

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

SALIM MESSAOUDI

PHÉNOMENOLOGIE ET ASPECT STRUCTURAL DE L'ÉQUILIBRE
ENTRE QUATRE FORMES SPECTRALES DE LA BACTÉRIORHODOPSINE
TEL QU'INFLUENCÉ PAR LES ANESTHÉSIQUES ET LES SOLVANTS

NOVEMBRE 1991

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.

"Oui, dans la création des cieux et de la terre, et dans l'alternance de la nuit et du jour, et dans le navire qui vogue en mer chargé de profits pour les gens, et dans l'eau que Dieu fait descendre du ciel, par quoi Il rend vie à terre une fois morte et y répand des bêtes de toute espèce, et dans la variation des vents, et dans le nuage contraint de rester entre ciel et terre, il y a des signes, certes, pour des hommes doués d'intelligence."

(Coran: 2, 164)

RÉSUMÉ

La bactériorhodopsine existe en équilibre acido-basique entre quatre formes spectrales dont les λ_{max} sont respectivement à 605, 570, 460 et 380 nm. Le pK_a apparent de ces formes spectrales dans la membrane pourpre native est comparable à celui de la bactériorhodopsine délipidée et à celui des membranes pourpres traitées par les anesthésiques. En absence de solvatation appropriée (ou de protection) par les lipides, l'intervalle de pH dans lequel s'effectuent ces transitions spectrales est fortement réduit. En plus des anesthésiques halogénés généraux, il existe d'autres molécules liposolubles qui peuvent reproduire les mêmes effets. Une série de solvants organiques usuels tel que l'acétone, les alcools et les alcanes peuvent mimer les effets des anesthésiques. On propose qu'ils agissent sur la phase lipidique. Une fois la bicouche lipidique perturbée, elle permettra aux ions de la solution de passer au travers de la membrane et de venir près du chromophore; ainsi les ions agissent sur les dipôles entourant le rétinal comme un interrupteur qui règle le passage d'une forme spectrale à une autre.

Nos résultats et l'interprétation que nous en faisons nous permettent de proposer un mécanisme d'action des anesthésiques, on pense qu'il est le même pour toutes les cellules: Si on arrive par n'importe quel moyen à éliminer (ou à affaiblir) le gradient ionique de la membrane, on arrive ainsi à éliminer (ou à affaiblir) la propagation de l'influx nerveux. On pense, que c'est ce qui se passe réellement lorsqu'on utilise des anesthésiques (ou des solvants); ces derniers vont se dissoudre dans la membrane et ainsi augmenter sa fluidité, ce qui se traduit par une diffusion transmembranaire des ions; le gradient ionique ainsi éliminé (ou affaibli), provoque une anesthésie (ou une analgésie).

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent principalement à mon directeur de thèse, le professeur François Boucher, pour son aide désintéressée, sa patience illimitée et ses conseils pertinents, sans oublier son aide financière qui m'a permis de mener à bien cette recherche.

Je remercie également mon co-directeur le Dr Heidar-Ali Tajmir-Riahi avec qui j'ai fait mes premiers pas dans le monde merveilleux de l'infrarouge.

Enfin, je remercie tous ceux et celles qui ont collaboré de près ou de loin à ces travaux.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTES DES FIGURES.....	viii
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION	1
1.1. Ce qu'on sait sur les anesthésiques.....	1
1.1.1. Règle de Meyer-Overton.....	2
1.1.2. Spécificité du site.....	3
1.2. La membrane pourpre comme modèle biologique ?	4
1.2.1. Structure de la membrane pourpre	4
1.2.1.1. Structure de la bactériorhodopsine.....	6
1.2.1.2. Les lipides de la membrane pourpre.....	6
1.2.2. Photochimie.....	6
1.2.3. Biochimie de la bactériorhodopsine : la modernité : la mutation dirigée	9
1.2.3.1. Substitutions d'acides aminés qui affectent le chromophore de la bactériorhodopsine.....	11
1.2.3.2. Substitutions qui affectent le pompage de protons.....	11
1.3. Les anesthésiques généraux et la membrane pourpre	12
1.4. Les anesthésiques locaux et la membrane pourpre.....	13
1.5. Génération de la bR480 par des procédés autres que l'addition d'anesthésiques	14
1.6. Cadre et objet du travail.....	16

	Page
II. MATERIEL ET MÉTHODES EXPERIMENTALES.....	19
2.1. Culture et récolte des bactéries	19
2.1.1. Pré-inoculation et inoculation.....	19
2.1.2. Induction de la membrane pourpre	20
2.1.3. Récolte des bactéries et conservation des souches bactériennes	20
2.2. Préparation de la membrane pourpre	21
2.2.1. Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires.....	21
2.2.2. Purification de la membrane pourpre.....	22
2.3. Techniques spectroscopiques	22
2.3.1. Spectroscopie infrarouge	22
2.3.1.1. Le spectrophotomètre infrarouge.....	22
2.3.1.2. Les spectres infrarouges.....	23
2.3.1.2.1. Enregistrement des spectres infrarouges.....	23
2.3.1.2.2. Préparation des échantillons.....	23
2.3.2. Spectroscopie d'absorption.....	23
2.3.2.1 Spectrophotomètre ultraviolet et visible.....	23
2.3.2.2. Préparation des échantillons.....	23
2.4. Fabrication de la cellule.....	24
2.5. Effet du pH sur l'action des anesthésiques	24
2.6. Effet de l'humidité.....	24
2.7. Produits chimiques.....	25
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	27
3.1. Echantillons utilisés au cours de ce travail.....	27
3.1.1. Activité photochimique des films de membrane pourpre.....	29
3.1.2. Spectres infrarouge des films de membrane pourpre.....	29
3.1.3. Discussion.....	33

	Page
3.2. Réactivité de la membrane pourpre face aux anesthésiques.....	40
3.2.1. Membrane pourpre en suspension aqueuse.....	40
3.2.2. Membrane pourpre en film.....	40
3.2.2.1. Effet de l'humidité.....	40
3.2.3. Spectres infrarouge des formes 570, 480 et 380 de la membrane pourpre	40
3.2.4. Comparaison de la forme 380 nm de la bR avec le pigment dénaturé.....	45
3.2.4.1. Dénaturation thermique des membranes pourpres	45
3.2.4.2. Dénaturation de la membrane pourpre par des solvants organiques.....	50
3.2.5 Discussion.....	53
3.3. Génération réversible de différentes formes spectrales de bactériorhodopsine par addition de solvants organiques aux membranes pourpres	56
3.3.1. Acétone et alcools.....	56
3.3.2 Règle de Meyer-Overton.....	60
3.3.3. Effet du pH	62
3.3.3.1. Effet du pH sur l'action de l'acétone.....	62
3.3.3.2. Effet du pH sur l'action des alcools.....	64
3.4.4. Effet du pH sur l'action des alcanes	66
3.4.4.1. Pourquoi les alcanes	66
3.4.4.2. Effet du pH	66
3.5. Discussion.....	68
IV. DISCUSSION GENERALE.....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	80

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1 : Structure de la membrane pourpre native projetée sur le plan de la membrane.....	5
Figure 1.2 : Structure de la bactériorhodopsine avec la séquence des acides aminés.....	7
Figure 1.3 : Structures des principaux lipides polaires.....	8
Figure 1.4 : Structure du rétinal dans sa forme tout-trans et cycles photochimiques de la bR adaptée à la lumière et à l'obscurité.....	10
Figure 1.5 : Equilibres acido-basiques entre différentes formes spectrales de suspensions de membranes pourpres	18
Figure 2.1 : Cellule d'aluminium pour mesures spectroscopiques	26
Figure 3.1 : Spectre d'absorption de la membrane pourpre adaptée à la lumière.....	28
Figure 3.2 : Spectre d'absorption d'un film sec de membrane pourpre.....	30
Figure 3.3 : Spectre infrarouge entre 1000 et 3500 cm ⁻¹ d'un film sec de membrane pourpre.....	32
Figure 3.4 : Spectre infrarouge entre 1000 et 1800 cm ⁻¹ d'un film sec de membrane pourpre.....	34
Figure 3.5 : Spectres infrarouge entre 1000 et 3500 cm ⁻¹ , d'un film sec de membrane pourpre adapté à la lumière (AL), du même film, mais adapté à l'obscurité (AO) et enfin le spectre de différence	35
Figure 3.6 : Spectres infrarouge entre 1000 et 3500 cm ⁻¹ de films de membrane pourpre équilibrés à différents pourcentages d'humidité.....	37
Figure 3.7 : Spectre infrarouge entre 1000 et 3500 cm ⁻¹ d'un film sec d'albumine bovine.....	38

	Page
Figure 3.8 : Spectres d'absorption de 6.9 mM de bactériorhodopsine suspendue dans un tampon Tris-HCl, 50 mM (pH=8.0) en présence de concentrations croissantes d'anesthésiques.....	41
Figure 3.9 : Spectres représentant l'effet de l'Enflurane sur des films sec et humide de membrane pourpre.....	43
Figure 3.10 : Spectres infrarouge entre 1000 et 3500 cm ⁻¹ de films équilibrés à 56% d'humidité des formes bR570, bR480 et bR380.....	46
Figure 3.11 : Spectres infrarouge entre 1480 et 1730 cm ⁻¹ de films de membrane pourpre dénaturée thermiquement.....	48
Figure 3.12 : Spectres infrarouge entre 1480 et 1730 cm ⁻¹ de films de membrane pourpre après traitement avec différents solvants organiques.....	51
Figure 3.13 : Spectres infrarouge entre 1480 et 1730 cm ⁻¹ de films après obtenus traitement de la membrane pourpre avec l'acétone.....	54
Figure 3.14 : Effet de l'acétone sur la membrane pourpre.....	58
Figure 3.15 : Réversibilité de l'effet de l'acétone.....	59
Figure 3.16 : Conversion de la bR570 en bR480 suivant l'addition progressive d'éthanol.....	61
Figure 3.17 : Relation de Meyer-Overton	63
Figure 3.18 : Membrane pourpre acide à pH=0.3 traitée avec de l'acétone.....	65
Figure 3.19 : Membrane pourpre traitée par l'hexane à différents pH.....	67
Figure 3.20 : Les courbes de titrages des différentes formes spectrales de la bactériorhodopsine.....	73

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Ce qu'on sait sur les anesthésiques

Parler des anesthésiques sans mentionner l'opium, revient à ignorer une partie très importante de l'histoire de l'anesthésie et des anesthésiques. Les origines de l'opium et de son utilisation comme analgésique central (i.e. il influe positivement sur les interrupteurs morphiniques du système nerveux et bloque de ce fait la transmission de la douleur vers les centres, d'où sa dénomination de "central") se perdent dans la nuit des temps. Par texte cunéiforme interposé (tablettes de Nippur), on peut faire remonter la connaissance de ses propriétés antidouleur aux origines de Sumer, soit quarante siècles avant Jésus-Christ. Mais ses rapports avec la chirurgie sont plus difficiles à rétablir. Les Egyptiens de l'antiquité s'en servaient-ils déjà pour leurs interventions? La complexité et la finesse de leurs techniques chirurgicales ne sauraient aller de pair avec une trop grande agitation du patient et laissent à penser qu'ils maîtrisaient un moyen de supprimer la douleur. Autant qu'on en puisse juger, il s'agissait plutôt d'une forme d'anesthésie locale que procurait la "pierre de Memphis" réduite en poudre. Pour certains, cette pierre serait tout simplement du marbre; attaqué par un acide, il libère du gaz carbonique; celui-ci, en solution aqueuse, devient l'acide carbonique et se comporte en anesthésique local.

En revanche, l'utilisation d'analgésiques centraux est certaine en ce qui concerne la chirurgie musulmane. On retrouve dans le Canon d'Avicenne, somme de connaissances médicales du XI^e siècle après Jésus-Christ, des recettes alliant sédatifs et analgésiques, comme par exemple l'association d'extraits de mandragore et de sirop d'opium. Avicenne pratiquait ses interventions sous une véritable anesthésie générale de profondeur et de durée variable qui prenait en compte la gravité et la longueur de l'acte opératoire. Profondeur et durée étaient modulées par la nature et la quantité de préparations qu'on faisait ingérer à l'opéré.

William Thomas Green Morton, dentiste à Boston (Massachusetts), entrait dans l'histoire en 1844 après avoir réalisé l'anesthésie générale par inhalation de gaz. L'anesthésie générale à l'éther, au gaz hilarant, puis au chloroforme, connaît dès

lors une foudroyante carrière. En 1884, Carl Koller montrait la possibilité d'opérer les yeux sans douleur en y instillant une solution de cocaïne, les anesthésies purement locales qui n'entraînent aucune modification de la vigilance prirent un essor irrésistible (Brès 1988).

Aujourd'hui on dénombre par centaines les anesthésiques utilisés en poste opératoire et l'anesthésie générale peut maintenant être provoquée avec un grand degré de fiabilité grâce à l'arsenal chimique, électronique et mécanique dont disposent les anesthésistes. Cependant, le mécanisme précis de l'action des agents qui induisent cette anesthésie (analgésie et inconscience) fait encore l'objet de controverses et de recherches.

1.1.1. Règle de Meyer-Overton

La plus ancienne des hypothèses concernant le site d'action des anesthésiques est celle connue sous le nom d'unité hydrophobe. Selon cette hypothèse l'action de l'agent anesthésiant prend place dans les parties hydrophobes de la bicouche lipidique des membranes neuronales, et se résume à une mobilisation des lipides membranaires due aux propriétés de solvant de l'anesthésique. Ainsi, les interactions anesthésique/membrane impliquées sont les mêmes pour tous les anesthésiques. L'hypothèse de l'unité hydrophobe est issue de la règle de Meyer-Overton, qui établit une bonne corrélation entre la solubilité des agents anesthésiants dans les lipides et le potentiel anesthésiant. La règle de Meyer-Overton a vu le jour à la fin du 19^e siècle (Meyer 1899; Overton 1901; Meyer 1937) et depuis lors, elle a été raffinée et complétée par plusieurs chercheurs (Krantz et Rudo, 1966; Larsen, 1969; Rudo et Krantz, 1974; Hansch et al., 1975; Davies et al., 1974, 1976). Cependant, cette hypothèse a connu beaucoup de critique. Franks et Lieb en 1982 et 1987 ont résumé les plus forts arguments contre l'exclusivité de la théorie lipidique. Leurs principaux arguments concernent l'aspect quantitatif. En utilisant la diffraction des rayons X et des neutrons, ils ont démontré qu'à des concentrations cliniques d'anesthésique, la perturbation de la bicouche lipidique n'était pas mesurable et ceci reste vrai même à des concentrations d'anesthésique significativement élevées. La croissance de la fluidité de la bicouche lipidique qui accompagne l'incorporation d'anesthésiques est très petite comparativement à ce que peut produire l'augmentation de la température par 1°C (Boggs et al. 1976; Pang et al. 1980; Lieb et al. 1982). Il existe aussi d'autres phénomènes qui ne peuvent être expliqués à partir de la théorie lipidique et ainsi ils

présentent des exceptions à la règle. Par exemple, le n-décane et le n-décanol sont tous les deux fortement solubles dans les lipides. Cependant, si le décanol a un fort potentiel anesthésiant, le décane n'en a aucun. Les alcanes ont un potentiel anesthésiant qui augmente avec la longueur de la chaîne carbonée, mais ce caractère anesthésiant sera perdu pour les alcanes supérieurs (Mullins, 1971 et ses références), ce phénomène est perceptible à partir du nonane. C'est tout le mystère du "cut-off". Il en est de même pour les alcools. En augmentant le nombre des groupes CH₂ dans les n-alcools, le potentiel anesthésiant augmente jusqu'au 12^e carbone; cependant, le potentiel chute à zéro pour le tétradécanol et les alcools supérieurs, bien que ces alcools supérieurs continuent à se dissoudre dans la bicouche lipidique (Franks et Lieb 1986; Requena et Haydon 1985). Cependant, le plus grand handicap de cette théorie est qu'elle reste muette sur le mécanisme d'action des anesthésiques.

1.1.2. Spécificité du site

Bien que la seconde hypothèse attribue le site d'action des anesthésiques à une région hydrophobe, elle stipule qu'il est spécifique par sa taille et par son emplacement. Selon cette théorie, la bicouche lipidique n'est pas la première cible des agents anesthésiants mais c'est une poche hydrophobe de structure et de taille bien définis, se trouvant sur les protéines membranaires (Adey et al. 1976; Middleton et Smith, 1976; Franks et al. 1978). Pour démontrer cela, Franks et Lieb (1985, 1986, Moss et al. 1991) utilisent la luciférase. L'émission de la lumière par la luciole (qui est liée à l'interaction luciferase/luciferine) est affectée par les anesthésiques généraux (les hydrocarbures, les alcools, les cétones, les esters, les hydrocarbures halogénés...) de la même façon que dans les membranes nerveuses; actuellement, il existe un frappant parallélisme entre la suppression de l'émission de la lumière par les lucioles et l'anesthésie. Les expériences sur la luciférase complètement délipidée suggèrent que le lien d'attache des anesthésiques est une poche amphiphilique de la protéine de dimension bien définie. Ces résultats peuvent donner une explication naturelle pour les effets du cut-off observés dans le cas des alcanes et des alcools. Selon cette théorie, en plus de la solubilité dans les lipides, le facteur déterminant pour créer l'anesthésie est l'espace disponible dans les poches hydrophobes des protéines. Cependant, on peut reprocher à cette théorie que l'anesthésique (alcano, alcool...) ajouté à la luciférase délipidée n'a qu'un seul choix : c'est celui d'aller s'insérer dans la partie la

plus hydrophobe de la luciférase, vu que cette dernière se trouve toute seule dans le milieu étudié.

1.2. La membrane pourpre comme modèle biologique ?

Afin de discriminer entre les deux hypothèses précédentes et de proposer un éventuel mécanisme d'action des anesthésiques, on a choisi comme modèle biologique la membrane pourpre. Ce choix est fondé sur les considérations suivantes:

- a) Complexité du système nerveux : Le système nerveux assure le contrôle de toutes les fonctions de l'organisme. Dans sa fonction de régulation, il s'avère d'une complexité exceptionnelle. C'est pourquoi l'étude directe des effets des anesthésiques sur ce dernier est pratiquement impossible.
 - b) La "simplicité" de la membrane pourpre : Comparée au système nerveux ou à des cellules nerveuses, la membrane pourpre possède une structure relativement simple. Elle possède une protéine unique la bactériorhodopsine.
 - c) Sa réactivité avec les anesthésiques : La membrane pourpre n'est pas insensible face aux anesthésiques. Les effets produits par les agents anesthésiants sont détectables directement par des méthodes spectroscopiques telle que la spectroscopie UV-visible.

1.2.1. Structure de la membrane pourpre

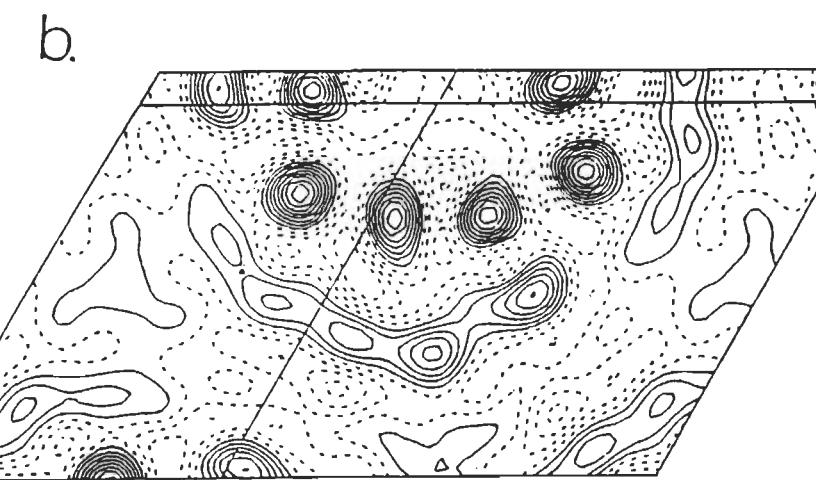
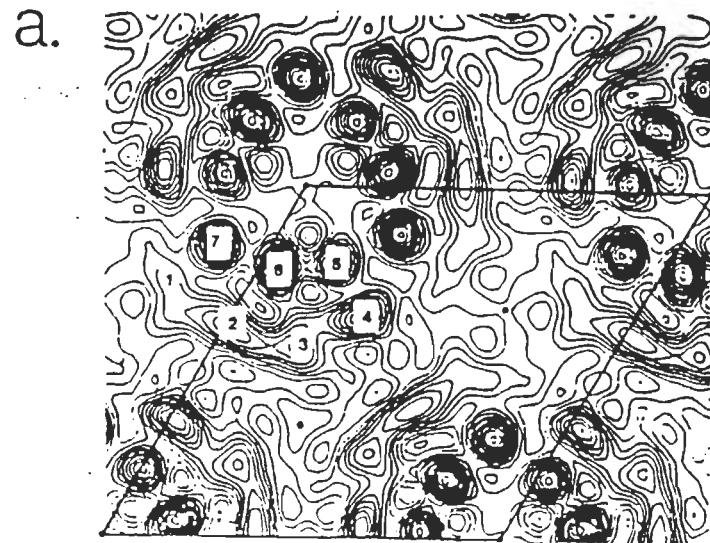


Figure 1.1 : Structure de la membrane pourpre native projetée sur le plan de la membrane. Chaque bR dans le trimère possède trois hélices α à l'intérieur et quatre à l'extérieur. a) Unwin et Henderson en 1975 avec une résolution de 7 Å. b) Ceska et Henderson en 1990 avec une résolution de 14-6.5 Å.

1.2.1.1. Structure de la bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine transmembranaire de 26 kD contenant 248 acides aminés (Ovchinnikov et al., 1979; Khorana et al., 1979; Dunn et al., 1981). Elle est constituée principalement de 7 hélices α qui traversent de part et d'autre la membrane plasmique (Unwin et Henderson, 1975). Le côté N-terminal est exposé à la surface extracellulaire et le côté C-terminal est à la surface cytoplasmique (Wallace 1982). La position du chromophore dans la membrane semble être à environ 10 Å de la face cytoplasmique (Thomas et Stryer 1980) où le rétinal est lié à la lysine 216 de la bactériorhodopsine (Katre et al. 1981) par formation d'un lien aldimine protoné (C=N) ou base de Schiff entre le dernier carbone du rétinal et le groupement aminé de la lysine (Fig. 1.2).

1.2.1.2. Les lipides de la membrane pourpre

Dans la nature, toutes les membranes biologiques sont constituées d'une bicoche lipidique. La majeure partie de ces lipides se trouvent dans presque la totalité des membranes, sauf que dans la membrane pourpre on trouve un glycolipide spécifique à cette dernière. Les lipides polaires qui constituent 90 % de la totalité des lipides dérivent tous d'un diether de glycérol dans lequel les chaînes hydrocarbonées sont des groupements phytanyl: 2,3-di-O-phytanyl-sn-glycérol. Le groupement phytanyl est une chaîne saturée composée de quatre unités isoprène. Les phospholipides majeurs sont des analogues du diphytanyl glycérol éther de phosphatidyl glycérophosphate (I), phosphatidyl glycérol (II), et phosphatidyl glycérosulfate (III) (Fig. 1.3). Les lipides neutres sont constitués principalement de squalène, dihydro et tétrahydrosqualène, vitamine MK-8, diphytanyl glycérol éther et de pigments variés.

1.2.2. Photochimie

La bR présente deux formes stables : une forme adaptée à la lumière (AL) et une forme adaptée à l'obscurité (AO). La forme adaptée à la lumière a un λ_{max} à 568 nm et contient un rétinal tout-trans (98% tout-trans). Par contre, la forme adaptée à l'obscurité est un mélange de tout-trans et 13-cis rétinal, dans un rapport respectif 66-67% et 33-34% c-à-d dans un rapport respectif de 2:1 (Scherrer et al., 1989).

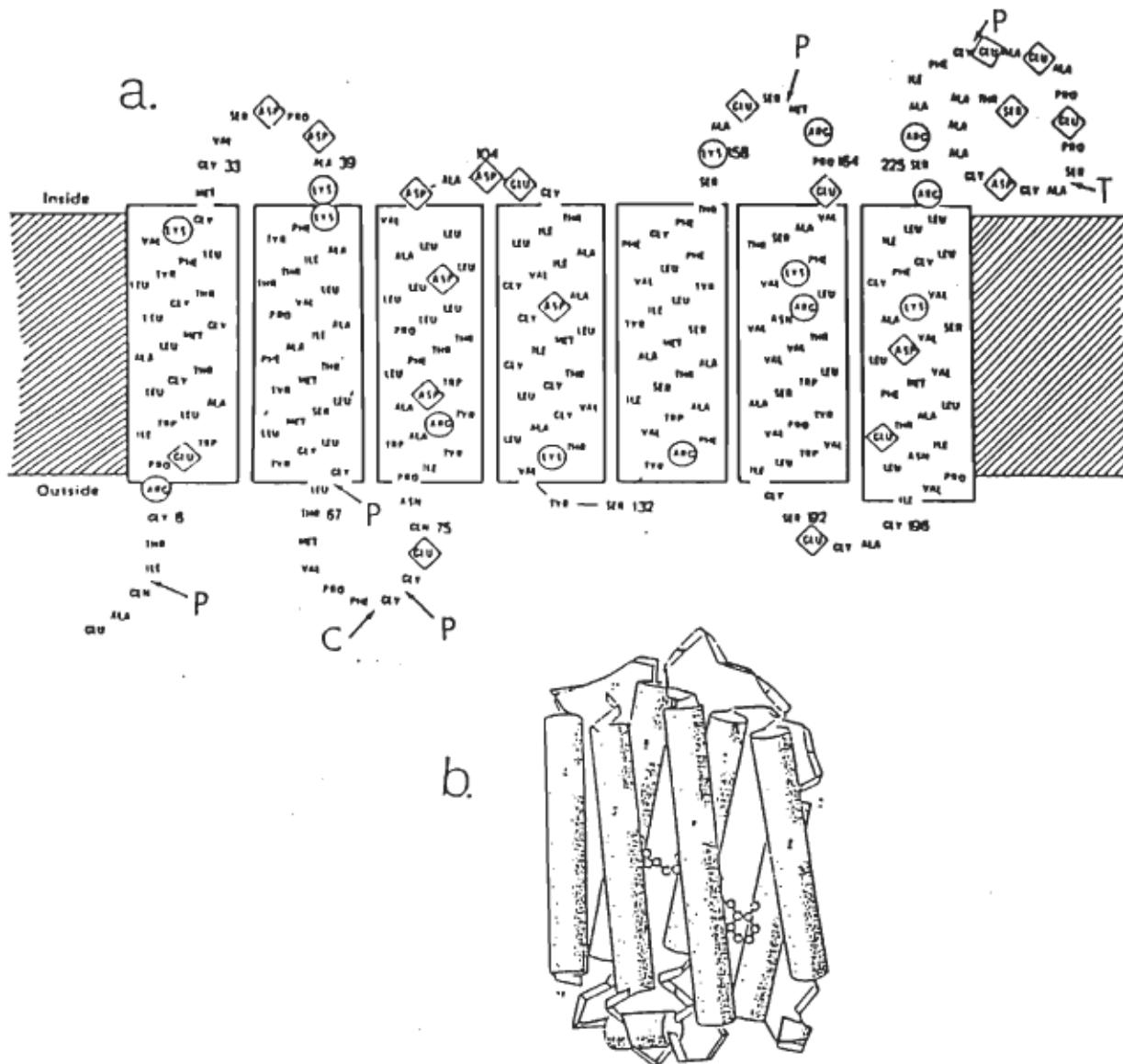


Figure 1.2 : Structure de la bactériorhodopsine. a) Séquence des acides aminés à travers la membrane. Les flèches indiquent les sites de coupures des enzymes protéolytiques. Les points P, C et T indiquent respectivement les liens hydrolysés par la pepsine, la chymotrypsine, et la trypsine. Les cercles représentent les résidus basiques, par contre les losanges désignent les résidus acides (Engelman et al. 1980). **b)** Les hélices α sont représentées par des bâtonnets. Le rétinal est lié à la Lys-216 (Henderson et al. 1990).

