

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE
PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR

DANIEL COSSETTE

ETUDE SPECTROSCOPIQUE UV-VISIBLE ET FTIR DE MODELES SIMPLIFIES DE
LA RHODOPSINE ET DE LA BACTERIORHODOPSINE ET EXTENSION
D'UNE ANALYSE DE RMN ^{15}N DU PIGMENT BACTERIEN.

JUIN 1994

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.

Résumé:

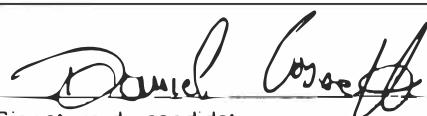
Les rhodopsines constituent une famille de pigments photorécepteurs qui utilisent le rétinal comme chromophore. Elles jouent un rôle primaire dans des fonctions biologiques diversifiées allant du contrôle de la locomotion et de l'utilisation du rayonnement électromagnétique comme source d'énergie chez certaines bactéries jusqu'au contrôle du comportement animal par la photopériode, en passant, évidemment, par la photoréception visuelle.

Dans tous les pigments rétiniens connus, le rétinal est lié à son apoprotéine par un lien covalent. Le lien est en fait une aldimine (ou base de Schiff) entre le dernier carbone du rétinal et l'azote de la position ϵ d'une lysine de la protéine. La particularité de la liaison aldimine des rhodopsines est d'être fortement protonée.

Pour un chimiste, une aldimine est rarement une base forte. En effet, ces molécules ont rarement des pK_a atteignant 8. Paradoxalement, selon la littérature, les pigments visuels (rhodopsine) et bactériens (bactériorhodopsine) ont des chromophores dont le pK_a serait anormalement élevé. Ce phénomène revêt une grande importance car il est directement lié à l'état structural des photorécepteurs qui contrôlent le processus de la vision et la transduction d'énergie dans le système bactérien. Cette présente thèse a pour but premier de mieux comprendre le milieu entourant la base de Schiff en relation notamment avec la protéine et ainsi expliquer leurs pK_a élevés.

Dans un premier temps, un modèle simplifié des pigments photosensibles a été élaboré afin de simuler la nature des interactions existant au sein même de ces photorécepteurs. Une fois ces interactions bien mises en évidence, nous avons réalisé une étude par RMN ^{15}N de la bactériorhodopsine afin de vérifier ou d'infirmer certaines hypothèses concernant la signification réelle des pK_a élevés dans les systèmes protéiques. Nos résultats démontrent le caractère fortement protoné de l'imine des pigments naturels dans le contexte d'un équilibre dynamique du proton dont la position oscille entre des groupements donneur et accepteur.

Ils indiquent de plus la vraisemblance d'un donneur de protons de structure complexe puisque le degré de protonation comparable aux pigments naturels est atteint dans les modèles avec une stoechiométrie imine/acide de 1:2. Enfin, notre étude permet également de conclure à la participation de l'eau dans le mécanisme de protonation de l'imine.

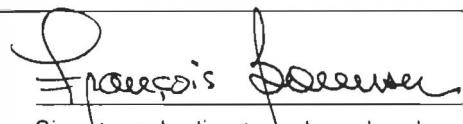


Signature du candidat

Date: Le 21 décembre 1992

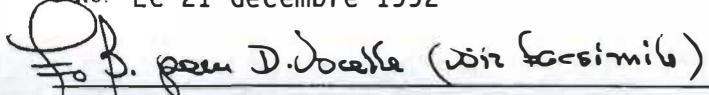
Signature du co-auteur (s'il y a lieu)

Date:



Signature du directeur de recherche

Date: Le 21 décembre 1992



Signature du co-directeur (s'il y a lieu)

Date: Le 21 décembre 1992

TABLE DES MATIERES

PAGE TITRE.....	i
DEDICACE.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES HORS-TEXTE.....	v
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	x
INTRODUCTION.....	1

CHAPITRE 1

Etude des paramètres thermodynamiques lors de l'association d'une base de Schiff avec un acide carboxylique dans le chloroforme.

Introduction.....	20
Partie expérimentale.....	21
Résultats.....	22
Comparaison des valeurs obtenues avec ceux des pigments.....	48
Conclusion.....	54

CHAPITRE 2

Etude de l'action que l'eau pourrait jouer dans les pigments photosensibles naturels.

Introduction.....	55
Méthodologie.....	57
Résultats et discussions.....	64
Signification des résultats obtenus dans cette étude en relation avec ceux obtenus à partir des pigments.....	76

CHAPITRE 3
Etude par RMN N-15 de la bactériorhodopsine et de quelques modèles.

Introduction.....	80
Méthodologie.....	84
Résultats et discussion.....	89
Conclusion.....	100
Références.....	102
Liste des Annexes.....	108

A mes parents.

Sommaire

Selon la littérature, les pigments visuels (rhodopsine) et bactériens (bactériorhodopsine) ont des chromophores dont le pK_a serait anormalement élevé. Ce phénomène revêt une grande importance car il est directement lié à l'état structural des photorécepteurs qui contrôlent le processus de la vision et la transduction d'énergie dans le système bactérien. Cette présente thèse a pour objet premier de mieux comprendre le milieu entourant la base de Schiff en relation notamment avec la protéine et ainsi expliquer leurs pK_a élevés.

Dans un premier temps, un modèle simplifié des pigments photosensibles fut élaboré afin de simuler la nature des interactions existant au sein même de ces photorécepteurs. Un premier modèle est constitué d'une imine conjuguée fut mélangée en rapport équimolaire avec des acides carboxyliques de différents degré d'acidité dans un solvant peu polaire. Par spectroscopie UV, des paramètres thermodynamiques entre l'imine seule, le complexe moléculaire et le complexe protoné furent calculés. Une relation linéaire a été établie entre ces paramètres et le pK_a de ces acides dans l'eau. Ces résultats ont montré une protonation incomplète lorsque l'imine est mélangée avec des acides dont le degré d'acidité est similaire à celui rencontré dans la protéine. Finalement, nous comparons nos valeurs thermodynamiques avec celle requise lorsque le pK_a de la base de Schiff du pigment bactérien serait élevé.

Dans un second temps, un modèle utilisant la base de Schiff du rétinal mélangée en rapport équimolaire avec l'acide acétique ainsi qu'une certaine quantité d'eau fut étudié par spectroscopie infrarouge. Il permet de montrer le rôle crucial que l'eau occupe dans ces systèmes. L'importante augmentation du degré de protonation apparaît un facteur déterminant dans cette étude. Les différentes fréquences $C=N^+$ obtenues sont également expliquées par le phénomène de l'homoconjugaison. En ajoutant deux équivalents d'acides, nous renforçons les preuves de la présence d'un tel phénomène. Suite à ces résultats, nous proposons un mécanisme qui expliquerait les différences obtenues des fréquences $C=N^+$ dans entre les pigments visuels et bactériens.

Finalement, les résultats de spectroscopie RMN de l'azote-15 présentés au dernier chapitre montrent que la cinétique d'échange entre le proton et l'azote de la base de Schiff est lente. Une étude par variation de température dans la bactérie enrichie en azote-15 permet de le confirmer. Par comparaison avec différentes vitesses d'échanges sur modèles, nous montrons que l'accès des ions hydroxydes à la base de Schiff est limité dans le pigment bactérien.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en doute l'hypothèse d'un pK_a de 13 pour la base de Schiff de la bactériorhodopsine.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le département de Photobiophysique de L'Université du Québec à Trois-Rivières de m'avoir accepté comme étudiant au Doctorat et plus particulièrement M. François Boucher qui en plus de ses judicieux conseils et de son appui financier, a réalisé dans ses laboratoires la synthèse de la bactériorhodopsine enrichie en azote-15.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à M. Daniel Vocelle qui a accepté de diriger les travaux de ma recherche, et de m'avoir conseillé tout au long de ce projet. Son appui financier fut également grandement apprécié.

Je ne voudrais surtout pas oublier ceux qui m'ont aidé dans mes travaux et en particulier M. Michel Lévesque, étudiant de troisième année dont le projet de fin d'étude m'a permis d'avancer les travaux du premier chapitre ainsi que M. T. Phan Viet et M. Robert Mayer du laboratoire de résonance magnétique nucléaire à haut champ de l'Université de Montréal pour l'obtention des spectres de RMN ^{15}N .

Je tiens également à mentionner l'apport stimulant de M. Patrice Turcotte et de M. Serge Alex, apport venu grâce à de nombreux entretiens.

Je tiens à remercier le fond F.C.A.R. pour m'avoir octroyé une bourse de recherche pour la poursuite de mes travaux .

Finalement, je remercie M. Robert Lecompte de Minéraux Noranda de m'avoir permis d'utiliser ses programmes et ses imprimantes pour la reproduction de cette thèse.

Table des hors texte

Liste des figures (fig.)

- Fig. 1 Schéma de l'oeil et de la rétine (p.3).
- Fig. 2 Schéma de la rhodopsine (p.4).
- Fig. 3 Structure cristalline dans la membrane pourpre (p.6).
- Fig. 4 Cycle photochimique de la rhodopsine (p.7).
- Fig. 5 Modèle de charge ponctuelle pour la rhodopsine (p.10).
- Fig. 6 Cycle photochimique de la bactériorhodopsine (p.13).
- Fig. 7 a) Spectre électronique de la trans, trans-2,4-heptadiénylidène tert-butylamine dans le chloroforme à 2×10^{-5} M (p.26).
b) Spectre électronique de la trans, trans-2,4-heptadiénylidène tert-butylamine/TCA en rapport équimolaire dans le chloroforme à 2×10^{-5} M (p.26).
- Fig. 8 Force de la liaison hydrogène selon la force de l'acide (p.48).
- Fig. 9 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.59).
- Fig. 10 Spectre FTIR de la NRBA dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.60).
- Fig. 11 a) Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 1 eau dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.61).
b) Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 2 eau dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.61).
- Fig. 12 a) Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 4 eau dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.62).
b) Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 10 eau dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.62).
- Fig. 13 a) Spectre FTIR de 1 NRBA/2 acide acétique/ dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.63).
b) Spectre FTIR de 1 NRBA/2 acide acétique/ 1 eau dans le KBr (1500-1800 cm^{-1}) (p.63).

- Fig. 14 Equilibre des complexes 1:1 et 1:2 pour un système de trioctylamine-MCA (p.73).
- Fig. 15 Complexation du système 1:2 avec l'eau (p.74).
- Fig. 16 La liaison de l'eau avec l'acide carboxylique dans le système pyridine/acide acétique/eau (p.75).
- Fig. 17 Séquence du pulse: a) Standard (p.87).
b) Avec incorporation d'un délai de 40 μ s. sans découplage de proton (p.87).
c) INEPT (p.88).
- Fig. 18 Spectre ^{15}N -RMN par CP/MAS de la bactériorhodopsine \in NH₂-lysine.
a) Normal à température ambiante (p.92).
b) Normal à -10°C (p.92).
c) Avec délai de 40 μ s. sans découplage de proton à température ambiante (p.94).
d) Avec délai de 40 μ s. sans découplage de proton. A -10°C (p.94).
- Fig. 19 Spectre ^{15}N -RMN par CP/MAS de la bactériorhodopsine \in NH₂-lysine à un pH de 12.
a) Normal à température ambiante (p.97).
b) Normal à -10°C (p.97).
c) Avec délai de 40 μ s. sans découplage de proton. A -10°C (p.98).
- Fig. 20 Spectre FTIR de NRBA dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.121).
- Fig. 21 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.122).
- Fig. 22 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 1 eau dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.123).
- Fig. 23 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 4 eau dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.124).

Liste des graphiques (Gr)

- Gr.1 Coefficient de l'absorbtivité molaire de l'imine en fonction de la température (p.35).
- Gr.2 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour Pr (p. 109).
- Gr.3 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour NO_2 (p.110).
- Gr.4 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour MIA (p.111).
- Gr.5 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour MCA (p.112).
- Gr.6 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour DCA (p.113).
- Gr.7 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour TCA (p.114).
- Gr.8 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour Pr (p.115).
- Gr.9 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour NO_2 (p.116).
- Gr.10 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour MIA (p.117).
- Gr.11 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour MCA (p.118).
- Gr.12 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour DCA (p.119).
- Gr.13 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour TCA (p.120).
- Gr. 14 Diagramme reliant l'énergie libre ΔG°_1 et ΔG°_2 au $\text{p}K_a$ de l'acide mesuré dans l'eau (p.42).
- Gr. 15 Diagramme reliant l'enthalpie ΔH°_1 et ΔH°_2 au $\text{p}K_a$ de l'acide mesuré dans l'eau (p.44).
- Gr. 16 Diagramme reliant l'enthalpie $\Delta H^\circ_1 + \Delta H^\circ_2$ au gradient de $\text{p}K_a$ (p.52).

Liste des équations [Eq.]

- [Eq.] 1 Réaction entre le chromophore aldéhyde et un résidu ϵ -amino de l'opsine (p.2).
- [Eq.] 2 Réaction d'équilibre entre le complexe moléculaire et le complexe protoné (p.22).
- [Eq.] 3 Réaction d'équilibre entre l'imine protonée et non protonée (p.25).
- [Eq.] 4 Double réaction d'équilibre entre l'imine libre, l'imine sous forme de complexe moléculaire et l'imine protonée (p.36).

Liste des tableaux (Tb.)

- Tb. 1 Similitudes et différences entre la rhodopsine et la bactériorhodopsine (p.14).
- Tb. 2 Absorbance à 310 et 267 nm du système trans, trans- 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine en rapport équimolaire avec TCA (p.28)
- Tb. 3 Absorbance à 310 et 267 nm du système trans, trans- 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine en rapport équimolaire avec DCA (p.29).
- Tb. 4 Absorbance à 310 et 267 nm du système trans, trans- 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine en rapport équimolaire avec MCA (p.30).
- Tb. 5 Absorbance à 310 et 267 nm du système trans, trans- 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine en rapport équimolaire avec MIA (p.31).
- Tb. 6 Absorbance à 310 et 267 nm du système trans, trans- 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine en rapport équimolaire avec NO₂ (p.32).

- Tb. 7 Absorbance à 310 et 267 nm du système trans, trans- 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine en rapport équimolaire avec Pr (p.33).
- Tb. 8 Valeurs des énergies libres ΔG^0_1 et ΔG^0_2 en kJ/mole (p.39).
- Tb. 9 Valeurs des l'enthalpies standard ΔH^0_1 et ΔH^0_2 en kJ/mole (p.39).
- Tb. 10 Valeurs des entropies standard ΔS^0_1 et ΔS^0_2 en kJ/mole K (p.40).
- Tb. 11 Mesure qualitative de la vitesse d'échange de protons de divers systèmes, à différentes températures (Une vitesse lente signifie que l'entité RN^+-H peut être vue) (p.90).

Liste des abréviations:

Å	distance en Angstrom
Abs	absorbance
as	asymétrique
AH	acide donneur de proton
Arg	arginine
Asp	acide aspartique
B	base accepteur de proton
b	longueur du parcours optique en centimètre
bR	bactériorhodopsine
BathoR	bathorhodopsine
¹³ C	carbone-13
CP	polarisation croisée
DCA	acide dichloroacétique
Et	éthyle
J	couplage en RMN
K	constante d'équilibre
lys	lysine
L	lumi
M	méta
MAS	“magic angle spinning”, rotation à angle magique en français.
MCA	acide monochloroacétique
MIA	acide monoiodoacétique

N-15	azote 15
nBu	radical n-butyle
NO ₂	acide 3-nitropropanoïque
NRBA	toute-trans-rétilylidène n-butylamine
NR tBA ou NR tertBA	toute-trans-rétilylidène tert-butylamine
Pr	acice propanoïque
ppm	unité de déplacement chimique en partie par million
Ret	rétilal
RN ⁺	radical azoté protoné
Rh	rhodopsine
s (en indice)	symétrique
t	tertio
TCA	acide trichloroacétique
T ₁	temps de relaxation spin-spin

Introduction

En 1967, Georges Wald recevait le prix Nobel pour ses travaux sur le mécanisme de la vision. Il fut le premier à démontrer qu'une carence en vitamine A provoquait la cécité chez l'être humain (1). Un dérivé oxydé de cette vitamine: le 11-cis rétinal est à la base de la dynamique des photorécepteurs impliqués dans le mécanisme de la vision.

Depuis ce temps, plusieurs chercheurs ont poursuivi les travaux entrepris par Wald et ils ont tenté notamment d'élucider les différentes étapes impliquées dans le mécanisme d'action des photorécepteurs. Ces études sont loin d'être terminées et on assiste actuellement à un développement exponentiel des travaux concernant non seulement les mécanismes moléculaires et biochimiques de la vision mais également les mécanismes d'action des protéines membranaires. Ainsi, intimement liée aux pigments visuels par la similitude des protéines photoréceptrices, la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique par certaines bactéries comme *l'Halobactérium halobium* fait aussi l'objet d'importantes recherches. On peut certainement parler de champs d'études en plein essor. La présence de similitudes structurales dans les pigments visuels (rhodopsine) et bactériens (bacteriorhodopsine) rend ces recherches encore plus importantes car la compréhension de l'un ou de l'autre permettra de mieux cerner le rôle des protéines membranaires dans les échanges intercellulaires. Voici donc un aperçu des résultats jusqu'ici obtenus et des questions qui demandent encore réponses.

Structure et mécanisme des pigments visuels et bactériens

L'étape primaire de la vision chez tous les vertébrés consiste en l'absorption de la lumière par un pigment situé au niveau de la rétine (figure1). La rétine possède des cellules photoréceptrices qui sont, soit des cônes, soit des bâtonnets (2), noms qui réfèrent à leur apparence au microscope. Ces deux types de cellules contiennent des pigments photosensibles. Chez l'être humain, les cônes possèdent trois pigments photosensibles: l'érythrolabe, le chlorolabe et le cyanolabe, respectivement sensibles aux trois couleurs primaires: le rouge, le vert et le bleu (3). Les bâtonnets possèdent quant à eux, la rhodopsine, un pigment photosensible aux faibles intensités lumineuses. Chaque cellule réceptrice, quelque soit son type, fait synapse avec un deuxième neurone ou cellule bipolaire qui fait à son tour synapse avec une cellule ganglionnaire (4). Les axones de ces dernières forment un faisceau, le nerf optique qui transmet le stimulus lumineux en message électrique jusqu'au cerveau (5). Le pigment visuel le plus couramment étudié est la rhodopsine et possède une masse moléculaire d'environ 38000 daltons. Il est composé d'un chromophore, le 11-cis rétinal, lié à une protéine - l'opsine- par un lien imine formé à partir d'un groupement ϵ -amino d'une lysine (lysine 296 (6)) appartenant à l'opsine (figure 2). La protéine se replie en sept hélices transmembranaires (6) et le lien qui unit le chromophore rétinal 11-cis et la protéine résulte de la réaction décrite par l'équation 1 où Ret signifie le radical rétinylidène.



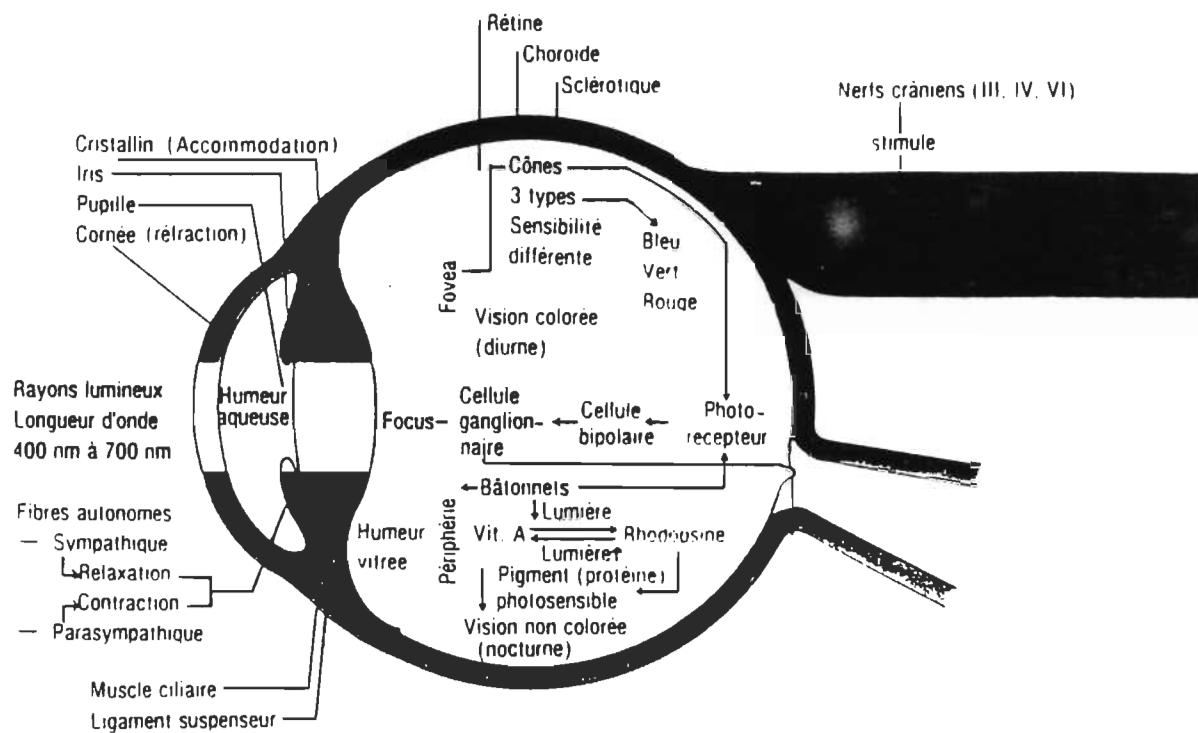


Figure 1: Schéma de l'oeil et de la rétine (3).

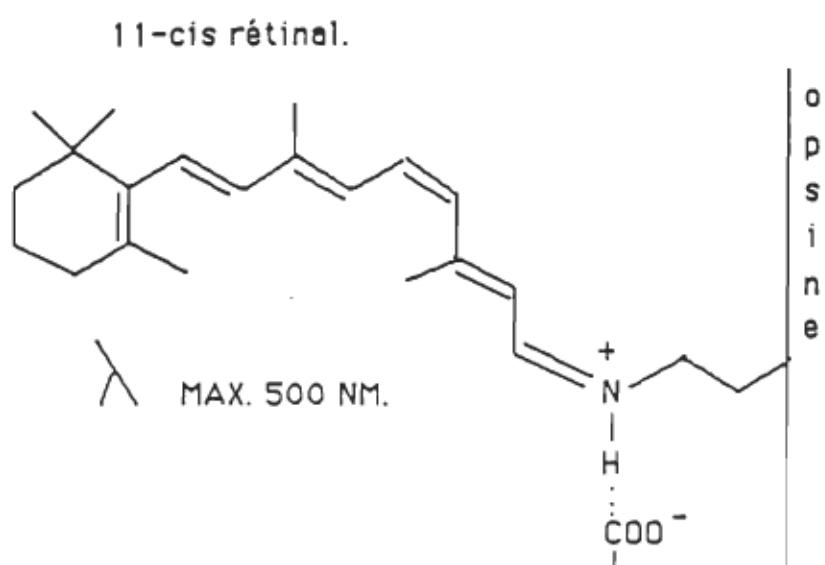


Figure 2 : Schéma de la rhodopsine.

L'Halobactérium halobium contient un pigment, la bactériorhodopsine, qui est une protéine à membrane cellulaire. L'énergie lumineuse est absorbée par ce pigment et convertie en gradient électrochimique par le pompage de protons à travers la membrane bactérienne, lequel gradient sera utilisé pour la synthèse d'ATP. La bactériorhodopsine est la première protéine membranaire dont les structures primaire, secondaire et tertiaire furent élucidées à la fin des années 1970 (7). Les unités de bR se regroupent en trimères, qui s'organisent en réseau hexagonal bidimensionnel cristallin (8) (figure 3). Le site d'attachement du chromophore rétinal 13- cis et tout trans se situe sur la lysine 216, retrouvé dans la septième hélice (6). Sa structure est analogue à celle de la rhodopsine illustrée à la figure 2.

Le rôle de la rhodopsine dans le mécanisme de la vision est essentiellement relié à la conversion d'un isomère du rétinal en un autre isomère (9). Ainsi, sous l'effet de la lumière, la conversion du rétinal-11 cis en rétinal tout trans se fait à partir d'une série d'intermédiaires comme le montre la figure 4 (10). Yoshisawa et Wald (11) furent les premiers en 1964 à caractériser ces intermédiaires. Depuis, plusieurs groupes de chercheurs tentent d'élucider la structure de ces intermédiaires et les mécanismes qui les relient. La transformation de la rhodopsine (Rh) à la bathorhodopsine (bathoR) est particulièrement étudiée à cause du fait qu'elle constitue l'événement primaire de la vision. Actuellement, l'unanimité n'est pas encore établie autour de la question concernant le mécanisme qui relie le passage de l'un à l'autre. Un article de revue par Vocelle et Sandorfy (12) fait le point sur

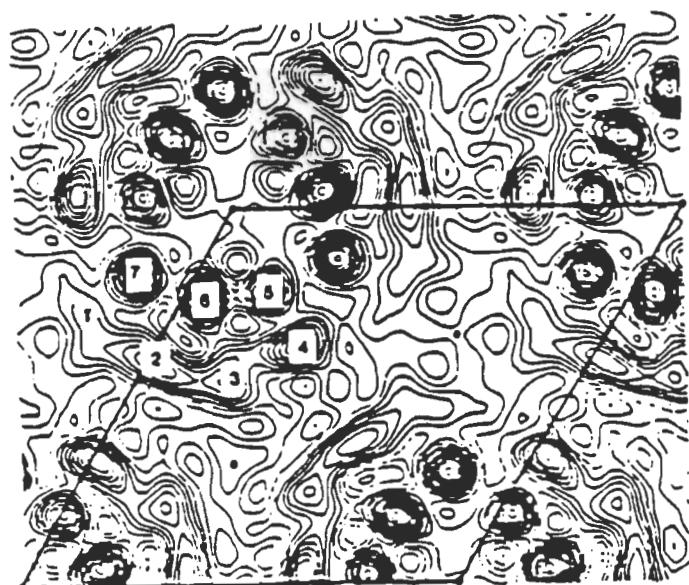


Figure 3: Structure cristalline de la bR dans la membrane pourpre.(7)

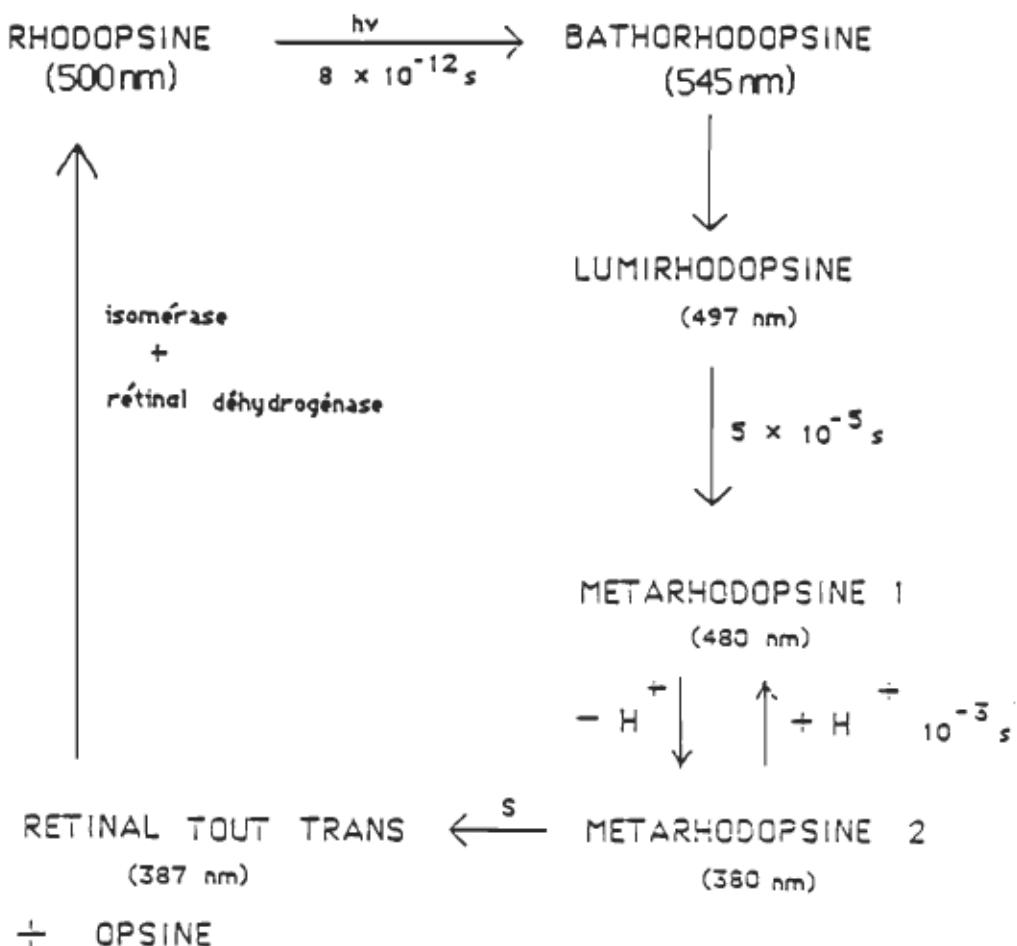


Figure 4: Cycle photochimique de la rhodopsine (10)

cette question. Le texte qui va suivre se bornera à donner un bref aperçu des principaux problèmes reliés à l'étape primaire de la photoréception du pigment visuel.

Jusqu'à la fin des années soixante, le seul paramètre valable pour étudier les pigments photorécepteurs était la longueur d'onde maximale observée par spectroscopie d'absorption. Blatz (13) fut le premier à utiliser des modèles non protéiques pour étudier les longueurs d'onde observées dans les pigments. Ces modèles étaient constitués de différents isomères de la rétinylidène n-butylamine. De plus, afin de simuler une protonation de la fonction imine de ces isomères, un acide très fort (HCl, HF, etc..) était ajouté pour former un sel d'imine (iminium). La base de Schiff et son sel respectif pouvaient être ainsi caractérisés par leur longueur d'onde d'absorption respective. Le modèle qui utilisait la toute-trans-rétinylidène n-butylamine et son sel (le chlorhydrate) donna des absorptions maximales à 360 et 440 nm respectivement pour les chromophores non protonés et protonés dans le méthanol. Puisque le chromophore du pigment visuel absorbe à 500 nm, alors même en considérant que des modèles protonés de la base de Schiff du rétinal absorbent vers 440 nm, il y a évidence qu'un apport de 60 nm doit provenir de l'interaction du chromophore avec la protéine. Une première explication a été fournie par Blatz et coll. (14). Selon ces auteurs, le déplacement bathochrome de 60 nm provient d'un éloignement graduel des charges positive et négative l'une de l'autre à l'intérieur du chromophore protoné. Ceci fut vérifié en changeant systématiquement la grosseur de la charge négative du contre-ion, ce qui signifie

que la distance entre la charge positive sur l'azote et la charge négative variait aussi. Dans ce cas précis, il fut noté lorsque le contre-ion devient plus volumineux, que la distance entre les charges augmente et qu'un effet bathochrome en résulte. Ce résultat n'est toutefois obtenu que dans un solvant peu polaire comme le chloroforme ou le dichlorométhane où des paires d'ions existent. Un solvant polaire comme le méthanol aurait plutôt tendance à solvater à la fois le chromophore et le contre-ion de telle sorte que l'effet ne serait plus le même.

Une étude plus poussée et réalisée cette fois-ci sur le pigment par Arnaboldi et coll. (15-16) a plutôt permis d'expliquer cette différence de 60 nm en terme d'une charge négative supplémentaire située à une certaine distance du chromophore. Leur conclusion est qu'en plus de la charge négative située près de l'azote de la fonction imine du chromophore (contre-ion du sel), il existe une autre charge située à 3,0 Å de la chaîne à proximité du lien 11-cis ce qui provoquerait le déplacement bathochrome observé chez la rhodopsine comme illustré sur la figure 5. Ultérieurement, les travaux de Dratz et Hargrave (17) ont supporté l'étude de Nakanishi. En effet, une étude structurale de la protéine a permis de montrer qu'un acide aspartique (asp 83) ainsi que deux acides glutamiques (glu 122 et glu 134) sont situés dans le voisinage de la base de Schiff du chromophore et ceux-ci pourraient ainsi fournir les charges en question via leur groupement carboxylate.

