthetic effects on membrane structure and function. R.C. Aloia, C.C. Curtain and L.M. Gordon, editors, Wiley-Liss, New York, 1-33.
- [135] Sandorfy, C. (1978) Intermolecular interaction and anesthesia. *Anesthesiology* **48**, 357-359.
- [136] Lee, K.-H., A.R. McIntosh and F. Boucher (1991) The interaction between halogenated anesthetics and bacteriorhodopsin in purple membranes as examined by intrinsic ultraviolet fluorescence. *Biochem. Cell Biol.* **69**, 178-184.
- [137] Barber, J., J.F. Ellena and D.S. Cafiso (1995) Distribution of general anesthetics in phospholipid bilayers determined using ^2H NMR and ^1H - ^1H NOE spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 6533-6539.