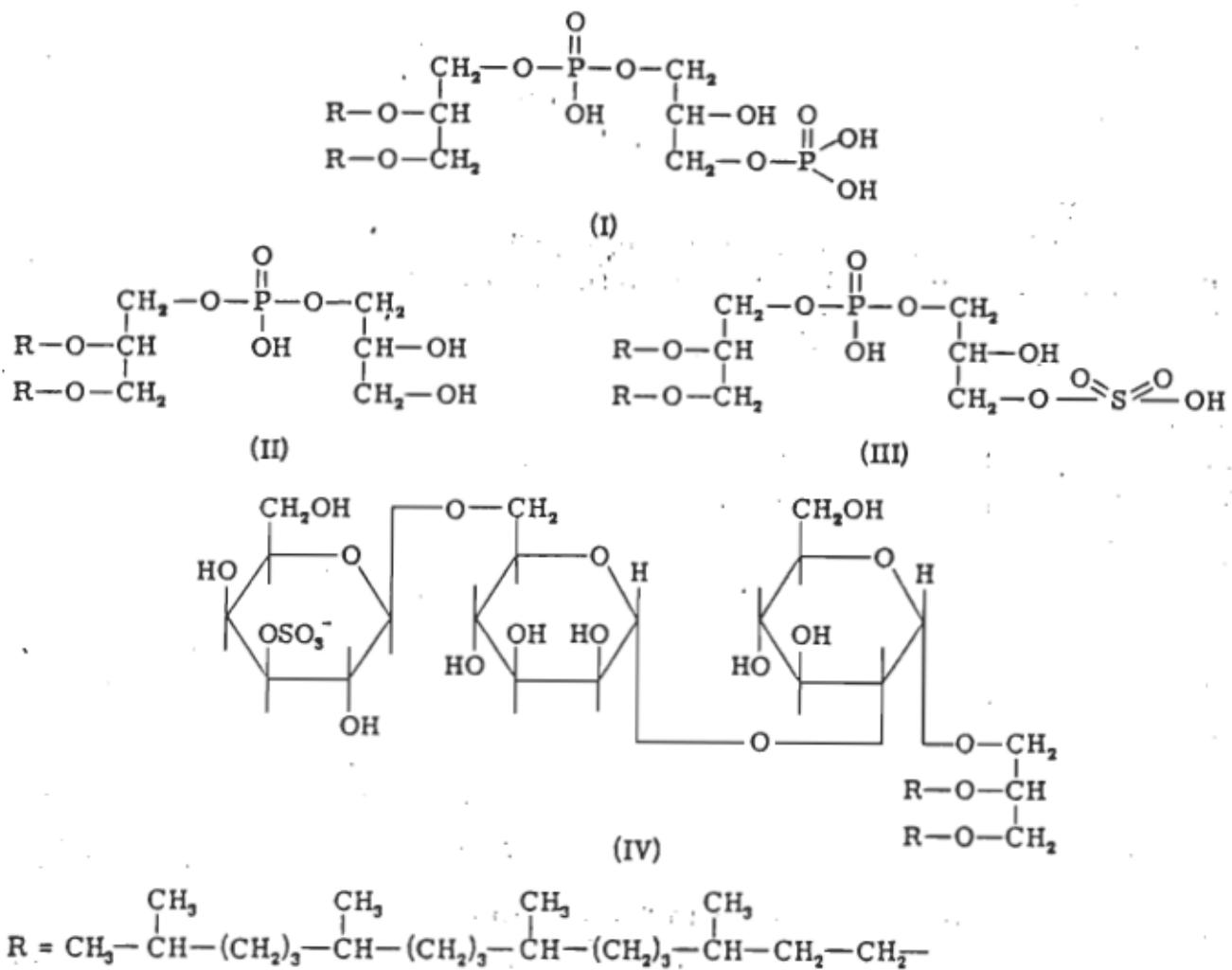


Figure 1.3 : Structures des principaux lipides polaires. I) Phosphatidyl glycérophosphate; II) Phosphatidyl glycérol; III) Phosphatidyl glycérosulfate; IV) Sulfate de glycolipide (Kates et al. 1982).

Après absorption d'un photon par la bR568 adaptée à la lumière, le chromophore subit un cycle de réaction durant lequel il se photoisomérise en 13-cis, se déprotone, mais revient thermiquement à sa forme tout-trans, et se reprotone . Durant ce photocycle la bR pompe un proton au travers de la membrane plasmique et ainsi elle génère un gradient électrochimique qui produit l'énergie nécessaire à des processus se produisant à l'intérieur de la cellule (Stoeckenius et al. 1979) .

10 psec suivant l'illumination de la forme adaptée à la lumière (bR568), il se forme le premier intermédiaire du cycle photochimique de la bR, la batho-bactériorhodopsine (notée K590), qui se transforme thermiquement en lumi-bactériorhodopsine (L550) en l'espace de 1 μ sec . Par la suite, et après 50 μ sec, l'intermédiaire méta-bactériorhodopsine (M412) se forme en s'accompagnant d'une perte d'un proton . Ainsi le chromophore du produit méta est déprotoné . Il faut noter que la conversion de la bR568 à la bR590 (K590) implique une photoisomérisation du chromophore; par conséquent, les intermédiaires batho, lumi et méta ont comme chromophore un rétinal 13-cis. A son tour, l'intermédiaire méta se transforme en N530 en 1 msec puis en O640 et finalement, le retour à la forme adaptée à la lumière bR568 ferme le cycle. Lors de la régénération de la bR568 et à partir de l'intermédiaire M412, un proton est repris . Pour ce qui est du photocycle de la bR adaptée à l'obscurité (13-cis bR548), il n'est pas bien défini, et il semble que le pigment est photoconverti à la forme batho 13-cis et a son propre cycle (Fig. 1.4).

1.2.3. Biochimie de la bactériorhodopsine : la modernité : la mutation dirigée

En plus des techniques spectroscopiques conventionnelles (UV-visible, infrarouge...), beaucoup de travaux récents ont porté sur la substitution d'un ou de plusieurs acides aminés sur la bactériorhodopsine dans le but de déterminer les amino-acides qui forment la cavité du rétinal et d'identifier les résidus d'acides aminés qui forment la chaîne de transport de protons à travers la membrane plasmique.

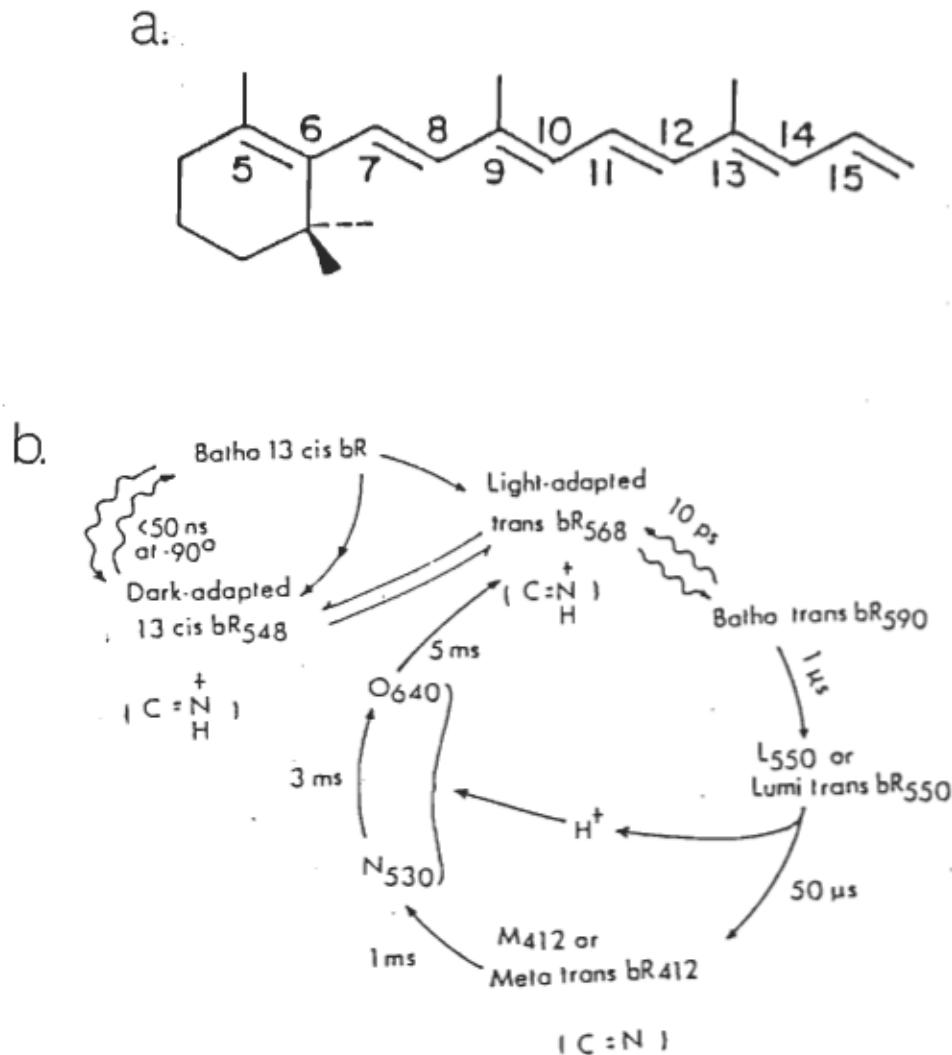


Figure 1.4 : a) Structure du rétinal dans sa forme tout-trans (Lugtenburg et al.1988).

b) cycles photochimiques de la bR adaptée à la lumière et à l'obscurité. Les indices indiquent le λ_{max} de chaque intermédiaire. La mention trans attribuée aux intermédiaires batho, lumi et méta indique que ces derniers sont issus de la forme adaptée à la lumière et n'indique pas la configuration du rétinal (Shichi 1983).

La presque totalité des mutants existants régénèrent un pigment en présence de rétinal. Cependant, plusieurs variations sont souvent observées dans le taux de régénération de la protéine et dans ses caractéristiques d'absorbance. De pareils effets peuvent être expliqués par les perturbations de l'enroulement de la structure causées par les substitutions des acides aminés. Certains mutants étudiés régénèrent un pigment semblable à la bR native (Khorana, 1988). Par exemple, le remplacement de 8 des 11 Tyr par des Phe (Khorana, 1988) et aussi plusieurs remplacements comme Asp--->Asn, Arg--->Gln, et 3 Pro--->Ala forment un pigment absorbant à 568 nm. Cependant certaines substitutions présentent des anomalies vis-à-vis de la bR native. Ces substitutions se divisent en deux classes : i)des substitutions qui affectent le λ_{max} de la protéine et ii)des substitutions qui affectent le pompage des protons.

1.2.3.1. Substitutions d'acides aminés qui affectent le chromophore de la bactériorhodopsine

La première classe présente des mutants qui régénèrent des chromophores avec des glissements dans leurs λ_{max} , comparé au chromophore de la protéine native. Les substitutions Trp-36, -137, 182, et -189--->Phe présentent un glissement de 20-30 nm vers le bleu. Les substitutions Pro-186--->Leu(Val) et Thr-89--->Val donnent aussi un glissement vers le bleu de 70 nm; cependant d'autres substitutions (Asp-115->Glu, Asp-212--->Ala) donnent des glissements vers le bleu de moins de 20 nm. Par contre les substitutions Asp-85--->Asn, Asp-212--->Glu, et Arg-82--->Cys ou Gln présentent un glissement vers le rouge de 30-35 nm. Les glissements spectraux causés par les substitutions précédentes suggèrent que ces acides aminés interagissent avec le rétinal. Les acides aminés dont le remplacement cause des glissements spectraux sont à l'intérieur de la membrane et peuvent s'arranger sans que la structure secondaire soit modifiée (Khorana 1988).

1.2.3.2. Substitutions qui affectent le pompage de protons

Les mutations décrites précédemment donnent, en général, un pompage de protons normal. Cependant certaines mutations affectent fortement le pompage des protons. Le remplacement individuel des acides aspartiques 85 ou 96 par l'asparagine détruit complètement le pompage des protons (Mogi et al., 1988). Les mutants Asp-212 (Asp-212--->Glu et Asp-212--->Asn) présentent une efficacité de pompage allant de 10 à 20% par rapport à l'état natif; cependant, le mutant Asp-212--->Ala est instable à

la lumière et ne présente aucun pompage détectable. Dans le cas du mutant Tyr-185->Phe, la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier et la spectroscopie UV-visible montrent que la protonation de ce résidu change d'état durant l'étape bR-->K625 et encore durant l'étape L550-->M412 (Roepe et al. 1987). Des études plus récentes utilisant des mutations dirigées sur d'autres acides aminés spécifiques (Stern et al., 1989; Subramaniam et al., 1990; Otto et al., 1989; Thorgeirsson et al., 1991) prouvent que les résidus Asp-85, Asp-96, Asp-212 participent directement dans le transport des protons au travers de la membrane.

1.3. Les anesthésiques généraux et la membrane pourpre

Avant d'entamer les investigations sur l'interaction anesthésiques/MP, il est nécessaire de faire un survol de la littérature afin d'en résumer les résultats les plus importants et de bien situer la problématique.

En 1985, Nishimura et al. démontrent, pour la première fois, que sous l'action d'anesthésiques volatils tels que l'Halothane ou l'Enflurane, la bR570 adaptée à la lumière voit son maximum d'absorption glisser vers 480 nm, avec un point isobeste aux alentours de 510 nm. Cependant, un excès d'Halothane (16 mM) fait disparaître le pigment à 480 nm en faveur d'une nouvelle forme à 380 nm. Ces auteurs affirment que la formation de la bR380 n'est pas réversible, que la protéine sous cette forme perd sa structure et qu'il est fort probable que la base de Schiff de ce pigment ait été hydrolysée. Finalement, ils concluent que les anesthésiques interagissent directement avec la protéine.

Uchida et al. (1989) ont démontré l'antagonisme de pressions élevées sur l'action des anesthésiques. Le pigment 480 nm formé par addition d'anesthésiques volatils retrouve sa forme native progressivement, au fur et à mesure que la pression au sein de la suspension membranaire augmente. Sous une pression de 500 atm, la bR retrouve presque la totalité de sa forme native ($\lambda_{\text{max}}=570$ nm).

Récemment, Boucher et al (1991) ont affirmé que malgré le photocycle complet de la bR480, elle n'arrive pas à pomper de protons au travers de la membrane. Par des mesures d'absorption transitoire aussi bien que par des spectres d'action, les auteurs montrent que l'activité de pompage de protons est exclusive à la forme 570 nm du pigment, indiquant que l'activité photochimique n'est pas obligatoirement couplée au pompage de protons et que l'équilibre qui existe entre les deux formes spectrales (480 et 570 nm) du pigment est également un équilibre entre une forme couplée et une forme découpée de la bR.

Enfin, Lee et al. (1991), en utilisant la fluorescence UV pour étudier les interactions entre la bR dans les MP et les anesthésiques halogénés concluent que les changements structuraux survenus lors de l'ajout d'Halothane ou d'Enflurane ne modifient nullement la dynamique de transfert énergétique qui existe entre les acides aminés aromatiques de la protéine et son chromophore rétinien. L'analyse de la fluorescence de la bR en présence d'anesthésiques révèle surtout les propriétés de "quencher" de ces derniers. Leurs propriétés de "quenching" se manifestent à des concentrations bien en dessous de celles qui sont nécessaires pour induire la transition spectrale du chromophore. Leurs résultats indiquent que le site du chromophore n'est peut-être pas la cible première de l'action des anesthésiques.

1.4. Les anesthésiques locaux et la membrane pourpre

Comme mentionné dans la section 1.1., l'utilisation des anesthésiques locaux a vu le jour en 1844 et ce n'est qu'en 1989 qu'on testa l'effet de la Dibucaine, un anesthésique local, sur la bactériorhodopsine, c'est à dire 4 ans après la découverte des effets des anesthésiques volatils sur cette dernière. Lin et al. (1989), par plusieurs techniques (absorption, émission, calorimétrie à balayage différentielle et absorption transitoire), arrivent aux résultats suivants : i)Les caractéristiques spectroscopiques UV-visible de la forme native ($\lambda_{\text{max}}=568$ nm) sont sensibles aux quantités ajoutées de la Dibucaine. Ainsi, la formation du pigment rouge bR480 à partir de la forme native bR568 est observée. ii)L'émission phosphorescente de la Dibucaine à 77 K est

complètement "quenchée" par la bR. iii) L'incorporation de la Dibucaine dans la bR décroît la quantité de l'intermédiaire M412 formé dans le photocycle de la protéine. Les auteurs suggèrent que le site d'action de l'anesthésique local (la Dibucaine) est près ou sur le chromophore, c'est à dire la base de Schiff du rétinal de la bR. Ils suggèrent que l'action de l'anesthésique sur la bR de la membrane pourpre se fait, probablement, via un site spécifique, mais pas via un mécanisme conformationnel.

L'utilisation de la Tétracaïne (Broun et al. 1991) dans sa forme déprotonée à pH 9.5 sur la membrane pourpre, induit un glissement hypsochromique de 570 à 470 nm. La forme bR470 possède une activité photochimique avec une cinétique de formation de l'intermédiaire M (absorbant à 380 nm) semblable à celle d'un intermédiaire analogue dans une bR intacte; cependant, la constante de temps de décomposition de l'intermédiaire M dans la bR traitée avec de la Tétracaïne est 10^4 fois plus grande. Par contre, dans sa forme protonée à pH 7.0, la Tétracaïne n'a aucun effet ni sur la cinétique de la bR ni sur ses caractéristiques spectrales. Les auteurs concluent que la forme électriquement neutre de la Tétracaïne provoque un changement de charge entourant le rétinal qui, en retour, cause un affaiblissement dans les interactions protéine-chromophore. Ce changement de charge autour du rétinal est probablement possible grâce à des changements mineurs survenus dans la conformation de la bR dus à la perturbation des interactions protéine-lipide dans la membrane pourpre.

Par ailleurs, la formation de la bR480 n'est pas uniquement liée à l'interaction des anesthésiques (généraux ou locaux) avec la bactériorhodopsine native. Il existe plusieurs autres procédés par lesquels on génère le pigment rouge.

1.5. Génération de la bR480 par des procédés autres que l'addition d'anesthésiques

En 1984, Baribeau et Boucher rapportèrent que la solubilisation de la membrane pourpre par le lauryl sucrose dénature moins la bR que le traitement par d'autres détergents. Bien qu'il leur était impossible de délipider complètement le pigment par chromatographie dans ce détergent, le lauryl sucrose s'est avéré un agent stabilisant très efficace pour la bR monomère préalablement délipidée par traitement au Triton X-100. La protéine ainsi purifiée présente un équilibre acido-basique entre deux formes spectrales différentes ayant leur maximum d'absorbance à 540 et 480 nm, respectivement. Le pKa de l'équilibre est de 6.8. La considération de la valeur du pKa, de l'amplitude du déplacement spectral et du fait que, sous illumination, les deux

formes de bR donnent des bathointermédiaires différents mais un même métaintermédiaire, amènent les auteurs à suggérer que l'équilibre acido-basique correspond à celui de la base de Schiff du rétinal. Comme cet équilibre n'est observable que dans la bR complètement délipidée, les auteurs proposent que dans la membrane native, une interaction lipide-protéine spécifique prévient ce phénomène et contribue au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la bactériorhodopsine.

Lorsque la bR est régénérée à partir de la bactériopsine et les isomères 13-cis ou tout-trans du rétinal, il se forme un intermédiaire absorbant près de 440 nm dont le chromophore est apparemment lié à la protéine par un lien non covalent (Schreckenbach et al. 1977, 1978). Aussi, la solubilisation de la bR dans différents détergents laisse apparaître une espèce nouvelle avec un $\lambda_{\text{max}}=440$ nm. Drukmann et al. (1982) rapportent qu'au dessus de pH 11, la suspension de membrane pourpre forme un pigment absorbant à ca. 460 nm et ayant un lien de base de Schiff non protoné. Le chauffage de la bR native crée une espèce absorbant à ca. 460 nm (Brouillette et al. 1987). Le traitement de la suspension de membrane pourpre par le DMSO (diméthylesulfoxyde Me_2SO ; entre 30 et 60%: v/v) génère un nouveau pigment appelé par Oesterhelt et al. (1973) "le complexe 460-nm". Ce complexe réagit avec l'hydroxylamine et le borohydrure. Pande et al. (1989b) ont repris l'étude de l'effet du DMSO sur la membrane pourpre. Ils concluent que la formation du complexe 460-nm (qu'ils dénomment bR480) s'accompagne par des changements mineurs dans la structure secondaire de la protéine et que dans cet état elle garde pleinement sa cristallinité. Les changements dans la structure de la protéine résultent de la diminution de l'interaction chromophore-protéine près de la région de la base de Schiff. Les auteurs attribuent les changements spectroscopiques observés à l'altération structurale de la protéine. Ils ont aussi constaté que le chromophore 13-cis résiste aux changements induits par le DMSO et proposent que le déplacement du contre-ion de la protéine vers la base de Schiff, suivant des changements mineurs dans la structure de la protéine, peut produire le glissement spectral observé.

1.6. Cadre et objet du travail

Il est souvent considéré que les principaux facteurs gouvernant les propriétés spectroscopiques des pigments rétiniens sont la protonation du lien de base de Schiff entre la protéine et le chromophore ainsi que la matrice de la protéine

entourant ce dernier (Honig et Ebrey 1982). La couleur pourpre de la bR native (bR570 ou bR560) est due à la forte protonation de la base de Schiff et à l'effet électrostatique de la paire de charges ou du dipôle porté par l'apoprotéine près du 7^{ème} carbone du rétinal (Lugtenberg et al. 1988). En plus, les interactions latérales entre le rétinal et la protéine jouent un rôle, mais moindre, dans le mécanisme complexe de régulation du λ_{max} de la bactériorhodopsine.

L'ajustement du λ_{max} de la bactériorhodopsine est un mécanisme complexe. Les effets de la solubilisation de la bactériorhodopsine, par un ensemble de détergents, sont prononcés. Il peut se produire un glissement vers le bleu de l'absorbance de 22 nm et plus (Lam et Packer 1983; Dencher et Heyn 1978; Baribeau et Boucher 1984; Baribeau et Boucher 1987). Chaque glissement spectral, si minime soit-il, est probablement dû à une modification structurale progressive accompagnant la solubilisation de la membrane. La bactériorhodopsine, en plus des effets dus à la solubilisation, présente de grands sauts de glissements spectraux sous une variété de conditions expérimentales. Par exemple, entre les pH 2 et 13, des équilibres acido-basiques sont observés entre différentes formes spectrales de suspensions de membranes. Ainsi, la forme pourpre du pigment natif peut être titrée, en membrane bleu acide ($\lambda_{\text{max}}=605 \text{ nm}$, $pK_a=2.8$) ou en pigment rouge ($\lambda_{\text{max}}=460 \text{ nm}$, $pK_a=12.8$) ou finalement en une forme spectrale jaune ($\lambda_{\text{max}}=380 \text{ nm}$, $pK_a>12.8$) (Oesterhelt et Stoeckenius 1971; Druckmann et al. 1982) (Fig.1.5).

Certaines de ces formes (bR480 et bR380) peuvent résulter, comme cité plus haut, de l'interaction de la membrane pourpre avec les anesthésiques volatils tels l'Halothane ou l'Enflurane. L'étude de l'effet des anesthésiques sur la MP a conduit à la même controverse que celle qui existe depuis fort longtemps dans le domaine de l'anesthésie des cellules nerveuses. La controverse est telle qu'on ne peut, jusqu'à présent, trancher entre les deux plus importantes hypothèses du site d'action des agents anesthésiants, à savoir, la protéine ou les lipides. Plus dramatique encore, le mécanisme par lequel les anesthésiques agissent sur les différentes cellules se perd dans les dizaines de modèles d'action proposés.

Notre travail vise deux buts distincts mais étroitement liés: i) L'étude du mécanisme de contrôle du λ_{max} de la bactériorhodopsine, et ii) La détermination du site et du mécanisme d'action des anesthésiques. A cette fin, nous avons utilisé principalement la spectroscopie UV-visible et la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier dans le but d'associer des éléments structuraux aux

changements spectraux qui surviennent lors de l'addition d'anesthésiques aux membranes pourpres.

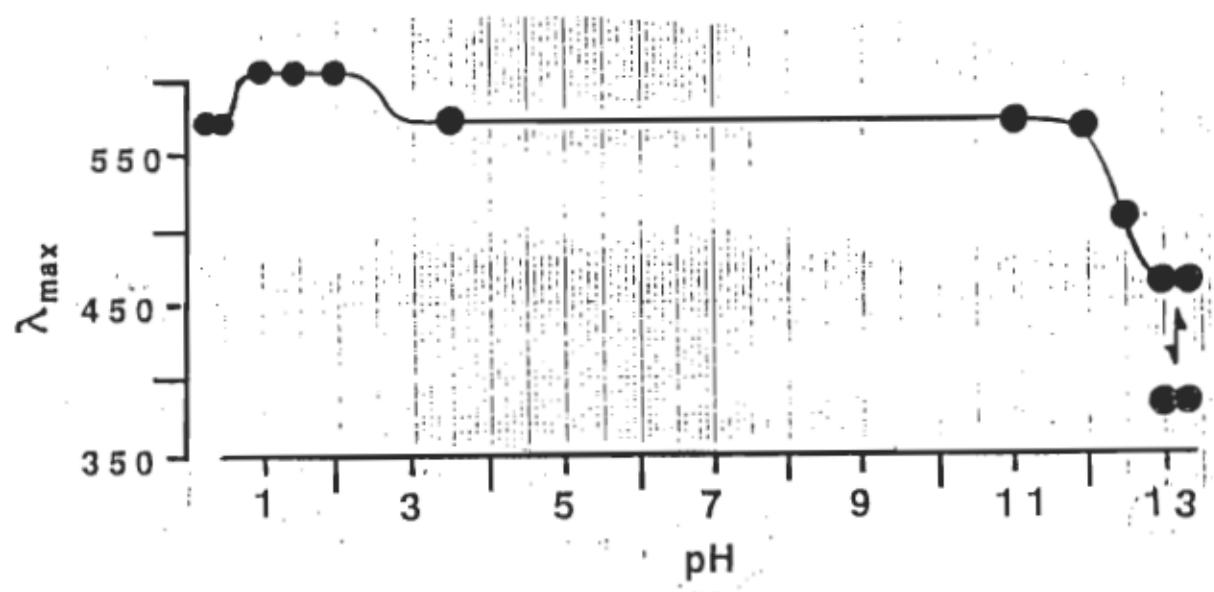


Figure 1.5 : Equilibres acido-basiques entre différentes formes spectrales de suspensions de membranes pourpres (voir texte). On remarque la réapparition de la forme pourpre aux $\text{pH} < 1$.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1. Culture et récolte des bactéries

Notre travail est rendu possible grâce à la culture au laboratoire de *Halobactérium halobium* à partir d'une souche mutante S9 offerte gracieusement par le Dr. W. Stockenius (Université de Californie, San Francisco).

La technique utilisée pour la préparation du milieu de culture ainsi que pour la culture même des bactéries est celle décrite par Baribeau (1987). La culture de ces bactéries nécessite un milieu de composition un peu particulier. Pour obtenir 1 litre de ce milieu, les produits suivants sont dissous dans de l'eau distillée par ordre d'apparition:

1/ NaCl	250 g
2/ KCl	2g
3/ Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	3 g
4/ MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g

5/ 1ml d'une solution contenant 0.5 g de FeSO₄. 7H₂O, dans 10 ml de H₂O qu'on acidifie avec 3 gouttes de HCl 1N. Le pH de la solution est ajusté à pH 6.5-6.7 et cette solution de sel est stérilisée par autoclavage.

6/ Oxoid peptone (bacteriological peptone) 10 g. Les peptones sont ajoutées après la stérilisation.

2.1.1. Pré-inoculation et inoculation

La culture des bactéries débute par une pré-inoculation dont les étapes sont décrites comme suit :

a/ Deux boucles pleines de bactéries provenant de la souche de départ (gélose ensemencée) sont inoculées dans 100 ml de milieu de culture contenu dans un erlenmeyer de 500 ml. Deux aliquots de ce type sont préparés.

b/ La croissance est d'environ trois à quatre jours et s'effectue dans un incubateur (New Brunswick Scientific. Edison, N. J., U.S.A) porté à 37°C tout en agitant le plateau mobile avec une vitesse de 180 r.p.m. jusqu'à l'obtention d'une

densité optique lue à 660 nm d'environ 1. A ce moment, nous avons atteint la fin de la phase exponentielle de croissance pour ce volume de culture.