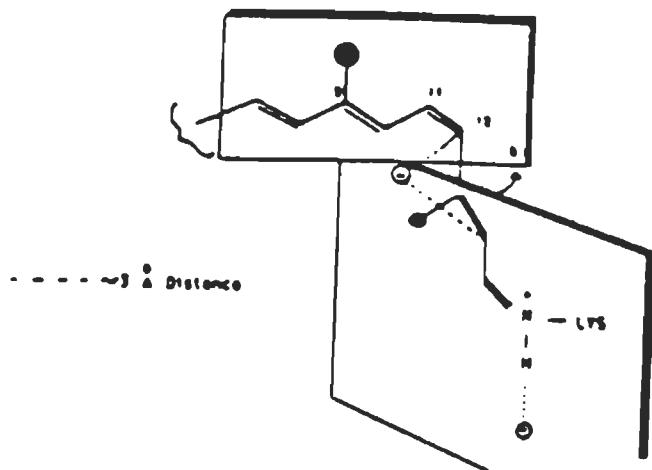


Figure 5: Modèle de charge ponctuelle pour la rhodopsine (15).

L'autre problème majeur rencontré lors de l'étape primaire de la vision concerne le rapport énergétique entre les deux premières espèces impliquées dans le cycle photochimique présenté à la figure 4. Nous rappelons que la bathoR emmagasine une grande quantité d'énergie: soit plus de 35 kcal/mol par rapport à la rhodopsine. Cette quantité fut évaluée par photocalorimétrie par Cooper (18) et confirmée par les travaux de Boucher et Leblanc (19) en spectroscopie photoacoustique. Initialement, deux facteurs ont été proposés pour expliquer cette valeur: l'isomérisation 11-cis en tout trans (20) et/ou un transfert de proton (21). Toutefois, à eux seuls ces deux facteurs ne peuvent apporter tout au plus qu'une

dizaine de kilocalories et leurs contributions ne sont nettement pas suffisantes pour expliquer toute l'énergie absorbée. Honig et coll.(22) ont proposé une autre explication: il y aurait une séparation de charge au niveau de la base de Schiff protonée. Celle-ci, chargée positivement, serait complètement séparée du contre-ion (provenant de l'acide responsable en premier lieu de la protonation) chargé négativement. Plusieurs critiques concernant cette hypothèse ont été soulevées notamment par Warshel et Barboy (23). Le litige tourne autour d'un facteur relativement peu étudié: la polarité du milieu au niveau du "pont" ionique entre la base de Schiff et son contre-ion à l'intérieur de la cage protéique. Le lecteur est invité à consulter l'article de revue de Vocelle et Sandorfy (12) pour de plus amples détails concernant cette problématique. Quelques années plus tard, Liu et Asoto (24) ont à leur tour suggéré un modèle pour expliquer l'emmagasinage de l'énergie par la bathoR en mettant en évidence la possibilité d'un chromophore transoïde tordu. Récemment, les travaux de Deng et Callender (25) et ceux de Palings et coll. (26) en Raman de résonance, ont permis de montrer des torsions importantes aux niveaux des liens 8-9 et des travaux sont en cours actuellement afin de vérifier si celles-ci peuvent induire des quantités d'énergie importantes.

De plus, il est utile de mentionner les travaux de Rafferty et Shichi (27) qui ont montré que lors du passage d'un courant d'azote sur un film composé de segments externes de membranes visuelles de bovins, l'absorption maximale du chromophore de la rhodopsine passe de 500 nm à 390 nm. Cet effet hypsochrome a été expliqué par l'élimination de molécules d'eau autour du chromophore qui favorise la

déprotonation du chromophore. Rappelons que la présence d'eau est requise autour du chromophore lors de la transformation de l'intermédiaire méta 1 à méta 2 dans le cycle photochimique de la rhodopsine (28). Ceci tend à suggérer que le milieu entourant la base de Schiff pourrait être beaucoup plus polaire que suggéré initialement.

Pour ce qui est de la bactériorhodopsine, un rôle similaire est envisagé à la différence que le chromophore ne se sépare pas de la protéine par hydrolyse mais suit plutôt un cycle où la configuration originelle du chromophore est régénérée. Durant le cycle réactionnel de ce pigment bactérien, un proton est transféré de l'extérieur de la membrane vers l'intérieur par l'intermédiaire du chromophore, ce qui fait de cette protéine membranaire une pompe à protons. Le photon capté par la bR génère un premier intermédiaire par photoisomérisation, suivie de réactions thermiques et du relargage d'un proton, conduisant au méta-intermédiaire. Ce dernier se reprotone et se ré-isomérisé pour retourner à la forme originale de la bR. La figure 6 montre la série d'intermédiaires de ce système survenant lors de l'absorption d'un photon par le pigment. Brièvement, au tableau 1, les similitudes et les différences entre ces deux pigments sont présentés.

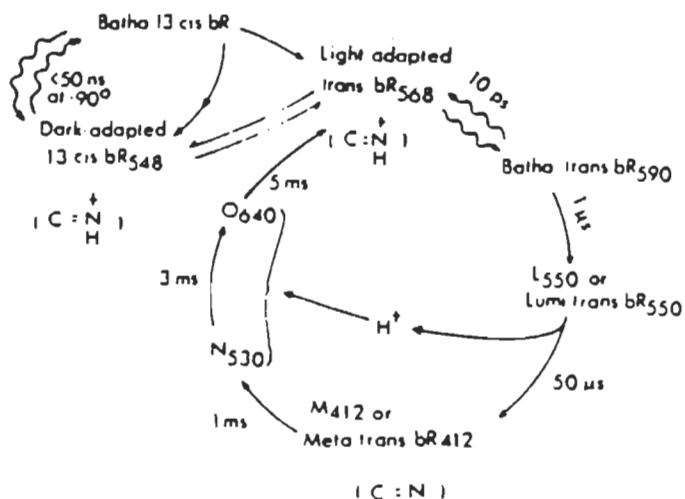


Figure 6: Cycle photochimique de la bactériorhodopsine selon la référence 29. Le terme bR signifie la bactériorhodopsine et les différentes lettres servent à identifier les intermédiaires selon leurs λ_{max} .

Tableau 1: Similitudes et différences entre la Rh et la bR.

	Rhodopsine(Rh)	Bactériorhodopsine(bR)
Nature	Protéine membranaire	protéine membranaire
Provenance halobacterium	répine de l'oeil	Bactérie Halobium
Poids moléculaire	~40000 daltons	~26000 daltons
Fonction biologique	Vision	Transformation de la lumière en énergie chimique
Chromophore rétinal	11-cis rétinal	Rétinal tout trans; 13 cis
Localisation dans la protéine	Forme une liaison imine avec la lysine	Forme une liaison imine avec la lysine 216
Structure tridimensionnelle	7 hélices alpha	7 hélices alpha
Séquence d'acides aminés	Différentes	

Les recherches sur la bactériorhodopsine sont aussi très nombreuses étant donné la grande stabilité de ce pigment et sa relative facilité d'obtention et de manipulation. Quelques fois, certaines études entreprises par le passé sur la Rh sont reproduites sur la bR et à titre d'exemple important, il faut noter les travaux analogues à ceux Rafferty et Shichi mais effectuées sur la bR par Hildebrandt et Stockburger (30) en résonance Raman et Siebert et coll. (31) par FTIR. Leurs conclusions sont essentiellement les mêmes: l'eau doit jouer un rôle important au niveau de la base de Schiff du pigment et pourrait influencer la polarité du milieu entourant le chromophore. De plus, une expérience par diffraction de neutrons par Dencher et Buldt (32) est venue confirmer la présence de molécules d'eau autour du chromophore de la bR (possibilité de quatre molécules d'eau).

Ces derniers résultats ont entraîné plusieurs interrogations concernant l'état de protonation de la base de Schiff des pigments visuels et bactériens. Par exemple, les travaux du groupe de Vocelle (33-34) et Blatz (35-37) concernant l'étude de bases de Schiff en milieux polaire et peu polaire, montrent jusqu'à quel point le mécanisme de protonation peut emprunter des chemins différents. Par exemple, si le milieu est polaire et protique, le proton lié à la base de Schiff peut s'échanger avec celui du solvant. Dans un milieu peu polaire tel le chloroforme, il est montré que ces échanges sont absents. Le texte qui suit présente un bref aperçu de la problématique concernant l'état de protonation des pigments.

Protonation du chromophore

Suite aux travaux par résonance Raman des groupes de Callender (25 et 38) et Mathies (26 et 39), il a pu être démontré que la base de Schiff de la rhodopsine et de son premier intermédiaire, la bathorhodopsine, est entièrement protonée. Dans le pigment bactérien, les intermédiaires suivants de la bactériorhodopsine (bR) sont admis protonés: bR₅₅₀, bR₅₇₀, K₅₉₀ (40) et L₅₅₀ (41). D'autre part, ces mêmes travaux ont aussi montré que les espèces M₃₈₀ (39) et M₄₁₂ (42) respectivement pour le pigment visuel et bactérien ne sont pas protonées. Leurs travaux reposent essentiellement sur la localisation de la bande de vibration C=N⁺-H qui est plus ou moins déplacée par substitution isotopique (hydrogène par deutérium). Cependant, dans le cas où l'espèce est admise protonée, Favrot et coll. (43) ont proposé l'existence d'une espèce non protonée de telle façon que les deux espèces puissent coexister dans des proportions non négligeables l'une par rapport à l'autre. Cette hypothèse prenait assise sur la différence de basicité des états fondamental et excité impliqués dans le processus de résonance Raman. Par surcroît, de récents travaux d'Alex et coll. (44) sur des modèles de la rhodopsine ont montré que le signal Raman résultant ne provenait pas forcément de l'espèce majoritaire. D'autres expériences seront néanmoins nécessaires pour prouver cette hypothèse dans les pigments. Cette dernière problématique se voulait une explication au fait que selon nos connaissances actuelles sur la protonation d'une base faible par un acide faible, celle-ci serait incomplète. Rappelons les faits: le pK_a d'une base de Schiff protonée est au voisinage de 7 tel que mesuré par Schaffer et coll. (45) sur des modèles de

rétinols analogues. En effet, avec un tel pK_a , la base est considérée faible et seul un donneur très fort pourrait induire une protonation totale. Un tel donneur n'est guère envisageable dans les systèmes protéiques. Les travaux du groupe de Vocelle (33,34,46,47), qui ont étudié le système de base de Schiff-acide carboxylique, ont montré que même le donneur le plus fort potentiellement présent dans les systèmes protéiques, soit l'acide aspartique, est encore loin d'induire une protonation totale et ce même à l'intérieur d'un milieu aussi polaire que le méthanol.

Cependant une expérience importante entreprise par Druckmann et coll. en 1982 (48) montre que la base de Schiff de la bactériorhodopsine peut être déprotonée vers un pH de 12 laissant envisager un pK_a d'environ 13. A cause de son instabilité aux ions -OH ce phénomène n'a pu être vérifié dans la rhodopsine mais Cooper et coll. (49) suggèrent une valeur de pK_a similaire à celui du système bactérien. Druckmann et coll. (48) apportèrent toutefois certaines réserves quant-à la signification réelle de ce pK_a à cause de la possibilité du manque d'accessibilité des ions hydroxydes à la base de Schiff. En 1986, Sheves et coll. (50) enchaînèrent avec une expérience cruciale pour la signification réelle de ce pK_a . Par la synthèse d'un dérivé analogue de la base de Schiff du rétinal trifluoré en position 14 et incorporation dans la bR, ils montrèrent ainsi que ce pK_a pourrait bien être réel.

Les travaux de notre groupe de recherche pourraient perdre une partie de leur intérêt advenant le cas où le pK_a de la base de Schiff serait réellement de 13

dans les pigments, car la protonation de la base de Schiff par un acide carboxylique de la protéine tel que montrer par une étude FTIR de Engelhard et coll. (51) et confirmée récemment par les travaux de Otto et coll. (52) serait complète et donc clairement expliquée. Par contre, pour plusieurs raisons que nous discuterons plus loin dans le texte, la signification de ce pK_a ne doit être acceptée qu'avec beaucoup de prudence. C'est ainsi que nos travaux sur la protonation incomplète d'une base de Schiff ($pK_a \sim 7$) par un acide carboxylique prennent leur l'importance. Quels sont les facteurs supplémentaires possibles qui puissent s'additionner à l'acide afin d'améliorer la protonation? Voilà ce que nos présents travaux veulent établir. En voici un bref résumé.

Au premier chapitre, nous allons établir les paramètres thermodynamiques régularisant l'action d'une base de Schiff conjuguée avec une série d'acides carboxyliques en rapport équimolaire dans le chloroforme; un solvant peu polaire qui peut simuler un environnement à faible polarité tel que généralement admis à l'intérieur de la protéine. Cette étude nous permettra de mieux comprendre la nature énergétique de la liaison hydrogène impliquée dans ce processus. A notre connaissance, si des résultats partiels sont déjà rapportés par la littérature sur des systèmes analogues, aucune analyse complète ne fut effectuée sur un système où la force de l'acide carboxylique est modifiée sur une grande échelle.

Au second chapitre, il sera traité du rôle possible de l'eau au niveau de la base de Schiff des pigments car si l'eau est effectivement présente à proximité du

chromophore, l'environnement de la protéine serait alors plus polaire que prévue. Nous tenterons notamment de mesurer son impact sur le degré de protonation des systèmes modèles étudiés au chapitre 1. Aucune étude n'a été jusqu'ici rapportée dans la littérature dans des conditions hydratées à cause principalement de l'instabilité des bases de Schiff dans l'eau. Cependant, nous sommes parvenus à minimiser ce problème par l'enregistrement de spectres FTIR soustraits d'une quantité précise du rétinal résiduel et pris dans l'intervalle de quelques secondes.

Finalement, dans le troisième chapitre, une étude de RMN de l'azote-15 directement sur la bactériorhodopsine tentera d'apporter certaines explications concernant le pK_a de 13 et l'accessibilité de la base de Schiff aux ions hydroxydes.

Chapitre 1

Etude des paramètres thermodynamiques lors de l'association d'une base de Schiff avec un acide carboxylique dans le chloroforme.

Le but de ce chapitre est d'évaluer les paramètres thermodynamiques impliqués lors de l'association d'une base de Schiff avec un acide carboxylique dans un solvant dont la constante diélectrique est voisine de celle de l'intérieur de la cage protéique. Bien qu'un modèle aussi simple puisse présenter d'importantes différences avec le pigment naturel, il apparaît néanmoins intéressant de pouvoir comparer nos valeurs énergétiques avec les valeurs obtenues à partir des pigments. A notre connaissance, il n'existe aucune étude complète des systèmes comparables aux nôtres où la différence de pK_a entre la base imine et l'acide est systématiquement contrôlée. Plus précisément, notre modèle consiste en une imine contenant deux doubles liaisons conjuguées: la trans, trans 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine jumelée en rapport équimolaire avec une série d'acides carboxyliques dans un solvant peu polaire, le chloroforme. Nous verrons plus loin dans le texte la nécessité de travailler avec cette base de Schiff plutôt que d'utiliser l'analogue du rétinal. Par variation de la température de notre système et de la concentration de la base de Schiff, les enthalpies, les énergies libres et les entropies de réaction seront mesurées et calculées. L'étude sera conduite essentiellement par spectroscopie ultraviolette.

Partie expérimentale

Les spectres UV ont été enregistrés sur un modèle Pye-Unicam à double faisceaux balayés entre 400 et 240 nm avec une résolution de 0,3 nm. Des cellules de différente longueur de parcours optique furent utilisées: 0,0057, 0,1 et 1 cm. La cellule de 0,0057 cm fut calibrée avec un étalon standard dont le coefficient d'extinction molaire est précisément connu. La précision de cette cellule est de $\pm 0,001$. Nous utiliserons le dernier chiffre pour nos calculs même s'il est jugé non significatif. La température fut variée de -30° à $+55^\circ\text{C}$. Un système de circulation à l'eau chaude a permis l'enregistrement des spectres entre 25° et 55°C , tandis qu'un système de circulation d'un mélange glace sèche-acétone a permis d'atteindre des températures entre 20° et -30°C . Un thermocouple préalablement calibré et incorporé dans les cellules a permis de s'assurer de lectures précises et constantes à $\pm 0,2^\circ\text{C}$. Un débit constant d'azote dans la boîte contenant la cellule a prévenu le phénomène de condensation de vapeurs d'eau sur les parois de la cellule; ceci a d'ailleurs pu être vérifié par une absorbance nulle (0.000) à 400 nm. D'après Al-Dilaimi et coll. (53), à l'intérieur d'un domaine de température aussi restreint, les contractions de volume peuvent être tenues pour négligeables. Le chloroforme fut purifié en l'éluant sur une colonne d'alumine basique afin d'éliminer toutes traces d'acide. L'imine: la trans, trans 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine a été synthétisée selon la méthode de Sorensen et Kosower (51) et distillée sous vide. Les acides liquides à 25°C : propanoïque (Pr) et dichloroacétique (DCA) ont été séchés sur tamis 3Å tandis que les acides solides à 25°C : trichloroacétique (TCA), monochloroacétique (MCA), 3-nitropropanoïque (NO₂) et monoiodoacétique (MIA) sont mis sous vide au dessiccateur.

Résultats

Des résultats préliminaires sur ce modèle furent déjà rapportés par spectroscopie UV (33), FTIR (55), RMN ^1H (33), RMN ^{13}C et ^{15}N (56). Un rapport entre les espèces protonées et non protonées (degré de protonation) de la fonction imine fut évalué pour chacun des acides. L'étude fut également menée en utilisant la base de Schiff du tout-trans-rétinal (47,57) au lieu du système contenant deux doubles liaisons conjuguées. Une comparaison des résultats obtenus à partir des deux imines a permis de noter la très grande similitude entre les deux modèles. Tous les résultats ont montré que dans le chloroforme les complexes équimolaires imine (B)-acide carboxylique (AH) ne présentent qu'une protonation partielle pour tout acide dont le pK_a est plus élevé qu'environ 1,25. Des expériences à basses températures en RMN ^1H (33) sur ce modèle ont montré que les complexes existaient sous au moins deux formes: l'une à caractère protonée où la fonction imine accepte le proton de l'acide ($\text{BH}^+ \dots \text{A}^-$) et l'autre non protonée où l'acide garde son proton tout en étant associé avec l'imine par liaison hydrogène ($\text{AH} \dots \text{B}$). Un couplage spin-spin entre le proton aldimine et celui lié à l'azote de la fonction imine observé à -40 °C avait permis de caractériser la première forme. A 25°C, ce couplage disparaît permettant d'établir ainsi qu'un transfert rapide du proton s'effectue entre l'imine et l'acide permettant le passage entre les deux formes. (équation 2).



Avec : $K = [\text{A}^- \dots \text{BH}^+] / [\text{AH} \dots \text{B}]$ où K est une constante d'équilibre non

dimensionnelle, $[A^-...BH^+]$ est la concentration de l'espèce protonée et finalement $[AH...B]$ est la concentration de l'imine non protonée liée par une liaison hydrogène. En utilisant un modèle de la toute trans-rétynylidène et l'acide acétique mélangés proportion équimolaire dans le tétrachlorure de carbone, Merz et Zundel (58) avaient pour leur part réussi à caractériser la forme $AH...B$ par spectroscopie infrarouge en l'associant à un élargissement de la bande de vibration d'étirement $C=O$ de l'acide par rapport à celle observée pour l'acide seul dans le tétrachlorure de carbone. Les spectres de la référence (55) concernent le modèle étudié et possèdent aussi de telles bandes élargies par rapport aux acides seuls. Cela permet de confirmer que cette espèce est présente dans le modèle que nous allons étudié. Les degrés de protonation obtenus avec les diverses techniques spectroscopiques déjà mentionnées étaient en parfait accord entre eux à l'exception de ceux obtenus préliminairement en UV (57,34) qui indiquaient des degrés de protonation plus faibles. Par comparaison, un paramètre s'avérait toutefois différent: la concentration qui est de 10^{-5} M en UV et 10^{-1} M en RMN et en FTIR. Dans ce travail, il sera montré qu'une variation de la concentration entre 10^{-5} M et 10^{-2} M implique des changements importants au niveau du degré de protonation et qu'à des concentrations plus voisines de celles utilisées en RMN et FTIR, les résultats deviennent similaires. Ainsi donc, la constante d'équilibre de l'équation 2 est invalide pour caractériser le système puisqu'une constante d'équilibre non dimensionnée comme celle de l'équation 2 ne peut varier avec la concentration. Plus spécifiquement, l'imine étudiée contient deux doubles liaisons conjuguées dont le λ_{max} se situe vers 310 nm (transition $\pi \rightarrow \pi^*$) lorsque protonée avec un acide

carboxylique et possède une transition $n \rightarrow \pi^*$ avec un $\lambda_{\text{max.}}$ vers 250 nm ($\epsilon = 2000-4000 \text{ l/mole.cm}$) tel que démontré par Dupuis (61). Cette bande est trop éloignée et surtout relativement trop peu intense pour causer une interférence significative avec celle de la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'imine non protonée à 267 nm et rend possible une étude quantitative assez précise. Par exemple, l'étude d'une base de Schiff contenue dans les pigments comme la toute trans-rétinylidène serait un système encore plus rapproché du pigment. Cependant, elle possède un $\lambda_{\text{max.}}$ pour l'espèce protonée à 440 nm, qui d'après une étude de Birge (62) engendre une transition $n \rightarrow \pi^*$ vers 360 nm. Cette transition devrait donc interférer avec l'imine non protonée ($\lambda_{\text{max.}}$ à 360 nm) et compliquerait une analyse quantitative.

D'un point de vue général, la formation de liens entre un donneur acide (AH) et un accepteur imine (B) implique de nouvelles transitions électroniques. Ceci, en retour, entraîne l'observation de nouvelles bandes d'absorption dans les spectres électroniques des complexes qui pourront servir à les caractériser. Cependant, la spectroscopie UV ne nous apportera pas d'évidence direct de la nature des interactions que nous allons étudier. A noter qu'un des avantages de la spectroscopie UV concerne l'élimination des interactions solutés-solutés grâce à l'utilisation d'échantillons dilués ($10^{-5}-10^{-3}\text{M}$). Citons, par exemple, la dimérisation et polymérisation des acides carboxyliques observées à 0,1M par spectroscopie RMN et FTIR à basses températures (59-60).

Dans ce travail, la concentration des espèces sera variée tout en gardant une température constante. Le même travail sera fait mais à des températures

différentes. Dans cette étude, l'imine non associée possède initialement un λ_{\max} à 267 nm avec un coefficient d'absorptivité molaire ξ de 37500 l/mole.cm (fig. 7a). En ajoutant à l'imine un acide fort comme le TCA dans un rapport équimolaire (fig. 7b), la bande à 267 nm disparaît et une autre apparaît à 308 nm montrant ainsi une protonation complète puisque cette bande résulte de la présence de l'espèce protonée $\text{BH}^+ \dots \text{A}^-$. Toutefois, l'absorbance à 267 nm de ce dernier cas n'est pas totalement nulle. Il pourrait s'agir d'un simple prolongement de la bande à 308 nm ou de faibles quantités de l'espèce non protonée. Nous verrons plus loin dans le texte la signification réelle de cette absorbance non nulle. Pour l'instant, le système pourrait être simplement défini par l'équilibre montré à l'équation 3 où l'espèce moléculaire ($\text{B} \dots \text{HA}$) serait absente.



$$\text{où } \text{K}_p = \text{C}_p / [(\text{A}_0 - \text{C}_p)(\text{B}_0 - \text{C}_p)]$$

Ici K_p est la constante d'équilibre de l'équation 3, A_0 et B_0 représentent les concentrations équimolaires initiales de l'acide et de la base tandis que C_p est la concentration de l'espèce protonée. Il est facile d'évaluer K_p , même si le coefficient d'absorptivité molaire de l'espèce protonée est initialement une inconnue. En effet, le coefficient d'absorptivité molaire de l'imine non protonée est connu ($\xi_{267} = 37,5 \times 10^3 \text{ l/mole.cm}$ à 25°C), il suffit simplement d'évaluer, pour tout spectre donné, $\log (I_0/I)$ à 267 nm et de le soustraire de la valeur originale, ce qui conduit directement à la concentration de l'espèce protonée. Ceci étant fait, il devient

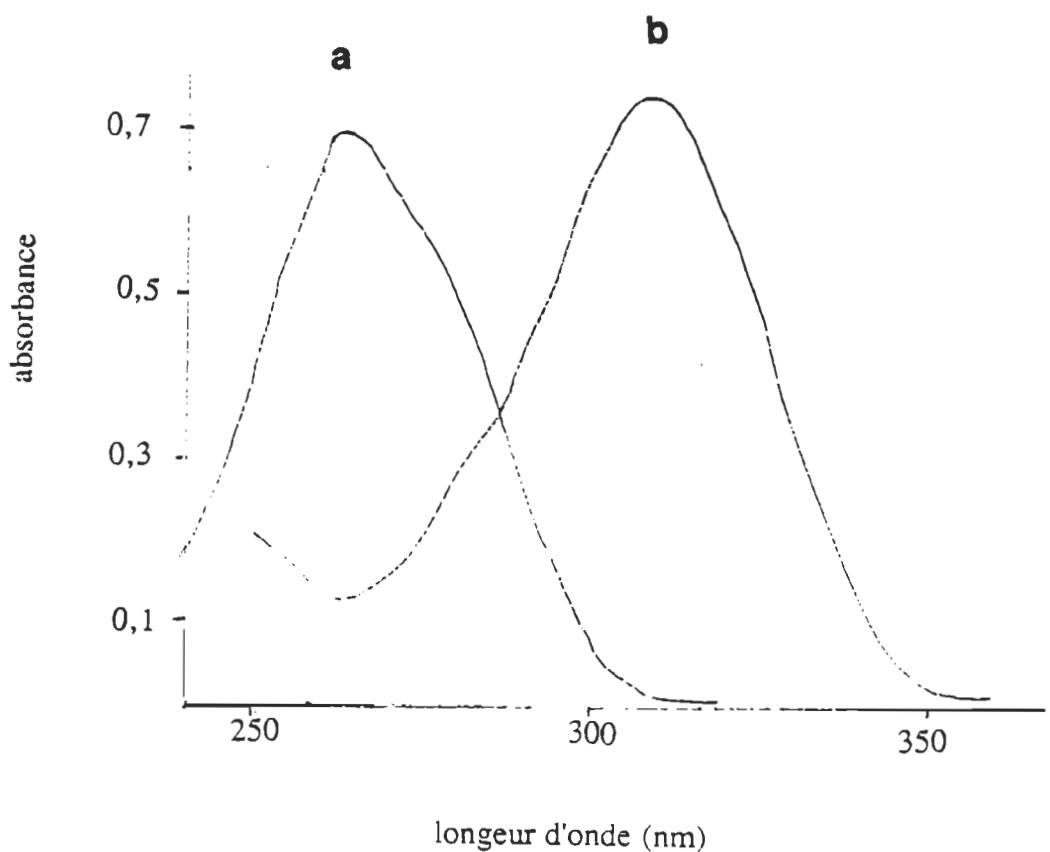


Figure 7 : Spectre électronique de la trans, trans 2,4 heptadién, lildène t-butylamine dans le chloroforme à 2×10^{-5} M.
a) imine seule
b) imine / TCA en rapport équimolaire.

possible de calculer les coefficients d'absorptivité molaire pour l'espèce protonée à 310 nm pour tout acide carboxylique. Nous trouvons pour la base de Schiff une valeur sensiblement constante quelque soit l'acide utilisé et cette valeur est de $\xi = 40.0 \times 10^3 \text{ l/mole.cm} \pm 1\% \text{ à } 25^\circ\text{C}$. Les tableaux 2 à 7 compilent les absorbances à 267 et 310 nm pour tous les acides à diverses concentrations et températures. La validité de cette méthode est basée sur l'hypothèse que les bandes protonées et non protonées n'interfèrent pas entre eux. Pour ce qui est de la bande non protonée, elle n'interfère pas sur celle protonée comme le démontre aisément la figure 7a). Néanmoins, pour plus de sécurité nous calculerons les absorbances de l'espèce protonée à partir de 310 nm au lieu de l'absorption maximale à 308 nm. Aller au delà de 310 nm est inutile d'autant plus que l'absorption de l'espèce protonée diminue et qu'une partie de l'information serait perdue lors de la protonation avec des acides faibles où l'absorption de l'espèce protonée est déjà très faible à 308 nm (cas de Pr et NO₂). Pour la bande protonée, son cas est plus complexe car il n'est pas certain à priori qu'elle interfère ou non sur la bande non protonée. Nous pourrions procéder comme précédemment en déplaçant la longueur d'onde d'analyse de la bande non protonée à 260 nm sauf que dans ce cas, la sensibilité éventuellement perdue sur l'absorbance de l'espèce non protonée à cette longueur d'onde, rendra difficile l'étude quantitative que nous allons développer ultérieurement pour les acides forts comme TCA et DCA. Néanmoins, nous pouvons utiliser temporairement cette longueur d'onde pour confirmer ou non que celle à 267 nm n'est pas ou très peu perturbée par la bande protonée. En effet, si cette bande interfère, le coefficient d'extinction molaire réel de l'espèce protonée à 310 nm sera supérieur à la valeur de

TABLEAU 2: ABSORBANCE A 310 ET 267 NM DU SYSTEME TRANS,TRANS-
 2,4-HEPTADIENYLIDENE TERT-BUTYLAMINE EN RAPPORT
 EQUIMOLAIRE AVEC TCA.

Température (°C)	Concentration (10^{-5} M/L)	b (cm)	Abs. 267	Abs. 310
25	0.44	1.0	0.047	0.130
	2.50	1.0	0.150	0.860
	4.47	1.0	0.242	1.531
	14.50	0.1	0.061	0.520
30	0.50	1.0	0.056	0.140
	1.00	1.0	0.089	0.302
	3.00	1.0	0.205	0.984
	5.00	1.0	0.294	1.668
	10.00	0.1	0.052	0.342
40	0.5	1.0	0.070	0.121
	1.0	1.0	0.115	0.272
	3.0	1.0	0.220	0.915
	5.0	1.0	0.381	1.576
	10.0	0.1	0.063	0.329
50	0.5	1.0	0.089	0.100
	1.0	1.0	0.146	0.236
	3.0	1.0	0.320	0.837
	5.0	1.0	0.464	1.473
	10.0	0.1	0.078	0.310
60	0.5	1.0	0.111	0.073
	1.0	1.0	0.186	0.188
	3.0	1.0	0.414	0.723
	5.0	1.0	0.598	1.307
	10.0	0.1	0.099	0.284

2,4-HEPTADIENYLIDENE TERT-BUTYLAMINE EN RAPPORT
EQUIMOLAIRE AVEC DCA.

Température (°C)	Concentration (10 ⁻⁵ M/L)	b (cm)	Abs. 267	Abs. 310
25	1.07	1.0	0.161	0.259
	2.07	1.0	0.276	0.536
	4.36	1.0	0.515	1.219
	6.43	1.0	0.716	1.814
	20.50	0.1	0.190	0.617
30	0.5	1.0	0.089	0.097
	1.0	1.0	0.164	0.224
	3.0	1.0	0.391	0.780
	5.0	1.0	0.599	1.356
	10.0	0.1	0.108	0.284
40	0.5	1.0	0.113	0.076
	1.0	1.0	0.194	0.188
	3.0	1.0	0.472	0.682
	5.0	1.0	0.703	1.229
	10.0	0.1	0.128	0.259
50	0.5	1.0	0.132	0.054
	1.0	1.0	0.230	0.143
	3.0	1.0	0.554	0.581
	5.0	1.0	0.839	1.063
	10.0	0.1	0.148	0.223
60	0.5	1.0	0.141	0.040
	1.0	1.0	0.251	0.115
	3.0	1.0	0.620	0.495
	5.0	1.0	0.931	0.939
	10.0	0.1	0.159	0.218

TABLEAU 4: ABSORBANCE A 310 ET 267 NM DU SYSTEME TRANS,TRANS- 30
 2,4-HEPTADIENYLIDENE TERT-BUTYLAMINE EN RAPPORT
 EQUIMOLAIRE AVEC MCA.