La phase d'inoculation qui consiste à accroître peu à peu le volume du milieu de culture pour permettre aux bactéries d'avoir un environnement frais, toujours rempli des nutriments nécessaires à leur croissance, suit les étapes suivantes:

a/ Deux fioles à culture de 4 000 ml contenant 1 200 ml de milieu sont ensemencées, chacune avec l'inoculum de 100 ml obtenu lors de la pré-inoculation.

b/ La croissance dure environ trois jours jusqu'à ce que la densité optique à 660 nm (DO660) soit environ égale à 1.

c/ Par la suite, on inocule six fioles à culture de 4 000 ml contenant chacune 1 600 ml de milieu avec 400 ml de l'inoculum obtenu en (b).

d/ Les microorganismes se reproduisent et croissent pendant trois jours.

2.1.2. Induction de la membrane pourpre

A la toute fin de la phase exponentielle de croissance, là où le nombre de bactéries est maximal, nous entreprenons l'étape de la culture où, par des changements de conditions expérimentales, nous faisons induire la synthèse de la membrane pourpre par la bactérie.

En premier lieu, la culture est exposée à une lumière intense, pendant trois jours. Le milieu est agité légèrement pour garder les bactéries en suspension. Trois jours plus tard, la membrane pourpre est présente en quantité suffisante et on récolte les bactéries.

2.1.3. Récolte des bactéries et conservation des souches bactériennes

Ce stade consiste à séparer les bactéries de leur milieu de croissance. La suspension bactérienne est donc centrifugée dans un appareil Sorvall RC-5B (8 500 r.p.m. pendant 10 minutes) à 4°C. Par la suite, les bactéries sont lavées deux fois dans une solution basale de sels pour enlever le milieu de culture restant. La solution basale de sel est composée des produits suivants:

NaCl	250 g
KCl	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g

pour un volume final de 1 litre de solution. Le pH est ajusté à pH=7 avec du NaOH.

Leurs poids frais est mesuré et elles sont alors déposées dans un bêcher (600 ml) où elles sont mises en présence de trois fois leur poids frais de solution basale de sels. On remet en suspension par une agitation mécanique puis 10 mg d'ADNase (Sigma Chemicals Co, St-Louis) y sont rajoutés. L'agitation s'effectue pendant une heure à l'obscurité et l'on obtient un mélange pâteux. Cette suspension est alors dialysée pendant 16 heures à 4°C contre de l'eau distillée avec un changement d'eau après 1:30 heure. C'est à ce moment qu'a lieu la lyse des cellules résultant en des fragments de membranes de grandeurs variables.

Les souches bactériennes peuvent se conserver très longtemps si on repique les bactéries à partir des géloses déjà ensemencées. Ce repiquage permet aux bactéries de garder un milieu toujours frais et ayant tous les nutriments nécessaires à leur survie.

Pour fabriquer les géloses, on utilise 3 g d'Oxoid peptone et 3 g de Bacto agar (Difco Laboratories, Détroit U.S.A.). On chauffe la solution jusqu'à ce qu'elle éclaircisse en la faisant agiter légèrement. Cette solution est ensuite coulée dans des plats de Petri (environ 10 plats de Petri). Les milieux se gélifient et sont conservés dans un sac de plastique pour éviter qu'ils ne s'assèchent. Les géloses sont repiquées environ tous les trois mois et la croissance des bactéries s'effectue dans un incubateur (Fisher Scientific Co, modèle Isotemp) à 37°C durant dix jours. Elles sont ensuite conservées à 4°C.

2.2. Préparation de la membrane pourpre

2.2.1. Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires

La membrane pourpre est préparée selon la méthode d'Oesterhelt et Stoeckenius (1979). Afin d'obtenir seulement la membrane pourpre libérée des constituants cellulaires, le dialysat obtenu en 2.1.3 est centrifugé à 9-10 000 r.p.m pendant 20-25 minutes. Le culot contient des débris cellulaires tandis que le surnageant est constitué de la fraction membranaire des cellules. Ce surnageant est alors centrifugé à 19 000 r.p.m pendant 1:30 heure. A ce moment, le culot (membrane pourpre) est resuspendu dans de l'eau distillée et recentrifugé pendant 1:30 heure. Cette étape est répétée deux à trois fois jusqu'à ce que le surnageant soit presque incolore.

2.2.2. Purification de la membrane pourpre

A la membrane pourpre obtenue en 2.2.1 est accolée une partie de membranes rouges contaminantes. Cette étape va permettre une séparation de ces deux types de membranes. Le culot (MP) est donc déposé sur un gradient discontinu de sucre (7 ml [1,5 M] - 21 ml [1,3 M]). On procède ensuite à une ultracentrifugation de 48 heures dans le rotor SB-110 de l'appareil IEC modèle B-60 à 27 000 r.p.m. La membrane pourpre sera à l'interface 1,3 et 1,5 M tandis que la membrane rouge se retrouvera au-dessus de la portion contenant 1,3 M de sucre. La bande pourpre est recueillie et dialysée contre de l'eau distillée pendant 16 heures avec un changement d'eau afin d'éliminer le sucre. Le dialysat est centrifugé à 19 000 r.p.m. dans l'appareil Sorvall RC-5B pendant 1:30 heure. La membrane pourpre est alors resuspendue dans la solution basale de sels pour la conservation (0-2 ans). Le rendement en membrane pourpre est évalué d'après le spectre d'absorption en utilisant un coefficient d'extinction ($\epsilon_{560 \text{ nm}}$) de 54 000 $\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, tel que suggéré par Oesterhelt et Stoeckenius (1971).

2.3. Techniques spectroscopiques

2.3.1. Spectroscopie infrarouge

2.3.1.1. Le spectrophotomètre infrarouge

L'acquisition des spectres infrarouge a été faite avec un interféromètre commercial Bomem, modèle DA3.02. La source de l'appareil est conventionnelle (globar) et l'interférogramme est généré par un interféromètre de Michelson composé d'une lame séparatrice (KBr et compensateur de germanium), d'un miroir fixe et d'un autre mobile. Le rayon lumineux de la source est focalisé en un cercle de 1 cm de diamètre sur l'échantillon. La lumière transmise frappe un détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure) refroidi à la température de l'azote liquide (-196°C). L'interférogramme recueilli est traité par un miniordinateur de la famille des PDP (PDP 11/23 de Digital Equipment Co.) qui exécute l'opération de la transformée rapide de Fourier à l'aide d'une unité de traitement rapide (High Speed Vector Processor Unit de la compagnie Bomem).

2.3.1.2. Les spectres infrarouge

2.3.1.2.1. Enregistrement des spectres infrarouge

Tous les spectres furent calculés à partir de la somme de 100 interférogrammes sauf dans le cas des spectres de différence où on a balayé 500 interférogrammes. Dans tous les cas la résolution était de $1\text{-}2 \text{ cm}^{-1}$. On a utilisé une apodisation triangulaire pour le calcul de la transformée de Fourier. Enfin, suivant l'intérêt de l'analyse on sélectionne la région du spectre sur laquelle va s'effectuer l'interprétation. Tous les spectres étaient enregistrés à la température de la pièce et sous vide afin d'éliminer les traces de molécules d'eau et de CO₂ se trouvant dans l'air à l'intérieur de l'appareil. On ne prend aucun spectre avant que la pression à l'intérieur du puits contenant l'échantillon, soit inférieur à 0.5 torr.

2.3.1.2.2. Préparation des échantillons

Pour réaliser les mesures avec des membranes pourpres, on prend 250 microlitres de MP de densité optique égale à 2 qu'on dépose avec une seringue sur une fenêtre en CaF₂ fabriquée par "Harrick Scientific Corporation", puis sous un jet d'azote gazeux on sèche cette quantité de membranes pourpres pendant 45 minutes. Après quoi, si l'échantillon ne va pas être traité avec des anesthésique, il sera monté directement sur le porte échantillon, par contre si l'échantillon sera traité par des anesthésiques alors la fenêtre sera montée dans une cellule étanche conçue, dans notre laboratoire, spécialement à cette fin.

2.3.2. Spectroscopie d'absorption

2.3.2.1. Spectrophotomètre ultraviolet et visible

Dans notre travail on a utilisé un spectrophotomètre enregistreur ultraviolet-visible Pye Unicam SP 8-100 muni d'un accessoire porte-échantillon pour échantillons diffus permettant d'enregistrer les spectres sans qu'ils ne soient faussés à cause de la lumière diffusée par l'échantillon. Ce spectrophotomètre peut couvrir un grand intervalle de longueurs d'onde allant de 190 à 800 nm.

2.3.2.2. Préparation des échantillons

Pour les films de membranes pourpres, la préparation des échantillons pour l'analyse en UV-visible se fait de la même manière que dans 2.3.2.2, cependant, pour les solutions, on utilise des cuvettes de verre spectroscopique (spectrosil) ou de

quartz, de différentes épaisseurs suivant la nécessité de la manipulation. Pour l'adaptation à la lumière des membranes pourpres, on expose la totalité des échantillons à la lumière blanche d'un projecteur pendant plusieurs minutes avant de les traiter et les analyser. L'adaptation à l'obscurité se fait par entreposage des échantillons de membranes pourpres à l'obscurité totale pas moins de quatre heures. Les spectres UV-visible étaient pris à la température de la pièce. L'addition des anesthésiques et des autres réactifs à différents pourcentages se fait tout simplement par injection du produit utilisé dans des tubes contenant de la membrane pourpre, avec une seringue (lors de l'ajout de petites quantités) ou à l'aide d'une pipette de 1 ml divisée en 100 unités. Suivant le but de l'expérience, les spectres sont enregistrés à des intervalles de temps bien précis.

2.4. Fabrication de la cellule

Comme les anesthésiques avec lesquels on a travaillé étaient volatils et comme les spectres infrarouges étaient pris sous vide, alors il nous était impossible de prendre des spectres infrarouges de membranes pourpres traitées avec des anesthésiques, d'où la nécessité de construire une cellule étanche. Cette cellule s'est avérée plus tard utile même pour la collecte des spectres UV-visible à différents pourcentages d'humidités Les détails en sont donnés à la figure 2.1.

2.5. Effet du pH sur l'action des anesthésiques

Ces expériences à différents pH visent à déterminer l'efficacité de l'action des anesthésiques sur la protéine, en fonction du pH. Dans la majorité des cas, on a utilisé des tampons acétate et phosphate pour stabiliser le pH, sauf dans les cas extrêmes comme pH 0.3 ou pH 12 où le pH était ajusté avec du HCl ou du NaOH dilué. Les mesures de pH ont été faites à l'aide d'un pH mètre (Corning modèle 10, Medfield Massachusetts).

2.6. Effet de l'humidité

L'eau est source de vie, par conséquent toute vie sur terre nécessite un environnement aqueux. C'est pourquoi les systèmes biologiques sont fortement altérés lorsqu'on change leur humidité. Dans cette perspective, on a étudié l'effet de l'humidité des échantillons de MP sur la photochimie de la bactériorhodopsine, sur l'efficacité de l'action des anesthésiques et enfin l'influence de la déshydratation sur

la structure de la membrane pourpre. Il est à noter que le contrôle de l'humidité à l'intérieur de la cellule se fait par l'incorporation, en présence du film de membrane pourpre préalablement séché avec un jet d'azote, d'une solution de sel saturée. Avant la mesure des spectres on attend 24 heures afin d'être sûr que le film de MP est effectivement équilibré à l'humidité désirée. Pour le choix de la solution de sel saturée adéquate, on s'est référé à "International Critical Tables".

2.7. Produits chimiques

Les produits chimiques et les solvants utilisés au cours de notre travail sont ceux de Fisher Scientific Co. Montréal, grade Reagent, le sel pour la culture bactérienne (gros sel, crystal séché, Windsor est celui de "The Canadian Salt Company Limited" et enfin l'ADNase (grade I)est de Sigma Chemical Co. (St-Louis). Pour les anesthésiques volatils, l'Halothane (nom commercial : Somnothane; 2-bromo-2-chloro-1,1,1 trifluoroethane) est de Hoechst Canada Inc. (Montréal, Qué.) or l'Enflurane (nom commercial : Ethrane; 2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl difluoromethyl éther) est de Anaquest (Pointe-Claire, Qué).

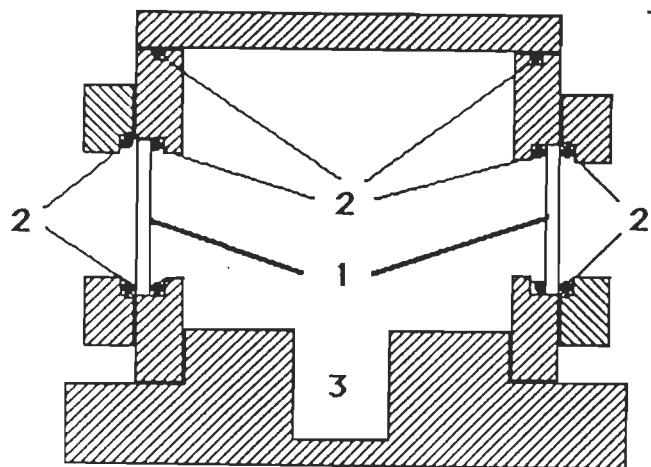


Figure 2.1 : Cellule d'aluminium pour mesures spectroscopiques (UV-visible et infrarouge).

1. Fenêtres de CaF_2
2. Joints tauriques en Viton
3. Puits central pour solution aqueuse ou anesthésiques.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Echantillons utilisés au cours de ce travail

Pour leur croissance, les bactéries halophiles ont besoin d'un milieu de culture spécifique ainsi que de conditions strictes à respecter, faute de quoi, la membrane pourpre obtenue sera fortement contaminée par la bactériorubérine. Le spectre d'absorption UV-visible de la membrane pourpre présente une bande centrée à 570 nm (forme adaptée à la lumière) caractéristique du complexe rétinal-opsine, en plus de la bande à 280 nm, spécifique aux acides aminés aromatiques de la protéine (Oesterhelt et Stoeckenius 1974). La pureté d'une préparation de membrane pourpre peut être évaluée par son spectre UV-visible, de même que par le rapport des absorbances à 280 et 570 nm (Becher et Cassim 1975). La décroissance dans la valeur de ce rapport est indicative de la croissance de la pureté de la préparation de membrane pourpre. Une contamination par la bactériorubérine se traduirait, sur le spectre UV-visible de la suspension de MP, par la présence d'épaulements à des longueurs d'ondes de 470 et 498 nm (Becher et Cassim). L'absence d'épaulements à 470 et 498 nm sur le spectre de nos préparations de MP (Fig. 3.1) obtenues selon la méthode décrite précédemment confirme la qualité de nos échantillons. Nos rapports d'absorption varient entre 1.55 et 1.65; comparés aux résultats mentionnés par Oesterhelt et Stoeckenius (2.0 à 2.1) et ceux donnés par Becher et Cassim (1.5 à 2.0), ils nous permettent d'affirmer que nos préparations sont de qualité égale ou supérieure à celle rapportée par les auteurs cités ci-haut.

Le spectre UV-visible permet aussi de déterminer la quantité obtenue après culture des bactéries. Sur 10 l de préparation, nos cultures ont produit entre 240 et 480 mg de membrane alors que Oesterhelt et Stoeckenius avancent, pour le même volume, une quantité allant de 200 à 500 mg (calcul basé sur un coefficient d'extinction de $54\ 000\ 1\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ et un poids moléculaire de 25 000 daltons).

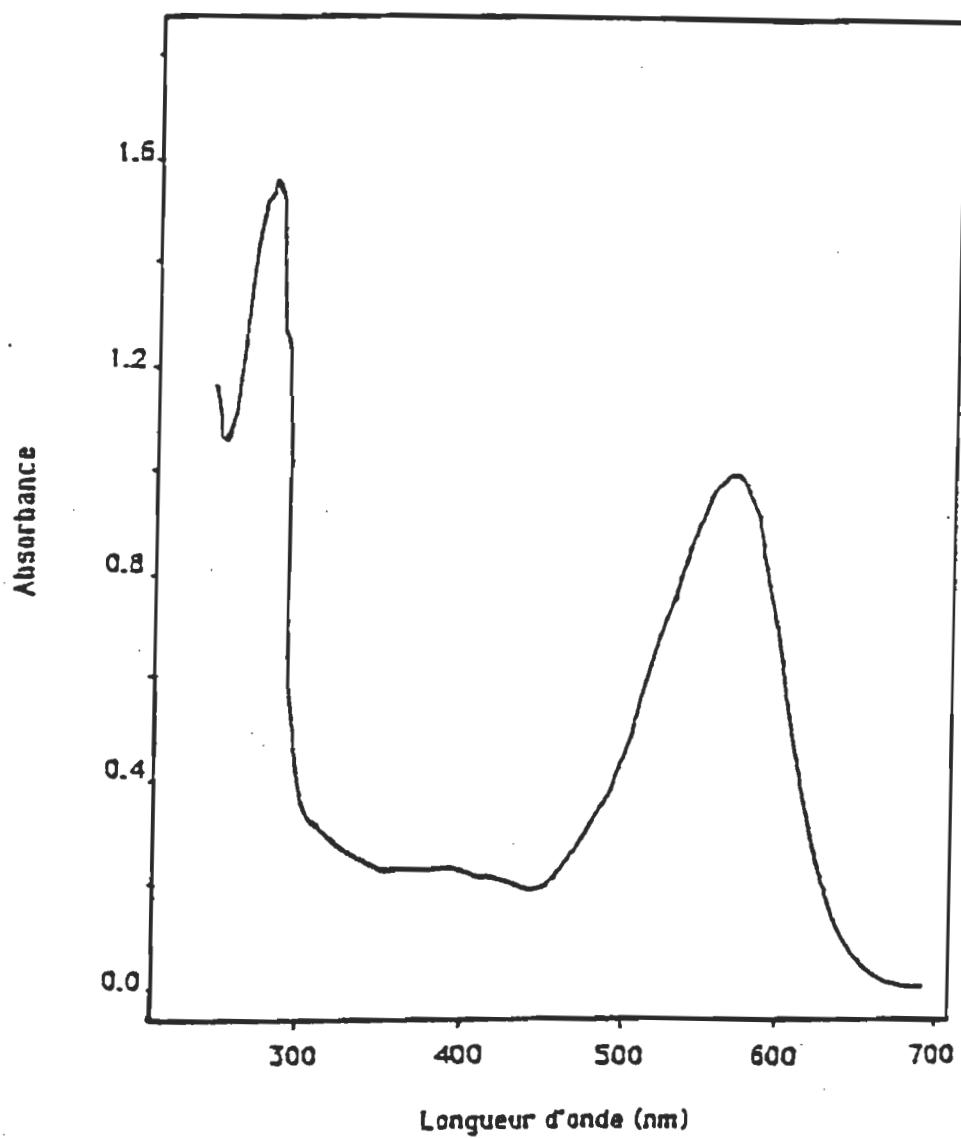


Figure 3.1 : Spectre d'absorption de la membrane pourpre adaptée à la lumière, $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$, dans un tampon phosphate à 200 mM (pH 7.5)

3.1.1. Activité photochimique des films de membrane pourpre

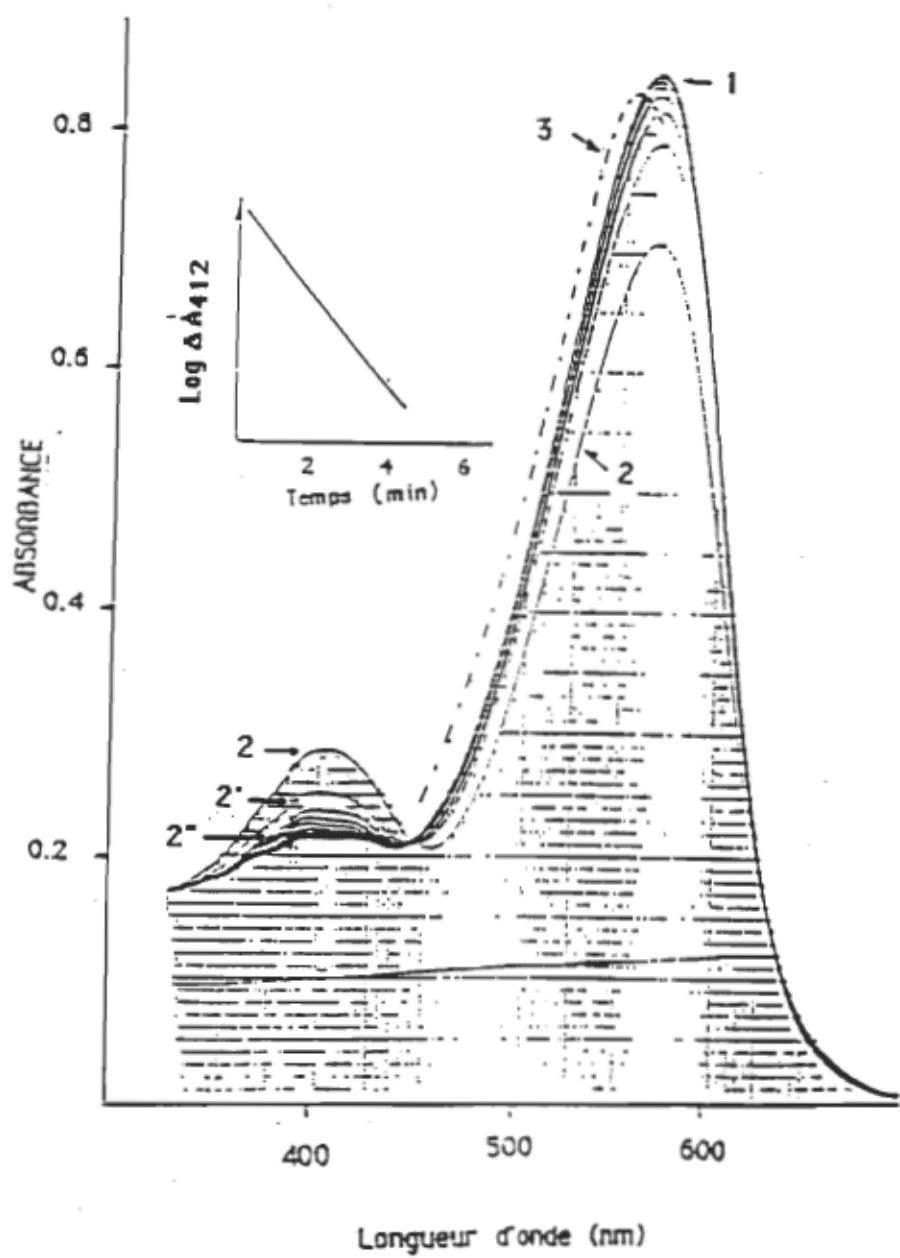
Dans beaucoup d'expériences effectuées au cours de ce travail, des films de membrane pourpre préparés sur des fenêtres de CaF_2 ont été utilisés.

Les films humides de membrane pourpre présentent les mêmes caractéristiques spectrales et les mêmes processus photochimiques que leurs suspensions aqueuses. La déshydratation des échantillons de membrane pourpre n'influence pas son maximum d'absorption, qui dans la forme adaptée à la lumière, se situe à 570 nm; mais elle modifie la cinétique de sa photochimie. Dans les films secs, le temps de photocycle de la bactériorhodopsine passe de quelques millisecondes à plusieurs minutes. Un exemple de ce ralentissement est donné dans la figure 3.2 où on peut observer l'apparition de la forme M412 après illumination de l'échantillon au moyen d'un projecteur. Nous avons observé que la quantité d'intermédiaire M412 qui pouvait ainsi être accumulée était fonction du degré de déshydratation du film. Par ailleurs, la figure 3.2 permet aussi d'observer que la déshydratation d'un film n'altère pas sa capacité d'adaptation à l'obscurité et à la lumière. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Korenstein et Hess (1977) qui, eux, prétendent que la déshydratation des films empêche leur adaptation à la lumière et la formation de M412.

3.1.2. Spectres infrarouge des films de membrane pourpre

Les spectres infrarouge obtenus pour des films de membrane pourpre secs (% humidité <10%) se comparent en tout point à ceux qu'on peut trouver dans la littérature (Ebrey et al., 1987). Les figures 3.3 et 3.4 présentent ces spectres dans les régions $1000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ et $1000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, respectivement. Les principaux pics sont attribués soit aux modes de vibrations de la protéine soit aux lipides membranaires (Parker, 1971; Rothschild et Clark 1979; Chapman, 1965; Wallach et al., 1968; Susi 1969). Les deux pics à 1660 cm^{-1} et à 1547 cm^{-1} sont assignés aux vibrations de l'amide I (étirement des C=O) et de l'amide II (déformation de NH dans le plan) du squelette polypeptidique de la bactériorhodopsine. Un troisième pic à 3307 cm^{-1} est assigné au mode vibrationnel de l'amide A (étirement de NH). Quant au pic à 1233 cm^{-1} il est attribué à l'étirement de la double liaison P=O; celui à 1065 cm^{-1} correspond à l'étirement du lien P-O-C et le pic à 1170 cm^{-1} est dû à l'étirement des liaisons C-O-C; tous ces pics peuvent être attribués aux phospholipides contenus dans la membrane. Dans la littérature, l'étirement du groupe carbonyle ester à

Figure 3.2 : Spectre d'absorption d'un film sec de membrane pourpre. La série de spectres correspond au film sec de membrane pourpre adaptée à la lumière pris avant (1) et après 20 minutes d'exposition à la lumière d'un projecteur (2). Ce dernier spectre montre clairement la présence de l'intermédiaire M412. Les spectres 2', 2'' et suivants ont été enregistrés à intervalles de 2 minutes après la mesure du spectre 2. Ils démontrent le retour de M412 vers le pigment mère, bR570. Le spectre en pointillé (3) est celui du même échantillon après plusieurs heures d'adaptation à l'obscurité. La position de son maximum par rapport au spectre 1 indique qu'il y a eu adaptation. La vignette représente le logarithme de la variation d'absorbance due à la disparition de M412 en fonction du temps après l'irradiation.



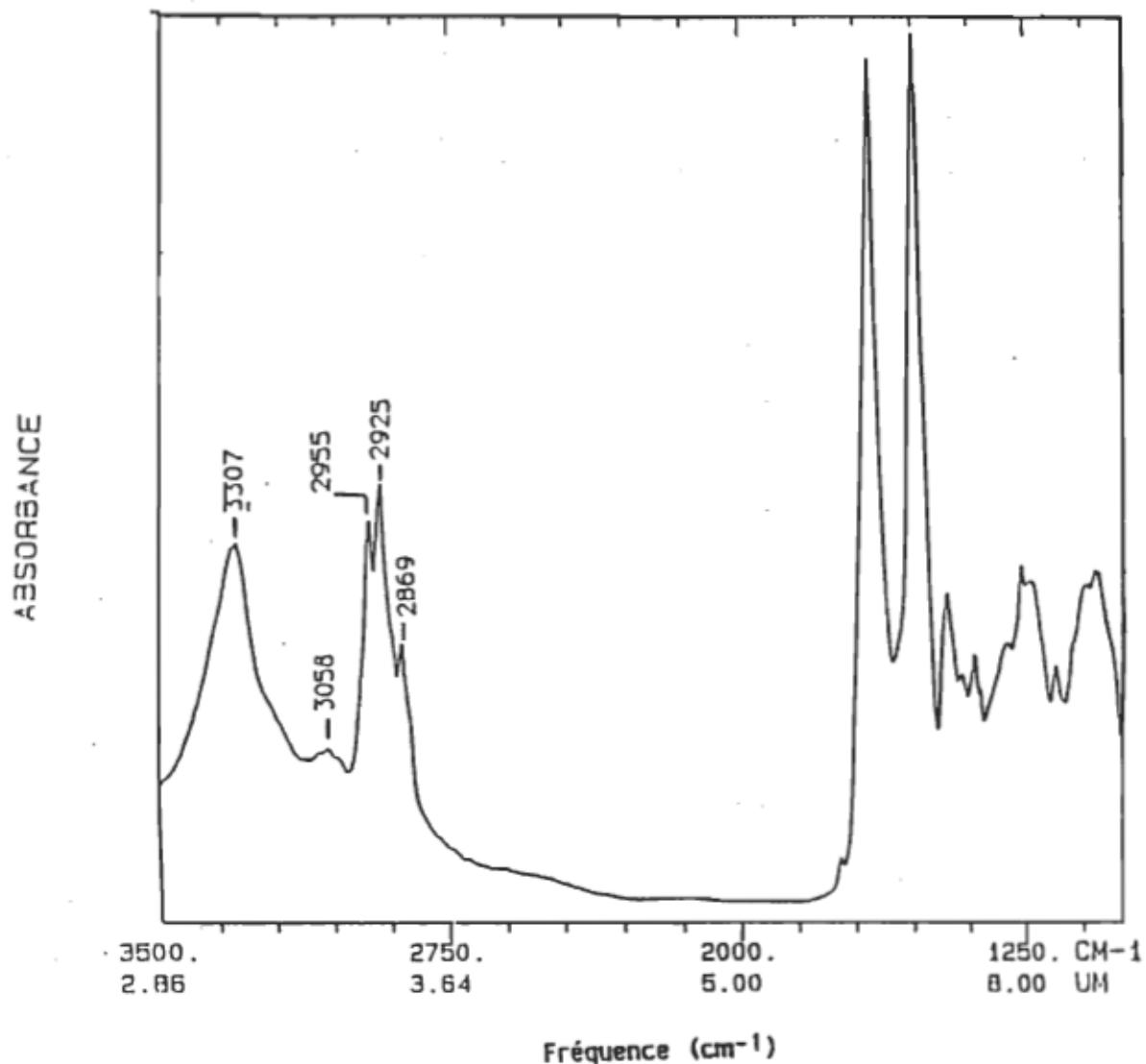


Figure 3.3 : Spectre infrarouge entre 1000 et 3500 cm⁻¹ d'un film sec de membrane pourpre.

1738 cm^{-1} apparaît comme une forte bande dans les spectres IR de la plupart des membranes (Chapman, 1965; Parker, 1971); cependant dans le cas de la MP elle est faible, en raison de l'absence de liens esters dans les lipides contenus dans la MP. Enfin, l'épaulement qui apparaît à 1518 cm^{-1} peut être attribué à la tyrosine (Bendit 1967).

Bien que les spectres IR des films secs de membrane pourpre pris à la température ambiante présentent les mêmes caractéristiques que ceux rapportés dans la littérature, il nous a été impossible d'obtenir des spectres de différence entre les formes adaptées à la lumière et à l'obscurité qui soient exempts de bruit. La raison en est simple: tous les auteurs qui ont rapporté de tels spectres ont effectué leurs mesures à -40°C , alors que les nôtres ont été effectuées à la température ambiante (Figure 3.5). Par contre, on le devine facilement, l'humidité joue un rôle important dans la forme du spectre. Ainsi, la figure 3.6 présente des spectres de films de MP mesurés à différents pourcentages d'humidité. A 100% d'humidité il apparaît sur le spectre une bande très intense aux alentours de 3500 cm^{-1} , dû à la présence d'eau dans le film. On peut également remarquer la bande d'association de l'eau (2125 cm^{-1}). De plus, sous la bande amide I existe la bande due à la vibration de déformation de l'eau (2645 cm^{-1}). Dans ces conditions, on conçoit aisément que le rapport des intensités des bandes amides I/II diminue avec le degré d'hydratation du film. Cette caractéristique est typique de la bactériorhodopsine, car, pour la plupart des protéines, à plus forte raison quand elles sont hydratées, l'intensité de la bande amide I dépasse largement celle de la bande amide II. Un exemple de cet état de fait est donné dans la figure 3.7.

3.1.3. Discussion

Nos observations sur les spectres UV-visible des films de membranes coïncident avec ceux retrouvés dans la littérature en ce qui concerne la lenteur du photocycle sous déshydratation (Lazarev et Terpugov 1980). Le temps du photocycle passe de quelques millisecondes à plusieurs minutes. Une déshydratation complète (<10% d'humidité) n'empêche cependant pas l'isomérisation du rétinal 13-cis en tout trans, contrairement à ce qui a été rapporté par Korenstein et Hess en 1977.

En spectroscopie IR, on observe, entre autre, un pic à 1660 cm^{-1} , caractéristique de la vibration amide I. Cette fréquence indique que la structure secondaire de la bR est principalement formée d'hélices α . La fréquence

ABSORBANCE

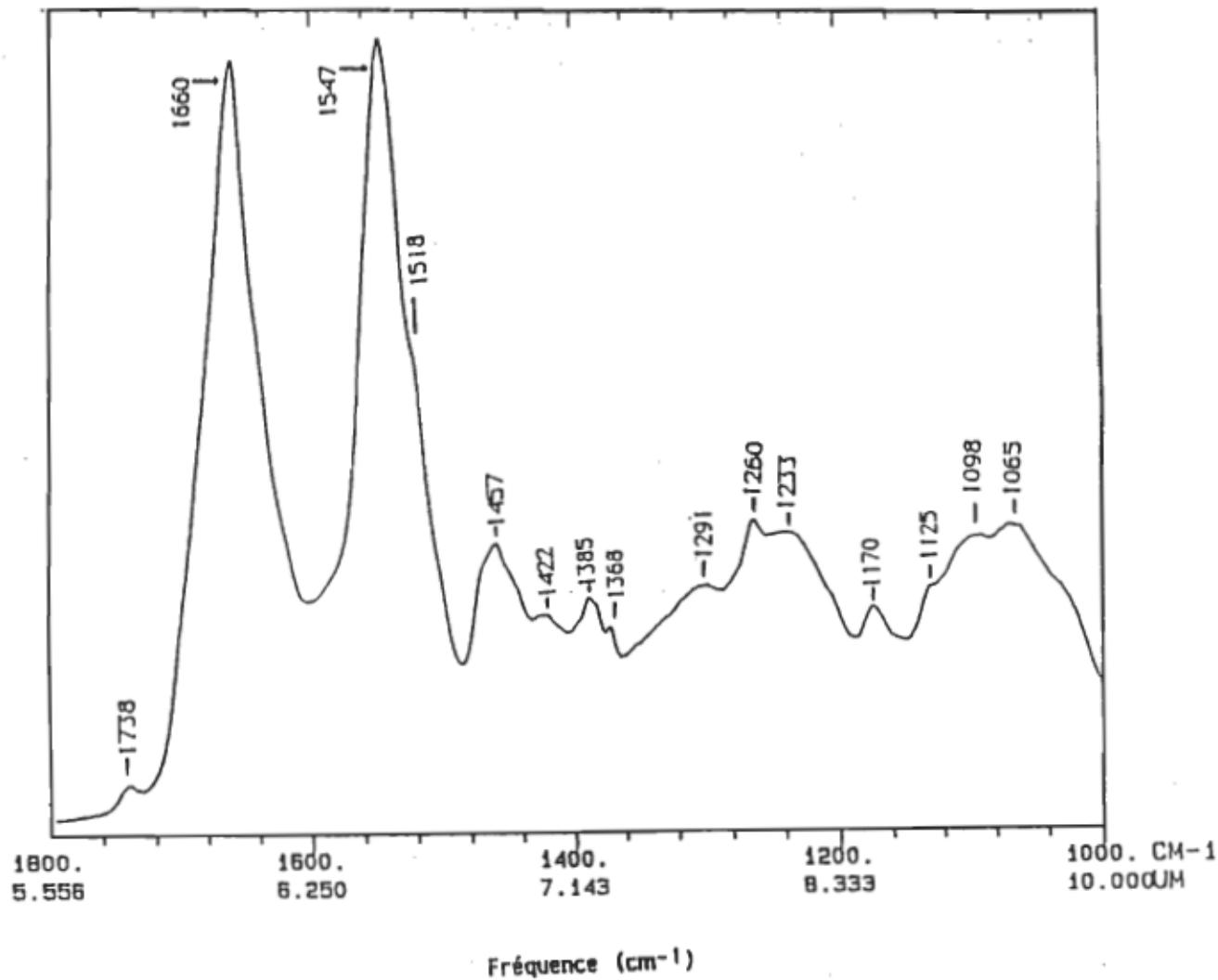
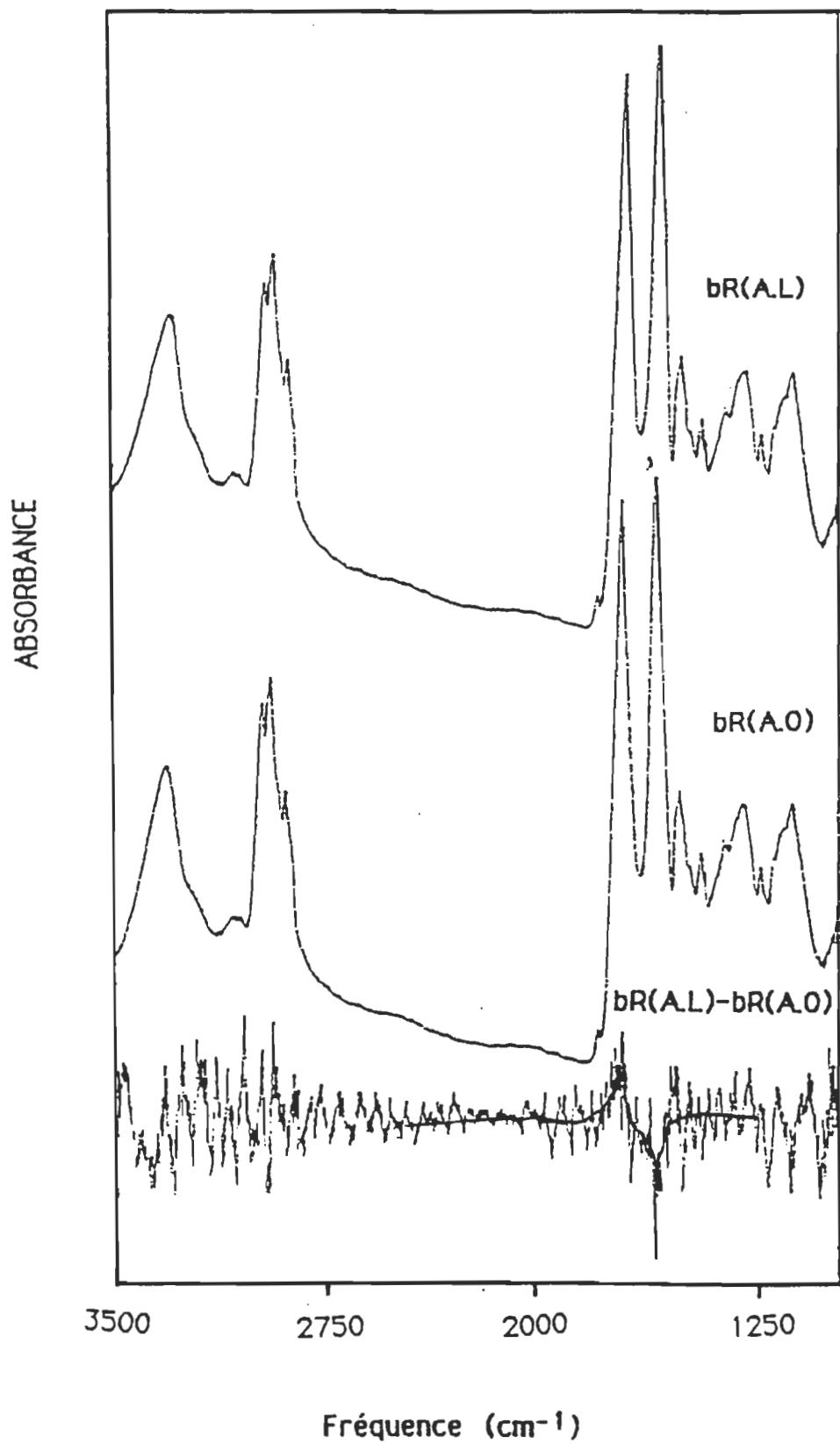


Figure 3.4 : Spectre infrarouge entre 1000 et 1800 cm^{-1} d'un film sec de membrane pourpre.

Figure 3.5 : Spectres infrarouge entre 1000 et 3500 cm^{-1} , d'un film sec de membrane pourpre adapté à la lumière (AL), du même film, mais adapté à l'obscurité (AO) et enfin le spectre de différence entre la forme adaptée à la lumière et celle adaptée à l'obscurité $bR(AL)-bR(AO)$.



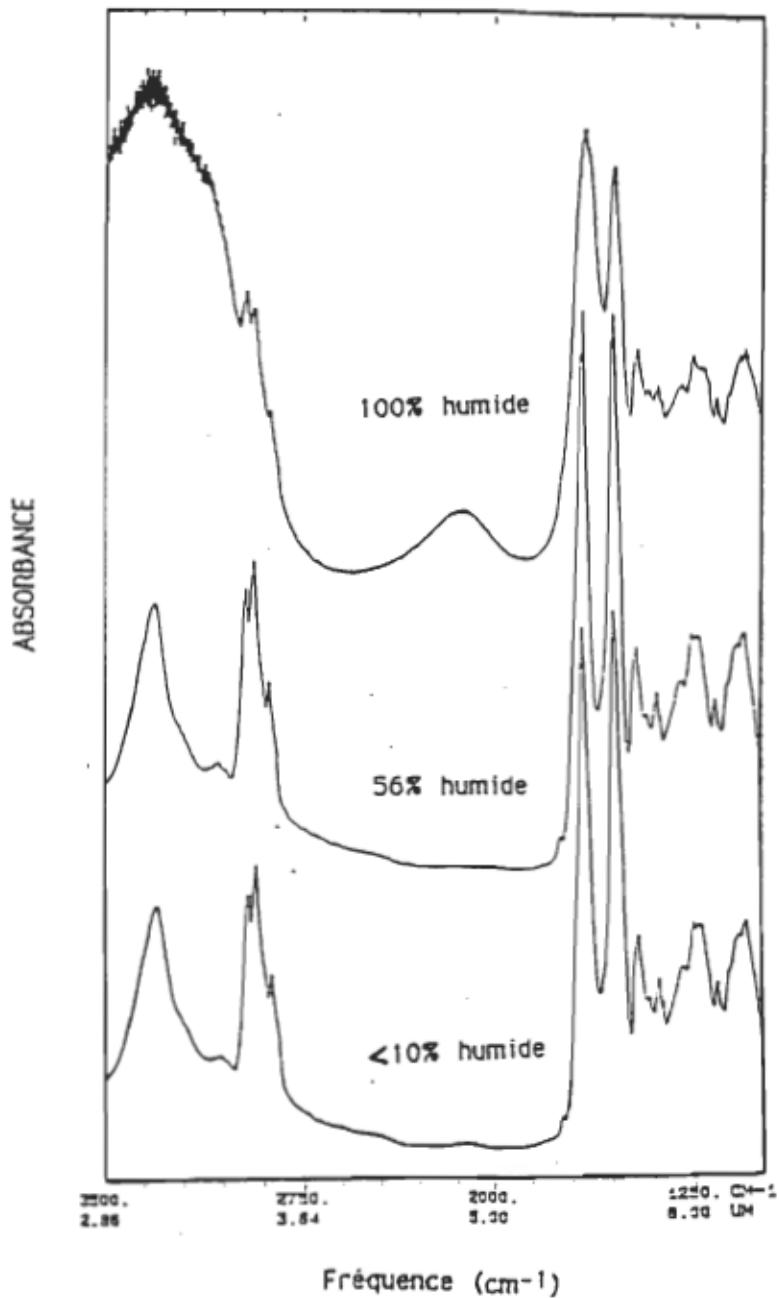


Figure 3.6 : Spectres infrarouge entre 1000 et 3500 cm⁻¹ de films de membrane pourpre équilibrés à différents pourcentages d'humidité.

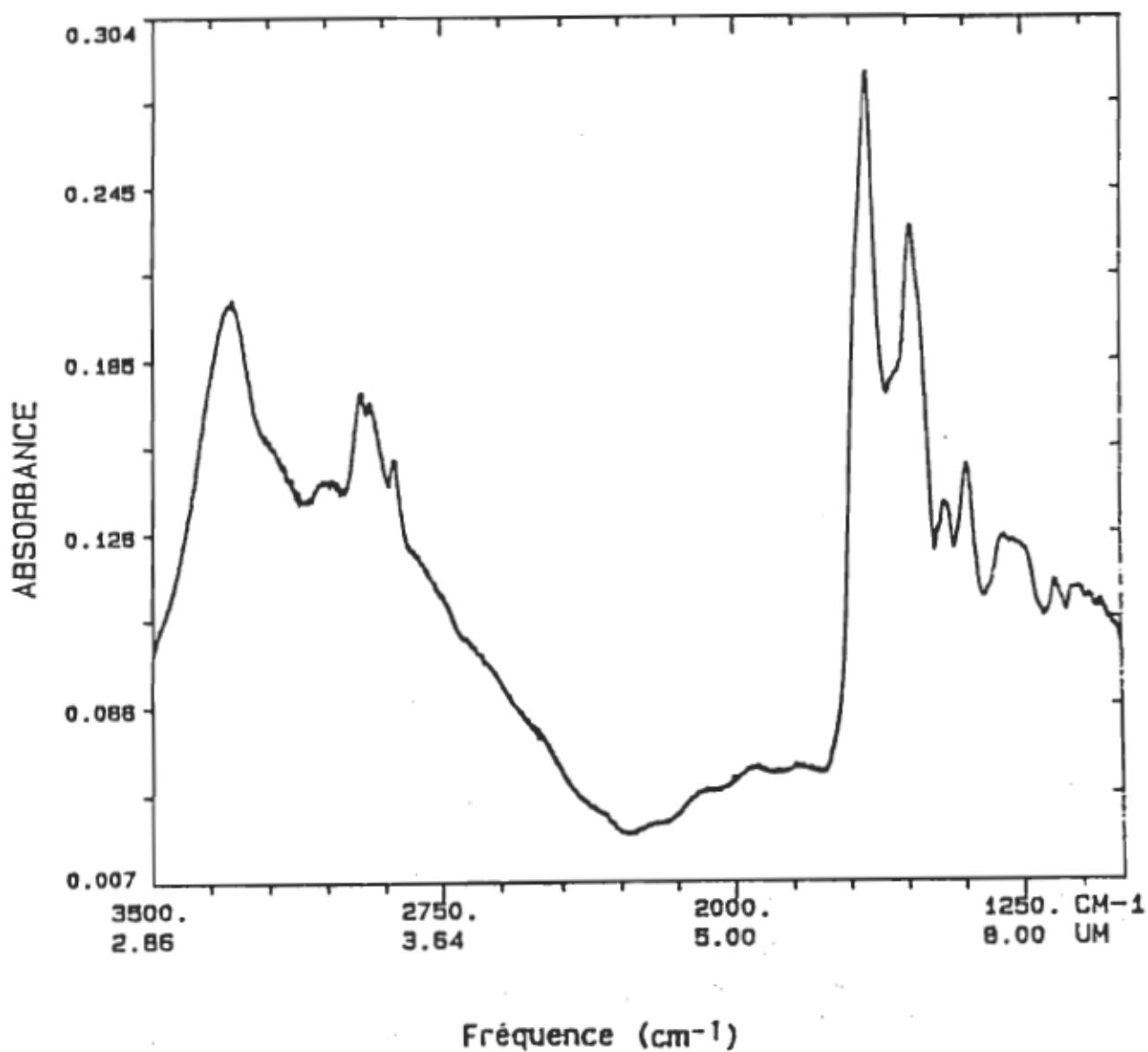


Figure 3.7 : Spectre infrarouge entre 1000 et 3500 cm^{-1} d'un film sec d'albumine bovine.
Le rapport des intensités des bandes amide I/II est de 1.4 : 1.

d'étirement du carbonyle de l'amide des hélices de la bR est cependant 5 cm^{-1} plus élevée que la normale observée pour les hélices α trouvées dans la majorité des protéines(Sandeman, 1955, et Krimm, 1962). Pour expliquer cette exception, deux hypothèses sont possibles: la première est que ceci est dû à la distorsion des hélices, vu qu'elles forment un angle de 26° (Rothschild et Clark 1979) par rapport au plan de la membrane, la deuxième résère à la présence possible de structure autre que l'hélice α tel que le feuillet β (Jap et al., 1983; Lee et a.,l 1987). Quant aux intensités relatives des bandes amides I et II, leur rapport apparemment anormal s'explique si on considère que les fragments de membrane pourpre sont orientés à plat dans les films, disposant ainsi les hélices perpendiculairement au plan de la fenêtre(Simon et al 1978., Heyn et al., 1977). L'intensité d'absorption de la vibration de l'étirement du carbonyle dépend de l'angle relatif entre son moment de transition et la direction du champ électrique (le maximum d'absorption se produit à 0° , le minimum d'absorption à 90°). Il est connu, à partir des études d'absorption polarisée sur des peptides que la direction du moment de transition pour le mode amide I est souvent parallèle à la liaison du carbonyle (Tsuboi. 1962; Sandeman 1955). La vibration de l'amide II est dominée par la déformation dans le plan N-H, qui fait un angle de 72° - 78° avec la liaison carbonyle. Dans le cas d'une hélice α , on peut facilement imaginer, à partir de sa structure, que le maximum des absorptions d'étirement de C=O et N-H se produit lorsque la lumière est polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice α . Par contre, le mode de déformation de N-H absorbe au maximum lorsque le vecteur électrique est orienté perpendiculairement à l'axe de l'hélice α . Ainsi, comme nos mesures sont faites avec une lumière non polarisée, il n'est que normal d'y observer une bande amide II d'intensité relativement élevée, puisque les hélices sont parallèles à l'axe de propagation de la lumière.

Enfin, pour ce qui est des spectres de différence entre la bR(AL) et la bR(AO), il faut rappeler que nous n'avons pu reproduire les spectres retrouvés dans la littérature. Cependant, la majorité des auteurs exécutent leurs spectres de différence à des températures très basses, selon eux, pour diminuer la pression de vapeur d'eau dans les films. Certains chercheurs mesurèrent la différence à -196°C (Rothschild et al., 1982), d'autres à -23°C (Bagley et al., 1982). Il se peut que la différence entre les formes adaptées à la lumière et à l'obscurité soit modulée par

les basses températures, ou bien à ces températures, qu'on voit une différence autre que celle qu'on croit observer.

3.2. Réactivité de la membrane pourpre face aux anesthésiques

3.2.1. Membrane pourpre en suspension aqueuse

En 1985, Nishimura et al. démontrent, pour la première fois, que sous l'action d'anesthésiques volatils tels que l'Halothane ou l'Enflurane, la bR570 adaptée à la lumière voit son maximum d'absorption glisser vers 480 nm, avec un point isobeste aux alentours de 510 nm. Cependant, un excès d'halothane (16 mM) fait disparaître le pigment à 480 nm en faveur d'une nouvelle forme à 380 nm. Les anesthésiques interagissent préférentiellement avec la forme adaptée à la lumière tel qu'on peut le voir sur la figure 3.8 (Henry et al. 1988).

3.2.2. Membrane pourpre en film

3.2.2.1. Effet de l'humidité

Le comportement des films de MP face aux anesthésiques est semblable à celui observé en solution aqueuse lorsque les films sont complètement hydratés (100% d'humidité) mais, un film sec de MP ne réagit pas avec l'Enflurane même après 36 heures d'incubation (Fig 3.9) alors qu'un film complètement humide commence à réagir avec l'Enflurane après seulement 4 minutes d'incubation. Dans ces conditions, après 25 minutes, la transformation de la bR570 en bR480 est presque totale et ainsi, un équilibre s'établit entre les deux formes de la bR. Les films secs (<10% d'humidité) de MP sont inertes face aux traitements par les anesthésiques volatils. La réactivité des films dépend donc de leur humidité. C'est à 56% d'humidité qu'ils commencent à réagir avec les anesthésiques (Enflurane) en formant la bR480. Il est raisonnable de croire que l'hydratation des films joue le rôle d'une barrière physique pour les anesthésiques et que l'eau peut être un intermédiaire ou un catalyseur entre l'anesthésique et la membrane pourpre.

3.2.3. Spectres infrarouge des formes 570, 480 et 380 de la membrane pourpre

L'absence de réaction de la bR dans des films secs nous oblige à mesurer les spectres IR de la bR dans des films équilibrés avec une atmosphère à 56% d'humidité afin de comparer les modifications du spectre vibrationnel du pigment

Figure 3.8 : Spectres d'absorption de 6.9 µM de bactériorhodopsine suspendue dans un tampon Tris-HCl, 50 mM (pH=8.0) en présence de concentrations croissantes d'anesthésiques. La série des spectres correspond aux membranes pourpres (spectre 1) traitées avec des concentrations croissantes d'Enflurane (A) ou d'Halothane (B), jusqu'à une concentration finale de 1.0% (v/v) (spectre 9 pour l'Enflurane et spectre 11 pour l'Halothane).