Température (°C)	Concentration (10^{-5} M/L)	b (cm)	Abs. 267	Abs. 310
25	2.8	1.0	0.901	0.165
	4.0	1.0	1.224	0.275
	22.4	0.1	0.531	0.340
	417.0	0.0057	0.380	0.541
	1120.0	0.0057	1.144	1.362
15	3.0	1.0	0.899	0.257
	6.0	1.0	1.656	0.662
	10.0	0.1	0.247	0.141
	50.0	0.1	0.941	1.014
	300.0	0.1	0.446	0.734
0	3.0	1.0	0.757	0.426
	6.0	1.0	1.314	1.057
	10.0	0.1	0.193	0.203
	50.0	0.1	0.749	1.238
	300.0	0.01	0.373	0.820
-15	3.0	1.0	0.403	0.637
	6.0	1.0	0.986	1.422
	10.0	0.1	0.156	0.246
	50.0	0.1	0.586	1.422
	300.0	0.01	0.299	0.907
-30	3.0	1.0	0.388	0.830
	6.0	1.0	0.673	1.762
	10.0	0.1	0.102	0.304
	50.0	0.1	0.428	1.600
	300.0	0.01	0.224	0.992

2,4-HEPTADIENYLIDENE TERT-BUTYLAMINE EN RAPPORT
EQUIMOLAIRE AVEC MIA.

Température (°C)	Concentration (10^{-5} M/L)	b (cm)	Abs. 267	Abs. 310
25	2.9	1.0	0.950	0.112
	30.1	0.1	0.982	0.506
	43.0	0.0057	0.251	0.201
	136.0	0.0057	0.795	0.760
	503.0	0.0057	1.541	1.550
15	3.0	1.0	0.979	0.172
	6.0	1.0	1.817	0.493
	10.0	0.1	0.281	0.104
	50.0	0.1	1.162	0.782
	300.0	0.01	0.598	0.573
0	3.0	1.0	0.909	0.269
	6.0	1.0	1.669	0.691
	10.0	0.1	0.256	0.139
	50.0	0.1	1.037	0.941
	300.0	0.01	0.527	0.663
-15	3.0	1.0	0.798	0.403
	6.0	1.0	0.426	0.967
	10.0	0.1	0.215	0.185
	50.0	0.1	0.878	1.128
	300.0	0.01	0.455	0.750

TABLEAU 6: ABSORBANCE A 310 ET 267 NM DU SYSTEME TRANS,TRANS-

32

2,4-HEPTADIENYLIDENE TERT-BUTYLAMINE EN RAPPORT
EQUIMOLAIRE AVEC NO₂.

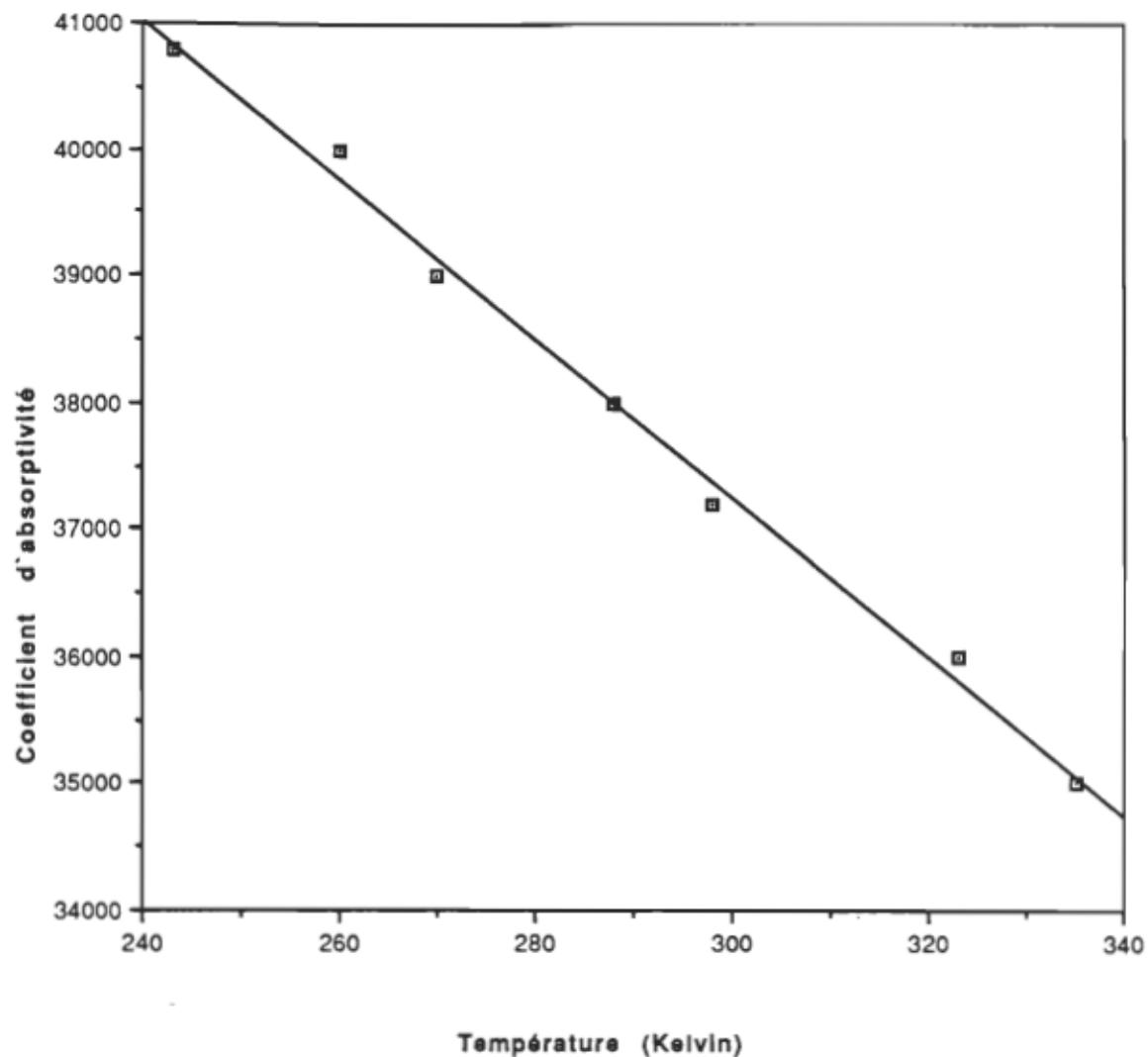
Température (°C)	Concentration (10 ⁻⁵ M/L)	b (cm)	Abs. 267	Abs. 310
25	18.2	0.1	0.621	0.070
	312.0	0.0057	0.480	0.203
	884.0	0.0057	1.237	0.596
	1400.0	0.0057	2.071	0.987
15	10.0	0.1	0.357	0.024
	50.0	0.1	1.600	0.321
	100.0	0.01	0.300	0.084
	300.0	0.01	0.836	0.320
	500.0	0.01	1.333	0.602
0	10.0	0.1	0.312	0.041
	50.0	0.1	1.527	0.444
	100.0	0.01	0.285	0.108
	300.0	0.01	0.782	0.403
	500.0	0.01	1.245	0.729
-15	10.0	0.1	0.333	0.065
	50.0	0.1	1.399	0.606
	100.0	0.01	0.258	0.141
	300.0	0.01	0.708	0.497
	500.0	0.01	1.135	0.869
-30	10.0	0.1	0.298	0.105
	50.0	0.1	0.225	0.808
	100.0	0.01	0.228	0.179
	300.0	0.01	0.610	0.609
	500.0	0.01	0.997	1.037

TABLEAU 7: ABSORBANCE A 310 ET 267 NM DU SYSTEME TRANS,TRANS-
 2,4-HEPTADIENYLIDENE TERT-BUTYLAMINE EN RAPPORT
 EQUIMOLAIRE AVEC PR,

Température (°C)	Concentration (10 ⁻⁵ M/L)	b (cm)	Abs. 267	Abs. 310
15	100.0	0.01	0.358	0.024
	300.0	0.01	1.029	0.120
	500.0	0.01	1.640	0.280
0	100.0	0.01	0.355	0.037
	300.0	0.01	1.000	0.177
	500.0	0.01	1.615	0.347
-15	100.0	0.01	0.355	0.053
	300.0	0.01	0.983	0.240
	500.0	0.01	1.592	0.444
-30	100.0	0.01	0.326	0.081
	300.0	0.01	0.938	1.284
	500.0	0.01	1.469	0.444

40.0×10^3 l/mole.cm obtenue. En utilisant la longueur d'onde à 260 nm pour la bande non protonée et en réutilisant la même méthode de calcul que précédemment, nous pouvons évaluer de nouveau le coefficient d'extinction molaire de l'espèce protonée. Si cette valeur est différente et normalement supérieure à celle calculée à 267 nm, et que par surcroît l'écart s'accentue avec un acide de plus en plus fort, il y aura une interférence. Par contre, si le coefficient d'extinction molaire demeure constant pour la bande de l'espèce protonée, il n'y aura pas d'interférence. On se base ici sur le fait que la bande interférante devrait diminuer d'intensité avec la longueur d'onde. La méthode de calcul utilise simplement le coefficient d'extinction molaire de l'imine non protonée à 260 nm et dont la valeur est de: 32.6×10^3 l/mole.cm. Le calcul se fait seulement avec les quatres acides les plus forts. La bande de l'espèce protonée est vraiment trop faible pour qu'il y est danger réel d'interférence avec les deux acides plus faibles. On constate que les coefficients d'extinction molaire des espèces protonées restent toujours constants à 40.0×10^3 l/mole.cm. On peut donc conclure que la bande de l'espèce protonée n'interfère pas sur celle à 267 nm (ni 260 à nm). L'analyse peut donc se faire à la valeur désirée de 267 nm.

Finalement, puisque l'étude montrera la nécessité d'obtenir des spectres à différentes températures, il est possible que ceux-ci influencent les valeurs des coefficients d'absorptivité molaire pour l'espèce protonée et non protonée. Ceci est confirmé par le graphique 1 qui montre une variation entre le coefficient d'absorptivité molaire pour l'espèce non protonée (imine seule) et la température. Toutefois, il n'apparaît pas nécessaire de d'obtenir un spectre de l'imine seule pour



Graphique 1: Coefficient de l'absorptivité molaire (l/mole.cm) en fonction de la température.

chacune des températures que nous allons étudiées car il existe une relation parfaitement linéaire entre ces deux paramètres. Une simple extrapolation de la droite est suffisante pour déterminer les coefficients d'absorptivité molaire aux températures désirées. A partir de ces données, les coefficients d'absorptivité molaire des espèces protonées seront calculés pour les températures désirées. Le calcul préliminaire à 260 nm déjà discuté est aussi nécessaire pour chaque température. Il confirme l'absence de la bande interférente.

Un calcul préliminaire de la valeur du K_p tirée de l'équation 3 révèle que celle-ci diminue lorsque la concentration augmente. Ceci est observé sans exception dans tous les systèmes. Par exemple, avec MIA à 15°C, les valeurs de K_p sont les suivantes: pour une concentration en imine de 3×10^{-5} M, K_p est de 11500 M $^{-1}$; pour 6×10^{-5} M, K_p est de 8700 M $^{-1}$; pour 10×10^{-5} M, K_p est de 8400 M $^{-1}$; pour 50×10^{-5} M, K_p est de 4000 M $^{-1}$; pour 300×10^{-5} M, $K_p=1500$ M $^{-1}$. La déviation des K_p doit impliquer que l'équation 3 est incorrecte pour définir le système. A ce stade, il est possible d'introduire la présence d'une troisième espèce qui serait l'espèce moléculaire telle que caractérisée par Merz et Zundel et dont la présence fut montrée dans notre modèle par FTIR. Ceci nous conduit à proposer l'équation 4:



Avec: $K_2 = C_p / C_{molec.}$ et $K_1 = C_{molec.} / [(A_0 \cdot C_p \cdot C_{molec.}) (B_0 \cdot C_p \cdot C_{molec.})]$

où K_1 et K_2 sont les deux constantes d'équilibre de cette réaction et $C_{molec.}$ est la concentration de l'espèce moléculaire. Ces trois paramètres sont des

inconnues: deux constantes K_1 et K_2 ainsi qu'une variable fonction de la concentration ($C_{molec.}$). La valeur de C_p étant calculée selon l'équation 3, A_0 et B_0 étant les concentrations initiales de l'acide et la base en proportion équimolaire exprimées en mole par litre. Pour résoudre ce système, nous allons assumer une hypothèse de travail. Si l'analyse numérique que nous allons proposer converge, cette hypothèse ainsi que l'équation 4 sont sûrement valables

Dans une étude par spectroscopie UV, Nasielski et Donckt (63), sur certaines bases dérivées de la quinoléine en présence de grand excès d'acides carboxyliques dans le chloroforme avaient réussi à caractériser l'espèce moléculaire. Leurs résultats montrèrent un léger déplacement bathochrome ($\sim 1\text{nm}$) et une légère augmentation du coefficient d'absorptivité molaire ($\sim 1\text{-}2\%$) entre le complexe formé et la quinoléine seule. Vinogradov et Linnell (64) mentionnent que la formation d'une liaison hydrogène (sans transfert de proton), en spectroscopie électronique, s'accompagne en général de changements très faibles. Sur la base de ces résultats, nous proposons donc qu'à 267 nm le coefficient d'absorptivité molaire de l'imine seule soit exactement le même que celui de l'espèce moléculaire ($\xi_{libre} = \xi_{molec.}$)

Grâce à une méthode d'analyse numérique, il est possible de calculer K_1 et K_2 . Il s'agit de choisir un K_2 de telle sorte que K_1 ne dévie plus avec la concentration car il existe théoriquement une seule valeur de K_2 où la variation de K_1 avec la concentration sera nulle. Nos résultats montrent qu'en effet, il existe effectivement une seule valeur de K_2 où K_1 est constant. Une fluctuation, et non pas une déviation de $\pm 10\%$ sera considérée comme acceptable. Ce calcul se fait aisément à l'aide d'un micro-ordinateur muni d'un programme que nous avons mis au point de telle

sorte que ce programme puisse choisir des valeurs de K_2 et calculer K_1 . A partir des constantes d'équilibres K_1 et K_2 , il est possible de calculer les énergies libres: $\Delta G^\circ_{1(298)}$ et $\Delta G^\circ_{2(298)}$ puisque $\Delta G^\circ = -RT\ln K$ (T étant la température en degré Kelvin). Ces valeurs thermodynamiques (ΔG°_1 , ΔG°_2 , K_1 et K_2) sont répertoriées pour chaque acide et température au tableau 8.

Le calcul conduisant aux chaleurs standards (ΔH°) se fait en portant en graphique $\ln K_1$ et l'inverse de la température. La pente de la droite ainsi trouvée multipliée par $-R$ (R est la constante des gaz et vaut 8,3 Joules/mole) donne l'enthalpie pour la réaction 1. On fait de même pour $\ln K_2$. Les graphiques 2 à 13 sont présentés en annexe pour chacune des relations d'Arrhenius. Les enthalpies standards ΔH°_1 et ΔH°_2 sont répertoriés au tableau 9. Finalement, les entropies standard respectives peuvent alors être facilement évaluées puisque $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ et sont présentées au tableau 10.

Discussion

Pour chaque acide, nous observons invariablement que le rapport des espèces protonées sur non protonées s'accentue lorsque la concentration augmente ou si la température est abaissée signalant ainsi une protonation accrue de la fonction imine. Les paramètres thermodynamiques identifiés à l'indice 1 correspondent au premier équilibre, soit la formation de la liaison hydrogène: $AH + B \rightleftharpoons AH...B$ tandis que l'indice 2 est associé à l'équilibre du transfert de proton: $AH...B \rightleftharpoons A-...BH+$. La relation de Huyskens (65) pour des complexes

Table 8 : Valeurs des énergies libres: ΔG°_1 et ΔG°_2
en kJ/mole.

TCA	ΔG°_1	ΔG°_2	T(K ⁰)
TCA	-31.4	-5.9	298
	-31.1	-5.8	303
	-30.5	-5.7	313
	-29.8	-5.6	323
	-28.8	-5.3	333
DCA	-30.1	-3.6	298
	-30.1	-3.4	303
	-29.7	-3.1	313
	-28.7	-2.9	323
	-28.4	-2.6	333
MCA	-20.5	-1.7	298
	-21.0	-1.9	288
	-21.6	-2.4	273
	-22.0	-2.8	258
	-22.4	-3.2	243
MIA	-20.6	-0.2	298
	-21.0	-0.6	288
	-21.3	-1.2	273
	-21.4	-1.5	258
	-21.7	-1.9	243
NO ₂	-16.6	+1.2	298
	-17.1	+0.9	288
	-17.3	+0.4	273
	-17.4	-0.1	258
	-17.6	-0.6	243
Pr	-13.3*	+2.7*	298
	-13.5	+2.4	288
	-13.7	+1.8	273
	-13.8	+1.3	258
	-13.9	+0.7	243

*: Valeurs extrapolées à partir des relations $\ln K$ vs pK_a des acides mesurés dans l'eau.

Table 9: Valeurs des enthalpies standards ΔH°_1 , et ΔH°_2 , en kJ/mol.

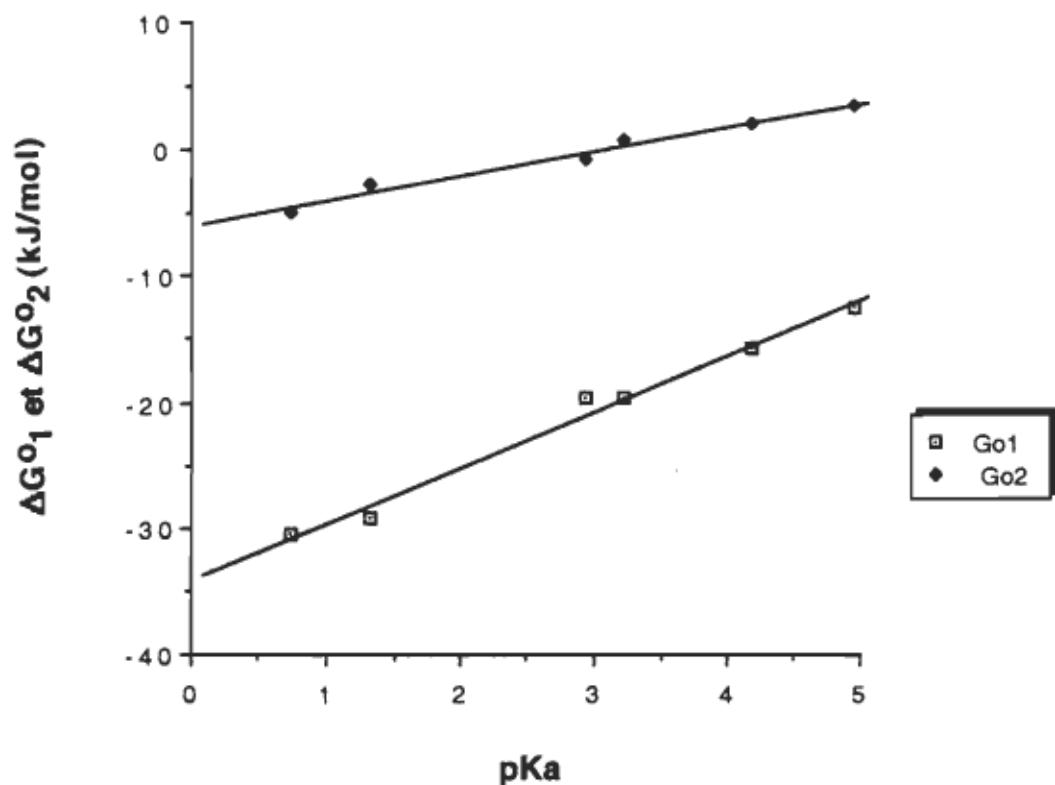
	ΔH°_1	ΔH°_2	$\Delta H^\circ_1 + \Delta H^\circ_2$
TCA	-53.0	-12.0	-65.0
DCA	-42.1	-11.2	-53.3
MCA	-29.2	-10.0	-39.2
MIA	-25.0	-9.7	-36.7
NO ₂	-19.9	-9.1	-29.0
Pr	-15.9	-8.2	-24.1

Table 10: Valeurs des entropies standards ΔS°_1 et ΔS°_2
 ΔS exprimées en kJ/mol K.

	ΔS°_1	ΔS°_2	$\Delta S^\circ_1 + \Delta S^\circ_2$
TCA	-0.072	-0.020	-0.092
DCA	-0.040	-0.025	-0.065
MCA	-0.028	-0.028	-0.057
MIA	-0.015	-0.032	-0.047
NO ₂	-0.010	-0.034	-0.044
Pr	-0.008	-0.037	-0.045

acide-base dans le chloroforme indique qu'il existe une linéarité entre $\ln K_2$ et le pK_a de l'acide mesuré dans l'eau. Cela est également observé dans nos systèmes. Le graphique 14 montre ce phénomène à 25°C avec nos systèmes en utilisant ΔG°_2 (la température et R étant constant, l'énergie libre est donc directement proportionnelle à $\ln K$). D'autre part, une relation similaire entre $\ln K_2$ et le pK_a de l'acide mesuré dans l'eau avait été rapportée par Böhner et Zundel (66) pour des systèmes formés de l'imidazole et d'acide carboxylique en solution dans le CCl_4 . Cette relation est aussi observée entre ΔG°_1 ($\ln K_1$) et le pK_a de notre modèle (graphique 14). Toutefois, mentionnons que pour des solvants peu polaires, la littérature ne rapporte pas toujours de relation linéaire entre $\ln K_1$ et le pK_a (67) pour des systèmes acide-base.

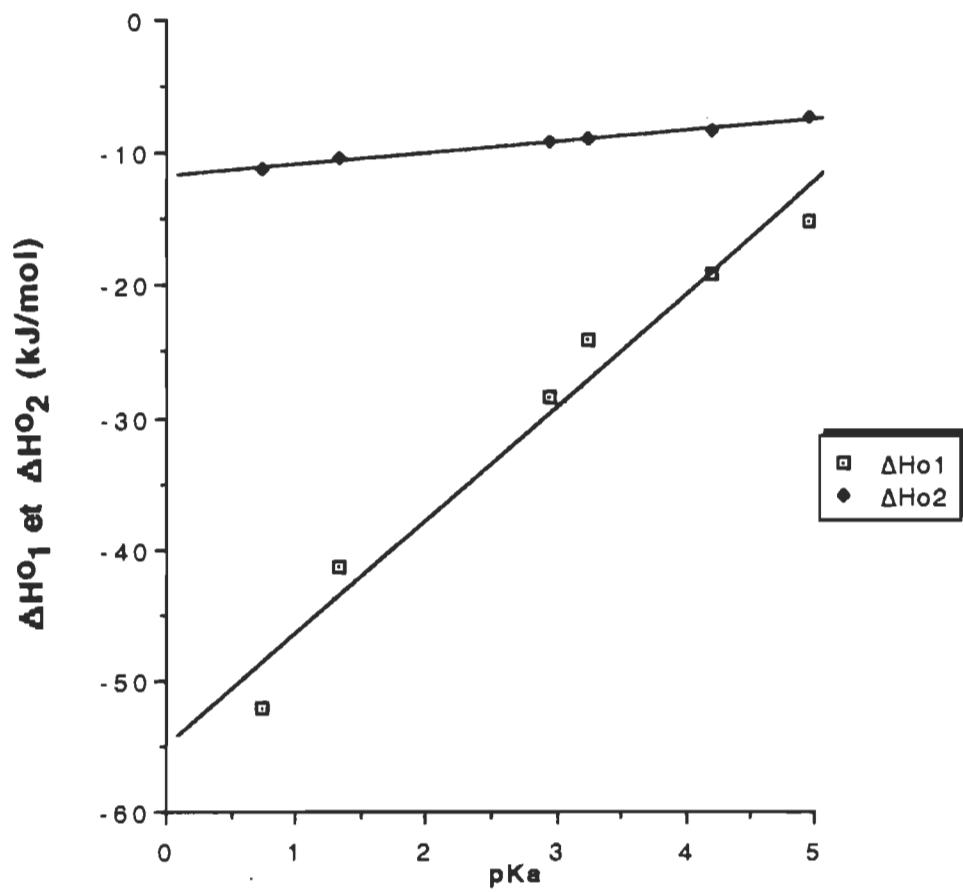
Les enthalpies standard ΔH°_1 et ΔH°_2 qui sont répertoriées au tableau 9 sont calculées pour chaque acide à partir de l'équation d'Arrhénius. Voici les principaux points qui ressortent de cette tableau. On notera en premier lieu que ces enthalpies sont de plus en plus négatives lorsque la force de l'acide augmente. Le signe négatif signifie que la réaction est exothermique et que celle-ci s'accompagne d'un dégagement de chaleur relativement important qui peut être aisément observé en laboratoire. D'une façon générale, en considérant l'imine et l'acide à un niveau d'enthalpie standard quelconque, le complexe moléculaire formé lors de la première réaction voit son enthalpie standard abaissée par rapport à celle de l'imine et l'acide. Par la suite, le complexe moléculaire est transformé en complexe protoné et l'enthalpie standard relative entre ces deux espèces est de nouveau abaissée. Cette fois-ci, l'enthalpie standard de l'espèce protonée est abaissée par rapport à celle de



Gr 14: Diagramme reliant l'énergie libre (25 Cel.) au pK_a de l'acide dans l'eau.

l'espèce moléculaire. D'autre part, on notera que la valeur de ces enthalpies standards est plus élevée dans la première réaction (16-52 kJ/mol) que pour la deuxième (8-12 kJ/mol). Finalement, en englobant les deux réactions, la valeur totale des enthalpies ($\Delta H^\circ_1 + \Delta H^\circ_2$) augmente avec la force de l'acide.

La relation précédente qui existait pour les énergies libres standards est aussi observée avec les enthalpies ΔH°_1 et ΔH°_2 en fonction du pK_a des acides dans l'eau. Ceci est montré au graphique 15. Nos travaux sont donc en accord avec plusieurs autres études, notamment celles faites par Kristoforov et coll. (68), Mashkovsky et Odinokov (69), Khon (70) et Rassidin et logansen (71) qui avaient tous également rapportées de semblables corrélations. Arnett (72) rapporte de son coté une relation linéaire entre ΔH°_1 et ΔH°_2 avec une série de pyridines substituées en passant du CCl_4 à l'acide fluorosulfurique. Cette corrélation est également anticipée avec notre système puisque ΔH°_1 et ΔH°_2 sont en relation linéaire avec le pK_a . Ceci supporte l'idée exprimée par Arnett pour expliquer ce genre de corrélation qui implique que la formation de la liaison hydrogène et le transfert de proton sont considérés comme étant des événements parallèles. En d'autres mots, cela signifie que si l'énergie de la liaison hydrogène est importante cela implique que l'énergie reliée au transfert de proton le sera aussi et ce malgré des valeurs énergétiques qui peuvent être très différentes pour chacun des processus pris séparément. D'autre part, Caldin (73) rapporte des résultats très différents en utilisant des pyridines substituées et un donneur dérivé du phénol dans un solvant peu polaire, le chlorobenzène. Selon cet auteur, il n'existe aucune relation entre



Gr. 15: Diagramme reliant l'enthalpie au pK_a .

ΔH°_1 et ΔG°_1 , avec le pK_a et par conséquent la formation de la liaison hydrogène serait exclusivement reliée à des phénomènes stériques. Seules les valeurs thermodynamiques reliées au transfert de proton auraient une relation linéaire avec le pK_a . Nous tenterons plus loin de donner une explication à ce résultat controversé. Maintenant que nous avons établi certaines corrélations intéressantes tirées de nos valeurs thermodynamiques, nous passerons à l'étude de leur ordre de grandeur en les comparant avec la littérature.

Formation de la liaison hydrogène (ΔH°_1 et ΔG°_1).

Lors de la formation d'une liaison hydrogène entre un accepteur azote et un donneur oxygène, les valeurs des énergies libres tirées du livre "Hydrogen Bonding" de Vinogradov et Linnell (74) sont en général plus faibles: 10-15 kJ/mol par rapport à ce travail: 13-30 kJ/mol. Remarquons que les valeurs de cette référence contiennent des acides et des bases très faibles. Cependant, lorsque la formation d'une liaison hydrogène est suivie par un transfert de proton, la première voit ses énergies libres et ses enthalpies augmentées. Rassidin et coll. (75) obtiennent une valeur qui peut aller jusqu'à 55 kJ/mol pour l'enthalpie de la liaison hydrogène lorsque la pyridine est mise en présence d'un acide fort tel le TCA. Les travaux des références 66-68 montrent aussi des enthalpies qui peuvent aller jusqu'à 40 kJ/mol avec des acides de plus en plus forts. Merz et Zundel (58) rapportent des valeurs respectives de -8,7 kJ/mol et +2,7 kJ/mol à 22° C pour ΔH°_1 et ΔG°_1 , avec un système similaire au nôtre, soit la toute-trans-rétinylidène n-butylamine et l'acide acétique. Ce résultat est semblable au nôtre, obtenu en utilisant un acide carboxylique

d'acidité comparable, l'acide propanoïque. Par contre, Caldin et coll. (67) utilisant des donneurs de proton très encombrés stériquement rapportent des valeurs thermodynamiques plus faibles et généralement constantes quelle que soit la force des acides ou des bases employés ($\Delta G^\circ_1 = -8\text{kJ/mol}$ et $\Delta H^\circ_1 = -28\text{kJ/mol}$ et ce, même si le système est accompagné d'un transfert de proton. En conclusion, nos résultats s'accordent fort bien avec plusieurs autres travaux faits sur des systèmes similaires et, par conséquent, ne paraissent pas inusités. Toutefois, ces différences entre les valeurs de Caldin et les nôtres peuvent sans doute être expliquées par le fait que les donneurs sont très différents: celui utilisé par Caldin est stériquement encombré par rapport à nos donneurs. De plus, notons que dans les travaux de ce dernier, il n'y a pas de corrélation entre ΔH°_1 et ΔH°_2 , ce qui signifie que le mécanisme de formation de la liaison hydrogène et du transfert de proton doit emprunter un chemin différent de celui de nos systèmes.

Les valeurs de nos enthalpies pour la formation de la liaison hydrogène augmentent considérablement en passant de l'acide le plus faible vers le plus fort. Une façon d'interpréter ces données est de faire appel à la théorie proposée par Rassidin et coll. (75) qui proposent que dans la liaison hydrogène B...H...A, lorsque la force de l'acide augmente, l'hydrogène a tendance à s'approcher de l'accepteur. Par exemple dans le cas du Pr, la liaison hydrogène du complexe moléculaire est bien fixée sur l'acide et son interaction avec la base est relativement faible. L'enthalpie d'une telle liaison est modeste (15 kJ/mol) et typique pour la formation d'une liaison hydrogène conventionnelle. Par contre avec TCA, le proton s'est considérablement éloigné de l'acide dans le complexe moléculaire comparativement à Pr pour se rapprocher de la base. Toujours selon cette théorie, ce genre de liaison hydrogène est de type central et admis comme étant très fort puisque l'interaction provient maintenant de deux parties désormais ioniques. Il permet à l'auteur d'expliquer ses valeurs d'enthalpie très élevées. La figure 8 permet de visualiser le raisonnement que nous proposons. Dans le cas d'un acide de force intermédiaire, nous aurions un cas où la longueur de la liaison est plus grande que Pr et moins grande que TCA. La longueur approximative de cette liaison hydrogène avec Pr serait 0,8 Å et pourrait augmenter jusqu'à 1,2 Å avec le TCA.

Avec Pr: $AH + B \rightleftharpoons A-H.....B \rightarrow$ liaison hydrogène faible.

Avec MCA: $AH + B \rightleftharpoons A--H....B \rightarrow$ liaison hydrogène moyenne.

Avec TCA: $AH + B \rightleftharpoons A---H....B \rightarrow$ liaison hydrogène forte.

Figure 8. Force de la liaison hydrogène selon la force de l'acide.

L'espèce moléculaire de type central où la force de la liaison hydrogène est élevée serait toutefois très difficile à caractériser par spectroscopie infrarouge et ce non pas à cause de la nature du complexe mais plutôt du fait que ce type de liaison favorise le transfert de proton (les valeurs de ΔH°_2 et ΔG°_2 sont plus élevées avec le système utilisant le TCA que Pr). Par exemple les proportions tirées des énergies libres standard du TCA montre une composition de seulement 8% d'espèce moléculaire et 92 % d'espèce protonée.

Transfert de proton (ΔH°_2 et ΔG°_2).

Les valeurs de ΔG°_2 reliées au transfert de proton tirées de l'étude de Merz et Zundel (58) à partir d'un système comparable au nôtre, diffèrent légèrement de nos valeurs (tableauau 8). A 22°C, les valeurs obtenues par ces auteurs sont -4 kJ/mol avec MCA et -7,3kJ/mol avec DCA. A 25°C, nous obtenons des valeurs un peu moins élevées soit -1,7 et -3,6 kJ/mol pour ces deux acides. Rappelons toutefois que notre système utilise une base moins conjuguée par rapport à celle de Merz et Zundel. La trans, trans 2,4 heptadiénylidène tert-butylamine étant un peu moins basique que

son analogue du rétinal, le degré de protonation peut être légèrement inférieur. Signalons que des études spectroscopiques par le groupe de Vocelle (34, 47, 56,) ont déjà mis en évidence ce phénomène par une légère augmentation du degré de protonation en passant d'une imine contenant deux doubles liaisons conjuguées à celle utilisant le rétinal.

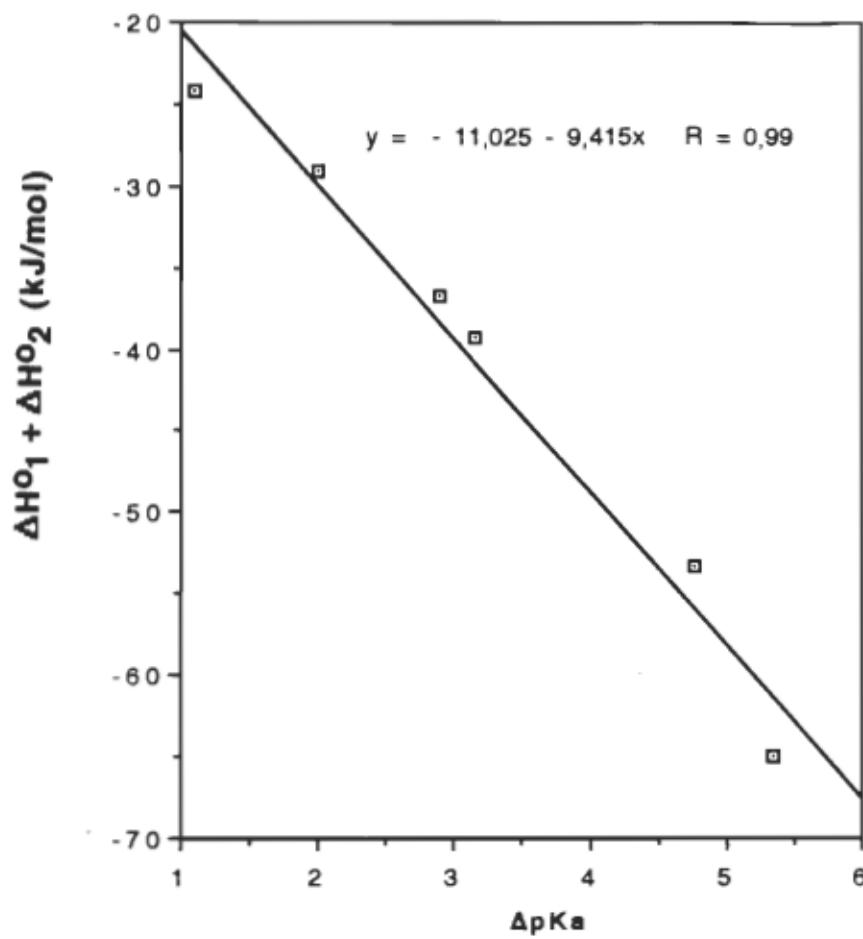
Auparavant, Caldin et coll. (67, 73) rapportaient des valeurs de ΔH°_2 et ΔG°_2 plus élevées que les nôtres. Par exemple, selon cette étude, une différence d'une unité de pK_a mesurée dans l'eau entre les bases pour un donneur dérivé du phénol entraîne une variation énorme du ΔG°_2 comparativement à nos résultats (25 vs 2-3 kJ/mol pour notre étude). Les raisons de cette différence ont déjà été discutées précédemment et reposent selon nous, sur l'encombrement stérique des donneurs utilisés. Les valeurs des enthalpies de formation des espèces protonées semblent moins varier d'un acide faible à un acide fort (-8 à -12 kJ/mol) par rapport à l'enthalpie de formation de la liaison hydrogène (-15 à -50 kJ/mol). Ceci s'explique par le fait que le processus de formation de la liaison hydrogène implique des changements plus importants selon le raisonnement proposé à la figure 8 par rapport à la formation de l'espèce protonnée. A ce stade-ci, il est toutefois difficile d'expliquer le processus impliquant les valeurs des enthalpies de protonation pour le passage de -8 kJ/mol pour l'acide faible jusqu'à -12 kJ/mol pour l'acide fort. En effet, deux facteurs doivent jouer: la stabilité thermodynamique de l'espèce protonée et la nature du complexe moléculaire. Tous ce que nous savons actuellement, c'est qu'il existe une relation énergétique entre eux pour expliquer la linéarité obtenue pour ces valeurs avec le pK_a .

Les valeurs entropiques ΔS°_1 et ΔS°_2 sont présentées au tableau 10. Très peu d'études ont été rapportées sur les entropies pour des systèmes similaires aux nôtres. Il n'est donc pas possible de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Néanmoins, il faut noter que la formation d'une liaison hydrogène implique toujours une entropie négative, ce qui est normal puisque l'association tend à mieux ordonner le système. Notons également que les entropies ΔS°_1 vont dans le même sens que les enthalpies ΔH°_1 , à savoir des valeurs d'entropie de -8 J/mole.K à -72 J/mole.K pour Pr à TCA par rapport aux valeurs des enthalpies de -15 à -50 kJ/mol pour les mêmes acides. Le phénomène inverse est toutefois observé avec ΔS°_2 et ΔH°_2 . Rappelons tout d'abord que ces valeurs d'entropies sont très faibles et qu'il n'est pas facile de pouvoir toujours les relier à un phénomène précis. Dans le cas des valeurs de ΔS°_1 , ceux-ci peuvent s'expliquer par le fait qu'un système de plus en plus stable thermodynamiquement selon le comportement des valeurs d'enthalpies aura tendance à mieux s'ordonner. Pour ΔS°_2 , ce raisonnement ne peut s'appliquer car les valeurs des enthalpies et des entropies vont dans le sens opposé selon la force de l'acide. Dans ce cas, il est possible que l'encombrement du contre-ion carboxylate joue un rôle important. Par exemple, le TCA avec ses trois atomes de chlores encombrerait suffisamment le système de façon à le rendre moins ordonné que son vis-à-vis utilisant l'acide Pr.

Comparaison des valeurs obtenues avec ceux des pigments

Le pK_a de 13 de la base de Schiff de la bR:

Il est possible de montrer que le pK_a de la base de Schiff protonée de notre modèle a une valeur de près de 6 d'après une étude menée par Schaffer et coll. (45) sur les pK_a des bases de Schiff conjuguées. En terme de différence de pK_a entre l'acide et la base, nous avons, par exemple, avec le TCA une différence de 5,34 unités, soit la différence entre la valeur du pK_a de l'imine estimée à 6 moins le pK_a de l'acide TCA à 0,66. Ce gradient de pK_a est en relation linéaire avec l'enthalpie du processus total de protonation ($\Delta H^\circ_1 + \Delta H^\circ_2$) pour nos systèmes étudiés tel que montré au graphique 16. D'autre part, il est possible d'établir un tel gradient avec la bR et d'extrapoler la valeur énergétique obtenue sur le graphique 16. Selon Sheves et coll. (50), le pK_a serait de 13 pour la base de Schiff de la bR et une valeur de 4 est anticipée pour l'acide responsable de la protonation. En effet, Engelhard et coll. (51) ont déjà montré que l'acide aspartique ou glutamique participait au processus de protonation de la bR. Egalement, ces auteurs ont signalé que l'acide ASP 96 serait responsable de la reprotonation de la bR. De plus, l'étude de Braiman et coll. (76) signale qu'une petite variation du pK_a des acides aspartiques est observée à l'intérieur de la bR. A partir de ces considérations, la différence de pK_a serait de $13 - 4 = 9$. Ce gradient de 9 peut être extrapolé sur notre graphique et ceci conduit à une valeur de -110 à -120 kJ/mol. Cette valeur nous amène à se questionner sur la signification réelle du pK_a élevé obtenue dans le pigment bactérien. En effet, d'après l'hypothèse d'un gradient élevé de pK_a qui entretiendrait la protonation du pigment bactérien, une valeur d'enthalpie de 110 à



Graphique 16 : Diagramme reliant l'enthalpie $\Delta H^{\circ}_1 + \Delta H^{\circ}_2$ au gradient de pK_a .

120 kJ/mole serait nécessaire pour déprotoner la bR. Puisque 110 Kj/mole est à peu près ce que le pigment stocke comme énergie, il serait surprenant que toute cette énergie serve en totalité au seul fin du processus de déprotonation.

L'entropie nulle dans les pigments:

Par ailleurs, en considérant un pK_a au voisinage de 7 pour la base de Schiff du pigment au lieu de 13, un de nos résultats est fort intéressant. Il s'agit de la valeur de l'enthalpie reliée au transfert de proton (ΔH°_2) pour le système utilisant l'acide propanoïque. Rappelons qu'une valeur d'enthalpie de -8 kJ/mol avait été obtenue. En considérant que le facteur entropique ($T\Delta S$) est nul ou négligeable dans une protéine comme la bR, alors: $\Delta H = -8\text{kJ/mol} = \Delta G = -RT\ln K_2$. A 25 °C, la valeur de K_2 serait de 25 et la protonation serait près de 100% et ainsi clairement expliquée.

L'entropie non nulle dans les pigments:

Néanmoins, cette vision qui suggère que l'entropie de protonation serait nulle dans la protéine apparaît sans doute imprudente. Certes, les entropies de conformation à l'intérieur d'une cage protéique pourraient être faibles; mais quel type d'entropie existe t-il au niveau de la liaison C=N et de son voisinage immédiat dans une cage protéique? Signalons un exemple révélateur: lorsque la bR₅₇₀ est mise en présence d'un mélange d'éthylène glycol et de triton X-100 à 25°C, celle-ci tourne au rouge et absorbe à 480 nm vers -40 °C (77). Advenant le cas où cette bR₄₈₀ serait déprotonée (ce qui est possible puisque la différence en terme de longueurs d'onde est du même ordre de grandeur qu'entre les modèles non

protonés et protonés) alors l'entropie de réaction lors de cette transition ne peut sûrement pas être nulle!

Le fait qu'aucun changement notable sur l'état de protonation soit observé avec la température en spectroscopie de résonance Raman dans les pigments visuels et bactériens pourrait s'expliquer par un autre mécanisme. En effet, la présence de molécules d'eau autour du chromophore tel que nous le proposerons au chapitre suivant peut possiblement induire une protonation totale à 25°C. Dès lors, il en est attendu de même à une température de -200°C puisqu'il fut montré par le groupe de Vocelle et coll. (59,60) que l'abaissement de la température ne peut qu'augmenter le degré de protonation.

Conclusion:

La présente étude a permis de calculer pour une base de Schiff offrant beaucoup de similitude avec la structure du chromophore de la Rh et bR, les paramètres physico-chimiques importants tels que ΔH , ΔG et ΔS . De plus, il a été démontré que les systèmes imine: acide carboxylique répondaient à un équilibre plus complexe que celui indiqué à l'équation 3 et que c'est plutôt l'équation 4 qui fait appel à deux équilibres qui est la plus pertinente aux concentrations utilisées.

Finalement, les valeurs thermodynamiques trouvées ici pourraient très bien expliquer le comportement de la bactériorhodopsine vis-à-vis un donneur de protons si le chromophore du pigment a un pK_a de 7 plutôt que 13.

Chapitre 2

Etude de l'action que l'eau pourrait jouer dans les pigments photosensibles naturels.

L'introduction à cette thèse a déjà fait ressortir l'importance que l'eau pourrait avoir sur le mécanisme moléculaire des pigments visuels et bactériens. Rappelons que la présence ou l'absence de molécules d'eau dans la protéine pourrait modifier de façon considérable la structure membranaire de la protéine. Le photocycle et l'état de protonation de la base de Schiff du chromophore sont affectés tel que le démontrent les études de Hildebrandt et Stockburger (30) et Rafferty et Shichi (27). Le passage de l'intermédiaire Méta 1 à Méta 2 dans le cycle de la rhodopsine est aussi affecté par le taux d'hydratation (28). Cette étape est d'intérêt médical puisque le taux de conversion est relié à certaines composantes de l'électrorétinogramme. Si les changements apportés par l'eau aux pigments sont assez bien connus, la nature des interactions de cette eau sur les bases de Schiff du chromophore le sont beaucoup moins. Dans les expériences de Rafferty et Shichi ainsi que Hildebrandt et Stockburger, l'élimination de molécules d'eau de leurs échantillons de membrane avait eu pour conséquence de déprotonner la base de Schiff. L'eau semble donc participer directement au mécanisme de protonation mais son rôle précis n'a cependant pas été élucidé. Certaines hypothèses avancées par Deng et Callender (25) suggèrent que les molécules d'eau puissent être situées entre le contre-ion et la base de Schiff protonnée où elles pourraient agir d'intermédiaires via une liaison hydrogène avec un résidu dipolaire de la protéine afin d'expliquer la fréquence d'étirement $\nu_{C=N+}$ relativement élevée dans la rhodopsine. Des études par RMN ^{15}N de Harbison et coll. (79) semblent montrer la proximité de molécules d'eau près du

chromophore et celles-ci pourraient s'échanger avec le proton situé sur l'imine ainsi protonée du chromophore de la bR. Finalement, l'étude de Dencher et Buldt (32), par diffraction neutronique, a permis de montrer la présence de quatre molécules d'eau près du chromophore de la bR.

Dans le premier chapitre, nous avons mesuré les paramètres physico-chimiques existant dans l'association d'une imine avec un acide faible dans un solvant peu polaire. Nos résultats indiquent une protonation incomplète de l'imine lorsque le pK_a de l'acide est de l'ordre de ceux des acides aminés de la protéine. De plus, des études similaires de notre groupe de recherche (43, 44, 52), qui cette fois-ci utilisaient un solvant polaire et protique tel le méthanol, avaient montré que le degré de protonation augmente mais demeure encore incomplet avec de tels acides. Un article fort intéressant de Lindemann et Zundel (80) en spectroscopie infrarouge relève que dans un système pyridine - acide acétique - eau, il existe des changements importants du degré de protonation de la base quand la composition du système est modifiée. Ainsi, l'ajout de quelques équivalents d'eau permettrait à l'acide de transférer complètement son proton vers la pyridine. A la lumière de ces résultats, il est possible d'envisager que l'eau puisse induire des changements beaucoup plus importants sur le degré de protonation que par exemple le méthanol. C'est ainsi que dans ce chapitre, nous avons voulu adapter l'expérience de Lindemann et Zundel en utilisant un système où la base de Schiff du rétinal serait utilisée au lieu de la pyridine. Ce système offre l'avantage d'étudier les bandes d'elongation $\nu_{C=N}$ et $\nu_{C=N^+}$, fréquences qui sont à la base des nombreux travaux sur les pigments visuels.

Méthodologie

La toute-trans-rétynylidène n-butylamine (NRBA) fut préparée selon le protocole expérimental de Shriver et coll. (81) et la technique de séchage de l'acide acétique est la même que pour l'acide propanoïque déjà décrite au chapitre 1. Il y a deux problèmes importants qui sont liés à l'utilisation d'une imine comparativement, par exemple, à l'utilisation de la pyridine. Le premier est l'hydrolyse partielle de l'imine en aldéhyde lors de l'ajout d'eau dans le système. Le second provient du manque d'homogénéité du système car deux phases sont souvent présentes. Nous avons développé un protocole expérimental de façon à contourner ces deux problèmes. Dans un premier temps, l'imine et l'acide sont ajoutés en des proportions équimolaires (ou en rapport 1:2 selon le cas) et dissous dans un mélange méthanol-eau où la quantité d'eau est soigneusement ajustée. Puis le méthanol est évaporé par un léger courant d'azote jusqu'à l'apparition d'un solide car l'eau et le méthanol ne forme pas d'azéotrope et seul le méthanol est totalement évaporé. Ceci est vérifié en IR par l'absence de la bande caractéristique du méthanol à 1500 cm^{-1} . Par la pesée du solide obtenu, on peut également s'assurer que la totalité de l'eau incorporée est encore présente. Cette procédure a pour but de répartir uniformément l'eau sur le système imine-acide. Finalement, le solide est mélangé avec du KBr pour en faire une pastille comprimée. Les spectres sont rapidement enregistrés en FTIR ce qui permet, grâce à un balayage de l'ordre de quelques secondes, de minimiser le plus possible l'hydrolyse de l'imine. Le spectrophotomètre utilisé ici est le modèle Digilab FTS-50 de la compagnie BioRad avec une résolution de 2 cm^{-1} . Un courant d'azote est utilisé dans le compartiment à échantillon afin de le garder sec et sans CO_2 .

La spectroscopie infrarouge a beaucoup évoluée suite à l'apparition de la FTIR. Un des nombreux avantages qu'offre cette technique est la possibilité de retrancher une quantité désirée d'un ou plusieurs constituants en autant évidemment que ces constituants n'interagissent pas avec le produit désiré. Par exemple, une simple interaction déplaçant la fréquence du produit principal de 2 cm^{-1} entraînera l'apparition de bandes négatives dans le spectre et empêchera une soustraction adéquate. Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode de soustraction de la façon suivante. Les constituants résiduels provenant de l'hydrolyse de la fonction imine sont: le tout- trans-rétinal et l'acétate de n-butylammonium et ces composés ne devraient pas causer d'interaction avec l'imine étudiée. Ils peuvent donc par conséquent être soustraits et pour ce faire la technique suivante a été suivie. Les pastilles solides au KBr du tout-trans-rétinal et l'acétate de n-butylammonium sont préparées, puis les spectres sont pris et gardés en mémoire dans l'appareil. Lorsque le système soumis à l'étude (imine-acide-eau), est soustrait des composantes du tout-trans-rétinal, un léger épaulement à 1654 cm^{-1} (dû à $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ du rétinal) et une bande à 1335 cm^{-1} (attribué à $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ du rétinal) disparaissent du spectre original. Le spectre résultant est par la suite une deuxième fois soustrait afin de retrancher la contribution due à l'acétate de n-butylammonium. La bande caractéristique de l'étirement $\nu_{\text{sym. N}^+-\text{H}}$ à 1495 cm^{-1} due au butylammonium disparaît du spectre principal de même qu'un épaulement vers 1600 cm^{-1} assigné à $\nu_{\text{as. N}^+-\text{H}}$. Essentiellement, le pourcentage des quantités soustraites se situait entre 10 et 30 % (les pourcentages élevés étant obtenus avec les échantillons à forte teneur en eau). Finalement, une dernière soustraction des composantes dues au KBr a conduit à l'obtention des spectres finaux qui représentent ainsi le système imine - acide - eau.

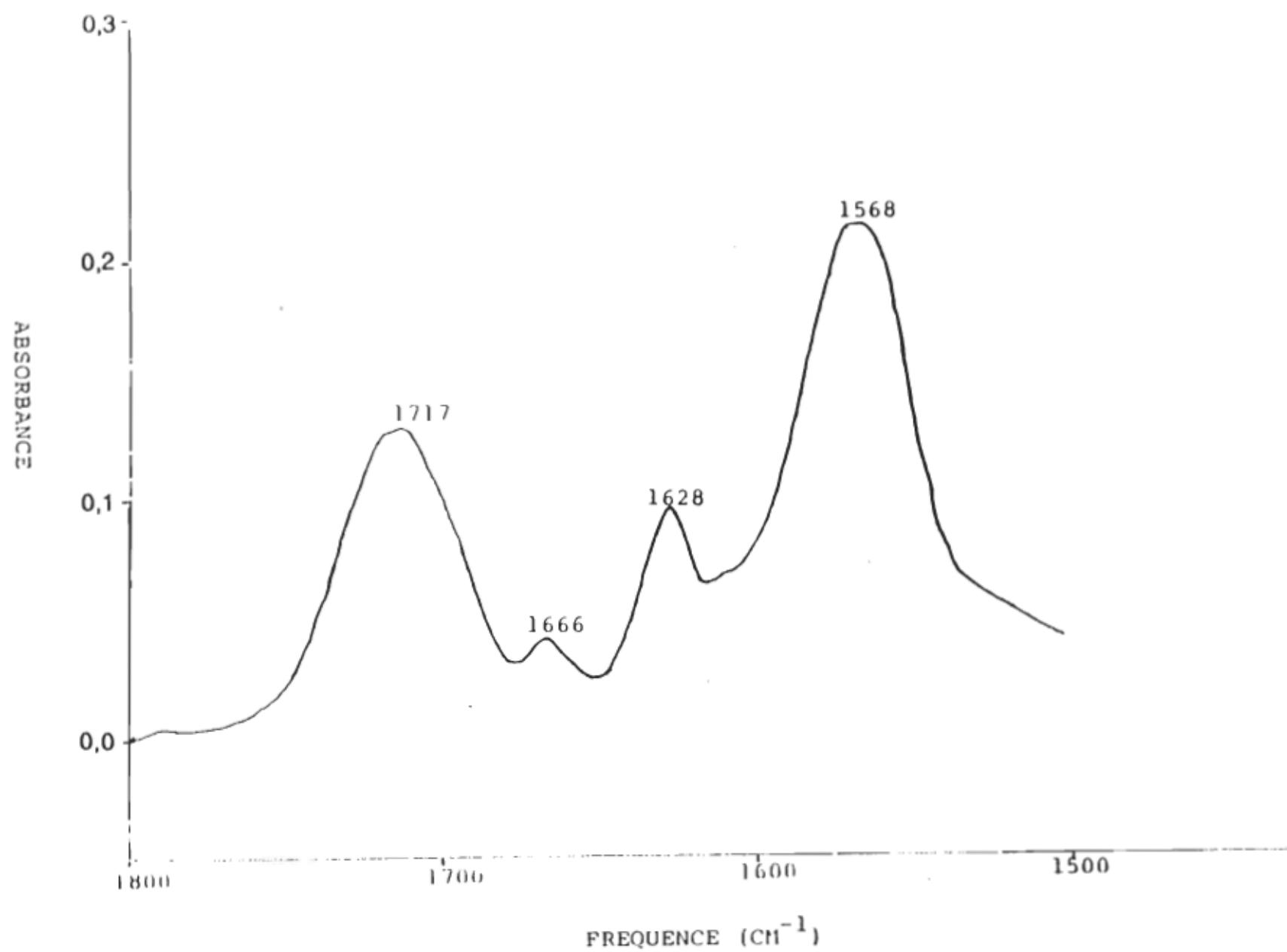


Figure 9: Spectre FTIR de NRBA/Acide acétique.
(spectre enregistré dans le KBr)

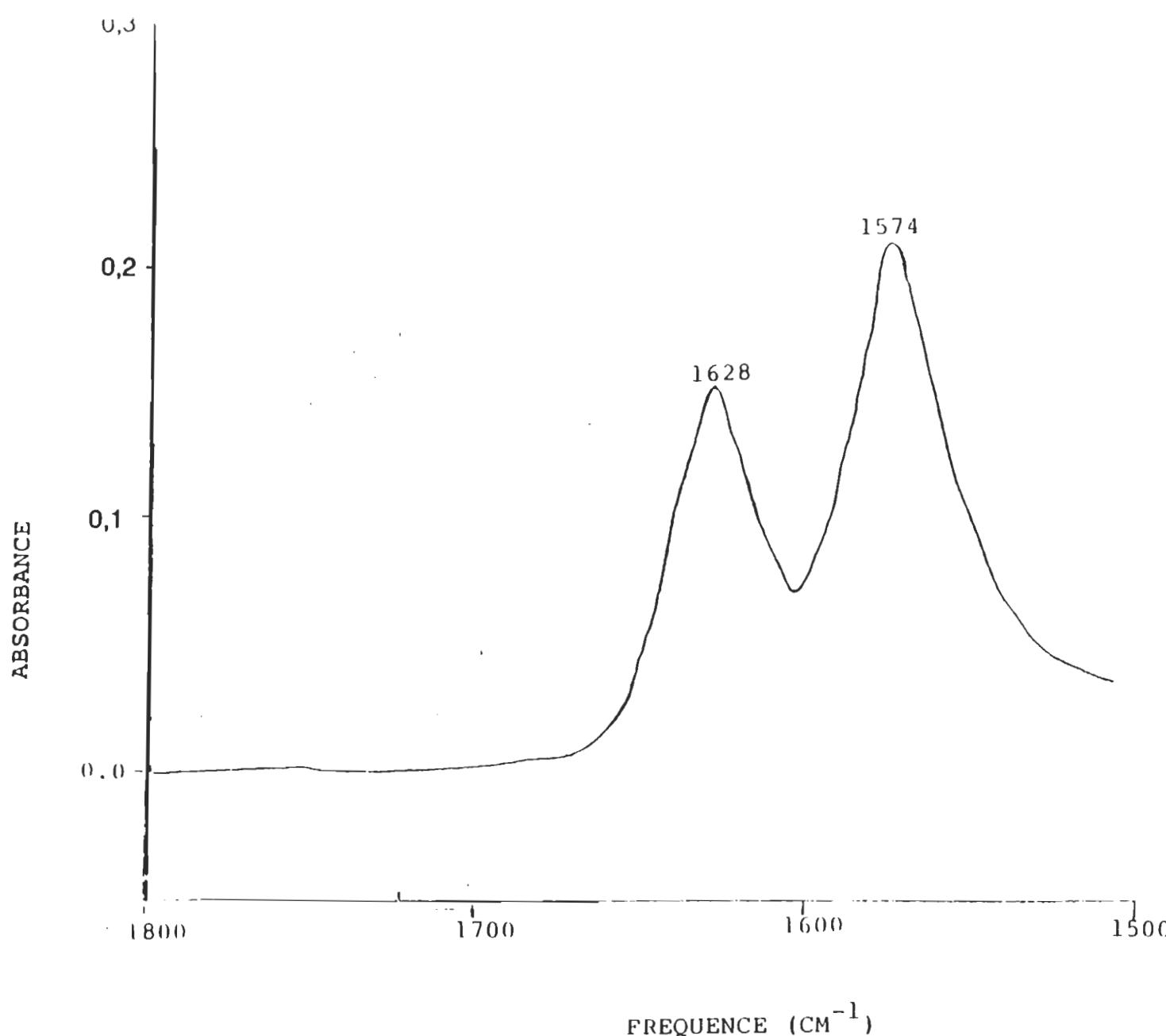


Figure 10: Spectre FTIR de NRBA
(spectre enregistré dans le KBr)

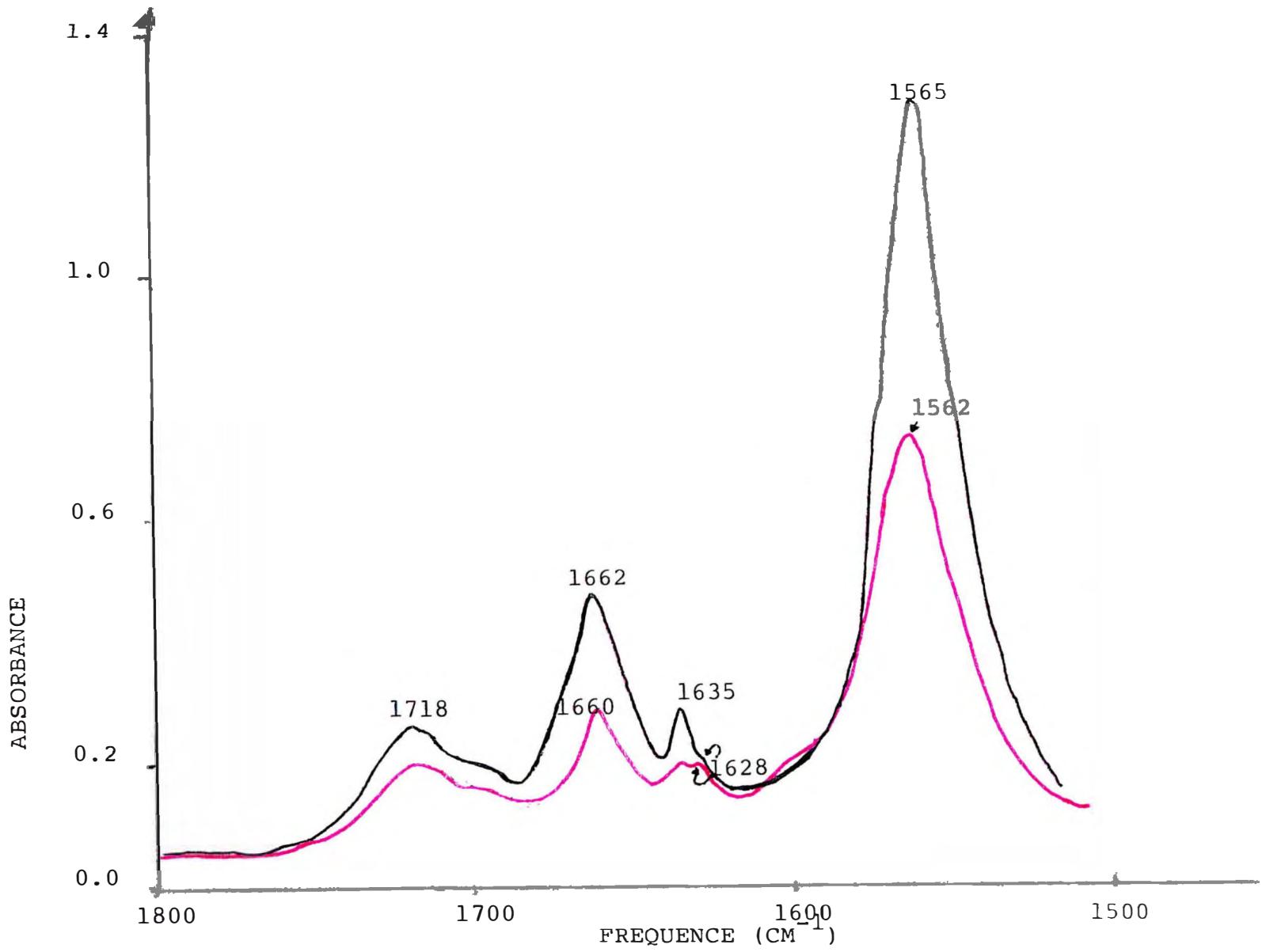


Figure 11: a) Spectre FTIR de NRBA/Acide acétique/1 H₂O (rouge).
 b) Spectre FTIR de NRBA/Acide acétique/2 H₂O (noir).
 (spectres enregistrés dans le KBr)