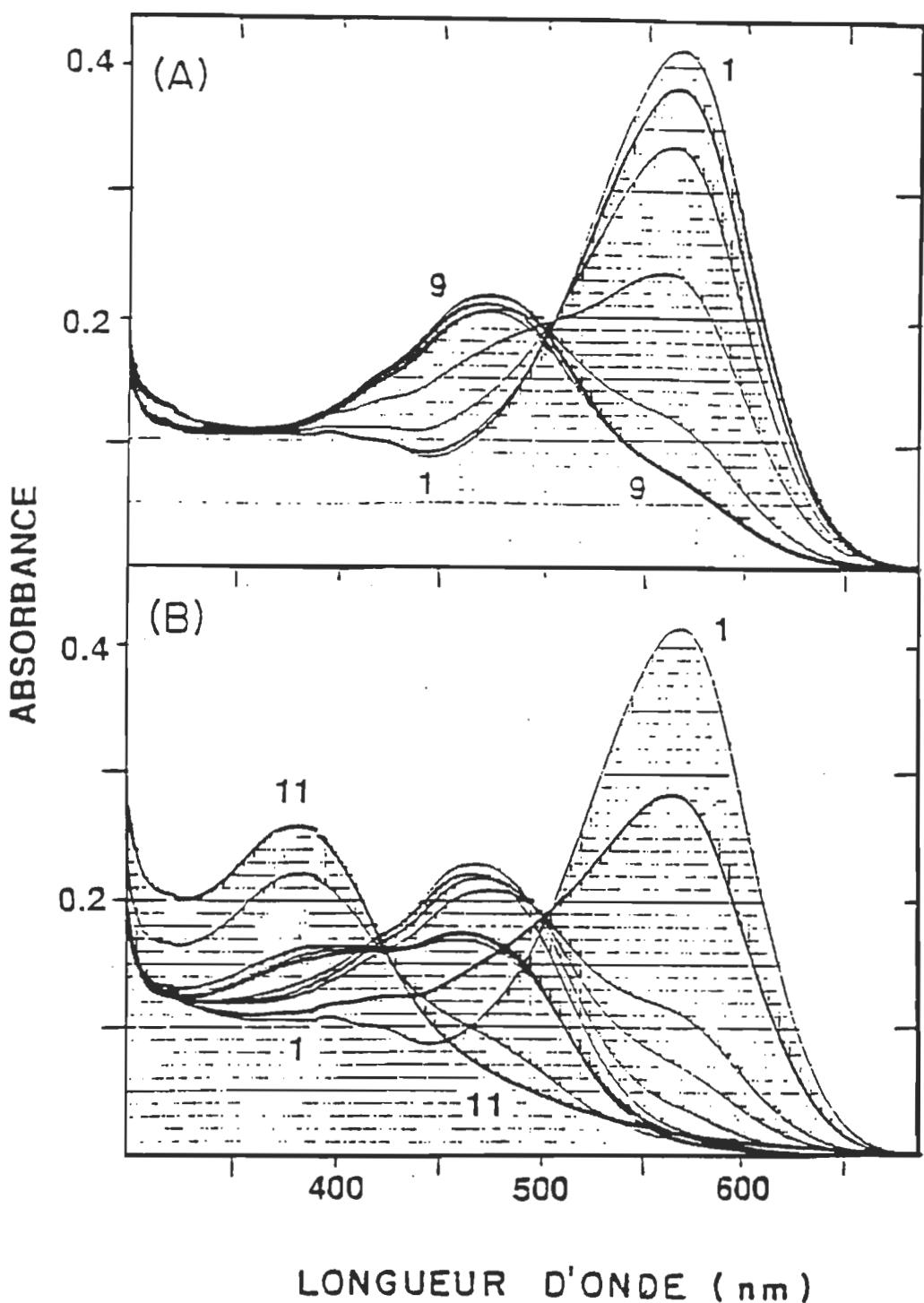
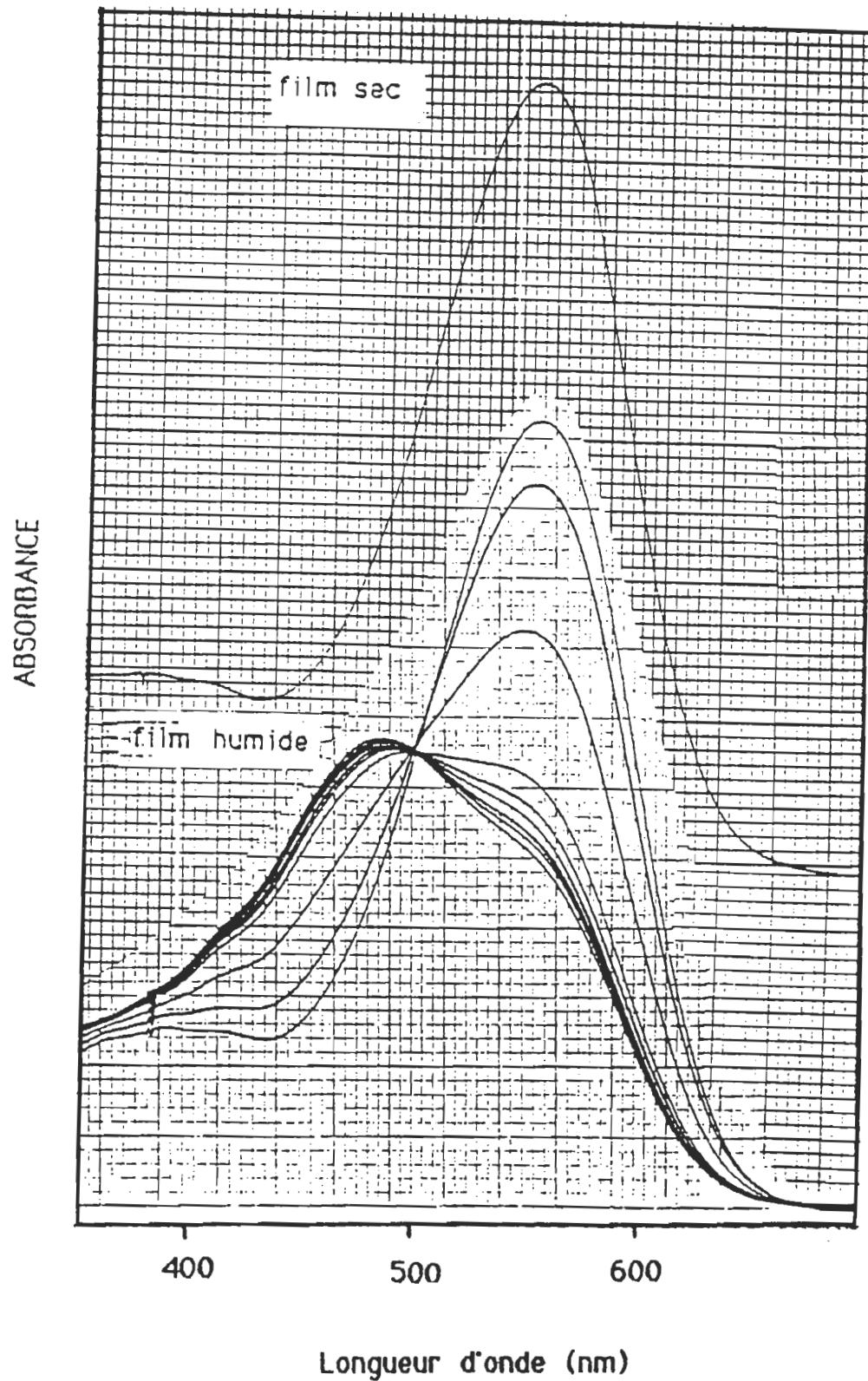


Figure 3.9 : Spectres représentant l'effet de l'Enflurane sur des films sec et humide de membrane pourpre. Le premier spectre correspond à celui d'un film sec de membrane pourpre traité pendant 36 heures avec de l'Enflurane. La série de spectres du bas est celle d'un film humide (1) traité par l'Enflurane pendant 4, 8, 12, 16, 20, 25 et 28 minutes (spectres 2 à 8), respectivement.



avec celles de son spectre électronique quand ce dernier est transformé sous la forme absorbant à 480 ou 380 nm.

La formation de la bR480 sous l'action d'anesthésique (Enflurane) à 56% d'humidité, ne présente pas de grands changements au niveau spectre infrarouge de l'échantillon. Les changements qui accompagnent la génération de la bR480 sont subtils ou bien l'utilisation des spectres absous infrarouge n'est pas adéquate pour l'étude de ce genre de phénomène. Alors on a généré la forme 380 (sous l'action de l'halothane), qui est considérée comme une forme dénaturée, puis on a comparé ces deux pigments (380 et 480) avec la forme native adaptée à la lumière bR570 (Fig. 3.10). L'allure générale des trois spectres est identique, sauf que les intensités relatives des bandes amide I et II changent en fonction de la forme du pigment. Sous le même pourcentage d'humidité du film (56% humidité) et allant de la forme 570 vers 380, le rapport amide I/II augmente de 1:1 à 1:1.6.

3.2.4. Comparaison de la forme 380 nm de la bR avec le pigment dénaturé

L'apparition d'une bande à 380 nm lors du traitement des membranes pourpre avec de l'Halothane pourrait être associée à la dénaturation de la bactériorhodopsine car cette longueur d'onde d'absorption maximale est près de celle d'un rétinal qui aurait perdu ses interactions avec la protéine. Dans ce contexte, il devient pertinent de comparer les spectres IR de bR380 avec ceux du pigment dénaturé.

3.2.4.1. Dénaturation thermique des membranes pourpres

Des échantillons de membrane pourpre dénaturés par la chaleur ont été obtenus en préparant des films à partir de suspensions aqueuses de membrane pourpre préalablement incubée pour des périodes de temps variables à 90 °C.

L'analyse des spectres infrarouge s'est faite sur une plage de fréquences allant de 1480 cm^{-1} à 1730 cm^{-1} . Les spectres de la figure 3.11 présentent respectivement de haut en bas, la MP après une incubation de 15, 30, 60, 120, 225 et plus de 260 minutes. On voit que la dénaturation thermique est caractérisée par l'augmentation du rapport des intensités des bandes amides I et II et le déplacement progressif du pic de l'amide I de 1660 cm^{-1} à 1632 cm^{-1} . Cette position est caractéristique de la présence de feuillet β . La quantité de la forme β augmente avec le temps de traitement si on se fie à l'augmentation de l'intensité du pic à

Figure 3.10 : Spectres infrarouge entre 1000 et 3500 cm^{-1} de films équilibrés à 56% d'humidité. Le premier spectre représente une membrane pourpre native adaptée à la lumière bR570, le second correspond au pigment bR480 généré par l'Enflurane et le dernier correspond au pigment bR380 généré par l'Halothane. Dans ces spectres le rapport des intensités des bandes amides I/II passe de 1 à 1.06 puis finalement à 1.6.

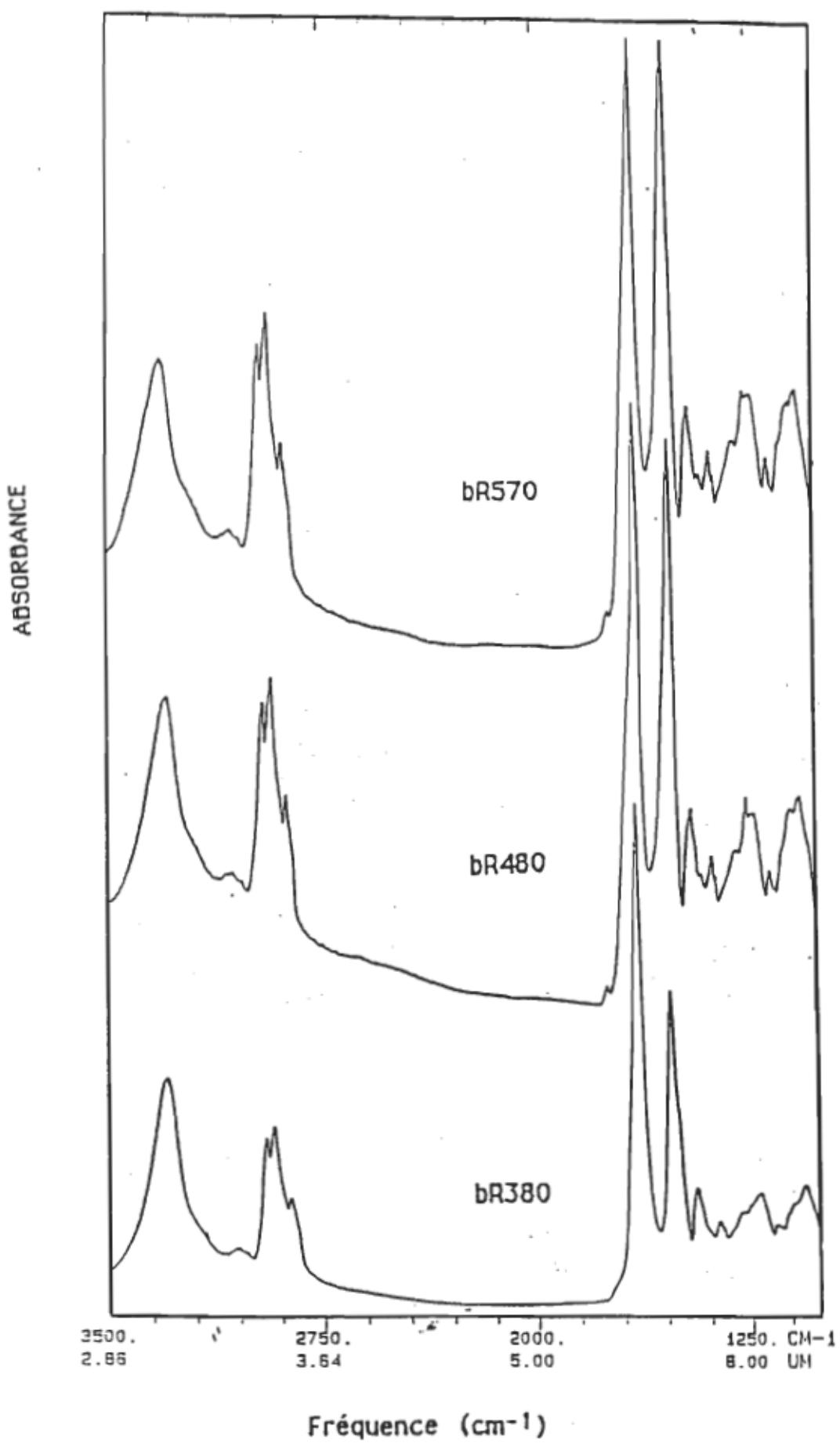
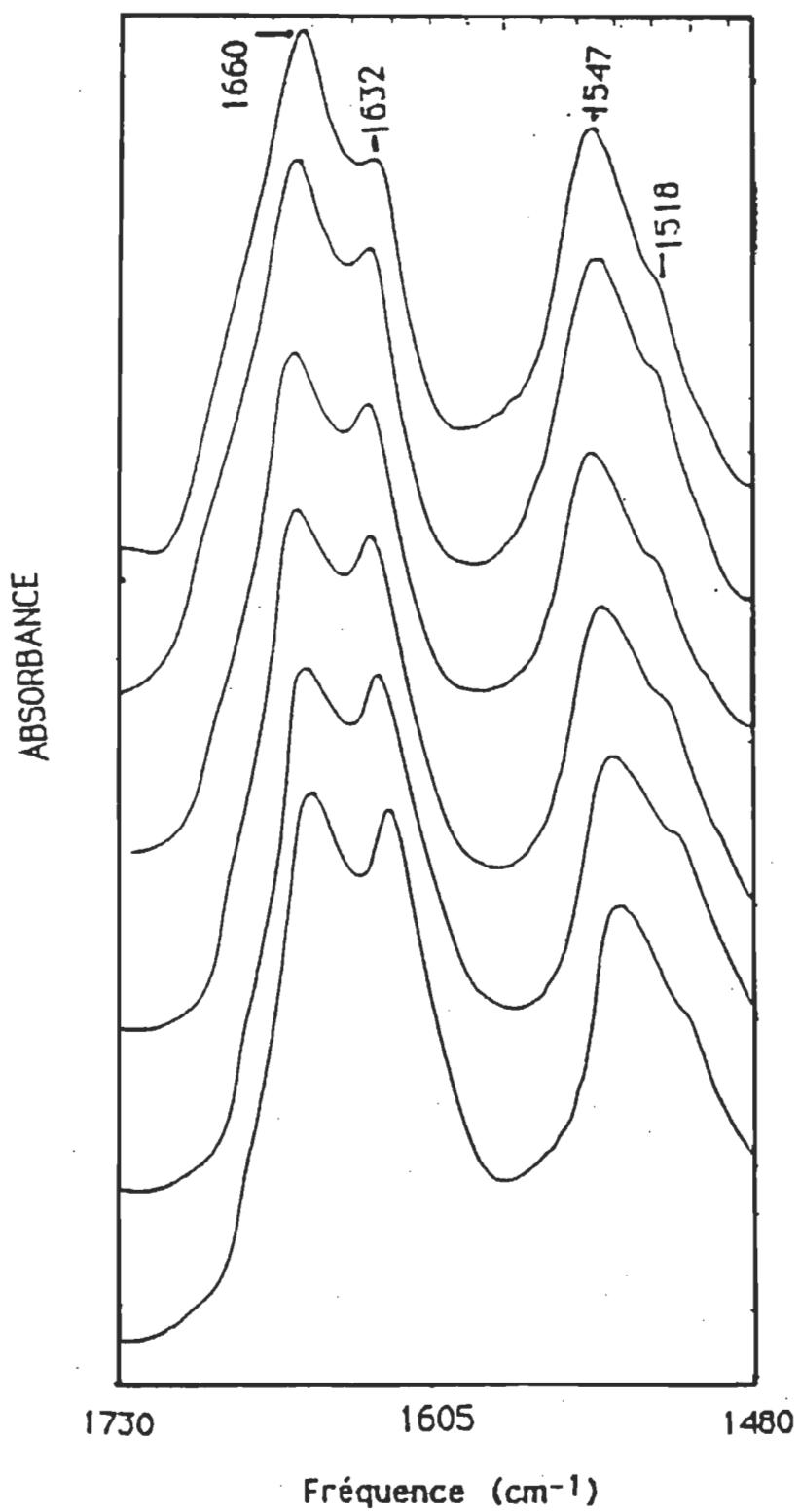


Figure 3.11 : Spectres infrarouge entre 1480 et 1730 cm⁻¹ de films de membrane pourpre dénaturée thermiquement. Les spectres présentent respectivement de haut en bas, la membrane pourpre après une incubation de 15, 30, 60, 120, 225 et 260 minutes à 90 °C.



1632 cm^{-1} . L'épaulement à 1518 cm^{-1} , attribué à la tyrosine est plus prononcé dans ce cas ci, peut-être que cela est dû à la libre vibration de cette dernière dans l'état bR380.

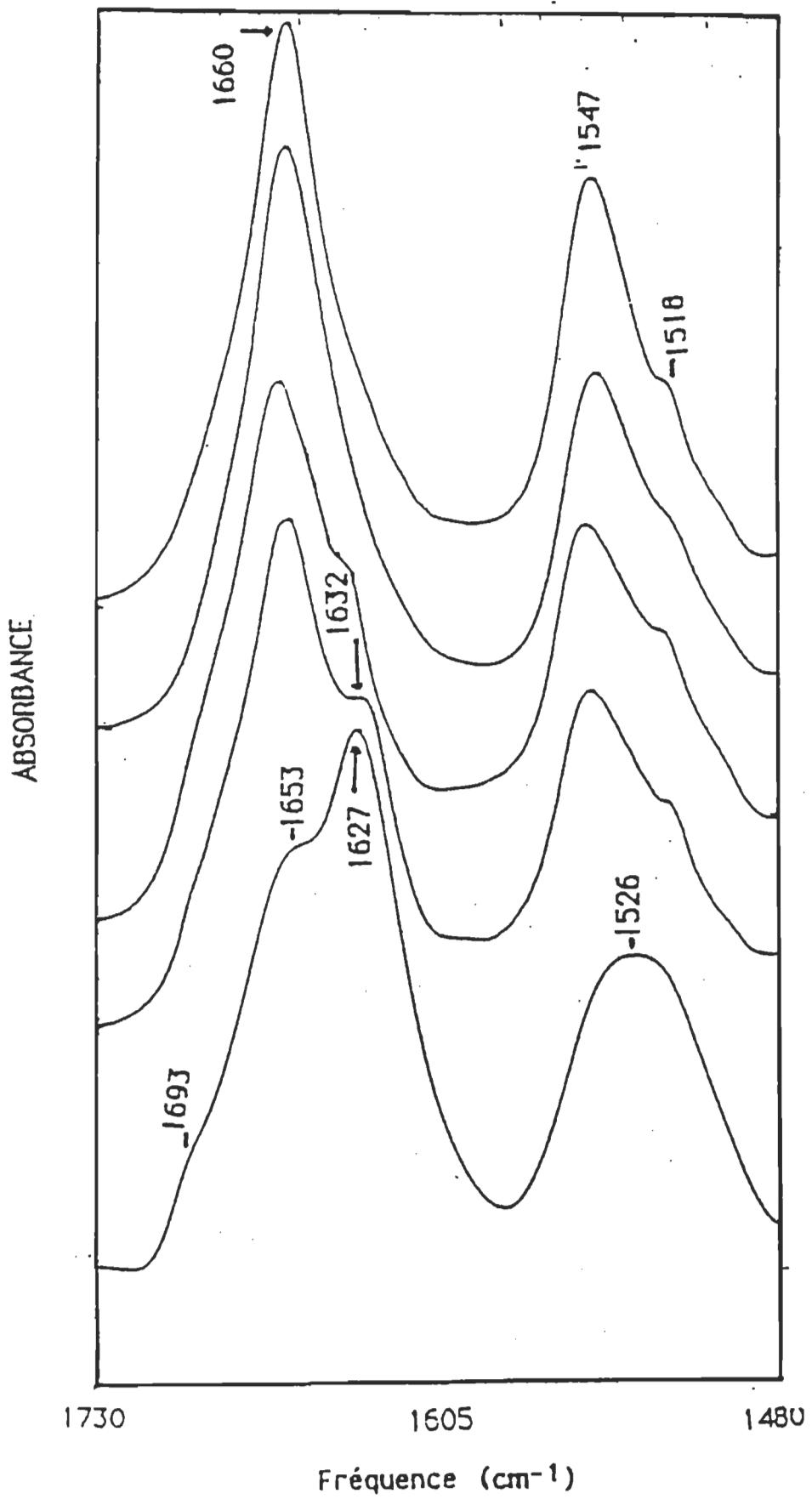
3.2.4.2. Dénaturation de la membrane pourpre par des solvants organiques

Toujours à des fins de comparaison, nous avons mesuré les spectres IR de films préparés à partir de membrane absorbant à 380 nm , obtenues par traitement des membranes pourpres avec différents solvants.

Les résultats de ces dénaturations sont présentés sur la figure 3.12. Par comparaison avec la bR380 obtenue en présence d'Halothane, la dénaturation par l'acétone ne génère aucun glissement ni aucun pic nouveau et présente le même rapport d'intensité des bandes amide I/II. La dénaturation par une base forte, NaOH, ainsi que par l'éther font apparaître le pic à 1632 cm^{-1} , attribué à la présence de feuillets β , également observé lors de la dénaturation thermique. Lors d'une dénaturation par un mélange chloroforme/méthanol, on obtient un pigment incolore. Le spectre IR de la protéine membranaire dans ce cas subit des changements importants. La disparition du pic à 1660 cm^{-1} est totale et peut être interprétée comme une perte de la structure secondaire de l'opsine qui était majoritairement hélicoïdale. L'élargissement du pic à 1547 cm^{-1} ainsi que son glissement vers 1526 cm^{-1} , avec l'apparition de deux nouveaux pics l'un à 1653 cm^{-1} et l'autre à 1693 cm^{-1} , indiquent que la structure dominante de la protéine dans cet état est la pelote statistique.

On voit donc que l'apparition des formes "dénaturées" de la bR en présence de différents solvants génère trois types de spectres infrarouge: i) ceux où on n'observe qu'une augmentation du rapport des intensités des bandes amide I/II, c'est le cas de l'échantillon traité par l'acétone, ii) ceux où on distingue nettement l'apparition d'une bande à 1632 cm^{-1} , caractéristique de la structure β , c'est le cas des échantillons traités au NaOH ou à l'éther, et enfin iii) ceux où les bandes amides I et II à 1627 et 1526 cm^{-1} laissent croire à une structure en pelotte statistique, c'est le cas de l'échantillon traité au chloroforme-méthanol. Dans ce dernier cas seulement, on peut vraiment parler de dénaturation. Dans les autres cas, il est évident que nous sommes en présence d'une conformation fortement modifiée, la position du maximum d'absorption et la présence d'un épaulement caractéristique de la structure β en font foi. Néanmoins, cette structure modifiée ne

Figure 3.12 : Spectres infrarouge entre 1480 et 1730 cm⁻¹ de films de membrane pourpre après traitement avec différents solvants organiques. De haut en bas, les spectres correspondent aux films obtenus à partir de membranes pourpres traitées par 44.5% d'acétone, 1.0% d'Halothane, 1M NaOH, 30% d'éther et 50% d'un mélange chloroforme-méthanol (7:2).



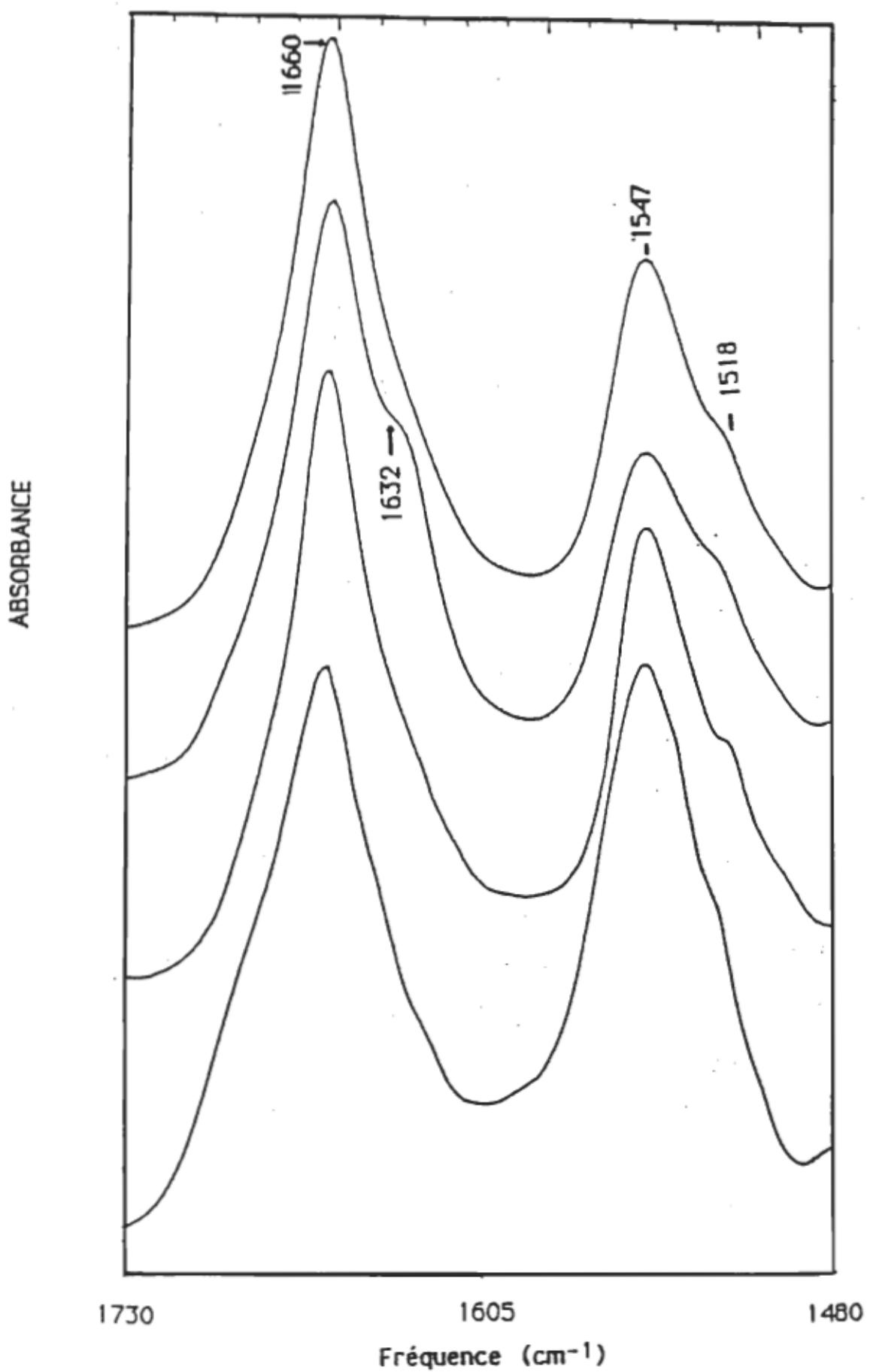
correspond pas obligatoirement à une dénaturation au sens irréversible du phénomène. Au cours de la réalisation de ce travail, nous avons observé de façon tout à fait fortuite que la formation de la bR380 par addition d'acétone aux membranes pourpres était réversible. En effet des films de bR380 préparés à partir de tels échantillons avaient retrouvé leur coloration pourpre après avoir été laissés à l'air libre pour la nuit. En tentant de reproduire ce phénomène, nous avons réalisé que la concentration d'acétone utilisée pour générer la forme 380 nm du pigment déterminait la quantité de membrane pourpre qui pouvait être régénérée lors de l'évaporation de l'acétone. Ainsi, un traitement de 30 minutes en présence de 37.5% (v/v) d'acétone permettait d'obtenir des films de bR380 complètement régénérables en bR570 après évaporation d'acétone tandis que la génération de bR380 en présence de 44% d'acétone était irréversible. On est donc en présence de formes réversibles et non-réversibles de bR380. La figure 3.13 donne les spectres infrarouge des formes réversible et irréversible de la bR380. Tel que prévu, la forme irréversible et caractérisée par la présence d'un épaulement à 1632 cm^{-1} (feuillet β) tandis que la forme réversible montre un spectre qui ne peut être distingué de la forme bR380 générée par l'Halothane. Il est opportun ici de signaler que la régénération de bR570 à partir de bR380 se traduit, dans le spectre infrarouge par un rétablissement du rapport des intensités des bandes amide I/II et l'atténuation de l'épaulement à 1518 cm^{-1} .

3.2.5. Discussion

Une certaine hydratation est nécessaire à l'action des anesthésiques en dépit du fait que les films secs retiennent leur activité photochimique et leur propriété d'adaptation à la lumière et à l'obscurité (contrairement aux données retrouvées dans la littérature). Les molécules d'eau nécessaires pour l'interaction effective MP/anesthésique peuvent être des intermédiaires de ce mécanisme ou des catalyseurs. Ces expériences effectuées jusqu'à présent sont insuffisantes pour attribuer aux molécules d'eau leur rôle exacte au sein du phénomène permettant la formation du pigment bR480 lors du traitement de la MP par les anesthésiques volatils, tel que l'Enflurane ou l'Halothane.

Le caractère inhabituel résidant dans la variation des intensités relatives des bandes amide I et II de la bactériorhodopsine est spécifique à cette dernière. Le gain d'intensité du pic de l'amide II relativement à celle de l'amide I, est interprété

Figure 3.13 : Spectres infrarouge entre 1480 et 1730 cm⁻¹ de films obtenus après traitement de la membrane pourpre avec l'acétone. De haut en bas, les deux premiers spectres correspondent à une membrane pourpre traitée avec 44.5% d'acétone (bR380); le premier a été obtenu au début et le deuxième après 30 minutes de traitement. Le troisième est celui de membranes traitées 30 minutes dans 37.5% d'acétone. Le quatrième correspond à la forme bR570 régénérée après évaporation de l'acétone de l'échantillon précédent.



comme étant dû à l'orientation des hélices de la protéine. Les hélices α tendent à former un angle droit par rapport au plan de la fenêtre IR. Le phénomène observé sur les spectres IR du pigment bR480 formé sous l'action d'anesthésique (Enflurane) donne lieu à la même interprétation. Les hélices perdent leur orientation initiale dans la membrane pourpre native qui était de 26° par rapport au plan de la membrane, pour s'incliner d'avantage en direction du plan de la fenêtre IR.