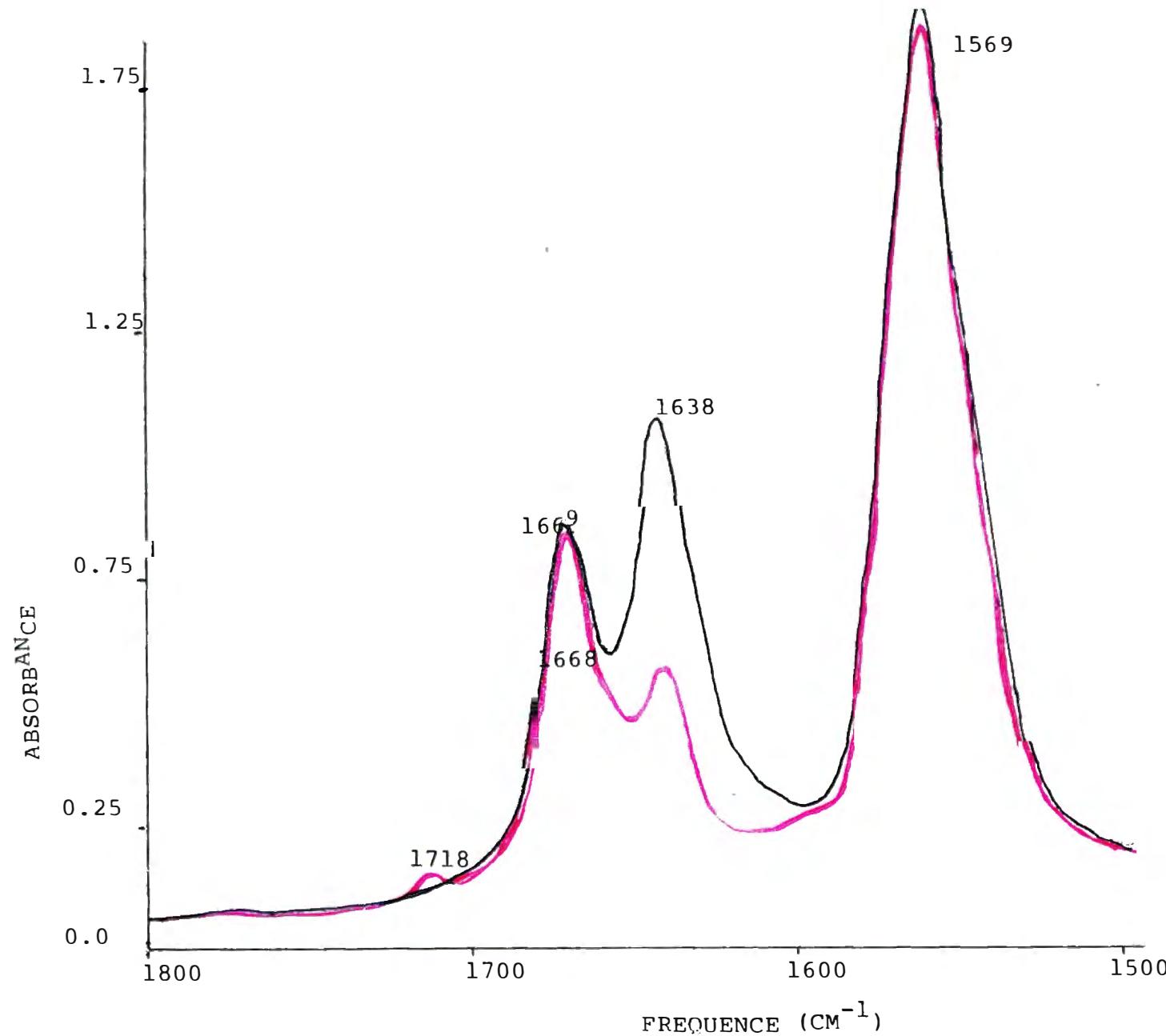


Figure 12: a) Spectre FTIR de NRBA/Acide acétique/4 H₂O (rouge).
b) Spectre FTIR de NRBA/Acide acétique/10H₂O (noir).
(spectres enregistrés dans le KBr)

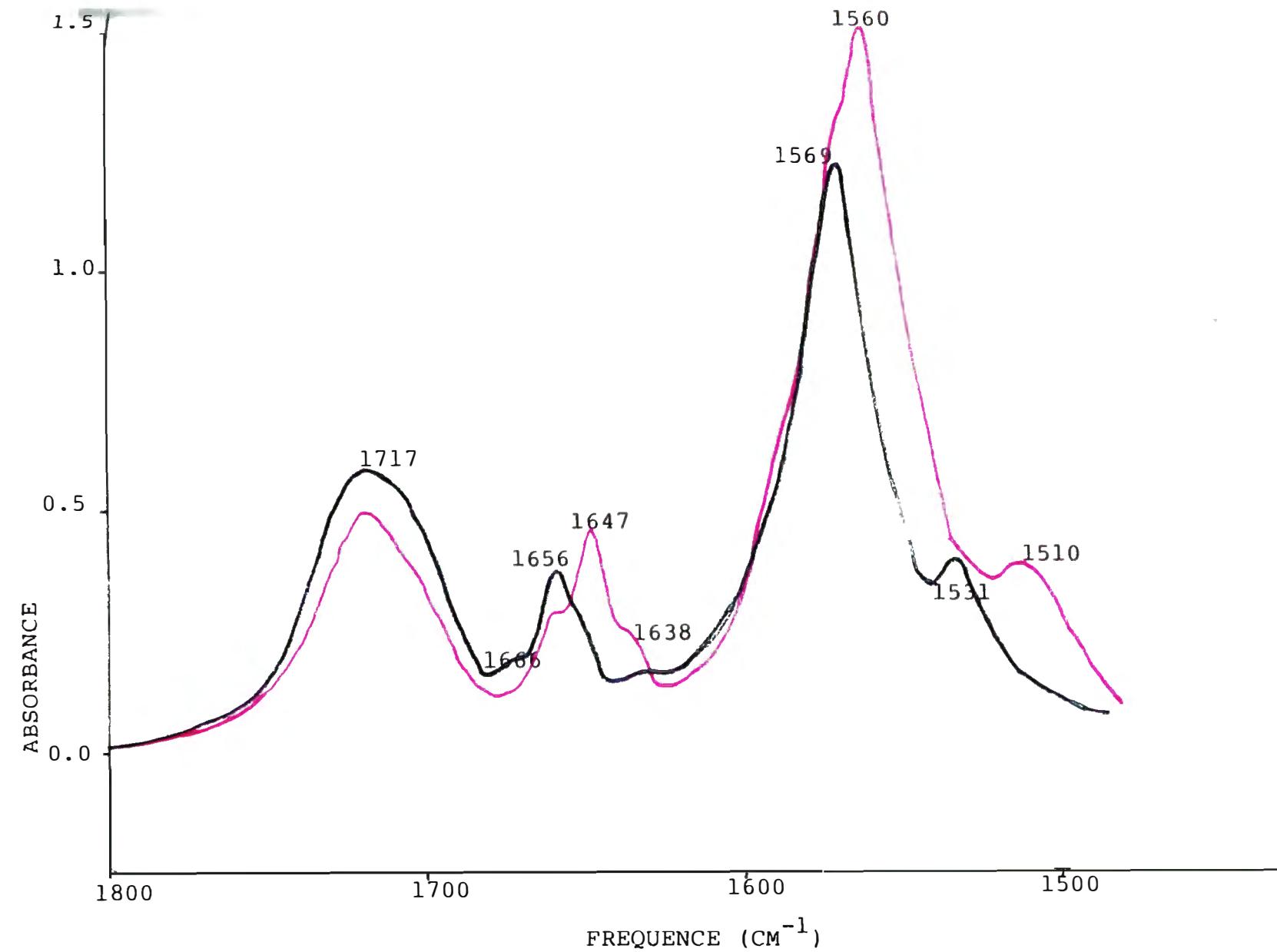


Figure 13: a) Spectre FTIR de NRBA/2Acide acétique (vert).
b) Spectre FTIR de NRBA/2Acide acétique/1H₂O (rouge).
(spectres enregistrés dans le KBr)

Résultats et discussions

L'ensemble des spectres est présenté aux figures 9 à 13 pour la région entre 1500 et 1800 cm⁻¹. C'est à l'intérieur de cette zone que l'on retrouve les principales informations comme les bandes d'étirements $\nu_{C=C}$, $\nu_{C=C^+}$, $\nu_{C=N}$ et $\nu_{C=N^+}$ de la base de Schiff qui ont fait l'objet de nombreuses études aussi bien par résonance Raman que par FTIR, permettant ainsi de caractériser l'état de protonation du chromophore des pigments visuels et bactériens.

Les spectres présentés sont toutefois assez complexes. Nous savons d'après les travaux de Lussier et coll. (55) qui ont étudié dans le chloroforme le système de la toute-trans-rétilnylidène tert-butylamine (NRtBA) avec l'acide propanoïque (un acide de pK_a similaire à l'acide acétique) que le degré de protonation serait de 15 à 25%. Cette information nous est très utile pour bien comprendre nos spectres. en se fiant à l'intensité de la vibration d'étirement $\nu_{C=C^+}$ par rapport aux autres bandes. Notons que la façon de décrire la vibration d'étirement $\nu_{C=C^+}$ n'est pas tout à fait précise car il s'agit de plusieurs modes rapprochés de vibration d'étirement C=C protonées et délocalisées le long du polyène. Il s'agit d'une simplification généralement adoptée par les scientifiques travaillant dans ce domaine. Egalement, des bandes dues à l'acide et à son carboxylate ainsi qu'une bande de torsion de l'eau viendront s'ajouter aux autres bandes de l'imine protonée et non protonée.

Etude du système NRBA-acide acétique 1:1.

Le spectre du système NRBA-acide acétique en proportion équimolaire est présenté à la figure 9. Remarquons en premier lieu une bande étendue due à

l'élongation du carbonyle de l'acide à 1717 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$). Pour le même système, mais dans le CCl_4 , Merz et Zundel (58) avaient montré la présence de deux espèces à l'intérieur de cette bande; l'une appartenant à l'acide du complexe moléculaire et l'autre à l'acide non associé. Puisque leur existence a déjà été montrée au chapitre 1, la même conclusion peut être tirée. D'autre part, la bande à 1666 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'étirement $\nu_{\text{C=N}+}$. La valeur de cette fréquence demande quelques explications. Deng et Callender (25) ont trouvé des valeurs de 1653 et 1656 cm^{-1} pour cette bande pour un système NRBA/HCl dans le dichlorométhane et le méthanol respectivement. Par contre, Lussier et coll. (55), pour un système utilisant le groupe tert-butyle plutôt que le groupe n-butyle comme dérivé du rétinal avaient trouvé des valeurs de 1646 cm^{-1} pour le système NRtertBA/HCl et 1657 cm^{-1} pour NRtertBA/Pr soit une différence de 11 cm^{-1} . Si une correction de 11 cm^{-1} est apportée à la valeur obtenue par Deng et Callender afin de tenir compte de l'utilisation d'un acide carboxylique plutôt que HCl, des valeurs de 1664 cm^{-1} ($1653+11$) et de 1667 cm^{-1} ($1656+11$) sont obtenues. Ces deux valeurs se rapprochent beaucoup de la nôtre (1666 cm^{-1}) obtenue dans le KBr. Rappelons également que Lindemann et Zundel (80) ont obtenu 1665 cm^{-1} pour cette vibration avec le système NRBA/acide acétique dans le CCl_4 . Par ailleurs, la bande à 1628 cm^{-1} est attribuée sans équivoque à la vibration d'étirement $\nu_{\text{C=N}}$ puisque le spectre de NRBA présenté à la figure 10 montre justement cette bande à 1628 cm^{-1} et une autre à 1574 cm^{-1} pour la vibration d'étirement $\nu_{\text{C=C}}$ pour la base de Schiff non protonée. Le spectre de la figure 9 montre finalement une très large bande centrée à 1568 cm^{-1} formée vraisemblablement de trois vibrations qui étant rapprochées les unes des autres ne sont pas résolues. Ces trois vibrations devraient inclure en principe une vibration d'étirement $\nu_{\text{C=C}}$ vers 1574 cm^{-1} tel que montré par le spectre

de la NRBA reproduit à la figure 10, un étirement $\nu_{C=C^+}$ qui d'après Deng et Callender (25) qui ont étudié le système NRBA/HCl dans le dichlorométhane devrait absorber vers 1565 cm^{-1} et une autre vibration vers 1575 cm^{-1} correspondant à la ν_{asCOO^-} de l'acide qui devrait selon une étude de Lindemann et Zundel (80) absorber à cette fréquence. Notons finalement un très faible épaulement vers 1605 cm^{-1} dû à une autre vibration $\nu_{C=C}$ tel qu'expliqué par les travaux en résonance Raman de Deng et Callender (25). On peut également comparer les intensités relatives des bandes COOH, C=N et C=C avec les intensités trouvées par Lussier et coll. (55) qui utilisent un système analogue (NRtBA-Pr) dans le chloroforme. Les rapports d'intensité apparaissent voisins ce qui indiquent un degré de protonation similaire.

Etude du système NRBA-acide acétique 1:1 avec addition d'eau

Les spectres FTIR du système NRBA - acide acétique avec un et deux équivalents d'eau sont présentés à la figure 11 et ont été traités selon ce qui a été décrit en méthodologie. Dans un premier temps, notons que toutes les intensités des bandes augmentent avec l'addition d'eau. Il faudra donc tenir compte des intensités relatives des bandes l'une par rapport aux autres. Dans un second temps, la vibration d'étirement $\nu_{C=O}$ de l'acide vers 1718 cm^{-1} a une intensité relative qui a diminué considérablement par rapport aux fréquences $\nu_{C=N^+}$ et $\nu_{C=C^+}$ avec l'ajout d'eau comparativement avec le système sans eau (fig. 9). Une évaluation sommaire sur les intensités relatives semble indiquer qu'à ce stade, il reste tout au plus 10-15 % d'espèce non protonée dans ces systèmes. La vibration d'étirement $\nu_{C=N}$ a

complètement disparu au profit de la vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ avec l'ajout de un et deux équivalents d'eau. Notons que la vibration $\nu_{C=N}$ est encore en principe présente dans le système mais étant donné qu'au départ cette bande est déjà peu intense, elle se perd dans le bruit de fond des autres bandes. Les vibrations $\nu_{C=N^+}$ sont déplacées à 1660 et 1662 cm^{-1} respectivement avec un et deux équivalents d'eau par rapport à celle de 1665 cm^{-1} qui utilisait le système sans eau. D'autre part, les bandes à 1562 et 1565 cm^{-1} respectivement avec un et deux équivalents d'eau sont observées. L'attribution est la même que celle montrée dans le spectre de la figure 9 précédemment avec essentiellement trois fréquences ($\nu_{C=C}$, $\nu_{C=C^+}$, et ν_{COO^-}) contenues dans cette enveloppe. Notons toutefois l'intensification importante de la bande $\nu_{C=C^+}$ par rapport aux autres bandes. Ceci est un signe évident de l'augmentation de la protonation de la base de Schiff car il est bien connu par les travaux de Lussier et coll. (55) que la vibration $\nu_{C=C^+}$ est très intense. Le léger déplacement vers les basses fréquences suite à l'addition d'eau peut être en partie expliqué par la contribution de plus en plus importante de la vibration d'étirement $\nu_{C=C^+}$ généralement à plus basse fréquence que son analogue non protoné. Toutes ces observations vont dans le sens d'une protonation accrue du système avec l'addition d'un seul ou deux équivalents d'eau. Finalement, une nouvelle bande apparaît vers 1635 cm^{-1} : il doit s'agir de la vibration de torsion de l'eau. Il est admis que cette bande peut se situer entre 1590 et 1650 cm^{-1} (82). Les travaux de Hildebrandt et Stockburger en Raman de résonance (30) ont montré que la fréquence de torsion de l'eau pourrait se situer vers 1630 cm^{-1} car elle perturbe la fréquence $\nu_{C=N^+}$ du pigment bactérien. De plus, puisque son intensité augmente avec l'addition supplémentaire d'eau, cela ne fait que renforcer la validité de son attribution.

Les spectres du système NRBA - acide acétique avec quatre et dix équivalents d'eau sont présentés à la figure 12. On note que la vibration d'étirement $\nu_{C=O}$ est presque disparue (seule une bande d'intensité très faible est observée avec quatre équivalents d'eau). Les fréquences $\nu_{C=N^+}$ sont maintenant à 1668 et 1669 cm^{-1} respectivement avec quatre et dix équivalents d'eau, soit 8 à 9 cm^{-1} de plus que pour un seul équivalent d'eau. La bande de torsion de l'eau est située à 1638 cm^{-1} et augmente d'intensité avec l'addition graduelle d'eau. La bande à 1569 cm^{-1} montre la vibration d'étirement $\nu_{C=C^+}$ et à l'intérieur de cette enveloppe on peut supposer la présence de la vibration $\nu_{as. coo^-}$ qui est masquée. Ceci est confirmé par la présence d'une bande additionnelle à 1403 cm^{-1} qui augmente également d'intensité avec l'addition d'eau dans nos spectres et qui correspond à la vibration d'étirement $\nu_{as. coo^-}$ qui d'après les travaux de Lindemann et Zundel (80) se situe entre 1400 et 1410 cm^{-1} (voir les spectres entre 1500-1200 cm^{-1} présentés en annexe). Toute ces indications semblent donc aller dans le sens d'une protonation complète de ces systèmes.

L'ensemble de ces résultats nous permet d'établir que l'addition d'un ou deux équivalents d'eau à notre système augmente considérablement la protonation (estimé à environ 80-90% d'espèce protonée). L'addition supplémentaire de quatre et dix équivalents d'eau amène une protonation complète. Ces résultats se comparent avantageusement avec l'étude de Lindemann et Zundel (80) qui avaient montré une protonation totale de leur système lorsque quatre équivalents d'eau étaient ajoutés.

D'autre part, un autre résultat intéressant obtenu par notre étude est le déplacement inédit de la fréquence $\nu_{C=N^+}$. Rappelons les faits: avec 0 équivalent d'eau, $\nu_{C=N^+}$ est à 1666 cm^{-1} , avec 1 équivalent d'eau, la bande est à 1660 cm^{-1} , avec 2 équivalents d'eau, à 1662 cm^{-1} , avec 4 équivalents d'eau, à 1668 cm^{-1} , avec 10 équivalents d'eau, à 1669 cm^{-1} . Voici l'hypothèse que nous proposons pour expliquer ces résultats suite à des travaux de Baasov et coll. (83) sur des systèmes qui peuvent se comparer aux nôtres. Ces auteurs ont étudié la fréquence $\nu_{C=N^+}$ de la NRBA avec un très grand excès d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane ainsi que le système NRBA/HCl dans certains fluoroalcools. Finalement, ces résultats sont comparés avec ceux utilisant la NRBA/HCl dans le méthanol. Leurs travaux ont permis de mettre en évidence deux effets importants sur la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ de la NRBA. Le premier est l'abaissement d'une douzaine de cm^{-1} de la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ avec la présence d'un grand excès d'acide trifluoroacétique. Ce résultat est expliqué en terme d'homoconjugaison. Ce phénomène tend à délocaliser la charge négative du carboxylate suite à l'enchaînement de deux ou plusieurs acides jumelés à la base de Schiff. Initialement, si nous complexons un acide carboxylique avec la base de Schiff, la paire d'ions résultante est fortement liée car la charge négative est répartie sur un seul acide. En ajoutant un autre acide, la force de la paire d'ions est affaiblie car la charge négative est maintenant distribuée sur deux acides et ainsi suite. Il en résulte que la liaison ionique entre l'anion et le cation sera affaiblie à cause de cette dispersion de la charge négative vis-à-vis celle de la charge positive contenue sur l'azote. L'affaiblissement de ce lien aura comme conséquence d'affaiblir le lien N^+-H à cause du manque de cohésion entre les charges. Il en résulte un affaiblissement des interactions entre la vibration de torsion N^+-H et la fréquence de vibration

d'étirement $\nu_{C=N^+}$. Le couplage entre ces deux fréquences en sera affaiblie avec pour conséquence une diminution de la valeur de la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ la rapprochant de sa valeur "pure", c'est à dire sans protonation. Le lecteur intéressé par une explication plus détaillée de ce type de couplage pourra au besoin consulter l'article de Sandorfy et Vocelle (12). Le second effet rapporté souligne qu'un lien N^+H peut être renforcée par la capacité qu'auraient certaines molécules à former des liaisons hydrogène fortes au voisinage du lien N^+H . Le méthanol, par exemple, solvate très bien le cation de la base de Schiff protonée. Il en résulte que le lien N^+H formera des liaisons hydrogènes fortes avec ceux du groupement alcool. L'eau pourrait en faire de même à cause de ses propriétés similaires en terme de formation de liaisons hydrogènes fortes. Le couplage qui résultera entre la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ et la bande de torsion N^+H aura plutôt comme conséquence d'augmenter la valeur de la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$. A titre d'exemple, ces auteurs comparent la valeur de la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ du système NRBA/HCl dans le méthanol et dans un fluoroalcool. Ces deux solvants ont des comportements opposés. Le premier forme avec son groupement protique des liaisons hydrogène fortes au voisinage du lien N^+H en parvenant à solvater le cation. Le second, à cause de ses atomes de fluor est incapable d'en faire autant et il aura plutôt tendance à se comporter comme le système qui utilise l'acide acétique en grand excès que nous avons décrit précédemment. Dans les faits, cela se traduit par une valeur de la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ de seulement $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ avec les fluoroalcools et 1656 cm^{-1} avec le méthanol. Ces explications que nous avons décrites peuvent être mises à profit pour expliquer le comportement de nos

fréquences de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$. Au départ, le système sans eau n'a pas cette contribution de liaisons hydrogène fortes avec l'extérieur mais sa fréquence reste relativement élevée (1666 cm^{-1}) car le cation et l'anion sont fortement liés ce qui renforce le lien $N^+ \text{-H}$. Par la suite, un équivalent d'eau est ajouté à notre système et la fréquence diminue à 1660. Certes, en principe l'eau devrait se comporter comme le méthanol de l'exemple précédent, soit former de fortes liaisons hydrogène (sinon mieux!), sauf que dans ce cas, l'eau semble plutôt se lier préférentiellement à l'acide favorisant l'homoconjugaison pour abaisser la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$. L'ajout d'un autre équivalent d'eau fait augmenter légèrement la fréquence de 1660 à 1662 cm^{-1} . Il est possible qu'ici les deux effets puissent coexister et que la seconde molécule d'eau commence à former des liaisons hydrogène fortes pour éléver légèrement la fréquence. Par la suite, il est possible que les nombreuses molécules d'eau ajoutées au système forment des liaisons hydrogène fortes et puissent solvater suffisamment le cation afin de déplacer la fréquence de vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ vers $1668-1669 \text{ cm}^{-1}$. Afin d'étayer l'hypothèse proposée, un système qui utilisait plutôt deux équivalents d'acides au lieu d'un seul a été étudié en absence ou en présence d'un seul équivalent d'eau. Dans ces systèmes, il sera peut-être possible de mettre en évidence l'effet d'homoconjugaison et de l'action de l'eau sur celle-ci.

Etude du système NRBA-acide acétique 1:2 avec et sans addition d'eau

Les spectres de ce système sont présentés à la figure 13. Sans l'addition d'eau (figure 13 a), le système possède sa bande d'acide ($\nu_{C=O}$) vers 1717 cm^{-1} .

Puis un faible épaulement vers 1666 cm^{-1} est observé et une bande très nette apparaît à 1656 cm^{-1} . L'épaulement doit correspondre à la vibration d'étirement $\nu_{\text{C}=\text{N}^+}$ du complexe associé 1:1 et l'autre à 1656 cm^{-1} à la vibration d'étirement $\nu_{\text{C}=\text{N}^+}$ du complexe associé 1:2. Il est connu, d'après les études de Denisov et coll. (84) sur le système trioctylamine-MCA dans le C_2Cl_4 , que ces deux complexes coexistent simultanément avec prépondérance pour le complexe 1:2 lors de l'ajout d'une deuxième acide. La figure 14 illustre cet équilibre et l'arrangement des acides dans le complexe 1:2, d'après Denisov et coll (84). La vibration d'étirement $\nu_{\text{C}=\text{N}^+}$ du complexe 1:2 serait donc à plus basse fréquence que son homologue 1:1 à cause de l'homoconjugaison qui entre en jeu. C'est ainsi que sur la figure 14, on notera que la charge négative de l'ion carboxylate du complexe 1:2 est distribuée sur deux molécules d'acide. En considérant l'existence du complexe 1:2, toutes les fréquences de vibration de notre système peuvent s'expliquer. La vibration d'étirement $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ à 1629 cm^{-1} a disparu et une très large bande est observée à 1569 cm^{-1} . Cette dernière bande recouvre les vibrations d'étirement $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ pour les complexes 1:1 et 1:2 protonés (il devrait en principe se trouver une bande de faible intensité à l'intérieur de cette enveloppe associée à l'espèce non protonée résiduelle) ainsi que la vibration $\nu_{\text{as. coo}^-}$ pour le complexe 1:1. Une autre bande est observée à 1531 cm^{-1} qui doit correspondre à la vibration $\nu_{\text{as. coo}^-}$ dans le complexe 1:2. Cette attribution est basée sur les travaux de Denisov et coll. (84) qui ont remarqué que les vibrations $\nu_{\text{as. coo}^-}$ pour les complexes 1:2 chez les acides carboxyliques sont toujours déplacées d'une quarantaine de cm^{-1} vers les basses fréquences par rapport à la vibration $\nu_{\text{as. coo}^-}$ du complexe 1:1. A ce stade-ci, le degré de protonation de la base de Schiff dans le système avec deux acides se situe entre 70-90% simplement en se fiant à l'intensité de la bande $\nu_{\text{C}=\text{C}^+}$ par rapport

aux autres bandes.

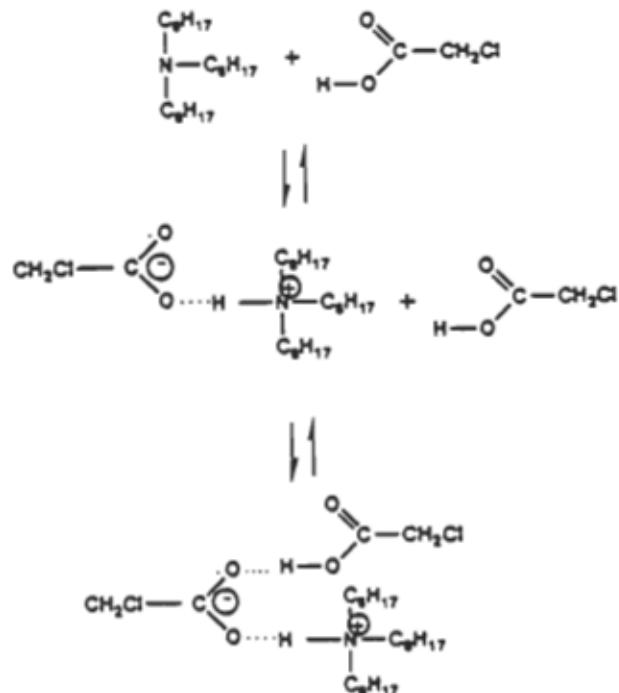


Figure 14: Equilibre des complexes 1:1 et 1:2 pour un système de trioctylamine-MCA (84).

Avec l'ajout d'un équivalent d'eau (figure 13 b), la protonation semble augmenter encore plus suite à l'intensification supplémentaire de la bande d'étirement $\nu_{C=C}$ à 1560 cm^{-1} . Un épaulement à 1638 cm^{-1} correspondant à la vibration de torsion de l'eau est observé. La bande d'étirement $\nu_{C=N^+}$ du complexe 1:1 à 1666 cm^{-1} a complètement disparu tandis que la bande à 1656 cm^{-1} n'est plus qu'un épaulement au profit d'une nouvelle bande à 1647 cm^{-1} . Un nouveau complexe s'est donc formé et ceci se vérifie encore par la vibration du carboxylate du complexe 1:2 qui n'est plus maintenant qu'un faible épaulement vers 1530 cm^{-1} au profit d'une nouvelle bande à 1510 cm^{-1} . Toujours en se basant sur l'homoconjugaison, le nouveau complexe comporte sans doute une liaison de l'eau

avec les deux acides, ce qui engendre un genre de tétramère (imine, 2 acides, 1 eau) qui permet de délocaliser encore davantage la charge négative par rapport au complexe 1:2 et encore plus davantage par rapport au complexe 1:1. Cette explication est en accord avec la valeur de la fréquence à 1510 cm^{-1} pour le nouveau complexe car il a été dit auparavant qu'un déplacement vers les basses fréquences est observé pour les systèmes à deux acides. La figure 15 illustre cette proposition. Notez que l'eau est placée à l'extrême de la chaîne. Elle aurait pu tout aussi bien être positionnée entre les deux acides ou même entre l'imine et les deux acides. Il n'est pas possible de discerner entre ces diverses possibilités et il est également possible que les trois façons coexistent. Des études sur les fréquences de vibration des carboxylates par substitution isotopique, notamment celle utilisant l'oxygène-18 et le carbone-13 pourraient élucider ces possibilités et faire l'objet de futures recherches.

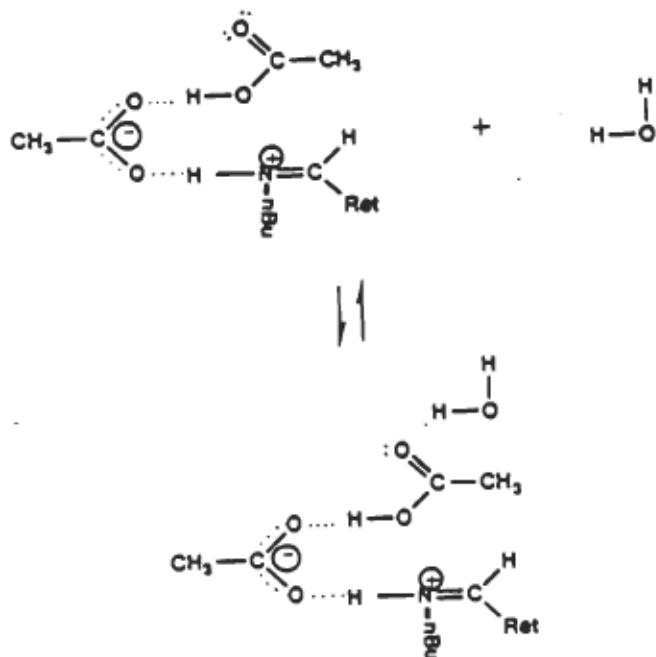


Figure 15: Complexation du système 1:2 avec l'eau.

Un parallèle étroit peut donc être établi entre la liaison de l'eau avec l'acide du complexe protoné 1:1 des premiers spectres et celui du complexe 1:2. D'ailleurs, leurs positions respectives pour la vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ se ressemblent: 1660 cm^{-1} pour le complexe eau-acide et 1656 cm^{-1} pour le complexe 1:2 (acide-acide). Lindemann et Zundel (80) furent les premiers à mettre en évidence la liaison de l'eau avec un acide carboxylique lors de la protonation de la pyridine. La seule différence ici entre notre système et celui décrit par Lindemann et Zundel est la substitution de la pyridine par la NRBA. Il est à noter que les auteurs n'ont pu observer les changements de fréquence $C=N^+$ puisque l'accepteur est tellement délocalisé rendant la contribution au mode $C=N$ trop faible. La figure 16 reproduit le lien eau-acide dans le système pyridine-acide acétique-eau tel que proposé par Lindemann et Zundel.

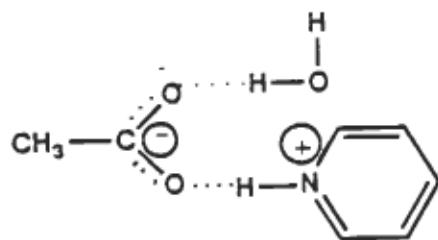


Figure 16: La liaison de l'eau avec l'acide carboxylique dans le système pyridine-acide acétique-eau selon la référence 80.

Ainsi pour récapituler, en présence de deux équivalents d'acide à NRBA, une bande à 1656 cm^{-1} est observée et doit correspondre à la fréquence $\nu_{\text{C}=\text{N}^+}$ pour le système 1 NRBA: 2 acides. Avec l'ajout d'un équivalent d'eau à ce système, la bande à 1656 cm^{-1} se déplace à 1647 cm^{-1} et doit correspondre à la fréquence $\nu_{\text{C}=\text{N}^+}$ pour un système 1 NRBA: 2 acides: 1 eau. L'ajout de plusieurs molécules d'eau ne semble pas interagir de la même façon sur la NRBA avec pour conséquence l'augmentation de la fréquence $\text{C}=\text{N}^+$ tel que montré pour le système 1 NRBA: 1 acide et 4 à 10 équivalents d'eau.

Signification des résultats obtenus dans cette étude en relation avec ceux obtenus dans les pigments.

Les résultats obtenus ici sont importants pour la compréhension du mécanisme de protonation des pigments visuels car ils montrent que les acides des systèmes protéiques, donc les acides aspartiques ou glutamiques et dont la force acide est similaire à l'acide acétique utilisé pour cette étude, peuvent à la suite de la participation de molécules d'eau ou d'une autre molécule d'acide induire une protonation complète. Les résultats trouvés à la suite des travaux de résonance Raman par les groupes de Callender et Mathies qui avaient suggéré une protonation complète des bases de Schiff dans les pigments visuels et bactériens pourraient être expliqués.

Les travaux d'Engelhard et coll. (51) et ceux d'Otto et coll. (52) vont dans ce sens car leurs travaux ont montré que la base de Schiff du chromophore pourrait être

associée à plusieurs acides aminés. Otto et coll. (52) ont d'ailleurs démontré par mutagenèse spécifique qu'au moins trois acides aminés étaient nécessaires à la protonation de la base de Schiff. Ces acides sont Asp 85, Asp 212 et Arg 82. D'une façon encore plus rapprochée, les travaux récents sur la bR acidifiée avec HCl à pH 2 (bR bleu ou bR_{600}) par de Groot et coll. (85) via les techniques de RMN ^{15}N et ^{13}C vont dans le même sens que nos résultats impliquant deux acides et une molécule d'eau. Leurs travaux ont montré que les signaux en RMN ^{15}N des bases de Schiff pour la bR_{600} voient leurs déplacements chimiques se déplacer vers les hauts champs par rapport à la bR normal (bR_{568}). Ces auteurs attribuent cette différence à la faiblesse encore plus prononcée de la liaison hydrogène dans la bR acidifiée. Afin d'expliquer leurs résultats, ils ont fait appel à un mécanisme qui illustre l'état de protonation de la base de Schiff pour ces deux formes de bR. Dans le cas de la bR normale, deux acides carboxyliques sont liés à une molécule d'eau qui à son tour forme une liaison hydrogène avec la base de Schiff. Lorsque la bR est acidifiée, le seul changement important provient d'une molécule de HCl remplacée par une molécule d'eau. Le mécanisme illustré à la figure 15 est très semblable à celui proposé par de Groot et coll. Seule la position de l'eau diffère mais il fut déjà mentionné la possibilité de la positionner sur l'azote de la fonction imine. De plus, le type de structure de tels complexes a récemment été considéré théoriquement en relation avec la conductivité des protons dans la glace (86).

Egalement, notre modèle peut expliquer la fréquence $C=N^+$ anormalement basse de la bR avec une vingtaine de cm^{-1} de différence entre le système qui utilise un équivalent d'acide et celui qui utilise deux équivalents d'acide et un équivalent d'eau. Baasov et coll. (83) ont expliqué la position à basse fréquence de la vibration

d'étirement $\nu_{C=N^+}$ à 1641 cm^{-1} dans la bactériorhodopsine de la façon suivante. Lorsque la NRBA est mise en présence d'un grand excès d'acide carboxylique, la position de la fréquence $\nu_{C=N^+}$ s'abaisse également vers 1640 cm^{-1} , suite sans doute, à un enchaînement des acides selon l'effet d'homoconjugaison. Notre modèle avec l'eau produit un effet similaire et est encore plus rapproché des pigments de celui de Baasov et coll. car il serait étonnant que plusieurs acides puissent s'enchaîner les uns à la suite des autres dans le système très ordonné d'une protéine.

Pour la rhodopsine, Baasov et coll. (83) proposèrent que la fréquence élevée observée à 1660 cm^{-1} pouvait se comparer au système NRBA/HCl dans le méthanol (1656 cm^{-1}). Ils proposèrent que l'eau, sans doute présente dans la protéine, puisse former des liaisons hydrogène plus fortes avec le cation et ainsi augmenter la fréquence jusqu'à la position désirée (1660 cm^{-1}). Bien que nous ne contestons pas la logique de ce raisonnement qui est d'ailleurs à la base de nos résultats, Baasov et coll. utilisent un système modèle très éloigné de la réalité (HCl est un acide très fort). Cette étude a montré qu'il existe une différence d'environ 10 cm^{-1} pour la fréquence $\nu_{C=N^+}$ entre le système NRBA/HCl et NRBA/acide carboxylique, le premier étant à plus basse fréquence que le second. Nous pouvons interpréter différemment la vibration d'étirement $\nu_{C=N^+}$ de la rhodopsine à 1660 cm^{-1} : la protonation de la base de Schiff du rétinal par un acide carboxylique comme l'acide aspartique ou glutamique lié à une molécule d'eau donne effectivement une valeur de 1660 cm^{-1} . Bien sûr, d'autres facteurs stériques ou coulombiques peuvent également faire varier la position de la fréquence $\nu_{C=N^+}$. Par contre Baasov et Sheves. (87) signalent, suite à des travaux par incubation de

chromophores synthétiques chargés positivement dans la bactériorhodopsine, que la fréquence $\nu_{C=N^+}$ ne semble pas être affectée par de telles interactions électrostatiques.

Chapitre 3

Etude par RMN N-15 de la bactériorhodopsine et de quelques modèles.

La RMN N-15 offre certains avantages vis-à-vis les techniques usuelles de résonance Raman et FTIR pour étudier l'état de protonation des bases de Schiff des pigments visuels et bactériens. Son grand domaine de champ magnétique étalé sur plus de 600 ppm est sensible aux perturbations électroniques et permet l'analyse spectrale avec plus de facilité. Également, le temps de réponse d'une transition en RMN étant beaucoup plus lent ($\sim 10^{-3}$ seconde. versus $\sim 10^{-12}$ seconde. pour le Raman et FTIR), cela peut permettre de discerner certains échanges moléculaires dont la vitesse d'échange est de l'ordre de ceux des transitions de RMN. Nous visons plus particulièrement les échanges de proton entre la base de Schiff et quelques molécules d'eau potentiellement présentes à proximité puisqu'il fut suggéré au chapitre précédent que l'eau jumelée à la présence d'une ou deux molécules d'acide carboxylique peuvent induire une protonation complète.

Cependant à cause de sa faible abondance naturelle (0,38%) et de la faible sensibilité de son noyau, l'azote-15 pose certains problèmes au niveau de la détection. L'étude d'une protéine rencontre aussi des problèmes au niveau de la limite de détection. Par exemple, une protéine d'un poids moléculaire de 30000 Daltons par rapport à une molécule de 300 Daltons voit son nombre de site diminué par cent fois pour une quantité donnée. La sensibilité relative en est par conséquent réduite d'un facteur 100. La rigidité notoire des protéines contribue à augmenter le temps de relaxation T1 des noyaux excités par les pulses. Le recouvrement optimal

de magnétisation transversale n'est pas atteint lors des pulses subséquents et cela se traduit par une perte de sensibilité. Heureusement, l'azote-15 a probablement plus que tout autre noyau, pu bénéficier des progrès réalisés dans le développement de la technologie de la RMN, en particulier par la venue des supers conducteurs solénoïde. Ceux-ci ont permis à la RMN de l'azote-15 de devenir familière voire même routinière pour des molécules de poids moléculaire commun. Toutefois, l'obtention de spectres d'azote-15 d'une protéine telle la bR n'est pas facile, d'où la nécessité d'enrichir à 100% le site cible en azote-15. Dans cette étude, nous avons enrichi spécifiquement l'azote de la fonction imine de la base de Schiff du rétinal. D'autres chercheurs ont réalisé avant nous des études de RMN de la bR enrichie en azote-15 sur la base de Schiff. Voici un bref aperçu de leurs travaux.

Le groupe de Mateescu et coll. (88) a tenté sans succès de résoudre le signal de la base de Schiff par RMN N-15 en phase liquide en solubilisant la bR dans des détergents via les techniques de pulse conventionnelle. Notons toutefois, que l'avènement de la technique de pulses "Multiple Quantum Coherence" récemment développée par Bax (89) ouvre la voie aux études de RMN N-15 sur les protéines en solution (90). Puisque l'Université de Montréal n'est actuellement pas équipée pour cette dernière technique, nous avons dû renoncer à l'étude de la protéine en solution. Nous nous sommes plutôt tournés vers l'étude de la protéine en phase solide qui conjointement reliée à la technique de "polarisation croisée" (CP) a supplanté la phase liquide pour ce genre d'étude. La phase solide étant plus concentrée que la phase liquide, le nombre de sites par quantité d'échantillon en sera par conséquent augmenté. La technique CP permet d'augmenter le rapport signal/bruit par transfert de polarisation du proton à l'azote et la diminution des temps

de répétition entre les expériences. De plus, la sensibilité des noyaux d'azote relativement rigides tels ceux localisés dans une cage protéique ou ceux possédant un proton lié à l'azote avec échange suffisamment lent (vitesse d'échange plus lente que les transitions des noyaux excités) est accrue. L'équipe de Harbison et coll. (91) a d'ailleurs réussi à obtenir le premier spectre résolu de la bR avec trois signaux clairement visibles. Pour ce faire, ils ont fait la synthèse d'une bR enrichie en ^{15}N sur le groupe amino en position ϵ de la lysine. En utilisant le chlorure d'ammonium comme référence, ces auteurs ont obtenu un signal vers 5 ppm provenant de $^{15}\text{N}_{\epsilon}$ de la lysine. Un second signal vers 100 ppm provient des ^{15}N des liens amides de la protéine. Finalement, à 145 et 152 ppm, deux signaux ont été obtenus et qui furent attribués au $^{15}\text{N}_{\epsilon}$ formant désormais la base de Schiff. Le signal à 145 ppm a été attribué par Harbison et coll au ^{15}N de la base de Schiff de la bR₅₆₈ et le signal à 152 ppm à la bR₅₄₈. Ces deux signaux demandent une explication: puisque l'expérience fut réalisée en absence de lumière, il coexiste deux isomères du rétinal en proportions relativement égales. Ces bases de Schiff sont admises protonées puisque tous les modèles de la NRBA protonés montrent des pics entre 150 et 175 ppm tandis que les ^{15}N de modèles non protonés ont des déplacements chimiques vers 300 ppm. Plus précisément, la toute-trans NRBA/HCl a une valeur de ^{15}N à 172 ppm tandis que la 13-cis NRBA/HCl a son ^{15}N à 159 ppm ainsi que les analogues utilisant l'ion iodure sont respectivement à 150 et à 155 ppm. Puisque les déplacements chimiques avec ce dernier contre-ion se rapprochent sensiblement des valeurs obtenues avec la protéine, cela implique qu'il existe dans la protéine une liaison hydrogène affaiblie de type $\text{N}^+-\text{H}...\text{-OOC-}$ qui serait analogue à $\text{N}^+-\text{H}...\text{-I}$. La même argumentation a servi à expliquer la position de la fréquence de vibration C=N⁺ en spectroscopie Raman de la bR tel qu'il a été déjà discuté au chapitre

précédent. Les auteurs ont également obtenu un résultat intéressant qui suggère que les protons de l'eau à proximité de la cage protéique peuvent s'échanger avec le proton de la fonction imine. Cet avancé va dans le même sens que le nôtre discuté au chapitre précédent.

Une étude de Bissonnette et coll. (92) par RMN du proton sur des modèles de bases de Schiff du rétinal dans le méthanol avait permis de montrer que le proton de la base de Schiff du rétinal s'échange avec les protons de ce solvant car la coalescence du doublet aldimine est observée dans la zone de températures entre -5° à -15°C. En s'inspirant de ces travaux, nous avons entrepris une étude par RMN N-15 sur la cinétique d'échange directement sur la bR en variant légèrement la température. Nous avons tenté d'approfondir le concept de cet échange intermoléculaire qui est d'une importance capitale dans l'état de protonation des pigments visuels et bactériens. Car, s'il est possible de vérifier l'accessibilité de l'eau sur la base de Schiff du rétinal grâce au processus d'échange, il serait possible d'en faire de même avec l'accessibilité des ions $-\text{OH}$ et ainsi apporter quelques éclaircissements sur la signification du pK_a de 13 dans la bR. Nous avons ainsi abordé une approche similaire à celle de l'étude de Harbison et coll. en utilisant la bR enrichie en azote-15 sur le groupe NH_2 en position ϵ de la lysine suivi ensuite d'une étude par RMN N-15 à l'état solide. Nous avons modifié l'environnement de la bR en lui incorporant des ions $-\text{OH}$ et nous avons vérifié de la même façon que pour l'eau, son accessibilité à la base de Schiff. Une étude préliminaire à l'aide de modèles s'est avérée nécessaire pour bien approfondir nos connaissances sur les vitesses d'échange d'un tel processus. Notons également que nous avons utilisé en certaines occasions une séquence de pulse différente afin de discerner rapidement

et simplement les échanges plus rapides ou plus lents que l'échelle de temps de la RMN.

Méthodologie:

La $^{15}\text{N}_{\epsilon}$ -lysine-bR (contenant ses lipides) fut préparée selon la méthode de Hargrave et coll. (93) dans les laboratoires du Dr François Boucher du centre de recherche en photobiophysique de l'UQTR. Environ 100 mg de bR hydratée à 85% en poids d'eau furent nécessaires pour obtenir les spectres CP-MAS. (MAS pour "Magic angle spinning" qui réfère à l'angle d'inclinaison pour l'obtention d'un spectre de RMN solide). Le rapport de poids entre l'eau et la bR (~15 mg de bR et ~85 mg d'eau) est aisément vérifié par spectroscopie d'absorption. Nous l'obtenons par évaporation successive sous vide jusqu'au poids désiré. L'échantillon obtenu est un solide sous forme de poudre. Le niveau d'hydratation utilisé maintient l'intégrité de la protéine si l'on en juge par sa couleur pourpre. Ce niveau d'hydratation est d'ailleurs légèrement supérieur à celui utilisé par Harbison et coll. (91). Une évaporation sous vide trop longue entraîne l'apparition d'une couleur rouge signalant une déprotonation de la base de Schiff de la bR. Finalement, nous l'incorporons dans une cellule conçue pour recevoir environ 100 mg de matériel.

L'échantillon solide contenant les ions ${}^-\text{OH}$ est préparé comme suit: une série d'essais sur le contrôle du pH de la bR non enrichie est effectuée de façon à obtenir un échantillon suffisamment basique par l'ajout d'hydroxyde de sodium sans toutefois dénaturer la protéine. Rappelons que Druckmann et al. (48) ont montré que la déprotonation de bR_{560} à bR_{480} commence à pH 11.5 tandis qu'à pH 12.67, la

bR_{560} tourne irréversiblement vers bR_{365} (dénaturée) en l'espace de trois heures. Notre objectif sera d'obtenir un pH final d'une valeur supérieure à 11.5 mais aussi possédant un temps de dénaturation suffisamment long pour permettre une expérience de RMN d'une quinzaine d'heures. Le problème est de déterminer le pH exact à l'intérieur de cette matrice solide. Pour ce faire, nous avons entrepris l'expérience suivante: une quantité identique de bR non enrichie (15 mg) est mise en solution aqueuse à pH 8.9 par addition de NaOH (environ un litre de la solution à pH 8.9 est nécessaire pour obtenir un mélange suffisamment homogène). Par la suite, nous débutons l'évaporation de l'eau par évaporation sous vide et reprenons le pH à chaque fois que la quantité d'eau est retranchée par un facteur de 10. Evidemment, comme seule l'eau est éliminée, la concentration molaire de NaOH augmente faisant ainsi augmenter le pH. Avec 100 ml d'eau résultant, le pH grimpe à 9.8; à 10 ml, le pH se situe à 10.7. Finalement à 1 ml, dernière valeur où le pH peut être enregistré adéquatement, nous mesurons un pH à 11.6. Nous continuons l'évaporation de façon à obtenir le solide possédant la même quantité d'eau que précédemment soit: ~ 85 mg d'eau pour 15 mg de bR . Par extrapolation de la quantité d'eau en fonction du pH, nous pouvons évaluer un pH final vers 12.5-12.6 pour le solide obtenu. Afin de vérifier la justesse de notre évaluation, le solide, une heure et demi plus tard, est remis en solution et acidifié avec HCl de façon à ré-obtenir le pH naturel de la protéine. Par spectroscopie d'absorption, nous pouvons vérifier que bR_{560} s'est transformée à environ 50% de sa quantité initiale au profit de bR_{365} . Ainsi cela nous assure que notre extrapolation est juste et que la proposition d'un pH de 12.5-12.6 à l'intérieur du solide est sans doute exacte car pour une solution avec un pH de près de cette valeur, l'expérience de Callender montre

également un $t_{1/2}$ de dénaturation d'une durée d'environ 90 minutes. Finalement, nous reprenons la même expérience sauf que nous débutons cette fois-ci avec une solution moins basique à pH 8.2 plutôt que 8.9. A 1 ml le pH est maintenant 11.1 et le solide obtenu après l'évaporation finale (~85 mg d'eau et 15 mg de bR) aurait selon notre extrapolation (gain d'une unité de pH pour chaque diminution d'un facteur 10 de la quantité d'eau) un pH vers 12.0. Le solide est gardé à température ambiante pendant 24 heures, remis en solution et acidifié comme précédemment. Par spectroscopie d'absorption, nous notons que bR₅₆₀ est quasiment entièrement recouvrée (95%) suggérant cette fois-ci un temps de dénaturation plus long et une bR₅₆₀ relativement plus stable. Cette dernière expérience peut être finalement reproduite directement sur l'échantillon enrichi en N-15 pour enregistrement des spectres de RMN.

L'enregistrement des spectres de RMN N-15 à l'état solide se fait sur un modèle Varian CPX 300 NMR opérant à des fréquences de 30.4 MHz pour N-15 et 301.1 MHz pour H-1. Les échantillons sont mis en rotation à l'angle magique à une vitesse de 4.73 kHz. Les déplacements chimiques sont relatifs au NH₄Cl enrichi en N-15 utilisé comme référence externe. Les températures des échantillons sont enregistrées à 20 °C et -10 °C. Les séquences de pulse utilisent la technique CP standard et une technique spéciale utilisant le CP standard avec un délai de 40 μ s sans découplage de proton, inséré après les contacts CP. L'effet d'omettre ce pulse diminue considérablement l'intensité des signaux de l'azote-15 couplé au proton impliqué dans des échanges plus lents que les temps de transitions de RMN. Cette technique fut développée par Opella et Frey (94) et appliquée avec succès sur la bR par RMN ¹³C à l'état solide par Engelhard et coll. (95). La figure 17 illustre la

séquence de ces deux techniques. Le temps du pulse de 90°_X du proton est $3 \mu\text{s}$. Le temps de contact du CP est de 1.8 msec . Le temps d'acquisition de donnée pour chaque pulse est de 59.8 ms . Un délai de 2.0 seconde est incorporé avant d'appliquer le prochain pulse de façon à permettre aux noyaux d'azote de récupérer suffisamment une partie de leur magnétisation. Le cycle est répété 30000 fois pour une durée totale d'environ 17 heures. Dans la séquence a, figure 17), les protons sont découplés à une fréquence de 30 kHz et dans la séquence b, figure 17), les protons ne sont pas découplés mais un délai de $40 \mu\text{s}$ est incorporé après le CP.

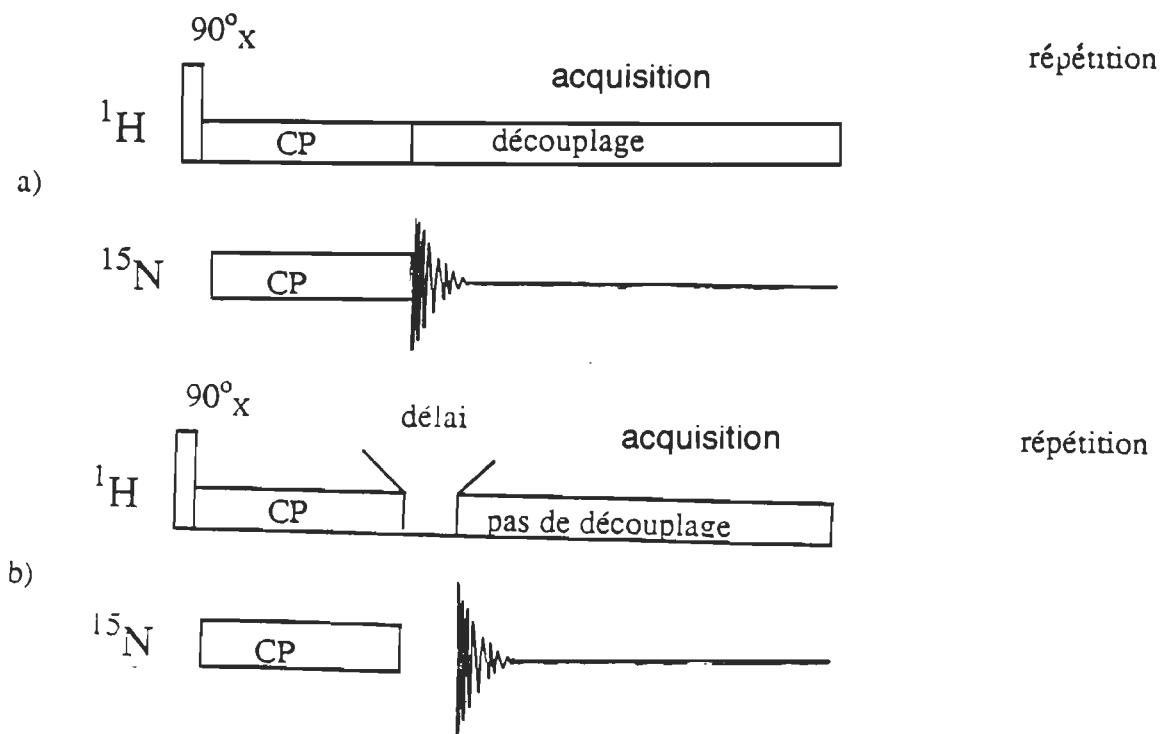


Figure 17: a) Séquence normale employée par Harbison et coll. (79)
b) Séquence avec incorporation d'un délai de $40 \mu\text{s}$ après CP.

Les modèles utilisant des bases et des acides ajoutés en rapport équimolaire en solution à 0,1 M. sont enregistrés sur un appareil Bruker 400 MHz pouvant opérer à des fréquences respectives de 400.5 MHz en proton et 40.4 MHz en N-15. La température des échantillons fut variée entre 25 °C et -60 °C. La technique INEPT est utilisée pour les modèles et sa séquence de pulse est présentée à la figure 17 c) selon la référence (96). Les conditions expérimentales pour obtenir les spectres avec la séquence INEPT sont décrites à la référence (56). Cette séquence fut employée avec succès sur des modèles de bases de Schiff par Cossette et Vocelle (47,56). Cette technique possède l'avantage de transférer efficacement le signal du proton sur l'azote par transfert de polarisation et d'augmenter significativement le rapport signal/bruit dans le cas où l'azote et le proton s'échangent à une vitesse suffisamment lente pour observer le couplage entre les deux. Le signal N-15 est détecté seulement après une quinzaine de minutes grâce au transfert de polarisation qui peut s'établir. Après ces 15 minutes d'enregistrement, si aucun signal N-15 est détecté, nous pouvons conclure que le proton est en échange encore trop rapide pour permettre un transfert de polarisation du proton sur l'azote via la séquence INEPT.

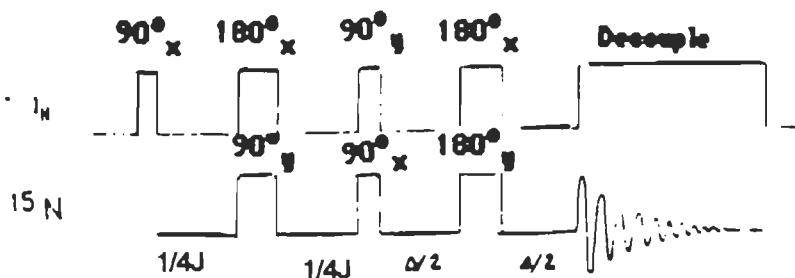


Figure 17 c). Séquence de pulse de la technique INEPT.

Résultat et discussion

Etude RMN ^{15}N des modèles:

Afin de bien saisir les phénomènes d'échange impliqués dans ce processus, nous allons brièvement résumer une partie des travaux en RMN du proton (34,92) faits sur un modèle de la base de Schiff du rétinal en incorporant des acides forts. Ces études voulaient vérifier si l'échange du proton sur l'azote était rapide (doublet est présent) ou suffisamment lent (un doublet de doublet est obtenu). En utilisant un solvant protique tel le méthanol, il s'établit un échange entre le proton acide et les protons labiles du groupement alcool du solvant. Cet échange est généralement trop rapide à température de la pièce mais suffisamment lent à des températures de -15° à -30°C. La cinétique d'échange est alors principalement contrôlée par le solvant. Nous croyons qu'un mécanisme analogue peut s'établir entre les protons de l'eau et celui du chromophore imine des pigments. C'est ainsi que nous avons voulu vérifier le degré de la vitesse d'échange à l'aide de modèles utilisant une base beaucoup plus forte (une amine) que la base de Schiff du pigment. Également, nous allons vérifier le comportement des ions ·OH sur la cinétique d'échange lorsque ceux-ci sont ajoutés à l'état de trace avec ces modèles dans des solvants protiques tels l'eau et le méthanol. Finalement, la température sera variée afin de vérifier la cinétique d'échange. Les résultats avec les modèles utilisant la séquence INEPT sont présentés au tableau 11. Une vitesse lente signifie qu'il y a eu transfert de polarisation c'est à dire qu'il y aura un échange suffisamment lent et que le proton est couplé à l'azote-15. Une vitesse rapide indique le contraire, soit un échange trop rapide qui est caractérisé par absence de couplage entre l'azote-15 et le proton.

Système	T (°C)	Vitesse d'échange
pyridine-MCA dans l'eau	25	rapide
pyridine-MCA dans l'eau	0	lente
pyridine-MCA dans le méthanol	25	rapide
pyridine-MCA dans le méthanol	-10	lente
NRBA-MCA dans le méthanol	25	rapide
NRBA-MCA dans le méthanol	-10	lente
(Et) ₃ -MCA dans le méthanol	25	rapide
(Et) ₃ -MCA dans le méthanol	-30	rapide
(Et) ₃ -MCA dans le méthanol	-40	lente
(Et) ₃ -MCA- ·OH dans le méthanol	-60	rapide

Tableau 11: Mesure qualitative de la vitesse d'échange de protons de systèmes modèles à différentes températures (une vitesse lente signifie que l'entité $\text{RN}^+ \cdot \text{H}$ peut être vue).

Le premier système présenté utilise la pyridine (une base faible avec un pK_a dans l'eau de 5.8) en rapport équimolaire avec le MCA dans l'eau. Il permet de constater qu'en abaissant la température à seulement 0°C par rapport à la température ambiante de 25°C, l'échange devient suffisamment lent. Le même système utilisant le méthanol comme solvant au lieu de l'eau donne des résultats analogues et suggère que la cinétique d'échange est similaire aussi bien dans l'eau que dans le méthanol. Le même système mais, où la pyridine est substituée par la NRBA (pK_a de 7) et ce nouveau montre un échange qui devient assez lent vers -10°C tout comme dans le cas de la pyridine. Dans l'expérience où la triéthylamine, une base très forte (pK_a de 11), remplace la base de Schiff dans le méthanol, il faut atteindre alors -40°C pour observer l'échange lent. A ce stade-ci, il est possible d'anticiper qu'une base avec un pK_a élevé accélérera l'échange. Finalement, l'ajout d'ions ${}^-\text{OH}$ à l'état de trace (10^{-3} M) à ce dernier système accélère aussi de façon significative la vitesse de ces échanges car même à -60 °C, l'échange est encore trop rapide. Ces derniers semblent servir de catalyseur pour mener à des échanges encore plus rapides. Nous verrons que ce dernier résultat pourra amener des conclusions importantes au niveau de l'accessibilité des ions ${}^-\text{OH}$ avec la base de Schiff de la bR.

Etude RMN ${}^{15}\text{N}$ de la bactériorhodopsine:

Les spectres de la ${}^{15}\text{N}_{\epsilon}$ -lysine-bR sont montrés à la figure 18. Le spectre montré à la figure 18 a) résulte d'une expérience analogue à celle faite par Harbison et coll. (79,91) et les trois signaux caractéristiques sont également obtenus. Notons toutefois que nos spectres (tout comme ceux de Harbisson et coll) ont un niveau de

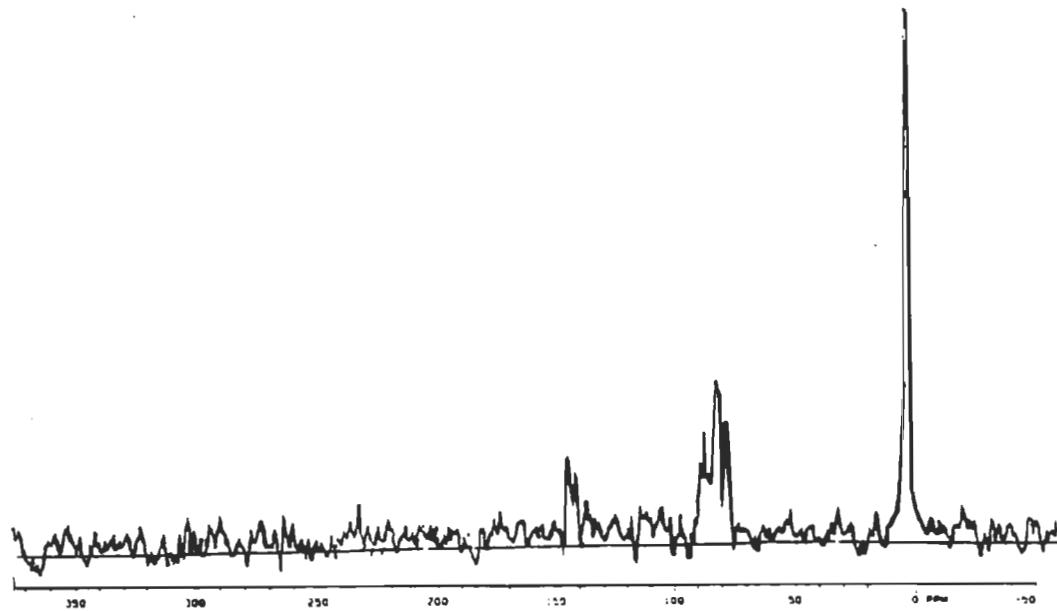


Figure 18 a): Spectre RMN N-15 de la bR enrichie, utilisant une séquence normale de CP à 20 °C.

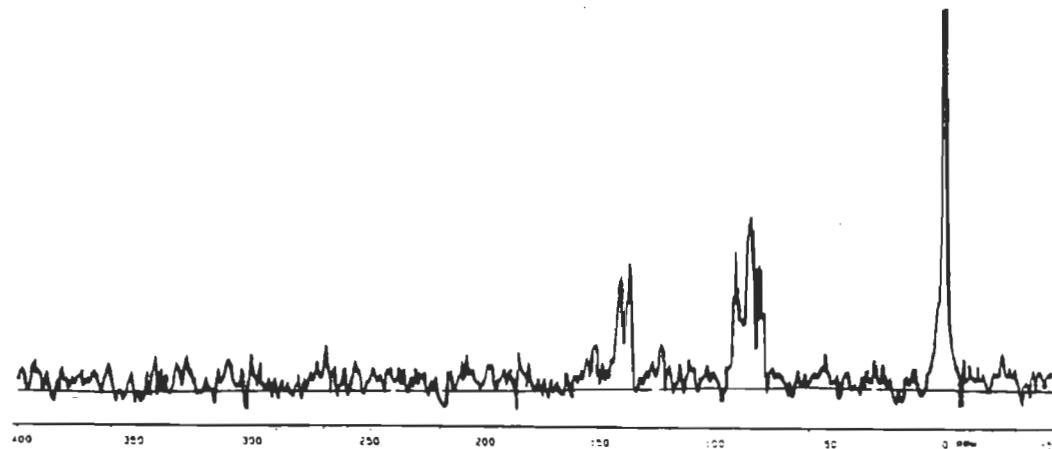


Figure 18 b): Spectre RMN N-15 de la BR enrichie, utilisant une séquence normale de CP à -10 °C.

bruit assez important. Pour les signaux de la base de Schiff, le rapport signal/bruit est environ 2.5 soit la limite pour être acceptable. Toutefois puisque ces signaux sont attendus dans cette région spectrale, la probabilité qu'il s'agisse que de bruit est très faible. Le premier signal est intense à 7 ppm et il s'agit des 6 lysines enrichies $^{15}\text{N}_{\text{e}}$. Le deuxième est le signal des groupements amides en abondance naturelle issu des liaisons peptidiques de la protéine vers 100 ppm. Le troisième, sous l'apparence d'un doublet, provient des bases de Schiff protonées à 145 et 152 ppm respectivement attribuée à bR_{568} et bR_{548} . En fait, il n'y a aucun changement majeur entre ce spectre et celui obtenu par Harbison et coll., à l'exception du massif amide qui est mieux résolu dans notre spectre. Ceci est tout à fait normal et peut provenir des conditions d'opération légèrement différentes. Par exemple, notre séquence de pulse est légèrement différente, de plus l'échantillon ne possède pas le même degré d'humidité et finalement la fréquence de notre appareil n'est pas exactement la même. Rappelons que cette fréquence est une fonction de certains paramètres de relaxation qui peuvent influencer l'intensité des bandes. Il est possible également qu'il puisse s'agir du bruit de fond de l'appareil vu son niveau important. Le spectre de la figure 18 b) est pris dans les mêmes conditions sauf que la température est abaissée à -10°C. Essentiellement, l'allure du spectre n'a pas changé. Finalement les spectres de la figure 18 c) et d) sont enregistrés aux mêmes températures respectives que a) et b) sauf que la séquence de pulse fait en sorte que les fréquences N-15 couplées avec les protons disparaîtront du spectre. A température ambiante, seule la fréquence des amides a disparu du spectre ce qui correspond avec le fait que les azotes des fonctions amides sont toujours en échange lent à cause du phénomène de délocalisation d'électron π . L'intensité du signal de la

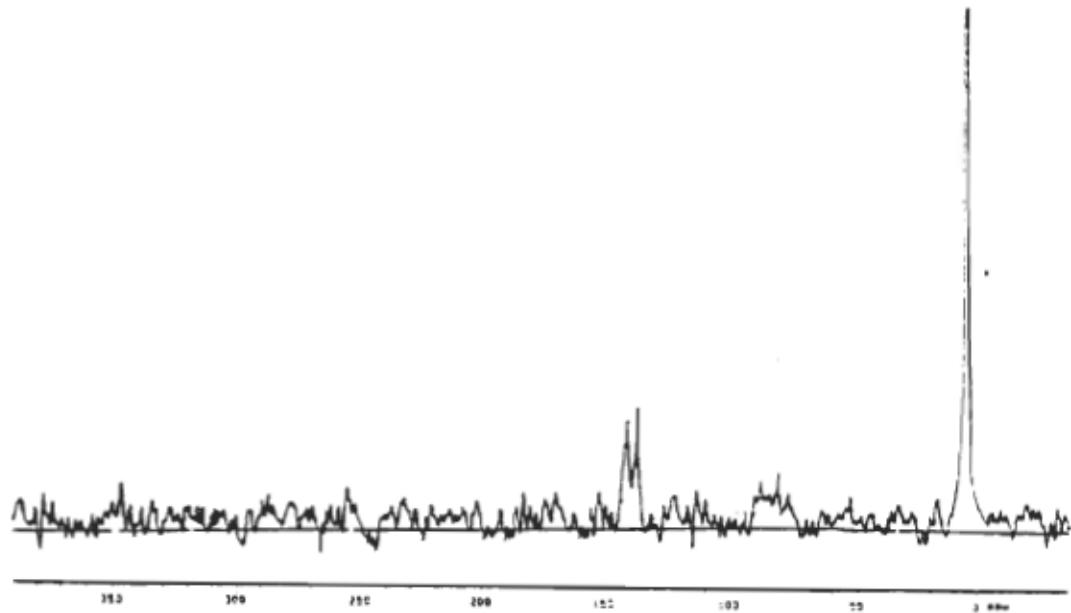


Figure 18 c): Spectre RMN N-15 de la bR enrichie, utilisant un délai sans découplage après le CP à 20 °C.