La formation du pigment bR380 s'accompagne d'une augmentation accrue du rapport des intensités amide I/II. Ce comportement observé sur les spectres IR de la bR380 est interprété par un effondrement accru des hélices α . Le pigment bR380 présente deux formes distinctes, une forme réversible, c'est à dire qui régénère la forme native de la protéine, et une autre non réversible; ces deux formes sont notées respectivement bR380rev et bR380nonrev. Le facteur déterminant le caractère de réversibilité réside dans la présence ou non de feuillet β dans le pigment bR380. La bR380nonrev a perdu une partie de sa structure hélicoïdale en faveur du feuillet β , caractérisé sur son spectre IR par la présence d'un pic à 1632 cm^{-1} . La bR380rev quant à elle a gardé toute sa structure hélicoïdale. On pense que la régénération de la forme native est probablement effectuée sous l'action de la seule force hydrophobe du milieu.

Comme l'acétone peut générer la bR380 avec possibilité de réversibilité en un pigment absorbant à 570 nm, il serait logique d'étudier d'une façon complète l'effet de l'acétone sur la membrane pourpre.

3.3. Génération réversible de différentes formes spectrales de bactériorhodopsine par addition de solvants organiques aux membranes pourpres

3.3.1. Acétone et alcools

L'action des cétones, et plus particulièrement l'acétone, sur la membrane pourpre fait glisser son maximum d'absorption vers des longueurs d'ondes plus basses et forme ainsi le pigment bR480. A notre connaissance, la formation de la bR480 sous l'action de l'acétone n'a pas été rapportée auparavant.

Pour les spectres UV-visible pris instantanément, on peut voir qu'entre 0 et 9.1% (v/v) d'acétone le maximum d'absorption ne varie pas, par contre, l'absorbance varie en subissant un glissement hypochromique plus important que

celui qu'on pourrait attribuer à la dilution de la préparation par l'acétone. Ce n'est qu'à partir de 16.7%(v/v) qu'apparaît un nouveau pic sur le spectre UV-visible ayant un maximum d'absorption à 480 nm. A 23.1 et 28.6% la bR570 disparaît complètement en faveur de la forme rouge bR480. En vue d'étudier la stabilité de la forme bR480 ainsi générée, on a suivi l'évolution des spectres en fonction du temps et à différents pourcentages d'acétone.

Après incubation de 30 minutes, on remarque qu'à 33.4, 37.5, et 41.2 % (v/v) d'acétone, les spectres présentent un nouveau pic à 380 nm qui est attribué dans la littérature (Nishimura et al 1985; Brouillette et al 1987) à la dénaturation de la protéine ou au rétinal libre dû à l'hydrolyse de la base de Schiff, avec la complète disparition du pigment bR480 (Fig. 3.14). Cette forme bR380 est aussi observée lorsqu'on traite la bR native par une grande concentration d'Halothane (Lee et al 1991).

Après incubation de 90 minutes, en laissant les tubes renfermant le mélange membrane pourpre-acétone à l'air libre, on remarque qu'aux pourcentages 9.1, 16.7, 23.1, et 28.6 % d'acétone, le phénomène de réversibilité est déjà entamé, ceci est vérifié sur les spectres UV-visible par le début d'une disparition du pigment bR480 en faveur de la forme native bR570.

Après 24 heures, une certaine quantité d'acétone s'évapore et la réversibilité est complète même pour des concentrations élevées d'acétone (37.5 et 41.2%); il faut noter ici que la réversibilité après un traitement à 41.2% n'est observable que deux fois sur trois; la membrane pourpre retrouve son maximum d'absorption à 570 nm et retrouve aussi sa propriété d'adaptation à la lumière et à l'obscurité.

La réversibilité du phénomène est aussi observée lorsqu'on dilue la bR380 avec de l'eau. La réversibilité à ce niveau est lente et la bR570 n'est régénérée complètement qu'après 17 heures (Fig. 3.15). Il est intéressant de noter qu'au cours de la régénération de la bR570 lors de la dilution de la bR380, la forme bR480 est formée en quantité significative et de façon transitoire. Lee et al. en 1991 ont observé cette réversibilité lorsque la forme bR380 est générée par un excès d'Halothane, néanmoins dans leur étude la régénération est partielle et dépend du temps que le pigment a passé sous la forme 380 nm.

Le méthanol est le plus simple des alcools. Son action sur la membrane pourpre se compare à celle de l'acétone. L'addition de méthanol aux membranes fait décroître l'intensité du pic d'absorption à 570 nm par un facteur qui dépasse le

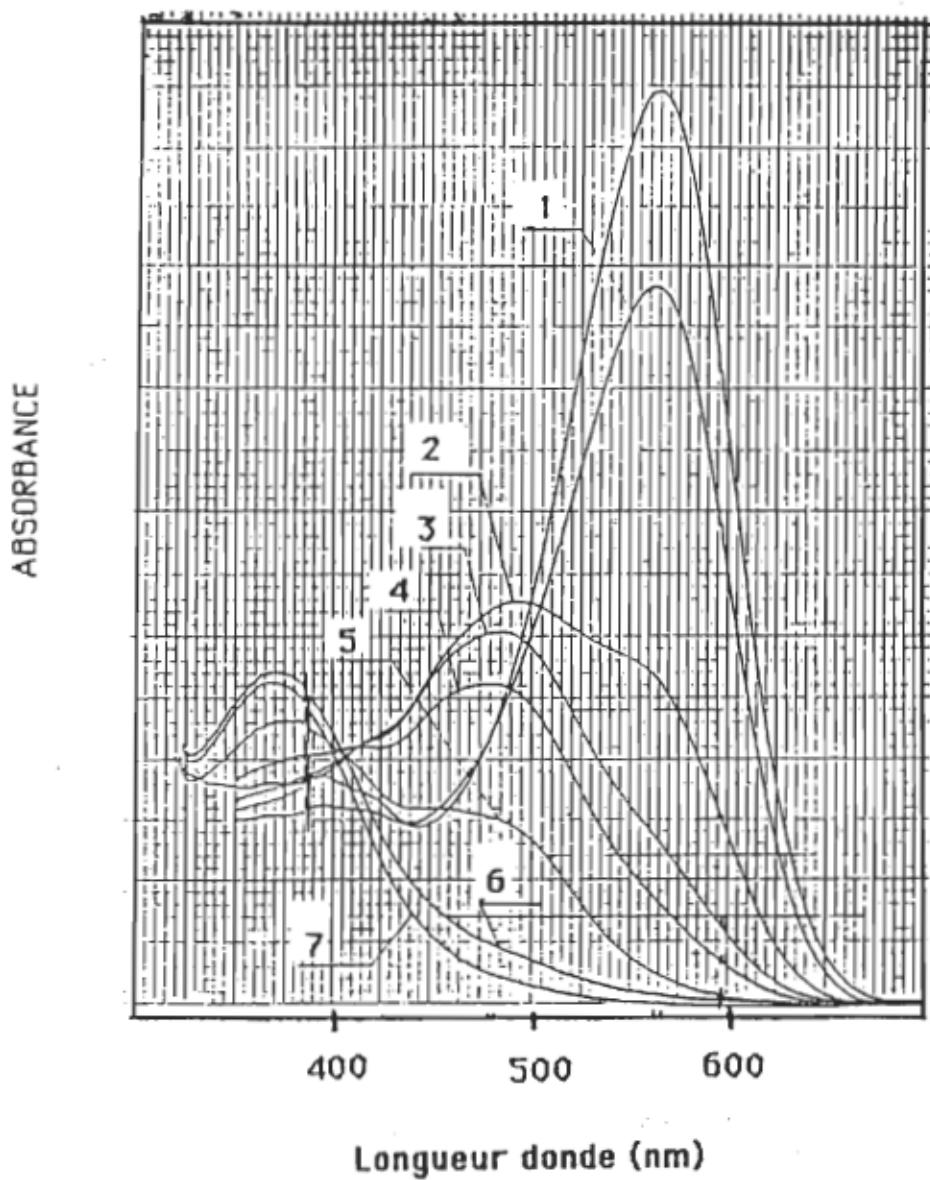


Figure 3.14 : Effet de l'acétone sur la membrane pourpre. Les spectres 1 à 7, ont été mesurés après 30 minutes d'incubation des membranes dans 9.1, 16.7, 23.1, 28.6, 33.4, 37.5 et 41.2% (v/v) d'acétone, respectivement, dans un tampon phosphate (100 mM), à pH=8.0.

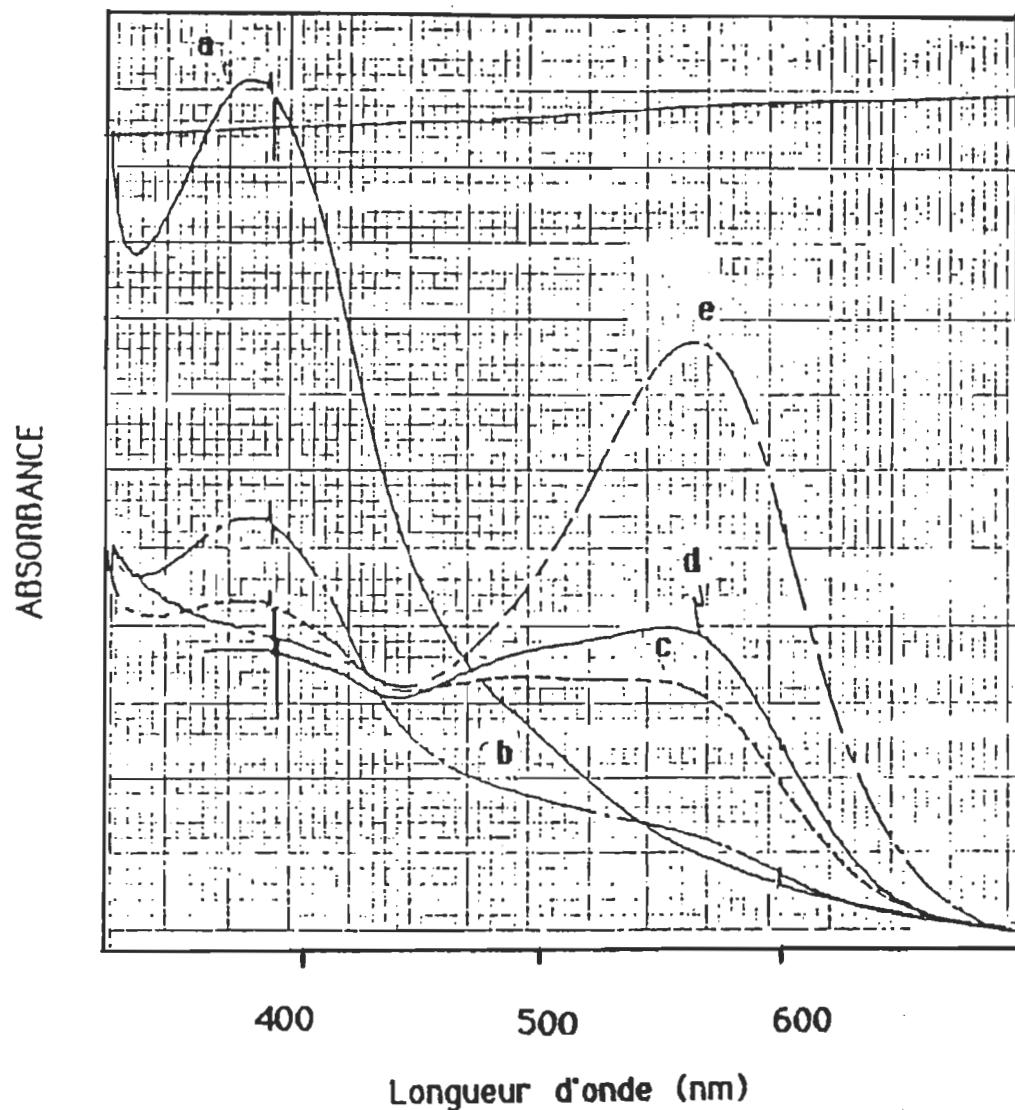


Figure 3.15 : Réversibilité de l'effet de l'acétone. Régénération de bR570 par dilution de bR380. Le spectre a est celui de membranes pourpres dans un tampon phosphate (100 mM) à pH=8.0 contenant 37.5% d'acétone, condition utilisée pour générer la forme bR380. Le spectre b est obtenu immédiatement après dilution 2 fois avec de l'eau. Les spectres c, d et e, montrant la régénération progressive de bR570, ont été obtenus respectivement 30 minutes, 90 minutes et 17 heures après la dilution.

facteur de dilution, comme dans le cas de l'acétone. A partir de 23.1% de méthanol la diminution de l'intensité d'absorption à 570 nm se fait par un gain dans la largeur de la bande. A partir de 47.4%, on observe l'établissement d'un équilibre entre les deux formes de bactériorhodopsine : bR570 et bR480. La dilution du pigment rouge formé précédemment, permet la récupération instantanée de la bR570.

L'action de l'éthanol sur la membrane pourpre est plus prononcée que celle du méthanol. La formation de la bR480 sous l'effet de l'éthanol, débute à partir de 16.7%, mais pour déplacer complètement l'équilibre du côté de la forme rouge, on utilise 33.4% d'éthanol. La réversibilité de la forme bR480 en bR570 est observable aussi pour ce cas ci. La figure 3.16 montre l'effet de concentrations croissantes d'éthanol sur le spectre des membranes pourpres.

L'addition de 16.7% de 2-propanol dans une suspension de membrane pourpre à pH=8 (tampon phosphate) donne également la forme bR480. Pour le 1-butanol, il a suffit de 2.9% pour générer la bR480 et établir un équilibre entre elle et la bR570.

Tous les pigments rouges générés par les cétones ou les alcools à pH=8 sont stables. Il faut noter aussi qu'en comparant la quantité d'alcool utilisée pour traiter la membrane pourpre, on se rend compte que plus la chaîne hydrocarbonée de l'alcool est longue moindre est la quantité nécessaire pour former le pigment bR480. Cette constatation mérite un intérêt particulier vu que lorsque la chaîne carbonée de l'alcool augmente, l'importance du groupement hydroxyle -OH décroît et la constante diélectrique approche la valeur de deux qui est celle des alcanes. Alors la partie hydrophobe du réactif est importante.

3.3.2 Règle de Meyer-Overton

Le fait que l'acétone et les alcools produisent des effets comparables à celui de l'Enflurane ou de l'Halothane permet de vérifier si le déplacement spectral qui se produit lors de l'ajout d'anesthésiques aux membranes pourpres est un phénomène qui obéit à la règle de Meyer-Overton.

La règle de Meyer-Overton établit une corrélation directe entre la solubilité d'un anesthésique dans les lipides et son potentiel anesthésiant. L'hypothèse, issue de cette règle, veut que le site d'action des anesthésiques soit la

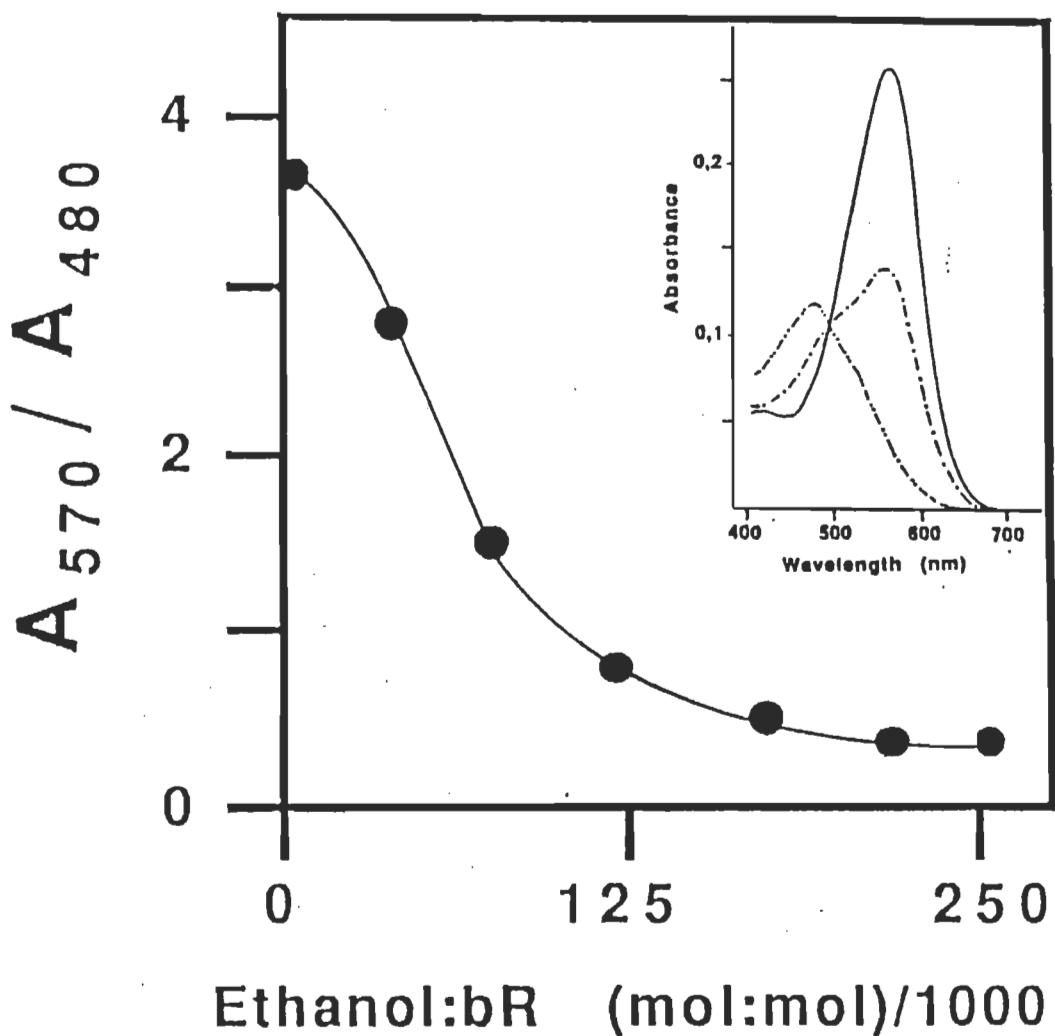


Figure 3.16: Conversion de la bR570 en bR480 suivant l'addition progressive d'éthanol à pH 8 (tampon Tris-Cl 10 mM). La vignette montre le spectre d'absorption de la membrane pourpre avant (—) et après l'ajout de 23 (----) et 37,5% (-----) d'éthanol (v/v).

bicouche lipidique et que l'anesthésie résulte de la perturbation de la phase lipidique des membranes par les molécules qui vont s'y dissoudre. Ainsi l'interaction membrane-anesthésique est la même pour tous les agents anesthésiants. La figure 3.17 montre la relation qui existe entre le potentiel anesthésiant et la solubilité des solvants dans les membranes. Le potentiel anesthésiant a été estimé d'après le rapport solvant : bacteriorhodopsine nécessaire pour transformer la moitié de la bR570 en bR480 et la solubilité dans les membranes est exprimée d'après le coefficient de partage entre le tampon et la membrane tel que donné par Firestone et al. (1986). La relation qui se dégage montre que l'équilibre bR570/bR480 produit par l'action des anesthésiques et des solvants respecte la règle de Meyer-Overton c'est à dire que le potentiel anesthésiant est directement relié à la solubilité dans les lipides. Le méthanol est le plus faible anesthésique capable de former la bacteriorhodopsine rouge, par contre l'Halothane se trouve être le plus puissant. Ainsi, dans la série que nous avons utilisée, le résultat démontre que le franchissement de la barrière tampon/membrane est une étape déterminante du mécanisme par lequel l'équilibre bR570/bR480 est généré. De plus, le respect de la règle de Meyer-Overton confirme la pertinence de la membrane pourpre comme modèle expérimental de l'étude du mécanisme d'action des anesthésiques.

3.3.3. Effet du pH

Nous savons depuis peu que la formation de bR480 et bR380 en présence d'anesthésiques comme l'Enflurane ou l'Halothane dépend du pH de la suspension de membranes pourpres (Lee K. H., Beaulieu D. communication personnelle). Si les solvants organiques que nous avons utilisés agissent de la même manière que les anesthésiques, il est prévisible que leur action dépende également du pH. C'est pourquoi nous avons testé l'effet de l'acétone, de certains alcools et alcanes sur le spectre des membranes pourpres à différents pH.

3.3.3.1. Effet du pH sur l'action de l'acétone

Rappelons qu'aux pH modérément alcalins (pH=8), la membrane pourpre traitée avec de l'acétone forme le pigment rouge bR480 (voir 3.3.1.)

A pH=4, dans un tampon acétate à 100mM, le pigment bR480 n'est pas du tout stable, il ne se forme que de façon transitoire et donne naissance à la forme

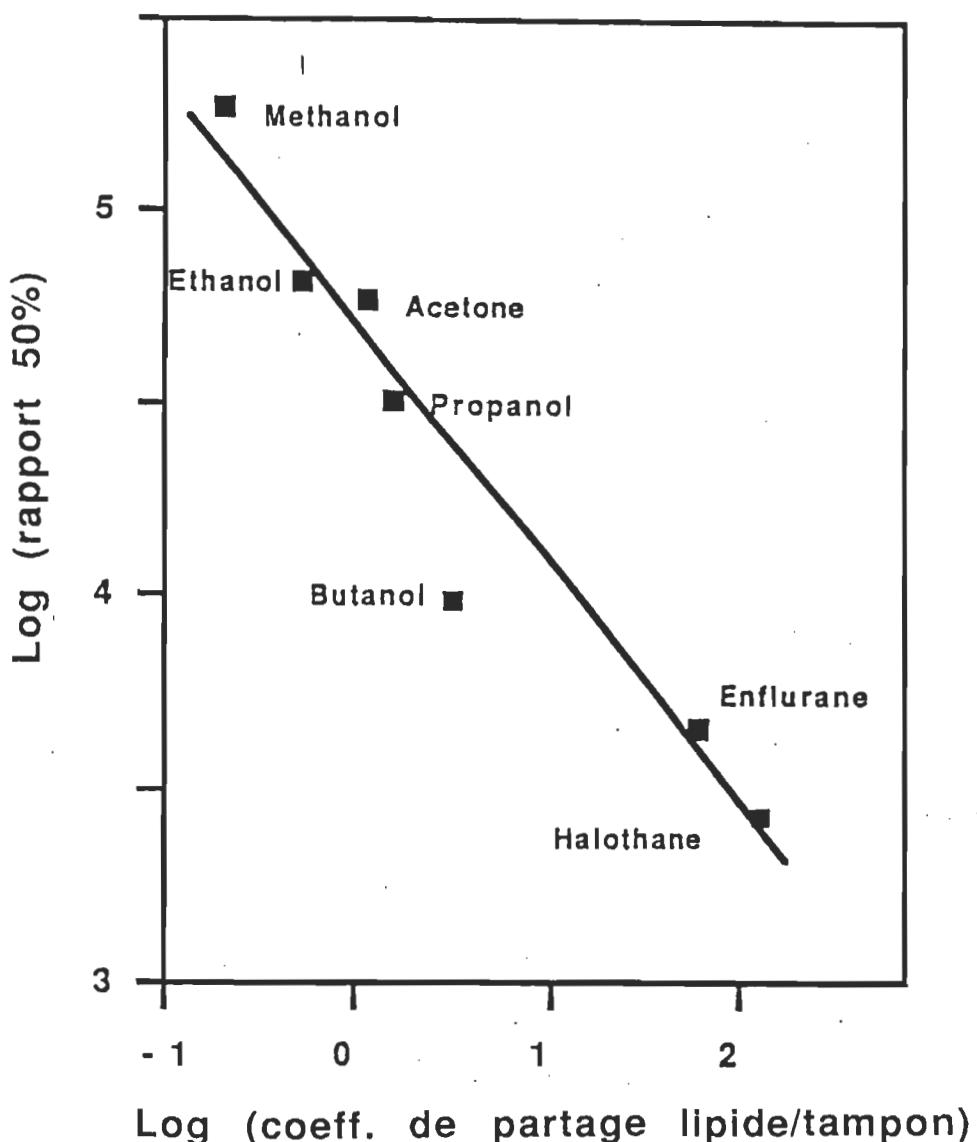


Figure 3.17 : Relation de Meyer-Overton pour l'établissement de l'équilibre entre les formes 570 et 480 nm de la bactériorhodopsine représentant la relation entre le potentiel anesthésiant et la solubilité dans les lipides des différents solvants utilisés. Log C₅₀ est le logarithme du rapport solvant:bactériorhodopsine où 50% de la bR570 est transformée en bR480.

irréversible de bR380. A 16.7% (v/v) d'acétone, sur les spectres UV-visible pris instantanément, l'intensité du pic à 570 nm décroît de façon importante en faisant apparaître un épaulement aux alentours de 480 nm; à 28.6% d'acétone ce pic commence à glisser vers 380 nm. Après 30 minutes d'incubation et à partir de 23.1% d'acétone le pic est à 380 nm. Après 90 minutes de traitement le phénomène de réversibilité de bR380 en bR480 n'est pas observé, contrairement à ce qui a été observé à pH=8 à des concentrations comparables d'acétone.

Aux pH inférieurs à 4, la membrane pourpre native perd graduellement sa coloration distinctive au profit de l'apparition d'un nouveau pigment bleu absorbant à 605 nm (Mowery et al 1979). Ce changement de coloration est attribuable au déplacement d'un ion divalent (Ca^{++} ou Mg^{++}) fixé dans la bactériorhodopsine par des protons (Jonas et Ebrey., 1991). Sous cette forme, les membranes "bleues" s'agrègent facilement et rendent difficile l'étude de l'effet des solvants sur ses propriétés spectrales. Toutefois, à des pH très acides, la forme bleue est reconvertie en forme pourpre (Mowery et al., 1979) connue sous le nom de bR570 acide.

A ces pH fortement acides (pH=0.3) la membrane pourpre (acide) forme le pigment bR480 sous l'action de l'acétone. Entre 9.1 et 16.7% d'acétone, l'intensité du maximum d'absorption à 570 diminue. A 23.1% d'acétone, il apparaît sur le spectre UV-visible un épaulement aux alentours de 450 nm; cet épaulement prend l'allure d'un pic distinct à 28.6% d'acétone; ce pigment est noté bR480 acide. Ce nouveau pigment rouge acide est stable et persiste même après plusieurs heures d'incubation (Fig. 3.18).

3.4.3.2. Effet du pH sur l'action des alcools

Comme dans le cas de l'acétone, à pH=8, tous les alcools utilisés pour traiter la membrane pourpre génèrent le pigment rouge bR480 (voir 3.3.1.).

Tous les alcools utilisés (méthanol, éthanol, propanol et butanol) à pH=4 génèrent un pigment bR480 (comme dans le cas de l'acétone); ce pigment n'est pas stable et disparaît rapidement pour former la bR380. La réversibilité de bR380 en bR570 est impossible à ce pH même après plusieurs jours d'attente.