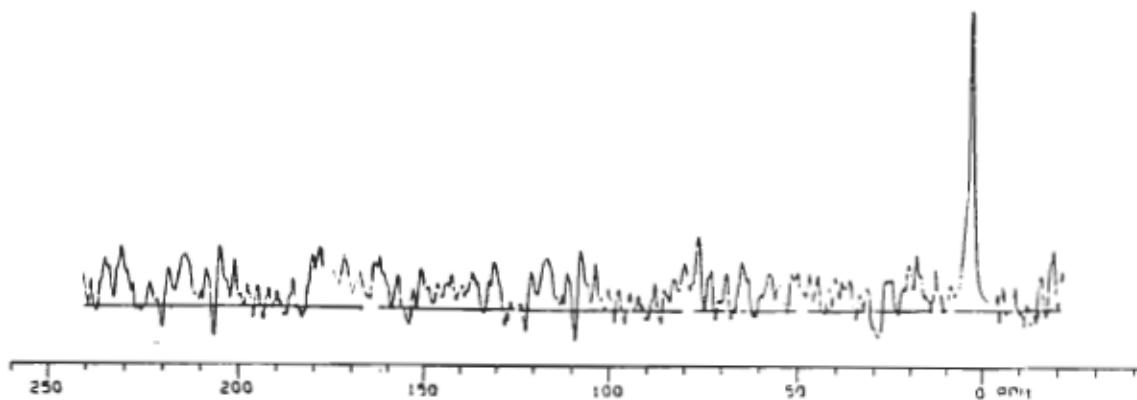


Figure 18 d): Spectre RMN N-15 de la bR enrichie, utilisant un délai sans découplage après le CP à -10 °C.

fonction amine ($^+NH_3$ des 6 lysines) n'est pas affecté car les protons de cette fonction sont reconnus pour s'échanger très rapidement avec l'eau de la membrane. Les travaux de Harbison et coll. avaient déjà fait mention de ce fait. Finalement, les intensités des fréquences associées aux bases de Schiff sont peu affectées, suggérant ainsi que le proton s'échange avec suffisamment de rapidité. La question qui se pose ici est: quel est le mécanisme d'échange dans ce dernier cas? Nous avons déjà fait mention que le groupe de Vocelle a montré qu'à l'aide de modèles placés dans un environnement peu polaire tel le chloroforme, le proton d'un système base faible -acide faible s'échange très rapidement entre eux. Dans un solvant polaire protique comme le méthanol, le proton s'échange avec les protons du solvant et cela à une vitesse encore trop rapide à température ambiante mais à une vitesse suffisamment plus lente à plus basse température. Le spectre à la figure 18 d) pris à $-10^{\circ}C$ répond à cette question car les signaux des $^{15}N_{\epsilon}$ des bases de Schiff sont complètement disparus suggérant maintenant un échange suffisamment lent. La vitesse d'échange des bases de Schiff de la bR peut se comparer avec le modèle utilisant la base de Schiff du rétinal avec MCA dans le méthanol. Puisque nous avons montré qu'il n'existe aucune différence entre les cinétiques d'échange du méthanol et de l'eau, la comparaison au niveau des échanges entre les deux est encore plus révélatrice. Cette expérience renforce l'étude de Harbison et coll. qui avaient montré la possibilité d'échange du proton de l'eau avec la base de Schiff de la bR, grâce à une technique qui utilise le temps de relaxation de l'eau en fonction de l'intensité du signal résultant de la base de Schiff. A ce stade-ci, une première constatation s'impose: puisque les modèles nous apprennent que la cinétique d'échange est beaucoup plus rapide avec une base très forte (pK_a de 13), l'hypothèse d'un pK_a de 13 pour la base de Schiff de la bR telle que proposée par

Druckmann et coll. (48) semble aller à l'encontre de nos résultats.

Les spectres de la figure 19 présentent les échantillons de bR N-15 avec un ajout d'ions ${}^1\text{OH}$. La figure 19 a) montre un spectre pris à température ambiante. On y note quelques changements par rapport au spectre de la figure 18 a. Il est possible de supposer qu'à pH élevé, il y a eu déprotonation d'une ou de plusieurs fonctions amino des lysines, ce qui se voit par l'apparition d'un pic vers -5 ppm en accord avec les modèles des acides aminés en milieu basique (97). L'intensité des pics dus aux bases de Schiff n'a pas changé de façon significative. A la lumière de ces résultats, nous pouvons supposer que les ions ${}^1\text{OH}$ n'ont pas déprotoné les bases de Schiff. Notons toutefois que le pH à l'intérieur de la protéine pour cette expérience est seulement de 12 environ et que l'expérience de Callender indique qu'il faut un pH encore plus élevé pour déprotoner la base de Schiff. Le spectre 19 b) à -10°C est essentiellement le même que celui pris à la température ambiante. Finalement, l'incorporation d'un pulse à ce système à -10°C entraîne la disparition des signaux de la base de Schiff suggérant un échange lent tel qu'illustrée à la figure 19 c). Ceci confirme une fois de plus le manque d'accessibilité des ions ${}^1\text{OH}$ à la base de Schiff car nous avons montré que l'ajout d'ions ${}^1\text{OH}$ dans nos modèles accélère le processus d'échange.

Pour conclure, nos résultats sur la base de Schiff de la bR vont dans le sens d'une cinétique d'échange suffisamment lente et typique de celle obtenue avec un modèle ayant une base de Schiff et un acide faible dans un solvant protique tel que le méthanol (l'eau pouvant sans doute faire de même). Egalement, si le pK_a de la base de Schiff était de 13, telle que proposé dans les travaux de Druckmann, nos

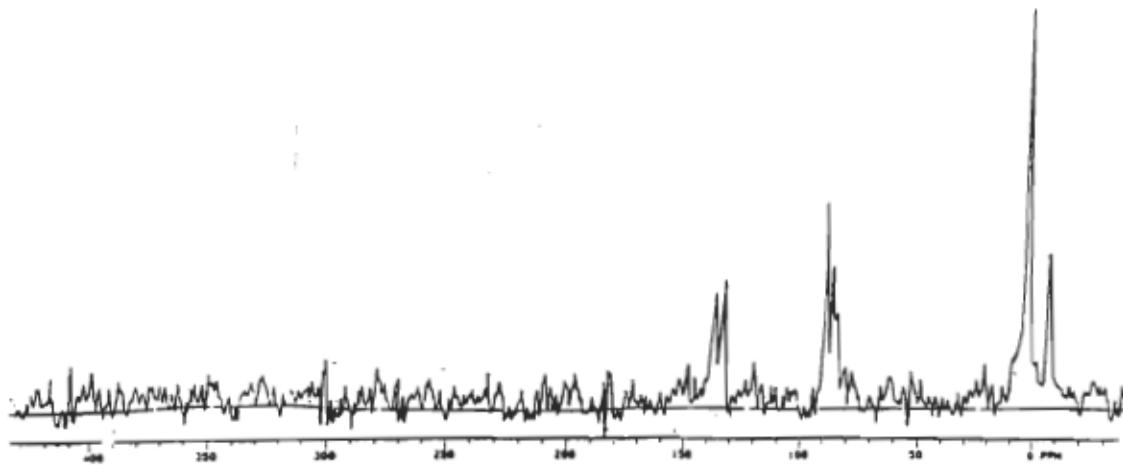


Figure 19 a): Spectre RMN N-15 de la bR enrichie, à pH 12, utilisant une séquence normale de CP à 20 °C.

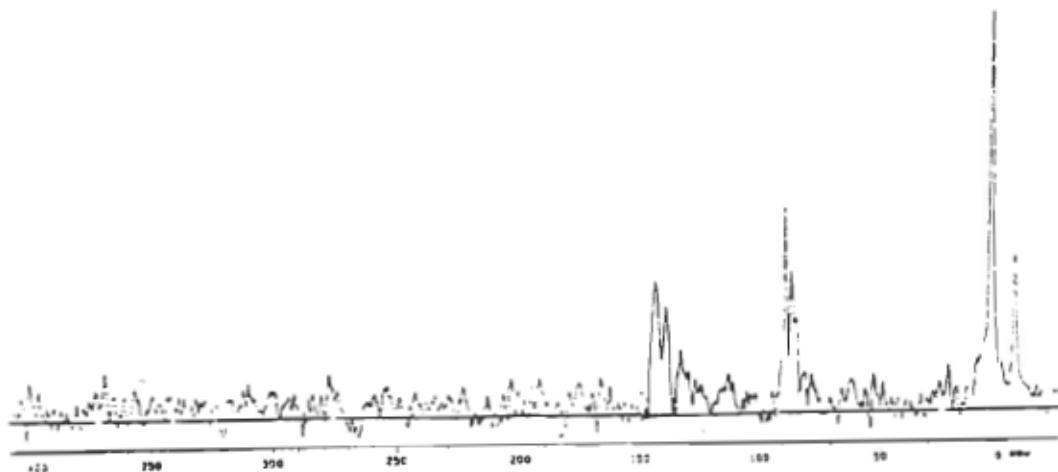


Figure 19 b): Spectre RMN N-15 de la bR enrichie, à pH 12, utilisant une séquence normale de CP à -10 °C.

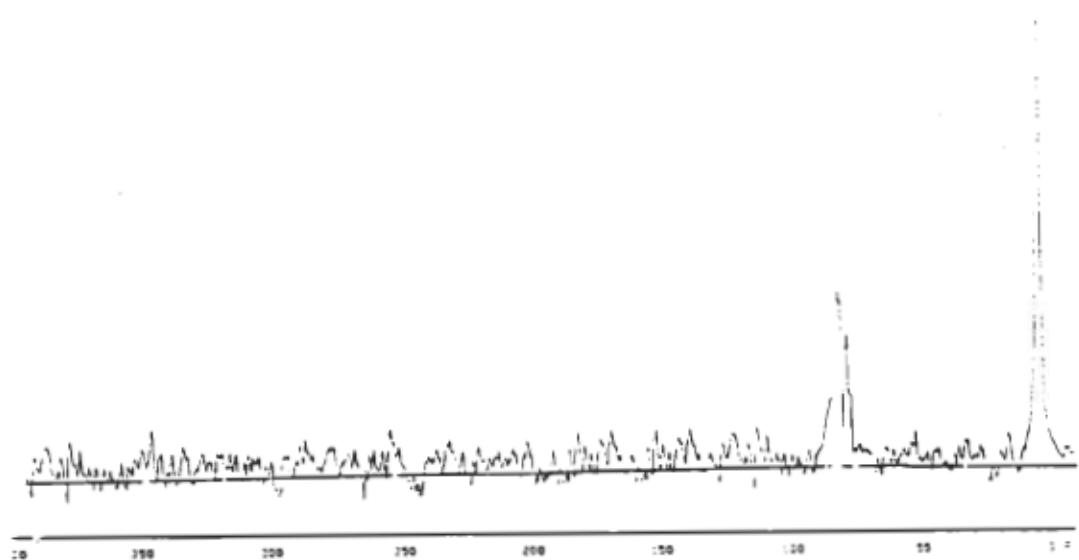


Figure 19 c): Spectre RMN N-15 de la bR enrichie, à pH 12, utilisant un délai sans découplage après CP à -10 °C.

modèles montrent que la cinétique d'échange serait plus rapide que celle observée et ce pour deux raisons: le pK_a élevé de la base et les ions ^-OH qui accélèrent l'échange. De plus, les ions ^-OH ne semblent pas avoir accès à la base de Schiff avec une bR ayant un pH d'environ une unité inférieure à celle proposée pour la déprotonation. Cependant, les ions ^-OH de notre système peuvent déprotoner une ou plusieurs molécules de lysine. De plus, on notera dans les spectres de la figure 19 que le massif amide est devenu plus étroit signifiant possiblement un début de désenroulement des chaînes de la protéine. En effet, si les interactions stériques d'une chaîne vis-à vis l'autre s'affaiblissent, les déplacements chimiques des amides auront tendance à se rapprocher (s'uniformiser) les uns des autres et ceci peut expliquer la bande étroite observée dans nos spectres. Ce résultat semble être confirmé par de récents travaux de Messaoudi et Boucher (98) par FTIR sur les bandes amides à ce niveau de pH dans la bactériorhodopsine.

CONCLUSION

En conclusion, voici les principaux points qui se dégagent de cette thèse.

Nos résultats thermodynamiques montrent que la protonation dans un solvant peu polaire tel le chloroforme est incomplète lorsqu'un acide de même force que ceux des acides aminés est présent en rapport équimolaire avec une imine de pK_a similaire à la NRBA. De plus l'équation 3 est incomplète pour décrire ce système et l'on doit faire appel à deux équilibres successifs tel que montré à l'équation 4. Il est également possible de relier des paramètres thermodynamiques comme l'énergie libre et l'enthalpie au pK_a des acides carboxyliques mesurés dans l'eau.

L'hypothèse d'un pK_a de 13 pour la base de Schiff de la bactériorhodopsine est remise en question par les points suivants:

- 1) Une quantité importante d'énergie devrait être libérée pour la reprotontonation de M_{412} à bR_{570} pour expliquer les enthalpies obtenues avec de tel gradient de pK_a et ceci ne semble pas être le cas.
- 2) La cinétique d'échange entre le proton et l'azote de la base de Schiff de la bR est relativement lente et suggère que l'eau doit jouer un rôle important pour ralentir l'échange. De plus cette cinétique va à l'encontre de celle anticipée avec un pK_a de 13 avec accès aux ions hydroxydes.
- 3) Notre expérience avec une bR à pH de 12 semble montrer l'inaccessibilité des ions hydroxydes à la base de Schiff. Pourtant ces ions semblent produire un effet sur la protonation des lysines et le déenroulement de la structure tertiaire de la

protéine.

4) Le pK_a de 13 expliquerait clairement la protonation. S'il advenait que ce pK_a ne soit pas de 13, nos modèles peuvent toutefois l'expliquer avec des scénarios parfaitement plausibles pour ce genre de protéine; à savoir qu'un ou deux acides jumelés avec un équivalent d'eau suffirait pour obtenir une protonation complète.

A l'aide de mutants pouvant remplacer spécifiquement certains acides carboxyliques de la protéine, les travaux du groupe de Khorana (52) suggèrent la participation d'au moins deux acides à la protonation de la base de Schiff dans la bactériorhodopsine. Nos travaux semblent donc aller dans ce sens.

5) Une étude récente du groupe de Herzfeld (85) a suggéré un mécanisme pour expliquer l'état de protonation de la bR. Celui-ci est similaire à celui proposé à la figure 15 de ce travail pour expliquer la complexation de deux acides carboxyliques, un équivalent d'eau et un équivalent d'une base de Schiff du rétinal.

Références

1. G. Wald. Am. J. Physiol. **133**, 1476 (1941).
2. H. Shichi. Dans Biochemistry of Vision. Academic Press, New-York. 1983. p.12
3. H. Shichi. Dans Biochemistry of Vision. Academic Press, New-York. 1983. p.2
4. H. Shichi. Dans Biochemistry of Vision. Academic Press, New-York. 1983. p.20
5. H. Shichi. Dans Biochemistry of Vision. Academic Press, New-York. 1983. p.222
6. Y. A. Ovchinnikov, N.G. Abdulaev, M.Y. Fergina, A. V. Kiselev, et N.A. Lobanov. FEBS lett., **100**, 219 (1979).
7. R. Henderson et P. Unwin. Nature, **257**, 28 (1975).
8. Y. A. Ovchinnikov, N.G. Abdulaev, M.Y. Fergina, A. V. Kiselev, et N.A. Lobanov. FEBS lett., **84**, 1 (1977).
9. T. Yoshizawa et G. Wald. Nature, **197**, 1279 (1963).
10. V. Balogh-Nair et K. Nakanishi. Dans New Comprehensive Biochemistry. **Vol 3**. Stereochemistry. édité par Ch. Tamm. Elsevier Biomedical Press.1982. p. 289
11. T. Yoshizawa et G. Wald. Nature, **201**, 340 (1964).
12. C. Sandorfy et D. Vocelle. Can. J. Chem. **64**, 2251 (1986).
13. P.E. Blatz. Photochem. Photobiol. **15**, 1 (1972).
14. P.E. Blatz, D.L. Pippert, et V. Balasubramaniyan. Photochem. Photobiol. **8**, 309 (1972).
15. K. Nakanishi, M. Arnaboldi, G.M. Motto, K. Tsujimoto, et V. Balogh-Nair. J. Am. Chem. Soc. **102**,7945 (1980).
16. K. Nakanishi, M. Arnaboldi, G.M. Motto, K. Tsujimoto, et V. Balogh-Nair. J. Am. Chem. Soc. **101**,7082 (1979).
17. E.A. Dratz et P. Hargrave. Trends. Biochem. Sci. **8**, 128 (1983).

18. A. Cooper. *Nature*, **282**, 531 (1979).
19. F. Boucher et R. M. Leblanc. *Photochem. Photobiol.* **41**, 459 (1985).
20. J.B. Hurley, T.G. Ebrey, et B. Honig. *Nature*, **270**, 540 (1977).
21. K. Peters, M.L. Appleburry, et P.M. Rentzepis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 3119 (1977).
22. B. Honig, T. Ebrey, R.H. Callender, V. Dinur, et M. Ottolenghi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2503 (1979).
23. A. Warshel et N. Barboy. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1469 (1982).
24. R.H.S. Liu et A.E. Asoto. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 259 (1985).
25. H. Deng et R.H. Callender. *Biochemistry*, **26**, 7418 (1987).
26. I. Palings, J.A. Pardoen, C. Winkel, E. van den Berg, J. Lugtenburg, et R.A. Mathies. *Biochemistry*, **26**, 2544 (1987).
27. C.N. Rafferty et H. Shichi. *Photochem. Photobiol.* **33**, 229 (1981).
28. H. Shichi. Dans *Biochemistry of Vision*. Academic Press, New-York. 1983. p.229
29. R.R. Birge. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 341, (1981).
30. P. Hildebrandt et M. Stockburger. *Biochemistry*, **23**, 5539 (1984).
31. F. Siebert, W. Mäntele, et K. Gerwert. *Eur. J. Biochem.* **136**, 199 (1983).
32. N.A.A. Dencher et G. Buldt. Dans *Molecular Retinal Protein*. Edité par T. Hara. Yamada Science Foundation, Osaka. Japon. 1988 p.109
33. M. Bissonnette et D. Vocelle. *Int. J. Spectrosc.* **2**, 120 (1983).
34. M. Bissonnette, H. Le-Thanh, et D. Vocelle. *Can. J. Chem.* **65**, 661 (1984).
35. P.E. Blatz et J.H. Mohler. *Biochemistry*, **14**, 2304 (1975).
36. P.E. Blatz, J.H. Mohler, et H.V. Navangul. *Biochemistry*, **11**, 848 (1972).

37. P.E. Blatz et D.L. Pippert. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1296 (1968).
38. A.R. Oseroff et R.H. Callender. *Biochemistry* **13**, 4243 (1974).
39. S.O. Smith, A.B. Myers, R.A. Mathies, J.A. Pardo, C. Winkel, E. van den Berg, et J. Lugtenburg. *Biophys. J.* **47**, 653 (1985).
40. A. Lewis, J. Spoohower, R.A. Bogomolni, R.H. Lauzier et W. Stoeckenius. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 4462 (1974).
41. W. Stoeckenius, et R.A. Bogomolni. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 587 (1982).
42. A.G. Doukas, B. Aton, T.G. Ebrey, et R.H. Callender. *Biochemistry*, **17**, 2430 (1978).
43. J. Favrot, D. Vocelle, et C. Sandorfy. *Photochem. Photobiol.* **30**, 417 (1979).
44. S. Alex, P. Turcotte, R. Fournier, et D. Vocelle. *Can. J. Chem.* **69**, 239 (1991).
45. A.M. Schaffer, T. Yamaska, et R.S. Becker. *Photochem. Photobiol.* **21**, 297 (1975).
46. C. Rhofir, C. Sandorfy, et D. Vocelle. *Res. Chem. Int.* **12**, 131 (1989).
47. D. Cossette et D. Vocelle. *Can. J. Chem.* **65**, 1576 (1987).
48. S. Druckmann, M. Ottolenghi, A. Pande, J. Pande, et R.H. Callender. *Biochemistry*, **21**, 4953 (1982).
49. A. Cooper, S.F. Dixon, M.A. Nutley, et J.L. Roob. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7256 (1987).
50. M. Sheves, A. Albeck, N. Friedman, et M. Ottolenghi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3232 (1986).
51. M. Engelhard, K. Gerwert, B. Hess, W. Kreutz, et F. Siebert. *Biochemistry*, **24**, 400 (1985).
52. H. Otto, T. Marti, M. Holz, T. Mogi, L.J. Stern, F. Engel, H.G. Khorana, et M.P. Heyn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1018 (1990).
53. S.K. Al-Dilaimi, J.C. Aumiller, R.H. Johnson, et P.E. Blatz. *Photochem. Photobiol.* **46**, 403 (1987).
54. T.S. Sorensen et E.M. Kosower. *J. Org. Chem.* **28**, 692 (1963).

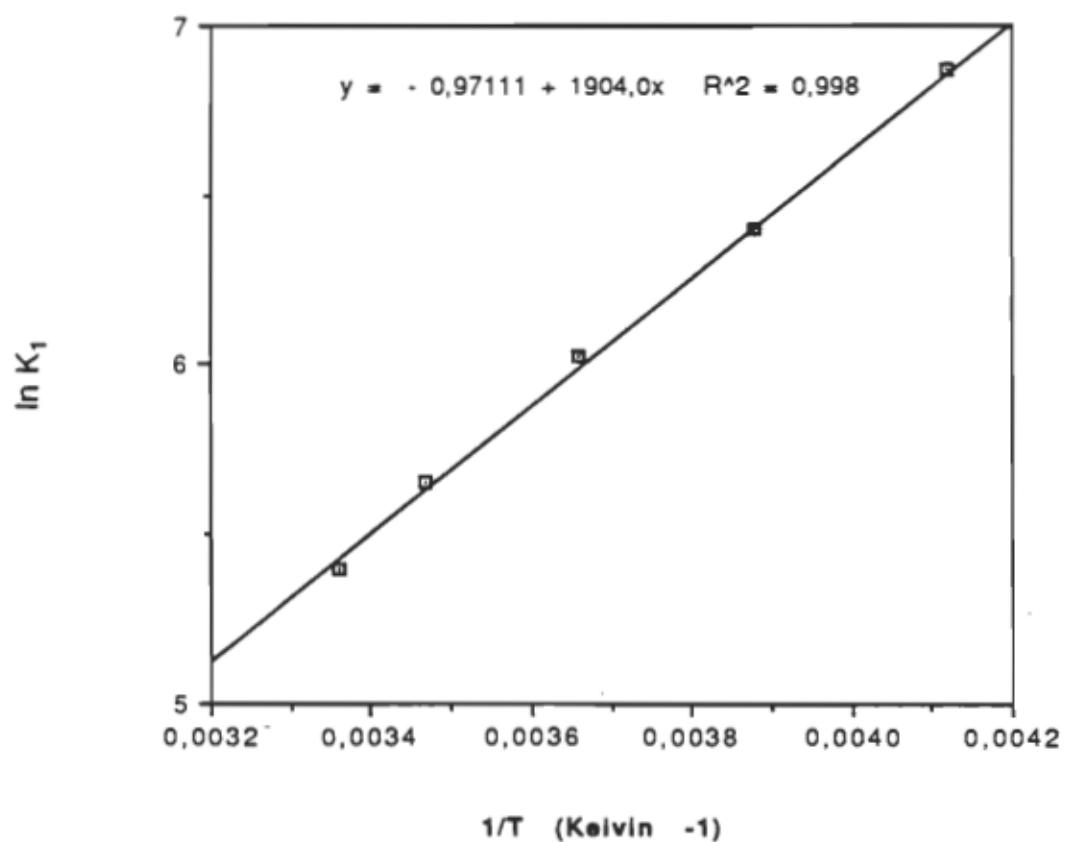
55. L.S. Lussier, C. Sandorfy, H. Le-Thanh, et D. Vocelle. *J. Phys. Chem.* **91**, 2282 (1987).
56. D. Cossette et D. Vocelle. *Can. J. Chem.* **65**, 661 (1987).
57. M. Bissonnette et D. Vocelle. *Chem. Phys. Lett.* **111**, 506 (1984).
58. H. Merz et G. Zundel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **138**, 819 (1986).
59. H. Le-Thanh et D. Vocelle. *Can. J. Chem.* **68**, 1909 (1990).
60. H. Le-Thanh, G. Richer, C. Sandorfy, P.P. Vaudreuil, et D. Vocelle. *Can. J. of Spectrosc.* **33**, 128 (1988).
61. P. Dupuis, Thèse de Doctorat. Université de Montréal, (1980).
62. R.R. Birge. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 315 (1981).
63. J. Nasielski et E.V. Donckt. *Spectrochim. Acta*, **19**, 1989 (1963).
64. S.N. Vinogradov et R.H. Linnell. *Hydrogen Bonding*. Edité par Van Nostrand Reinhold Co. p. 108 (1971).
65. P. Huyskens et T. Huyskens. *Molecular Interactions* **Vol 2**, 1-106 (1980).
66. U. Böhner et G. Zundel. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*. **81**, 1425 (1985).
67. E.F. Caldin, J.E. Crooks, et D. O'Donnell. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*. **69**, 1000 (1973).
68. V.L. Kristoforov, E.N. Zvonkova, et R.P. Evtigneeva. *Zh. Obs. Khim.* **44**, 909 (1974).
69. A.A. Mashkovski et S.E. Odinokov. *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.* **204**, 1165 (1972).
70. V.A. Khon. *Zh. Fiz. Khim.* **45**, 960 (1971).
71. B.V. Rassidin et A.V. logansen. *Zhur. Prikl. Spektrosk.* **10**, 291 (1969).
72. E.M. Arnett. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4052 (1971).
73. E.F. Caldin. *Chem. Rev.* **69**, 135 (1969).

74. S.N. Vinogradov et R.H. Linnell. *Hydrogen Bonding*. Edité par Van Nostrand Reinhold Co. p. 122 (1971).
75. B.V. Rassidin, A.V. logansen, A.A. Mashkovsky, et S.E. Odinokov. *Spectrochim. Acta* **32A**, 1355 (1976).
76. M.S. Braiman, T. Mogi, T. Marti, L.J. Stern, H.G. Khorana, et K.J. Rothschild. *Biochemistry* **27**, 8516 (1988).
77. R. Birge, A.F. Lawrence, T. M. Cooper, C.T. Martin, D.F. Blair, et S.I. Chan. Dans *Nonlinear Electrodyn. Biol. Syst.* Edité par A.W. Ross et A.F. Albert, New-York. 1983 p. 107
78. T. Isawa, F. Tokunaga, et T Yoshizawa. *Can. J. Chem.* **63**, 1891 (1985).
79. G.S. Harbison, J.E. Roberts, J. Herzfeld, et R.G. Griffin. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7221 (1988).
80. R. Lindemann et G. Zundel. *J. Chem. Soc. Faraday II*. **73**, 788 (1977).
81. J.W. Shriver, E.W. Abrahamson, et G.D. Mateescu. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 2407 (1976).
82. S.N. Vinogradov et R.H. Linnell. *Hydrogen Bonding*. Edité par Van Nostrand Reinhold Co. p. 50 (1971).
83. T. Baasov, N. Friedman, et M. Sheves. *Biochemistry*, **26**, 3210 (1987).
84. G.S. Denisov, G.V. Gusakova, et A.L. Smolyansky. *Journal of Mol. Struct.* **15**, 377 (1973).
85. H.J.M. de Groot, S.O. Smith, J. Courtin, E. van den Berg, C. Winkel, J. Lutgengurg, R.G. Griffin, et J. Herzfeld. *Biochemistry* **29**, 6873 (1990).
86. S. Pnevmatikos. *Phys. Rev. Lett.* **60**, 1534 (1988).
87. T. Baasov et M. Sheves. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7524 (1985).
88. G.D. Mateescu, W.G. Copan, D.D. Muccio, D.V. Waterhouse, et E.W. Abrahamson. *Proceedings of International Symposium on Synthesis and Applications of Isotopically Compounds*. Edités par W.P. Duncan et A. Susan, Elsevier, Amsterdam (1983).