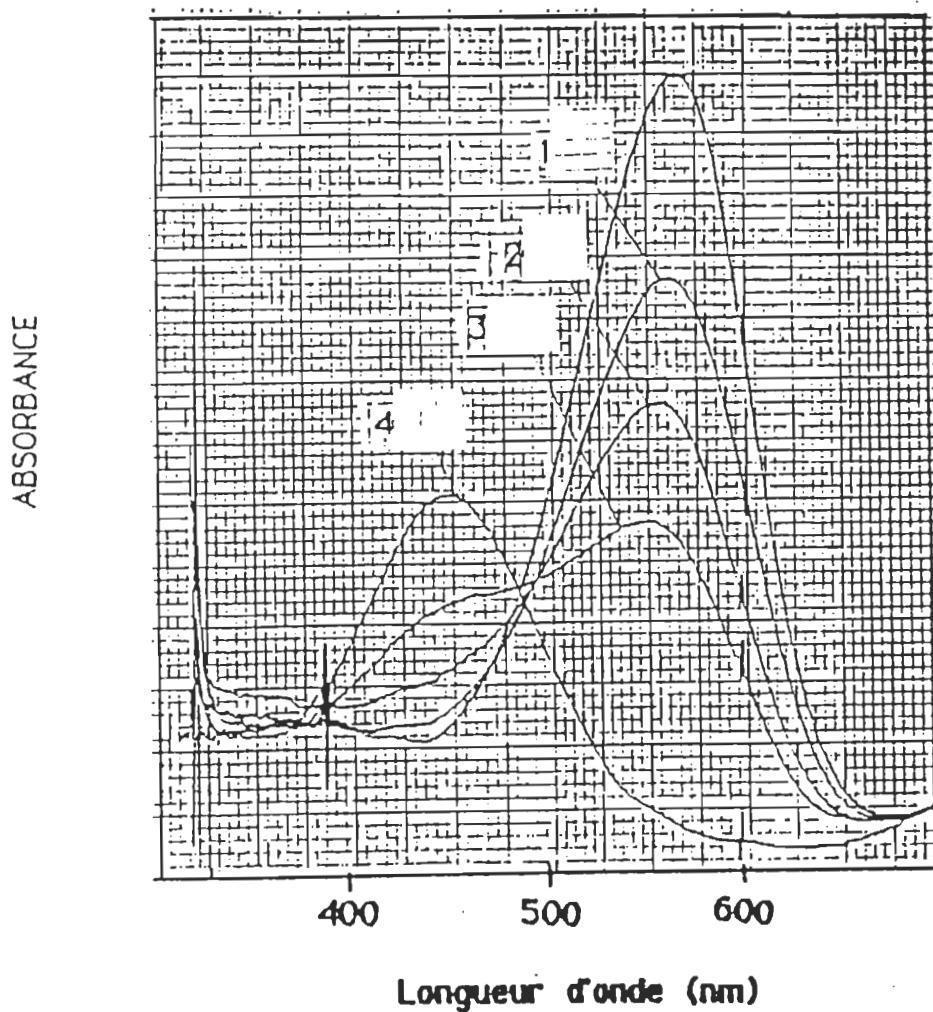


Figure 3.18 : Membrane pourpre acide à pH=0.3 traitée avec de l'acétone. Les spectres 1, 2, 3 et 4, pris 30 min. après incubation, correspondent respectivement à 9.1, 16.7, 23.1 et 28.6% (v/v) d'acétone.

3.4.4. Effet du pH sur l'action des alcanes

3.4.4.1. Pourquoi les alcanes

Le choix de l'étude de l'effet des alcanes (particulièrement l'hexane) sur la membrane pourpre, a été stimulé par deux facteurs: Premièrement, Tadayoshi et al. (1990), avancent l'hypothèse que l'effet anesthésiant de l'Halothane (et par extension, tous les anesthésiques) est dû à la neutralisation des charges de la surface membranaire, par ce dernier. Le cas échéant les alcanes devraient se comporter différemment des anesthésiques. Deuxièmement, l'augmentation simultanée du potentiel anesthésiant avec la longueur de la chaîne carbonée des alcools laisse croire que ces derniers interagissent avec la protéine par leur partie hydrophobe. Dans ce cas, contrairement à la possibilité évoquée ci-haut, on s'attend à ce que les alcanes se comportent de façon comparable aux autres solvants. Par ailleurs, l'insolubilité des alcanes dans l'eau et leur volatilité nous empêchent d'effectuer une analyse précise en fonction de leur concentration comme dans le cas des alcools et de l'acétone. Toutefois, comme on peut le voir ci-après, il est possible d'incorporer suffisamment d'un alcane dans la membrane pourpre pour étudier l'effet du pH sur cette incorporation.

3.4.4.2. Effet du pH

D'une façon générale, l'ajout d'approximativement 2% (v/v) d'hexane aux membranes pourpres génère la bR480. A différents pH, allant de 5.5 à 10 et avec la même quantité d'hexane, l'équilibre existant entre la bR570 et la bR480 se déplace. Allant vers des pH de plus en plus alcalins, la quantité de bR native diminue, par contre celle de la bR480 augmente (Fig. 3.19). Ce phénomène est lui aussi réversible, après dilution de la suspension de membrane pourpre ou évaporation de l'hexane par exposition à l'air.

Du côté acide, à partir de pH=4, l'ajout d'hexane, déplace le maximum d'absorption de la suspension de membrane pourpre à 590 nm, à pH=3.5 le maximum est à 605 nm. Ce phénomène est lentement réversible si on laisse évaporer l'hexane et après 36 heures, le pic glisse de nouveau vers 575 nm et la suspension retrouve sa couleur pourpre.

Il faut noter que contrairement aux autres solvants utilisés dans cette étude, l'ajout d'une quantité supplémentaire d'hexane n'a aucun effet ni sur le

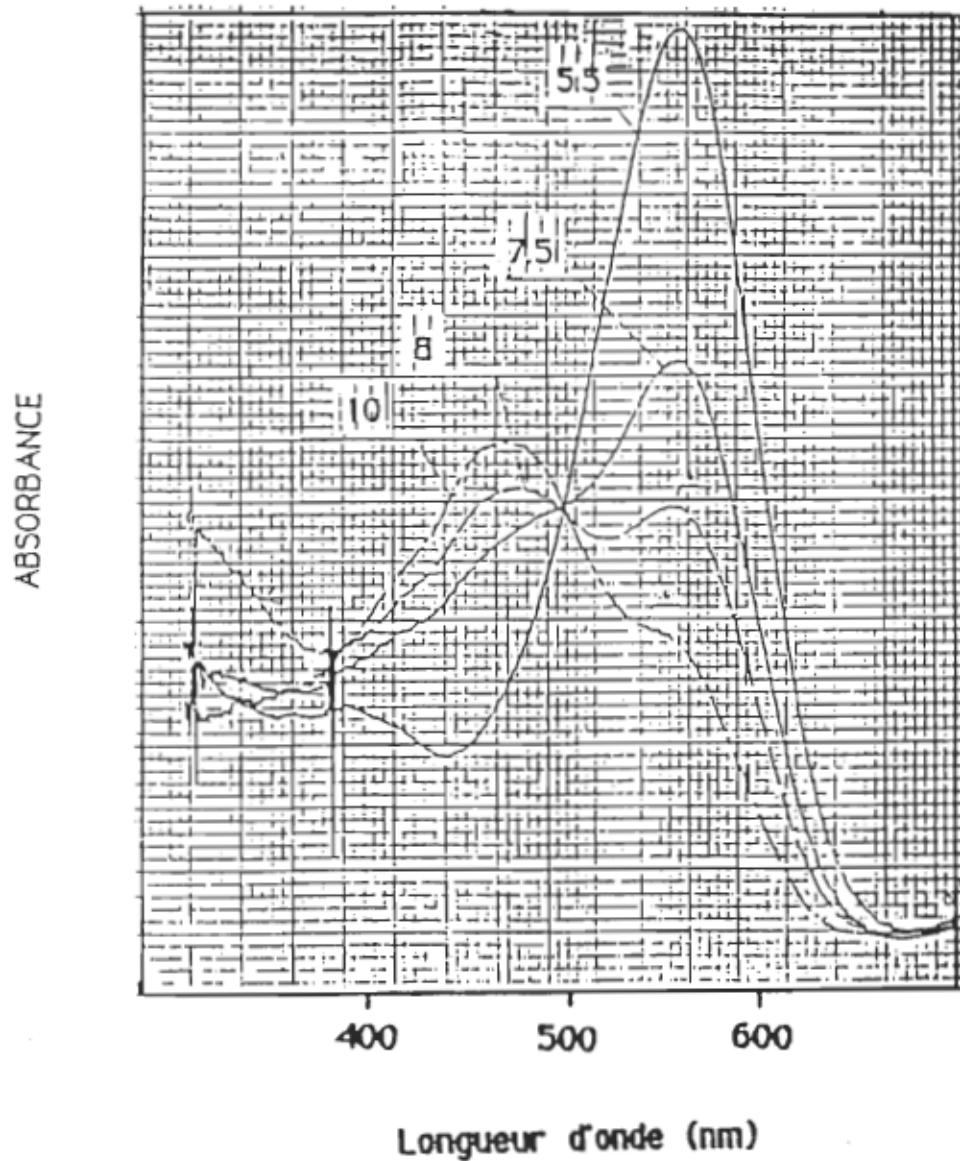


Figure 3.19 : Membrane pourpre traitée par l'hexane à différents pH. Les pH de la solution sont indiqués sur la figure.

λ_{max} du nouveau pigment bR480 ni sur la concentration relative de ce dernier, contrairement aux alcools et à l'acétone qui, en fonction de la concentration finissent par générer le pigment jaune bR380.

Il est à noter aussi que l'octane, le pentane et le cyclohexane reproduisent les mêmes phénomènes que ceux observés avec l'hexane. Ce n'est cependant pas le cas pour le pentadecane.

3.5. Discussion

Les esters et les cétones sont considérés comme des anesthésiques. Leur action sur des cellules nerveuses est connue depuis plusieurs années. L'interaction des esters et des cétones avec les canaux sodiques était mise en évidence en 1984 par Elliot et al. Ces produits ne bloquent pas le canal mais leurs effets se manifestent par une légère altération de la conductance ionique. Pour la membrane pourpre l'action des esters est nulle du moins pour l'ester que nous avons testé dans notre laboratoire soit l'acétate d'éthyle.

Cependant, nos résultats montrent, pour la première fois, la formation de la bR480 sous l'action de l'acétone. A des pourcentages bien définis -qui sont considérables- les cétones et en particulier l'acétone ne dénaturent pas la bactériorhodopsine. L'utilisation de grandes quantités de cétone sans dénaturer la protéine prouve bien que la bactériorhodopsine est une protéine membranaire très stable. La régénération spontanée ou après dilution de la bactériorhodopsine native à partir de la forme 380 prouve -contrairement à la croyance générale- que la protéine sous cette forme n'est pas dénaturée (voir 3.2.5.) et on peut conclure aussi que la base de Schiff dans cet état n'est pas hydrolysée.

Comparé aux anesthésiques volatils, l'acétone réagit rapidement avec la membrane pourpre pour former le pigment rouge. Par exemple, pour l'Enflurane il faut 15 minutes pour qu'un équilibre puisse s'établir entre les deux formes de membrane pourpre, la bR570 et la bR480 (Henry et al., 1988), pourtant, il suffit à l'acétone de quelques secondes pour transformer complètement la bR570 en bR480. Cette propriété de conversion complète de la bactériorhodopsine native en bR480 sous l'effet de l'acétone pourrait être exploitée pour étudier la conformation de cette dernière sans avoir des quantités résiduelles de la forme native à 570 nm qui risquent de compliquer le spectre ainsi que son interprétation.

Il existe une gamme d'alcools (méthanol, éthanol, propanol et butanol) qui permettent aussi la formation de la bR480. En comparant la quantité d'alcool utilisée pour générer le pigment rouge, on se rend compte que plus la chaîne hydrocarbonée de l'alcool est longue, moins grande est la quantité nécessaire pour former la bR480. Cette constatation mérite un intérêt particulier. Lorsque la chaîne carbonée des alcools augmente, l'importance du groupement -OH décroît et la constante diélectrique approche la valeur de 2 qui est celle des alcanes (Andrew et Heathcock, 1985). A notre connaissance, la génération de la bR480 par l'action des alcools n'a pas été rapportée auparavant. Cependant, l'action des alcools utilisés comme des anesthésiques sur des cellules nerveuses était connue depuis plusieurs décennies. En effet, le potentiel anesthésiant des n-alcools croît graduellement du méthanol au dodécanol, mais le tridécanol n'a qu'un faible potentiel anesthésiant, alors que le téttradécanol n'en a aucun (Meyer et Hemmi, 1935; Pringle et al., 1981). En plus de leur chaîne carbonée, les alcools possèdent le groupement OH qui, dans plusieurs cas, est engagé dans des liaisons hydrogène avec des groupements OH appartenant à d'autres molécules d'alcool (auto-association) ou bien avec des accepteurs de protons. Dans les membranes biologiques, les accepteurs de protons peuvent être des molécules d'eau, des groupements phosphate ou ester; sur les protéines, le choix est varié, on trouve en plus des amides, des groupements carbonyles,...etc.

La question qui se pose est: Comment les alcools réagissent-ils avec la MP? Par leur groupe OH, par leur chaîne carbonée ou bien les deux ? Cette question est aussi valable pour les cétones.

Tout d'abord, il faut mentionner qu'on rapporte ici pour la première fois, la formation de la bR480, sous l'effet des alcanes et en particulier de l'hexane. Cependant, on connaît depuis fort longtemps le caractère anesthésiant des alcanes sur les cellules nerveuses (Seeman, 1972; Boggs et al, 1976; Lee 1976). Les alcanes possèdent une propriété semblable à celle des alcools cités au début. Leur potentiel anesthésiant augmente avec la longueur de la chaîne carboné, mais ce caractère anesthésiant sera perdu pour les alcanes supérieurs (Mullins., 1971 et ses références); ce phénomène est perceptible à partir du nonadécane. Comme pour les alcools, ce phénomène est appelé "cut-off". On peut imaginer que ce phénomène de cut-off existe également dans notre cas puisque le pentadécane s'est avéré sans effet sur la membrane pourpre.

Les anesthésiques halogénés tels que l'Halothane ou l'Enflurane forment le pigment rouge bR480. Il en est de même pour l'acétone, les alcools (méthanol, éthanol, propanol et butanol), le benzène et d'autres solvants (ethyl butyrate et cyclohexanone). Tous ces produits ont des structures et des fonctions chimiques très différentes les unes des autres; c'est pourquoi il est très difficile d'imaginer un seul site d'action, de structure et de taille bien définis, pour tous ces composés. Il nous est donc difficile de conclure à une certaine spécificité du site d'action des anesthésiques, contrairement à ce qui a été proposé par certains auteurs (Moss et al., 1991, et ses références), pour d'autres systèmes biologiques.

Les alcanes en réagissant avec la membrane pourpre ne peuvent former ni des liaisons covalentes, ni des liaisons hydrogène avec la protéine ou les lipides de la membrane pourpre. En plus, les interactions des anesthésiques et des solvants avec la membrane pourpre vérifient la règle de Meyer-Overton; alors, on peut conclure que le site d'action des anesthésiques et des solvants est de nature hydrophobe. Cependant, on peut attribuer ce site à une poche hydrophobe se trouvant à l'intérieur de la protéine dans la mesure où on peut démontrer l'existence d'une telle poche dans la bactériorhodopsine, faute de quoi, la seule cible logique restante est la bicouche lipidique.

La vérification sur la membrane pourpre de certains phénomènes reliés aux anesthésiques et observés sur les cellules nerveuses confirme bien que la membrane pourpre est un bon modèle biologique pour l'étude de l'action biologique des anesthésiques. La détermination du site d'action des anesthésiques et des solvants ainsi que la détermination de sa nature ne nous renseignent pas sur le mécanisme par lequel ces agents interagissent avec la membrane pourpre. Cependant, les similitudes frappantes qui existent entre les propriétés spectrales et leur dépendance du pH dans des suspensions de membranes pourpres traitées avec des anesthésiques d'une part, et dans la bactériorhodopsine purifiée, d'autre part, peuvent apporter des éléments supplémentaires pour la compréhension du mécanisme général relié à l'interaction anesthésiques (solvants)/membranes pourpres.

Dans les membranes pourpres, il existe un équilibre acido-basique entre quatre formes spectrales de bactériorhodopsine. A pH supérieur à 12, le pigment initialement pourpre absorbant à 570 nm est titré en une forme rouge absorbant à 460 nm et ayant un chromophore déprotoné. Ce dernier pigment peut être

transformé en bR380, si le pH de la suspension est augmenté encore plus. La réversibilité de la formation de ce pigment bR380 dépend étroitement du temps que ce dernier a passé sous cette forme (Druckmann et al., 1982). Aux pH faibles, les membranes pourpres se transforment en une forme bleue ($\lambda_{\text{max}}=605 \text{ nm}$). Le pKa de cette réaction est de 2.8 (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971). Récemment, on a suggéré que ce glissement vers des grandes longueurs d'ondes est dû au déplacement, par les protons, d'un cation divalent se trouvant dans la cavité du rétinal de la bactériorhodopsine (Jonas et Ebrey., 1991). Aux pH très bas (<1) le pigment bleu se reconvertit en un pigment de couleur pourpre (Mowery et al. 1979). Cependant, il n'existe pas d'information structurelle précise sur la nature de cette membrane pourpre acide; on pense généralement que ceci est dû à une réorganisation des charges autour du rétinal.

La bactériorhodopsine délipidée puis solubilisée dans des micelles de détergents appropriés présente elle aussi un équilibre acido-basique entre différentes formes spectrales comparables à celles observées dans les membranes pourpres natives. Dans le cas de la bactériorhodopsine délipidée, la forme pourpre ($\lambda_{\text{max}}=540 \text{ nm}$) existe en équilibre acide-base avec la forme bR480. Le pKa apparent de cet équilibre dépend fortement de la nature du détergent utilisé (Baribeau et Boucher., 1987). Dans cet équilibre particulier, les deux chromophores des formes bR540 et bR480 contiennent une base de Schiff protonée (Pande et al., 1989a). Tout comme dans le cas des membranes pourpres, la forme bR480 du pigment purifié peut être titrée en bR380 mais à un pH inférieur (pKa=10). Par ailleurs, la forme bleue de la bactériorhodopsine purifiée (bR590) est observable dès pH<4.

En présence d'anesthésiques ou de solvants, la membrane pourpre ressemble à la bactériorhodopsine délipidée au sens où le chromophore garde des propriétés d'indicateur de pH comparables. L'équilibre entre bR570 et bR480 apparaît près du pH neutre dans tous les cas. L'équilibre entre bR480 et bR380 apparaît entre pH=8 et 10 dans tous les cas à l'exception du traitement de la membrane par l'Halothane ou l'hexane. Comme dans le cas de la bactériorhodopsine purifiée, la forme bleue apparaît à des pH plus élevés par comparaison avec les membranes pourpres natives. En présence d'anesthésique, d'acétone ou d'alcools, nous n'avons pu observer la formation du pigment bleu; cependant, l'acidité croissante du milieu laisse apparaître le pigment bR380.

La figure 3.20 résume l'ensemble des observations relatives à l'effet du pH sur la position de la bande d'absorption du chromophore de la bactériorhodopsine dans différentes conditions expérimentales. Le point commun de ces observations est que sous chacune des conditions expérimentales, l'équilibre entre les quatre formes bleue (bR605), pourpre (bR570 ou bR540), rouge (bR480) et jaune (bR380) peut être associé à une courbe de titrage. Ainsi, a priori, on pourrait imaginer que les quatre formes spectrales du pigment correspondent à quatre états différents de protonation du chromophore ou de son environnement et que la position des différentes courbes de titrage (i.e. leur pK_a apparent) sur l'échelle des pH soit déplacée en réponse à la perturbation de la membrane par la solubilisation dans des détergents ou par addition de solvants (ou d'anesthésique).

Par ailleurs, il est probablement opportun de résumer ici les facteurs connus qui déterminent la position du spectre du chromophore du pigment, tel que précisés par Honig et Ebrey., (1982), Nakanishi et al., (1980), Harbison et al., (1985), Spudich al., (1986), Rodman et al., (1986) et Lugtenburg et al., (1986) qui sont :

- i)** La présence d'un dipôle au voisinage du noyau β -ionone du rétinal et **ii)** la distance entre la charge positive de la base de Schiff et son contre-ion.

Or, si on estime que la base de Schiff est protonée, il est normal de croire que le chromophore est dans un environnement hydrophobe, c'est à dire de constante diélectrique faible (Honig et al., 1979). Cependant, Warshel en 1981 puis Warshel et Barboy en 1982 ont démontré que la paire d'ions $C=NH^+....COO^-$ ne peut être stable dans des environnements à constante diélectrique faible. Ces ions vont se convertir en $C=NH....COOH$, comme c'est le cas des acides aminés zwitterioniques dans des solvants non polaires. Aussi, les travaux en infrarouge de Merz et Zundel en 1981 et Zundel et Merz en 1984 démontrent que sous des conditions neutres, les acides présents dans le pigment ne peuvent protoner la base de Schiff. La paire d'ions a donc besoin pour sa stabilité de groupes polaires. La stabilité peut être obtenue de plusieurs manières (pour une bibliographie extensive, voir Sandorfy et Vocelle, 1986) mais selon toute évidence, la paire d'ions de la base de Schiff est stabilisée par des molécules d'eau. Ces molécules aux nombre de quatre (± 1) sont présentes dans la cavité du chromophore, même si la membrane pourpre est déshydratée à 100% (Hildbrandt et Stockburger, 1984., Papadopoulos et al., 1990). Ceci est en accord avec les suggestions de Warshel qui stipulent que l'environnement de la base de Schiff doit avoir une constante

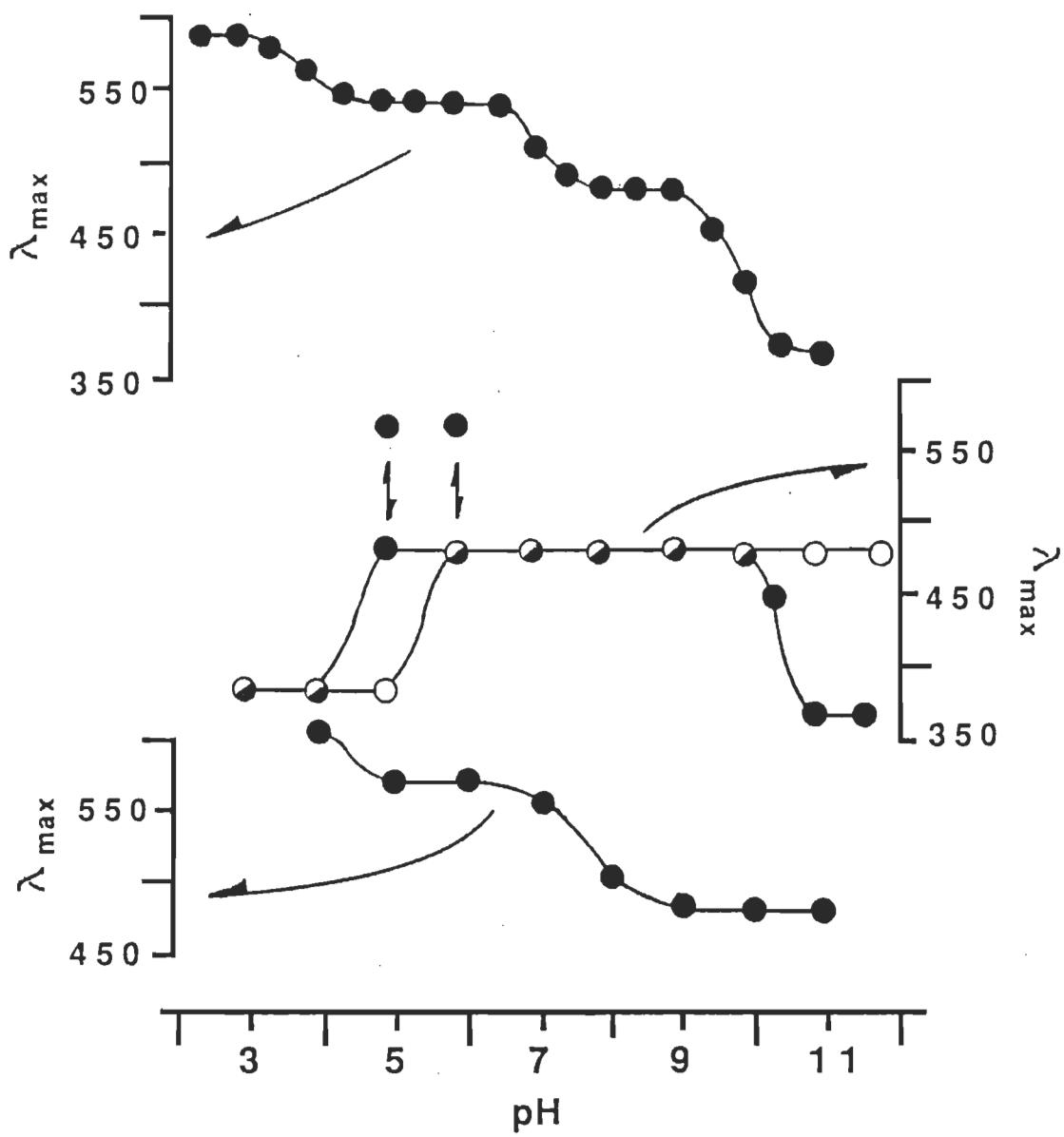
Figure 3.20 : Les courbes de titrages des différentes formes spectrales de la bactériorhodopsine sous les conditions suivantes :

La courbe supérieure : La bR purifiée solubilisée dans 0.2 % (p/v) de lauryl sucrose. Entre les pH 2 et 11, le λ_{max} du pigment varie de 590 nm à 540, à 480 et finalement à 370 nm. Les mi-points des courbes de titrages sont aux pH 4.7 et 9.5.

La courbe du centre : Membrane pourpre traitée avec 0.3 % (v/v) d'Halothane (cercles ouverts) et avec 1 % (v/v) d'Enflurane (cercles fermés). Avec l'Halothane, le λ_{max} varie de 380 à 480 entre les pH 5 et 6 et il reste à cette longueur d'onde même si le pH dépasse 12. Avec l'Enflurane, la transition entre les pigments 380 et 480 nm se produit entre pH 4 et 5; entre pH 5 et 6, la bR570 coexiste avec la bR480 et enfin aux pH supérieurs à 10 la bR370 apparaît.

La dernière courbe : Les membranes pourpres en présence d'hexane. Le pigment est titré de la forme bleue 605 nm à la forme bR570 et puis en bR480 aux pH respectifs 4.5 et 8.

Dans toutes les mesures, on a utilisé des tampons acétates, phosphates, Tris-Cl ou carbonates, des concentrations égales à 10 ou 20 mM.



diélectrique élevée sans toutefois permettre l'hydrolyse spontanée de l'imine. D'autre part, on sait depuis que le contre-ion de la base de Schiff est complexe et, selon toute vraisemblance, constitué par les acides aminés Asp212 et Asp85 (Needleman et al., 1991., De Groot et al., 1989). On peut donc aisément croire à une polarité élevée de l'environnement de la base de Schiff.

Dans ce contexte structural, on peut donc simplifier l'environnement électrostatique du chromophore en le réduisant à deux dipôles : l'un étant généré par des groupements latéraux d'acides aminés au voisinage de l'anneau β -ionone, l'autre étant associé à la paire de charges de l'imine et de son contre-ion; dans au moins un des cas, des molécules d'eau pourraient stabiliser le dipôle. L'effet du pH sur la dynamique de ces interactions n'est pas facile à rationaliser, aussi, afin de simplifier la discussion, on concentrera, le raisonnement sur l'action de l'hexane, ce qui permet d'éviter toute supposition voulant que l'action des anesthésiques résulte de la formation de liaisons hydrogène entre l'anesthésique et la protéine étudiée (Urry et Sandorfy 1991).

De toute évidence, la base de Schiff protonée est la première candidate à être considérée dans un équilibre acido-basique entre deux formes spectrales. Il est établi que la déprotonation de la base de Schiff ne peut être associée à l'équilibre entre bR570 et bR480, les deux chromophores étant protonés (Pande et al. 1989a; Daigle 1991). Néanmoins, l'amplitude du déplacement spectral observé dans l'équilibre entre bR480 et bR380 aux pH alcalins rend vraisemblable l'attribution de cette transition à la déprotonation du chromophore. Dans ce cas, l'interprétation, à notre avis, la plus probable de la différence de pK_a pour cette transition entre les membranes natives et les membranes perturbées par des solvants réside dans la différence d'accèsibilité du site de titrage dans l'état natif et dans l'état perturbé.

Les transitions spectrales qui existent dans la membrane native aux extrémités de l'échelle des pH sont déplacées, à différents degrés, vers les pH neutres dans la bactériorhodopsine purifiée ou dans les membranes traitées par les solvants. Or, sachant que dans la bactériorhodopsine, la cavité du rétinal est enfouie au coeur de l'espace hydrophobe de la membrane, on peut aisément imaginer que la perturbation (au sens d'une fluidification ou d'une solubilisation partielle) de la membrane par un solvant permet à des groupements, jusqu'alors difficilement accessibles, de devenir sensibles au pH de la phase aqueuse. Autrement dit, les solvants pourraient très bien n'agir sur la membrane qu'en

"perforant des trous" permettant à des groupements de devenir sensibles au pH de la phase aqueuse et à des pH moins extrêmes que dans le cas des membranes intactes.

Selon cette vision du phénomène, on peut maintenant mieux comprendre que la mobilisation des lipides membranaires par des solvants puisse faciliter la déprotonation du chromophore (transition de bR480 en bR380) ou le remplacement d'un cation divalent par un proton (transition de bR570 en bR605). On ne peut toutefois pas visualiser facilement le même effet sur la transition bR570 en bR480 ou bR605 en bR570acide et encore moins l'effet de l'hexane quand il transforme en bR450 la bR570acide puisqu'il s'agit de transitions où il est difficile de connaître les éléments structuraux impliqués. Il est donc clair qu'à lui seul, ce travail ne peut contenir toutes les informations nécessaires à l'explication de l'ensemble des phénomènes observés.

Néanmoins, comme "il n'existe pas de règle d'architecture pour construire des châteaux dans les nuages", il est peut être opportun d'élaborer ici un modèle des transitions spectrales dans la bactériorhodopsine. Pour l'élaboration de ce modèle, nous retiendrons comme élément principal le fait qu'il n'existe pas un continuum de formes spectrales mais bien un équilibre entre quatre formes précises qui exclut une déformation progressive de la structure du pigment au profit d'une action très localisée des ions H^+ ou OH^- dont l'accès est facilité par les solvants. Toujours dans le contexte structural de la paire de dipôles qui déterminent la position du spectre du chromophore, on réalise que deux dipôles ne peuvent donner lieu qu'à quatre distributions si chacun d'eux peut adopter deux orientations. On pourrait ainsi associer l'équilibre des formes spectrales à un équilibre de la distribution des charges autour du chromophore. L'origine moléculaire de cet équilibre multiple résiderait dans la rotation ou la réorientation des dipôles ou des molécules d'eau qui les stabilisent. Enfin, l'effet facilitant des solvants en regard de la dépendance du pH sur leur orientation résulterait de l'ouverture qu'ils créent au travers de la bicoche pour des ions H^+ , OH^- ou éventuellement d'autres ions.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

Lorsqu'on traite des échantillons secs de bR avec des anesthésiques volatils tel que l'Halothane ou l'Enflurane, ces échantillons ne subissent aucune transformation, ils sont inertes et ne réagissent guère avec l'Halothane ou l'Enflurane, par contre si on humidifie l'échantillon, il réagit avec l'Halothane (ou l'Enflurane) et change de couleur (génération de la forme bR480). Ce changement de couleur est réversible car si l'action de l'anesthésique cesse (par évaporation), l'échantillon reprend sa couleur pourpre initiale. Donc, l'action des anesthésiques est fortement liée à l'hydratation de la membrane pourpre.

Cependant, la formation de la bR480 n'est pas spécifique aux anesthésiques volatils car on a reproduit leur effet avec toute une gamme de produits de structures et de fonctions chimiques très différentes, tels que les alcanes (cycliques ou acycliques), les alcools, les cétones, le benzène,...etc. Suivant les considérations précédentes, il est difficile de concevoir un site d'action spécifique, que ce soit pour les anesthésiques ou pour les solvants. Ce site se localise dans la bicouche lipidique vu que les alcanes ont une grande affinité pour la partie hydrophobe de la membrane pourpre, qu'est la bicouche. En plus, les alcools et les autres produits utilisés, respectent bien la règle de Meyer-Overton, c'est à dire qu'ils présentent une bonne corrélation entre le degré d'hydrophobicité (qui est exprimé par leur coefficient de partage) et la quantité d'anesthésique employée pour générer la bR480.

En présence d'anesthésiques ou de solvants, la bactériorhodopsine native possède les propriétés d'indicateur de pH comme dans le cas de la bactériorhodopsine délipidée. En effet, dans tous les cas, l'équilibre entre bR570 et bR480 apparaît près du pH 7, or l'équilibre bR480/bR380 apparaît entre pH 8 et 10 dans tous les cas sauf en présence d'Halothane et d'hexane où la forme bleue du pigment apparaît à des pH élevés comparativement à la forme native. Cette sensibilité au pH de la membrane pourpre face aux anesthésiques ne signifie pas nécessairement, lors des changements spectraux d'une forme à l'autre, que le chromophore ou les acides aminés qui l'entourent sont titrés. Effectivement, la bR480 générée par délipidation de la membrane pourpre ou son traitement par les anesthésiques est un pigment ayant une

base de Schiff protonée. En plus, la formation du pigment rouge au pH 0.3 détruit complètement l'hypothèse voulant lier le titrage d'acides aminés formant la cavité du rétinal aux changements spectroscopiques observés. On propose donc, pour la variation discrète du spectre de la bR, qu'elle est réglée par des interactions électrostatiques directes entre les dipôles de la cavité et les ions de la solution. Selon la nature des ions majoritaires dans la solution, les dipôles s'orientent préférentiellement suivant la direction qui donne l'état de plus faible énergie possible.

Les pigments bR570, bR480 et bR380 ont des spectres IR identiques, sauf que l'intensité relative des bandes amides I et II diffère d'une forme à une autre. La bR570 possède le ratio amide I/II le plus grand parmi les trois formes spectrales précédentes, bR380 possède le plus petit. Cette variation apparente des ratios est liée aux changements d'orientation des hélices α de la bactériorhodopsine. On pense, que lors de la solubilisation des anesthésiques volatils généraux ou des solvants dans la bicouche lipidique, les interactions lipides/protéine s'affaiblissent, entraînant un changement d'orientation de la protéine. D'après nos mesures en infrarouge, on a pu distinguer structuralement entre la bR380rev et la bR380 nonrev. Effectivement, la présence du pic à 1632 cm^{-1} dans les pigments bR380 non-régénérables indique l'étape déterminante dans le processus de réversibilité. Donc, si la bR perd ces liaisons intramoléculaires faibles (présence du pic à 1632 cm^{-1}) sous l'action des anesthésiques ou des solvants, elle ne peut plus être régénérée, c'est à dire qu'elle ne peut plus retrouver sa forme pourpre qui absorbe à 570 nm.

On peut résumer l'action des anesthésiques sur la bactériorhodopsine selon les étapes suivantes:

- i) affaiblissement des interactions lipides-protéine en perturbant la bicouche (forme 480 nm)
- ii) destruction des interactions lipides-protéine et effondrement des hélices α (forme 380 nm réversible).
- iii) destruction des liaisons faibles internes de la protéine et apparition des feuillets β (380 nm non réversible).

La bactériorhodopsine peut-être considérée comme un bon modèle biologique pour l'étude des effets des anesthésiques sur les cellules nerveuses, vu qu'elle reproduit la plupart des effets des agents anesthésiants observés sur les neurones.

Avant de clore cette discussion, il nous paraît opportun de proposer un mécanisme d'action des anesthésiques. L'abolition ou la diminution du gradient ionique existant de part et d'autre de la membrane de la cellule se traduit par une perte ou un affaiblissement du potentiel d'action, responsable de la transmission de l'information vers les centres nerveux, provoquant une analgésie ou une anesthésie. On pense que c'est ce qui se passe réellement lorsqu'on utilise des anesthésiques; ces derniers vont se dissoudre dans la membrane et ainsi augmenter sa fluidité, ce qui favoriserait un transport d'ions transmembranaire et éliminerait le gradient ionique et l'influx nerveux qu'il permet de propager.

BIBLIOGRAPHIE

Adey, G., Wardley-Smith. B. and White, D. C. (1976). Mechanism of inhibition of bacterial luciferase by anaesthetics. *Life Sci.* 17, 1849-1854.

Andrew, S. and Heathcock, C. H. (1985)."Introduction à la chimie organique". Edition française adapté de "Introduction to organic chemistry". Ed. Marketing. Paris.

Bagley, K., Dollinger, G., Eisenstein, L., Singh, A. K. and Zimanyi, L. (1982), Fourier transform infrared difference spectroscopy of bacteriorhodopsin and its photoproducts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4972-4976.

Baribeau, J. (1987). Thèse de Doctorat "Les interactions lipides-proteines dans la membrane pourpre : une approche analytique". Université du Quebec à Trois-Rivières.

Baribeau, J. and Boucher, F. (1987). Is the color of bacteriorhodopsin maintained by lipid-protein interactions?. *Biochim. Biophys. Acta* 890, 275-278.

Baribeau, J., Boucher, F. (1984). Isolation, purification, and partial characterisation of stable forms of monomeric bacteriorhodopsin in lauryl sucrose. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 63, 305-312.

Becher, B. M., Cassim, J. Y. (1975). Improved isolation procedures for the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Prep. Biochem.*, 5, 161-178.

Bendit, E. B. (1967), Infrared absorption of tyrosine side chains in proteins. *Biopolymers*. 5, 525-533.

Boggs, J. M., Yoong, T. and Hsia, J. C. (1976). Site and mechanism of anesthetic action. *Mol. Pharmacol.* 12, 127-135.

Boucher, F., Pomerleau, V. and Harvey-Girard. (1991). Modulation du couplage entre l'activité photochimique et le pompage des protons dans la bactériorhodopsine. Annales de l'ACFAS, 59, 46.

Brès. G. 1988., "J'ai peur de ne pas me réveiller". Ed. Seuil.

Brouillette, C. G., Muccio, D. D. and Finney, T. K. (1987). pH dependance of bacteriorhodopsin thermal unfolding. Biochemistry 26, 7431-7438.

Broun, L. S., Semin, B. K., Ivanov, I. I., Kononenko, A. A., Chamorovskii, S. K. and Churin, A. A. (1991). Tetracaine induces the formation of the spectral form of bacteriorhodopsin BR-470 in the purple membranes of Halobacteria. Biochemistry-USSR, 56, 134-140.

Brzezinski, B. and Zundel, G. (1985). Influence of conjugation of donor and acceptor on the properties of hydrogen bonds of cis and trans isomers. Chem. Phys. Lett. 115, 212-215.

Ceska, T. A. and Henderson, R. (1990). Analysis of high-resolutionelectron diffraction patterns from purple membrane labelled with heavy-atoms. J. Mol. Biol. 213, 539-560.

Chapman, D. (1965), "The structure of lipids by spectroscopy and X-ray techniques". Wiley, New York.

Daigle, I. (1991). Mémoire de maîtrise. "Aspects structuraux et fonctionnels de la perturbation des membranes photoreceptrices par les anesthésiques". Université du Quebec à Trois-Rivières.

Davies, R. G., Bagnall, R. D., Bell, W. and Jones, W. G. M. (1976). The hydrogen bond proton donor properties of volatile halogenated hydrocarbons and ethers and their mode of action in anesthesia. Int. J. Quantum Chem. : Quantum Biol. Symp. No. 3, 171-185.

Davies, R. H., Bagnall, R. D. and Jones, W. G. M. (1974). A quantitative interpretation of phase effects in anaesthesia. Int. J. Quantum Chem. : Quantum Biol. Symp. No. 1, 201-212.

De Groot, H. J. M., Harbison, G. S., Herzfeld, J. and Griffin, R. G. (1989). Nuclear Magnetic Resonance study of the Schiff base in bacteriorhodopsin : counterion effects on the ¹⁵N Schiff anisotropy. Biochemistry 28, 3346-3353.

Dencher, N. A. and Heyn, M. P. (1978). Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl- β -D-glucoside et Triton X-100. FEBS Lett., 96, 322-326.

Drukmann, S., Ottolenghi, M., Pande, A., Pande, J., and Callender, R. H. (1982). Acid-Base Equilibrium of the Schiff Base in Bacteriorhodopsin. Biochemistry, 21, 4953-4959.

Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, S. H., RajBhandary, U. L. and Khorana, H. G. (1981). The bacteriorhodopsin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6744-6748.

Ebrey, G. T., Frauenfelder, H., Honig, B. and Nakanishi, K. (1987), Biophysical studies of retinal proteins. Published by the department of physics of the university of Illinois at Urbana-Champaign, 1-15.

Engelman, D. M., Henderson, R., McLachlan, A. D. and Wallace, B. A. (1980). Path of the polypeptide in bacteriorhodopsin. Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 2023-2027.

Firestone, L. L., Sauter, J. Braswell, L. M. and Miller, K. W. (1986). Actions of general anesthetics on acetylcholine receptor-rich membranes from *topedo californica*. Anesthesiology, 64, 694-702.

Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1978). Where do general anesthetic act ?. Nature (London), 274, 339-342.

Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1982). Molecular mechanisms of general anaesthesia. *Nature (London)*, 300, 487-493.

Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1985). The firefly throws light on anaesthesia. *Chem. Britain*, 919-921.

Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1986). Partitioning of long-chain alcohols into lipid bilayers : Implications for mechanisms of general anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, 5116-5120.

Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1987). Anaesthetics and the mind. *Nature (London)*, 328, 113-114.

Hansch, C., Vittoria, A., Silipo, C. and Jow, P.Y.C. (1975). Partition coefficients and the structure activity relationship of the anesthetic gases. *J. Med. Chem.* 18, 546-548.

Harbison, G. S., Smith, S. O., Pardoen, J. A., Courtin, J. M. L., Lugtenburg, J., Herzfield, J., Mathies, R. A. and Griffin, R. G. (1985). Solid state ^{13}C NMR detection of a perturbed 6-s-trans chromophore in bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 24, 6955-6962.

Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemplin, F., Beckemann, E. and Downing, K. H. (1990). *J. Mol. Biol.* 231, 899-929.

Henry, N., Beaudoin, N., Baribeau, J. and Boucher F. (1988). Further characterisation of anesthetic-treated purple membranes. *Photochem. Photobiol.* 47, 85-90.

Heyn, M. P., Cherry, R. J. and Muller, U. (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.

Hildebrandt, P. and Stockburger, M. (1984). Role of water in bacteriorhodopsin's chromophore : Resonance Raman Study. *Biochemistry*, 23, 5539-5548.

Honig, B. and Ebrey, T. (1982). Protein- chromophore interactions as spectroscopic and photochemical determinants. *Methods in Enzymology*, 88, 462-470.

Honig, B., Ebrey, T., Callender, R. H., Dinur, V. and Ottolenghi, M. (1979). Photoisomerization, energy storage, and charge separation : a model for light energy transduction in visuel pigments and bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2503-2507.

Jap, B. K., Maestre, M. F., Hayward, S. B. and Glaeser, R. M. (1983). Peptide-chain secondary structure of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 43, 81-89.

Jonas, R. and Ebrey, T. G. (1991). Binding of a single divalent cation directly correlates with the blue-to-purple transition in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 149-153.

Kates, M., Kushwaha, S. C. and Sprott, G. D. (1982). Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. *Methods in Enzymology*, 88, 98-111.

Katre, M. V., Wolber, P. K., Stoeckenius, W. and Stroud, R. M. (1981). Attachment site (s) of retinal bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4068-4072.

Khorana, H. G. (1988). Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons. *J. Biol. Chem.* 263, 7439-7442.

Khorana, H. G., Gerber, G. E., Herlihy, W. C., Gray, C. P., Anderegg, R. J., Nihei, K. and Biemann, K. (1979). Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 5046-5050.

Korenstein, R. and Hess, B. (1977) Hydration effects on cis-trans isomerisation of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 82, 7-11.

Krantz, J. C. and Rudo, F. G. (1966). The fluorinated anesthetics. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. (Ed. F. A. Smith; Springer-Verlag, Berlin), 20, 501-564.

Krimm, S. (1962). Infrared spectra and chain conformation of proteins. *J. Mol. Biol.* 4, 528-540.

Lam, E. and Packer, L. (1983). Nonionic detergent effects on spectroscopic characteristics and the photocycle of bacteriorhodopsin in purple membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 221, 557-564.

Larsen, E.R. (1969). Fluorine compounds in anesthesiology. In *Fluorine Chemistry Reviews*. Vol. 3 (Ed. P. Tarrant; Dekker, New York) pp.1-44.

Lazarev, Y. A. and Terpugov, E. L. (1980). Effect of water on the structure of bacteriorhodopsin and photochemical processes in purple membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 590, 324-338.

Lee, A. G. (1976). Model for action of local anaesthetics. *Nature (Lond.)* 262, 545-548.

Lee, D. C., Herzyk, E. and Chapman, D. (1987). Structure of bacteriorhodopsin investigated using Fourier transform infrared spectroscopy and proteolytic digestion. *Biochemistry*, 26, 5775-5783.

Lee, K. H., McIntosh, A. R. and Boucher, F. (1991). The interaction between halogenated anesthetics and bacteriorhodopsin in purple membranes as examined by intrinsic ultraviolet fluorescence. *Biochem. Cell Biol.*, 69, 178-184.

Lieb, W. R., Kovalyscik, M. and Mendelson, R. (1982). Do clinical levels of general anesthetics affect lipid bilayers? Evidence from Raman scattering. *Biochim. Biophys. Acta* 688, 388-398.

Lin, C. T., Chyan, Y. G., Kresheck, G. C., Herbert, C., Bitting, JR. and El-Sayed, M. A. (1989). Interaction of Dibucaine.HCl local anesthetics with bacteriorhodopsin in purple membrane : a spectroscopic study. *Photochem. Photobiol.* 49, 641-648.

Lugtenberg, J., Muradin-Szweykoska, M. Van der Steen, R., Heeremans, C., Barbison, G. S., Herzfeld, J., Griffin, R.G., Smith, S. O. and Mathies, R. (1986). Retinal analogues

show that the opsin shift in bacteriorhodopsin is due to a 6-s-trans retinal chromophore with a perturbed Schiff base. *Biophys. J.*, 49, 210a.

Lugtenburg, J., Mathies, R. A., Griffin, R. G., and Herzfeld, J. (1988). Structure and function of rhodopsin from solid state NMR and resonance Raman spectroscopy of isotopic retinal derivatives. *Trends Biochem. Sci.* 13, 388-393.

Merz, H. and Zundel, G. (1981). Proton conduction in bacteriorhodopsin via hydrogen-bonded chain with large proton polarizability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 540-546.

Meyer, H. H. (1899). Zur Theorie der alkohol-narkose. Welche Eigenschaft der anasthetika bedingt ihre narkotische wirkung. *Arch. Exp. Path. Pharmakol. (Naunyn-Schmiedeberg)* 42, 109-118.

Meyer, K. H. and Hemmi, H. (1935). The theory of narcosis. *Biochem. Z.* 277, 39-71.

Meyer, K.H. (1937). Contributions to the theory of narcosis. *Trans. Faraday Soc.* 33, 1062-1068.

Middleton, A. J. and Smith, E. B. (1976a). General anaesthetics and bacterial luminescence. I. The effect of diethyl ether on the in vivo lightemission of vibrio fischeri. *Proc. R. Soc. London*, B193, 159-171.

Middleton, A. J. and Smith, E. B. (1976b). General anaesthetics and bacterial luminescence. II. The effect of diethyl ether on thr in vitro lightemission of vibrio fischeri. *Proc. R. Soc. London*, B193, 173-190.

Mogi, T., Stern, L. J., Marti, T., Chao, B. H. and Khorana, H. G. (1988). Aspartic acid substitutions affect proton translocation by bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4148-4152.

Moss, G. W. J., Franks, N. P. and Lieb, W. R. (1991). Modulation of the general anesthetic sensitivity of a protein : A transition between two forms of firefly luciferase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 134-138.

Mowery, P. C., Lozier, R. H., Chae, Q., Tseng, Y. -W., Taylor, M. and Stoeckenius, W. (1979). Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin. Biochemistry, 18, 4100-4107.

Mullins, L. J. (1971). Anesthetics. In Handbook of Neurochemistry, 6, (ed. A. Lajtha; Plenum, New York) 395-421.

Nakanishi, K., Balogh-Nair, V., Arnaboldi, M., Tsujimoto, K. and Honig, B. (1980). An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple color. J. Chem. Soc. 102, 7945-7947.

Needleman, R., Chang, M., Ni, B., Värös, G., Fornés, J., White, S. H. and Lanyi, J. K. (1991). Properties of Asp²¹²→Asn bacteriorhodopsin suggest that Asp²¹² and Asp⁸⁵ both participate in a counterion and proton acceptor complex near the Schiff base. J. Biol. Chem., 266, 11478-11484.

Nishimura, S., Mashimo, T., Hiraki, K., Hamanaka, T., Kitô, Y. and Yoshiya, I. (1985). Volatile anesthetics cause conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membranes. Biochim. Biophys. Acta 818, 421-424.

Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like protein from purple membrane of *Halobacterium halobium*. Nature (London) New Biol. 233, 149-152.

Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1974). Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fraction into purple membrane. Methods in Enzymology, 31, 667-678.

Oesterhelt, D., Meentzen, M. and Schuhmann, L. (1973). Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophore. Eur. J. Biochem. 40, 453-463.

Otto, H., Marti, T., Holz, M., Mogi, T., Lindau, M., Khorana, H. G. and Heyn, M. P. (1989). Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 9228-9232.

Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G., Feigina, M. Y., Kiselev, A. V. and Lobanov, N. A. (1979). The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin : an overview. FEBS Lett. 100, 219-224.

Overton, E. (1901). Studien über die narkose zugleich ein beitrag zur allgemeinen pharmakologie. (G. Fisher, Jena).

Pande, C., Callender, R., Baribeau, J., Boucher, F. and Pande, A. (1989a). Effect of lipid-protein interaction on the color of bacteriorhodopsin. Biochim. Biophys. Acta 973, 257-262.

Pande, C., Callender, R., Henderson, R. and Pande A. (1989b). Purple membrane : color, crystallinity, and the effect of dimethyl sulfoxide. Biochemistry 28, 5971-5978.

Pang, K. Y. Y., Braswell, L. M., Chang, L., Sommer, T. J. and Miller, K. W. (1980). The perturbation of lipid bilayers by general anesthetics : a quantitative test of the disordered lipid hypothesis. Mol. Pharmacol. 18, 84-90.

Papadopoulos, G., Dencher, N. A., Zaccai, G. and Büldt, G. (1990). Water molecules and exchangeable hydrogen ions at the active centre of bacteriorhodopsin localized by neutron diffraction. J. Mol. Biol. 214, 15-19.

Parker, F. (1971), "Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine" Plenum, New York.

Pringle, M. J., Brown, K. B. and Miller, K. W. (1981). Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols? Mol. Pharmacol. 19, 49-45.

Requena, J. and Haydon, D. A. (1985). Is there a "cut-off" in the adsorption of long chain amphipathic molecules into lipid membranes? *Biochim. Biophys. Acta* 814, 191-194.

Rodman, H., Honig, B., Nakanishi, K., Okabe, M., Shimizu, N., Spudich, J. and McCaine, D. (1986). Retinal protein interaction in bacteriorhodopsin and bacterial sensory rhodopsin. *Biophys. J.*, 49, 210a.

Roepe, P., Ahl, L. P., Gupta, D. K. S., Herzfeld, J. and Rothschild, J. K. (1987). Tyrosine and carboxyl protonation changes in the bacteriorhodopsin photocycle M412 and L550 intermediates. *Biochemistry* 26, 6696-6707.

Rothschild, K. J. and Clark, N. A. (1979). Polarized infrared spectroscopy of oriented purple membrane. *Biophys. J.* 25, 473-488.

Rothschild, K. J., R. Sanches, and Noel A. Clark. (1982a). Methods in Enzymology, 88, 696-714.

Rothschild, K. J., Zagaeski, M. and Cantore, W. A. (1982b). Fourier transform infrared difference spectroscopy of purple membrane. *Biophys. J.*, 37, 229a.

Rudo, F. G. and Krantz, J. C. (1974). Anaesthetic molecules. *Br. J. Anaesth.* 46, 181-189.

Sandeman, I. (1955). Amide bands in IR spectra. *Proc. R. Soc. Lond. A. Maths. Phys. Sci.* 232, 105.

Sandorfy, C and Vocelle, D. (1986). The photochemical event in rhodopsins. *Can. J. Chem.* 64, 2251-2266.

Scherrer, P., Mathew, K. M., Sperling, W. and Stoeckenius, W. (1989). Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membranes and bacteriorhodopsin monomers. *Biochemistry*, 28, 829-834.

Schreckenbach, T., Walckhoff, B., and Oesterhelt, D. (1977). Studies on the retinal-protein interaction in bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.* 76, 499-511.

Schreckenbach, T., Walckhoff, B., and Oesterhelt, D. (1978). Specificity of the retinal binding site of bacteriorhodopsin : chemical and stereochemical requirements for the binding of retinol and retinal. *Biochemistry* 17, 5353-5359.

Seeman, P. (1972). The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* 24, 583-655.

Shichi, H. (1983). *Biochemistry of vision*, Academic Press (N.Y).

Simon, B., Luippold, D., Clark, N. A. and Rothschild, K. J. (1978). Physical studies of oriented purple membrane. *Bull. Am. Phys. Soc.* 23, 283-290.

Spudich, J., McCaine, D., Nakanishi, K., Okabe, M., Shimizu, N., Rodman, H., Honig, B. and Bogomolni, R. (1986). Chromophore sensory rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 49, 479-483.

Stern, L. J., Ahl, P. L., Marti, T., Mogi, T., Dunach, M., Barkowitz, S., Rothschild, K. J. and Khorana, H. G. (1989). Substitution of membrane-embedded aspartic acids in bacteriorhodopsin causes specific changes in different steps of the photochemical cycle. *Biochemistry* 28, 10035-10042.

Stoeckenius, W., Lozier, R. H. and Bogomolni, R. A. (1979). Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 505, 215-278.

Subramaniam, S., Marti, T. and Khorana, H. G. (1990). Protonation state of Asp(Glu)-85 regulates the purple-to-blue transition in bacteriorhodopsin mutants Arg-82--->Ala and Asp-85--->Glu : the blue form is inactive in proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1013-1017.

Susi, H. (1969). *Structure and stability of biological macromolecules*. S. N. Timasheff and G. D. Fasman, editors. Marcel Dekker, Inc., New York. 575.

Tadayoshi, Y., Taga, K., Okabayashi, H., Kamaya, H. and Ueda, I. (1990). Proton flow along lipid bilayer surfaces: effect of halothane on the lateral surface conductance and membrane hydration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1028, 95-102.

Thomas, D. D. and Stryer, L. (1980). Transverse location of the retinal chromophore of bacteriorhodopsin in the purple membrane. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 39, 1847.

Thorgeirsson, E. T., Milder, J. S., Miercke, W. J. L., Betlach, C. M., Shand, F. R., Stroud, M. R. and Kliger, S. D. (1991). Effects of Asp-96---> ASN, Asp-85---> ASN, and Arg-82---> GLN single-site substitutions on the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 30, 9133-9142.

Tsuboi, M. (1962). Infrared dichroism and molecular conformation of α -form poly- γ -benzyl-L-glutamate. *J. Polym. Sci.* 58, 139-153.

Uchida, I., Mashimo, T., Yoshiya, I. and Kito, Y. (1989). Antagonistic action of pressure on volatile anesthetic-induced structural change in bacteriorhodopsin. *Anesthesiology* 71, A446.

Unwin, P. N. T. and Henderson, R. (1975). Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystallin specimens. *J. Mol. Biol.* 94, 425-440.

Urry, D. W. and Sandorfy, C. (1991). Generalized perspectives on the chemical modulation of transmembrane protein structure and function. *Communication personnelle*. 65p.

Wallace, B. A. (1982). Comparison of bacteriorhodopsin and rhodopsin molecular structure. *Methods in Enzymology*, 88, Toronto : Academic Press, pp. 447-462.

Wallach, D. F. H., Verma, S. P. and Fookson, J. (1979). Application of laser Raman and infrared spectroscopy to the analysis of membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta* 559, 153-208.

Warshel, A. (1981). Calculations of enzymatic reactions : calculations of pK_a , proton transfer reactions, and general acid catalysis reactions in enzymes. *Biochemistry* 20, 3167-3177.

Warshel, A. and Barboy, N. (1982). Energy storage and reaction pathways in the first step of the vision process. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 1469-1476.

Zundel, G. and Merz, H. (1984). In information and energy transduction in biological membranes. Alan R. Liss, New York. p. 153.