89. A. Bax. Dans Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in liquids. Edité par Delft Univ Press, Amsterdam. 1982
90. L. Mueller, R.A. Schiksnis et S.J. Opella. *J. Magn. Res.* **66**, 379 (1986).
91. G.S. Harbison, J. Herzfeld et R.G. Griffin. *Biochemistry*, **22**, 1 (1983).
92. M. Bissonnette, H. Le-Thanh, et D. Vocelle. *Can J. Chem.* **63**, 2298 (1985).
93. P.V. Hargrave, K.J. Rothschild, A.M. Kawamoto, J. Herzfeld, et C.W. Herlihy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 1643 (1981).
94. S.J. Opella et M.H. Frey *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 5854 (1979).
95. M. Engelhard, B. Hess, D. Emeis, G. Metz, W. Kreutz, et F. Siebert *Biochemistry* **28**, 3967 (1989).
96. A. Bax. dans *Interpretation of 2D NMR Spectra*. Edité par Heyden, London. 1983
97. G.J. Martin. Dans *N-15 NMR Spectroscopy*. Springer-Verlag. 1981
98. A.S. Messaoudi et F. Boucher. *J. Mol Struct.* (sous presse)

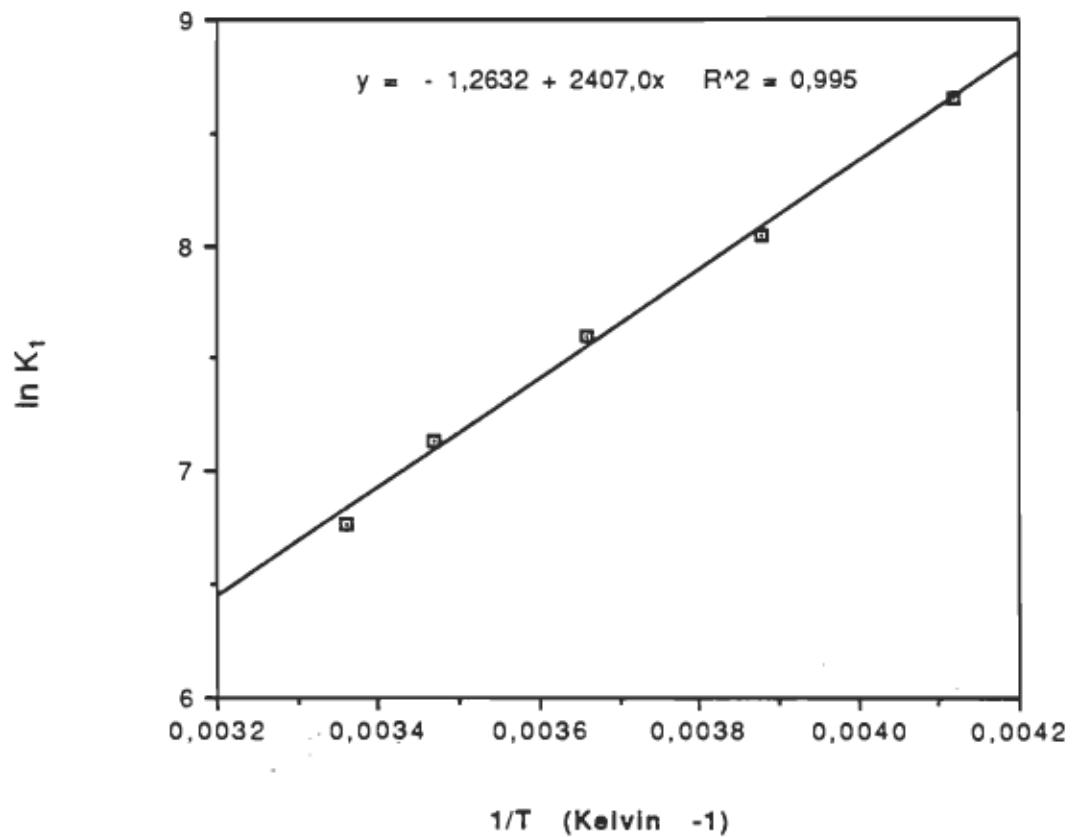
Liste des annexes

- Gr.2 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour Pr (p.109).
- Gr.3 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour NO_2 (p.110).
- Gr.4 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour MIA (p.111).
- Gr.5 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour MCA (p.112).
- Gr.6 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour DCA (p.113).
- Gr.7 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour TCA (p.114).
- Gr.8 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour Pr (p.115).
- Gr.9 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour NO_2 (p.116).
- Gr.10 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour MIA (p.117).
- Gr.11 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour MCA (p.118).
- Gr.12 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour DCA (p.119).
- Gr.13 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour TCA (p.120).
- Fig. 20 Spectre FTIR de NRBA dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.121).
- Fig. 21 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.122).
- Fig. 22 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 1 eau dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.123).
- Fig. 23 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 4 eau dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}) (p.124).

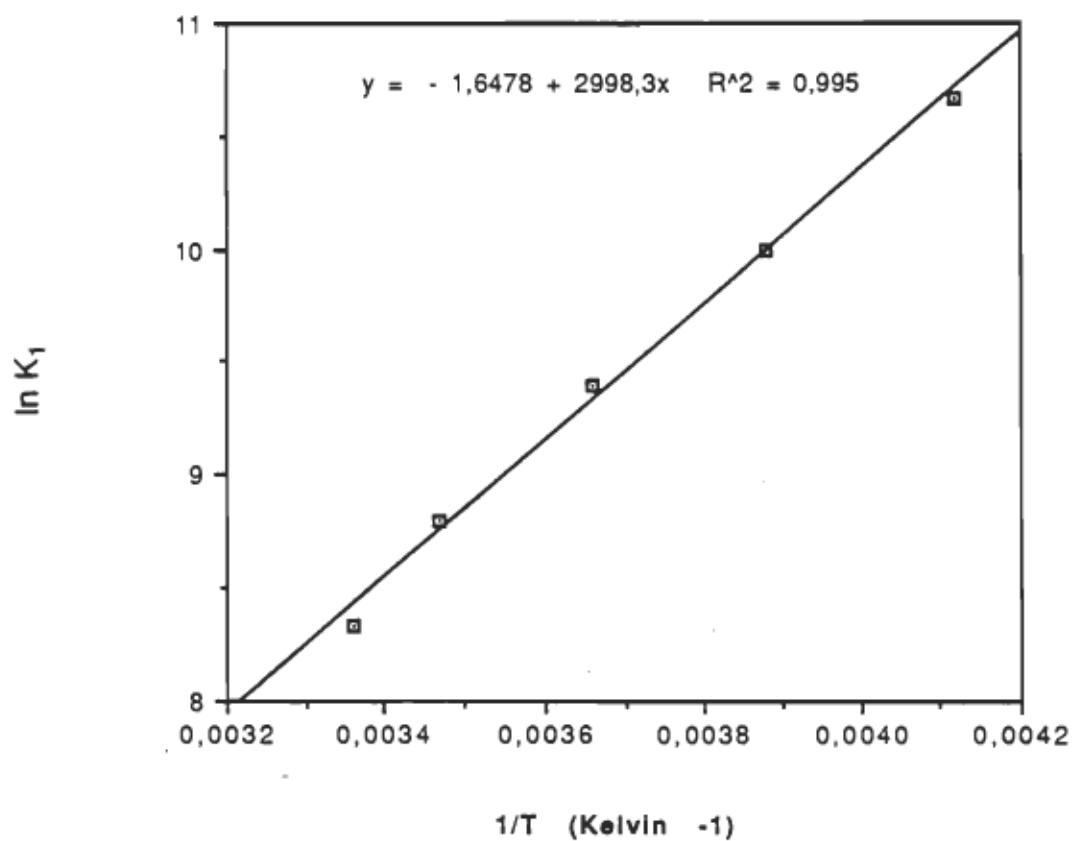


Gr.2

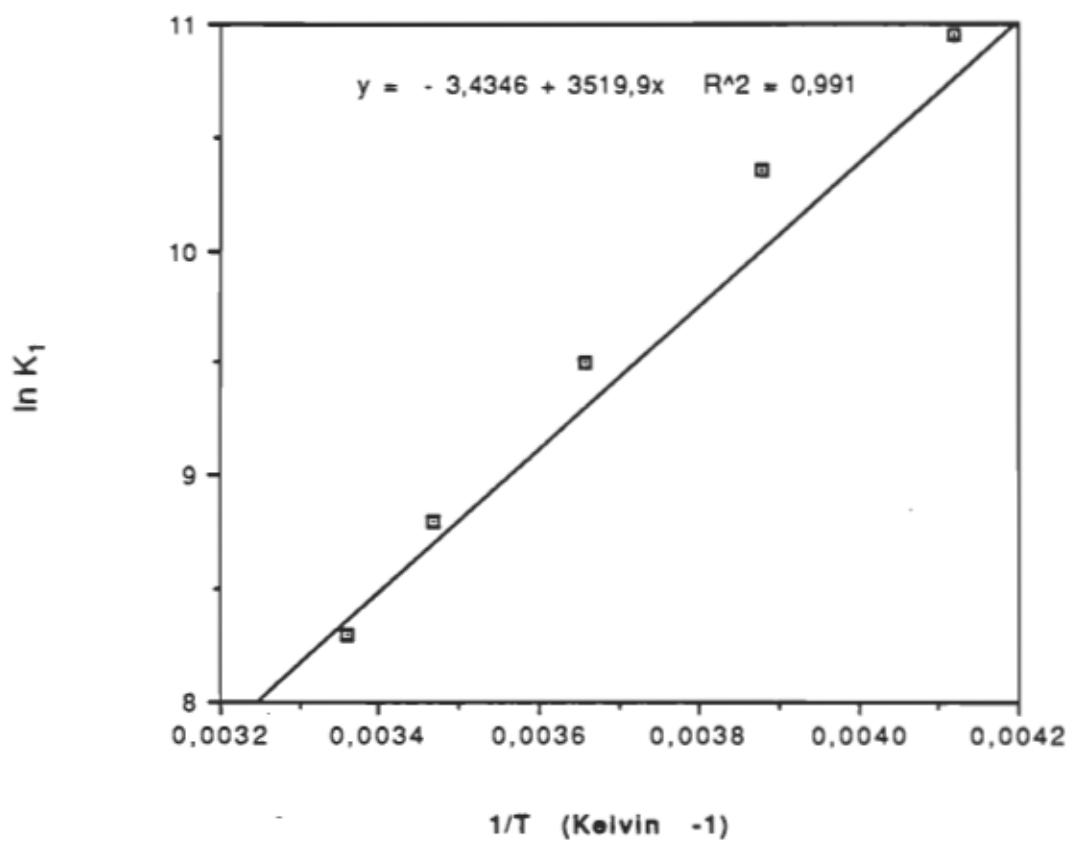
 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour Pr.



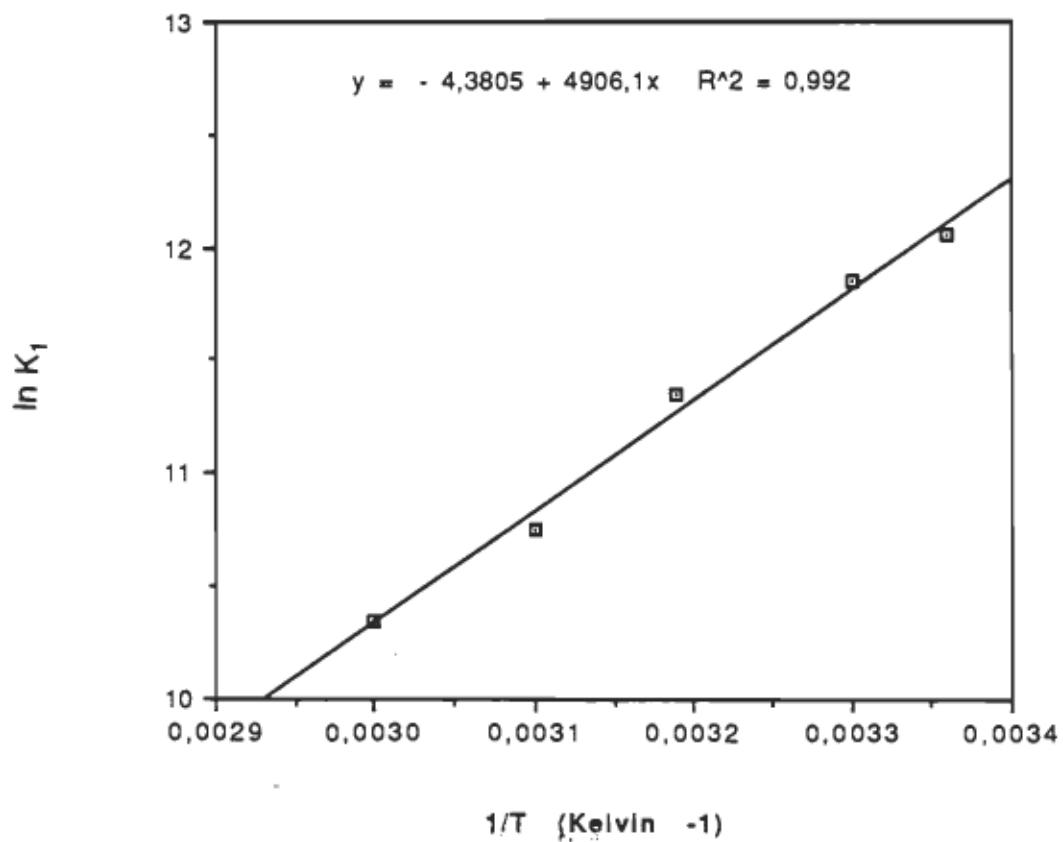
Gr.3 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour NO_2 .



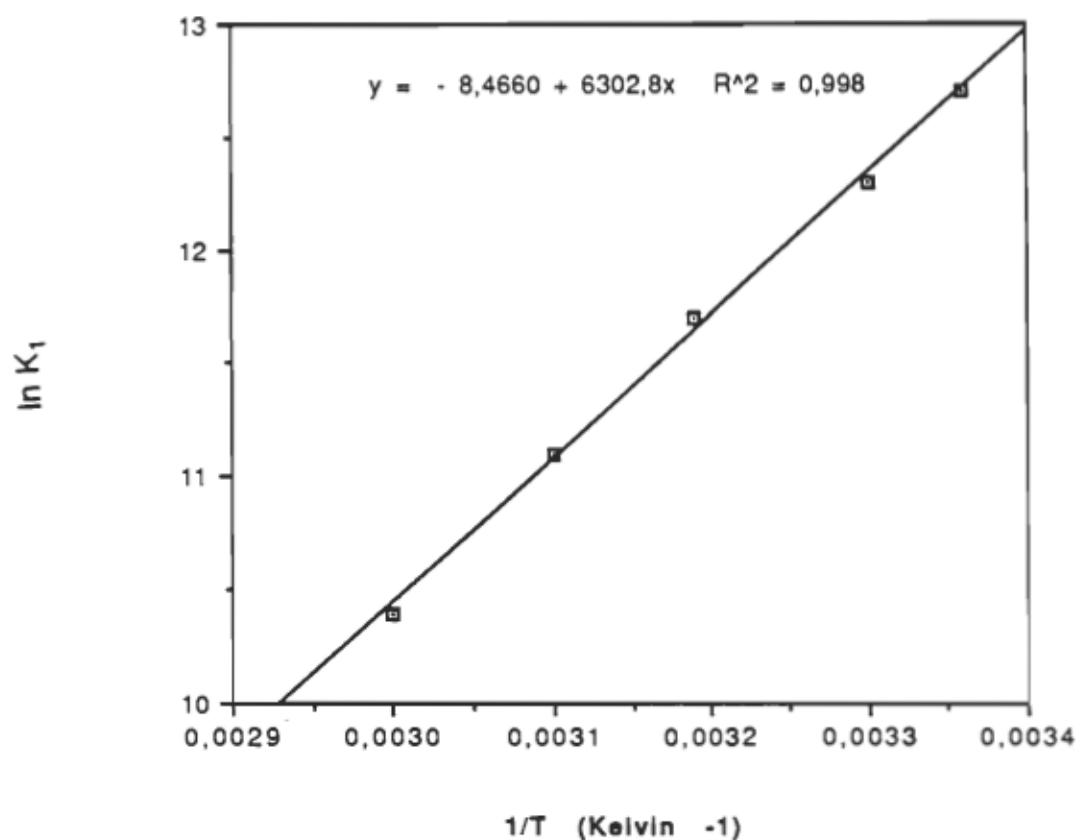
Gr.4 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour MIA.



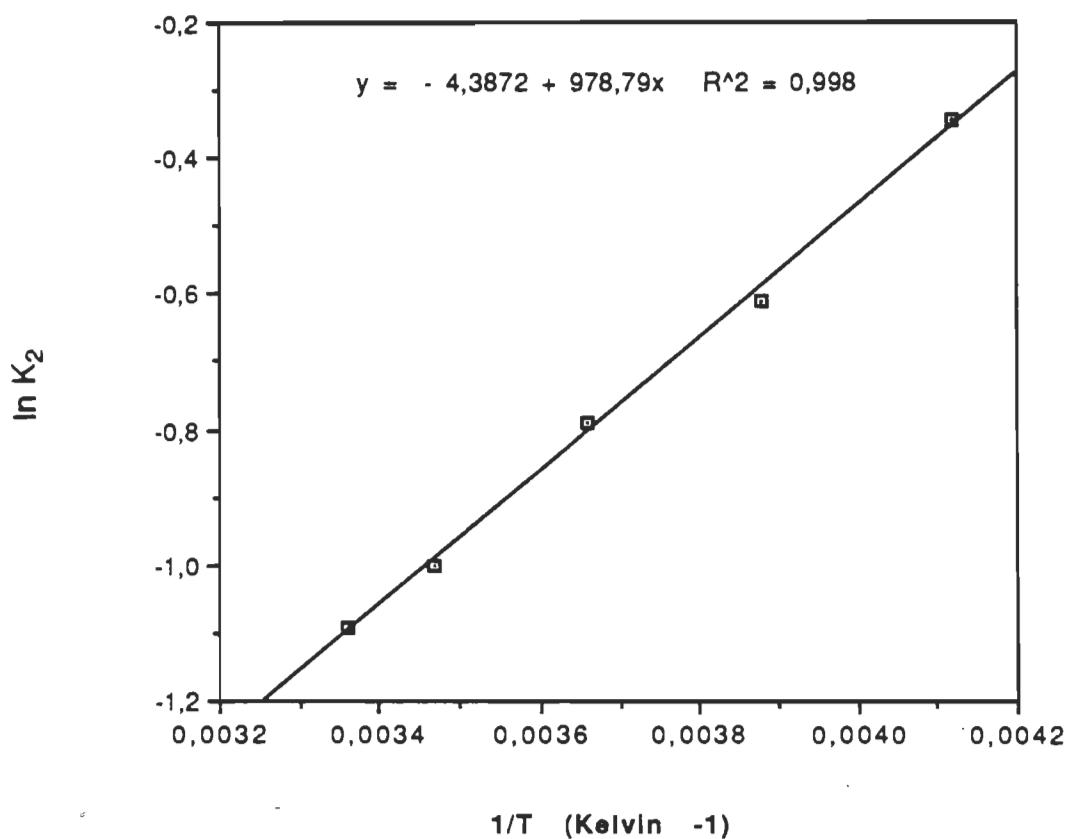
Gr.5 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour MCA.



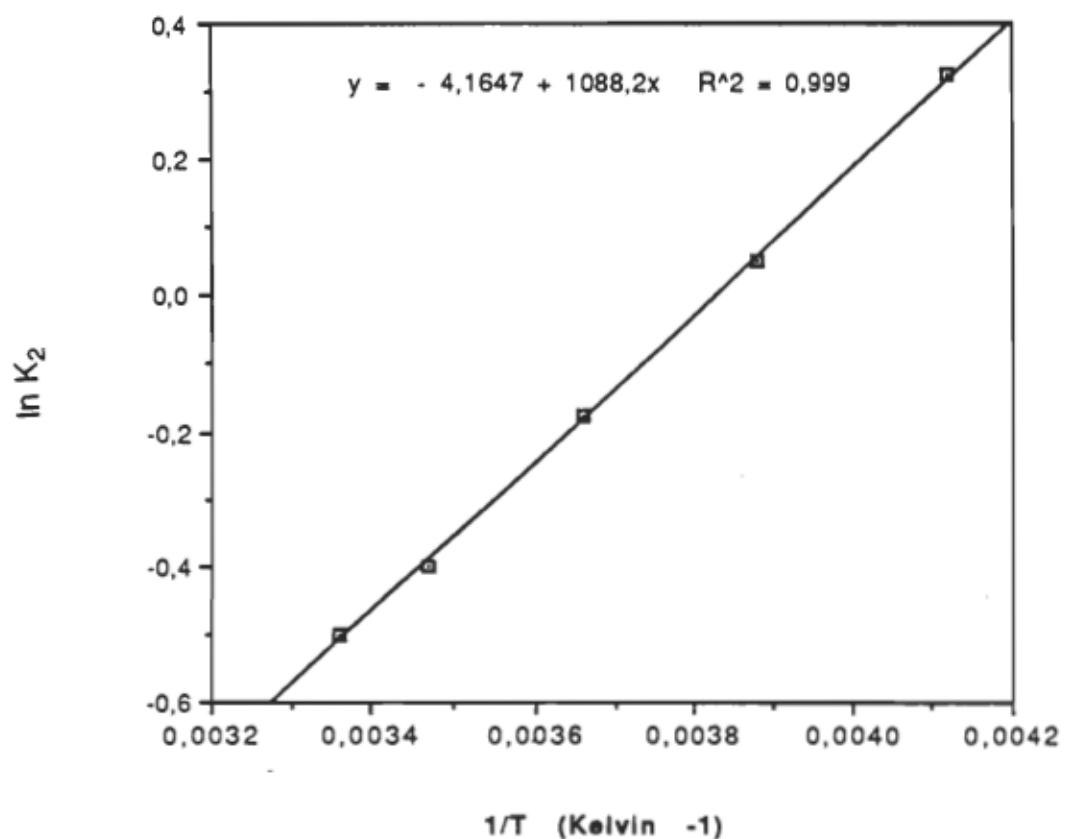
Gr.6 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour DCA.



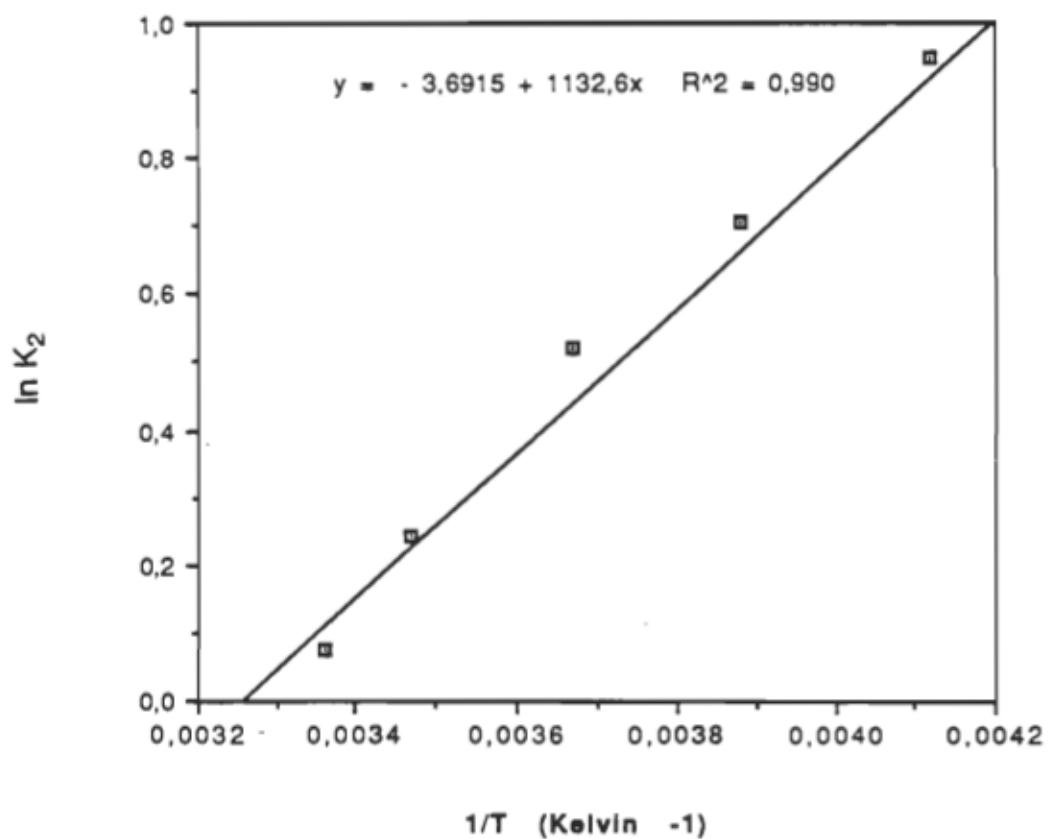
Gr.7 $\ln K_1$ en fonction de l'inverse de la température pour TCA.



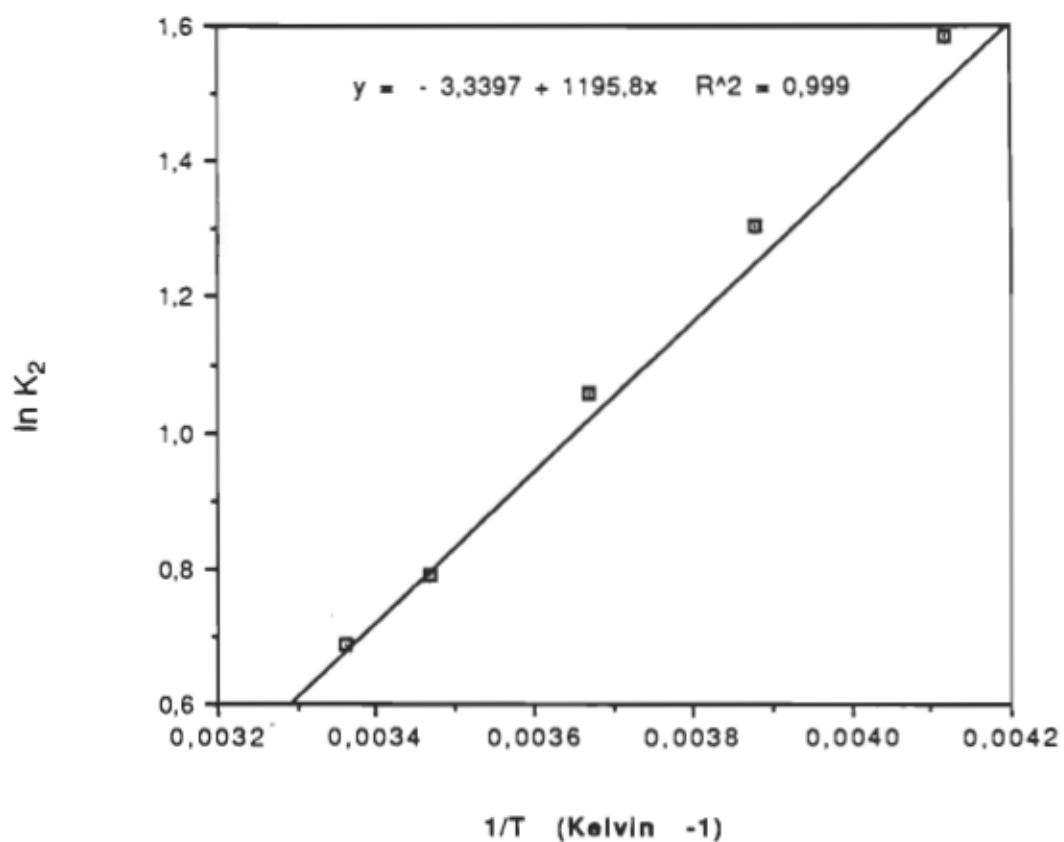
Gr.8 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour Pr.



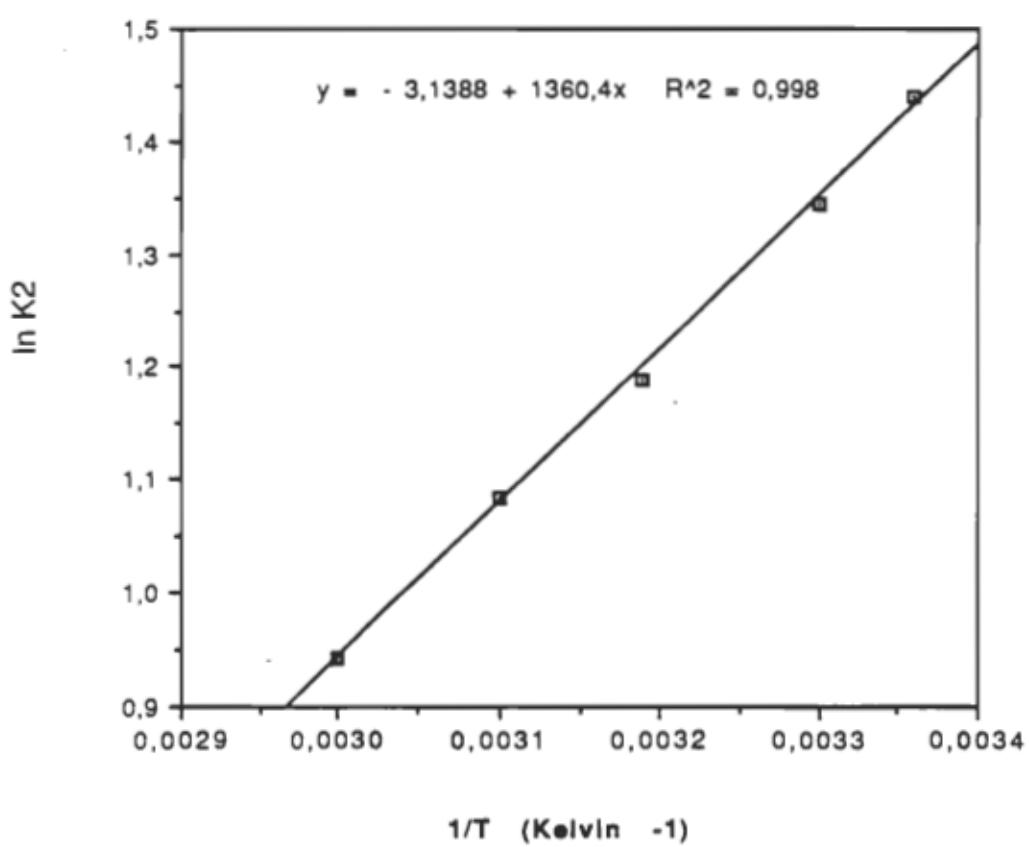
Gr.9 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour NO_2 .



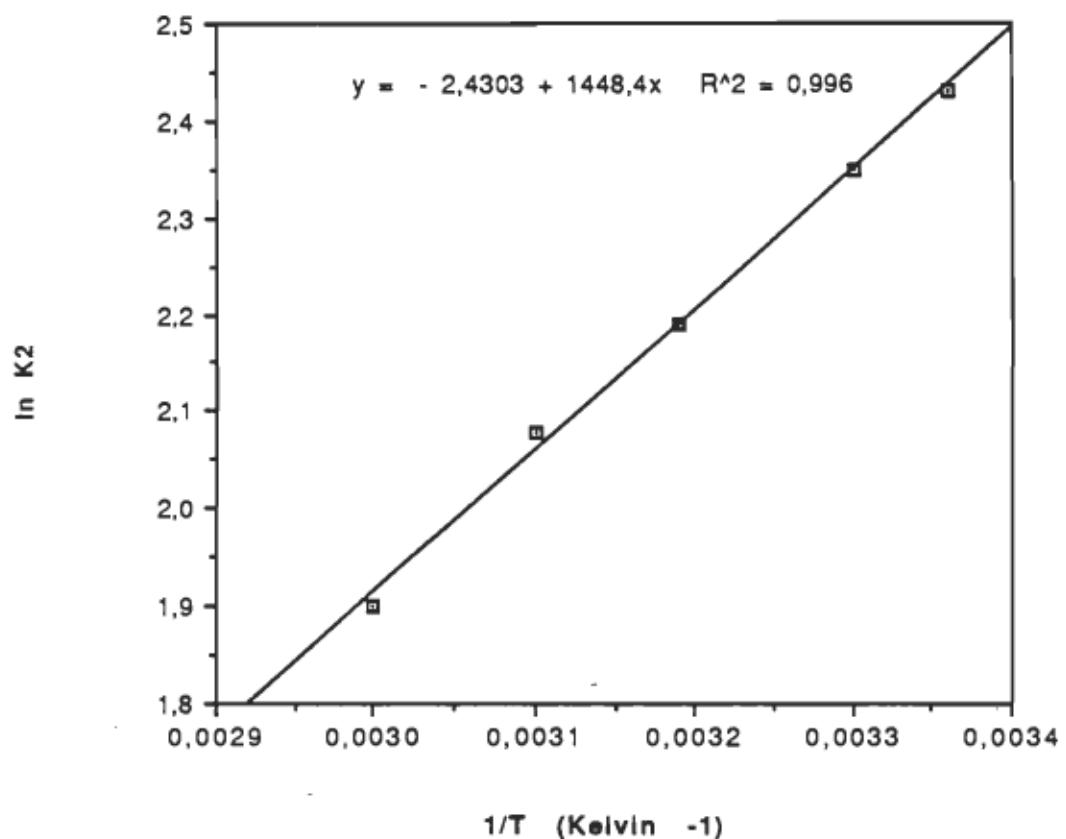
Gr.10 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour MIA.



Gr.11 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour MCA.



Gr.12 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour DCA.



Gr.13 $\ln K_2$ en fonction de l'inverse de la température pour TCA.

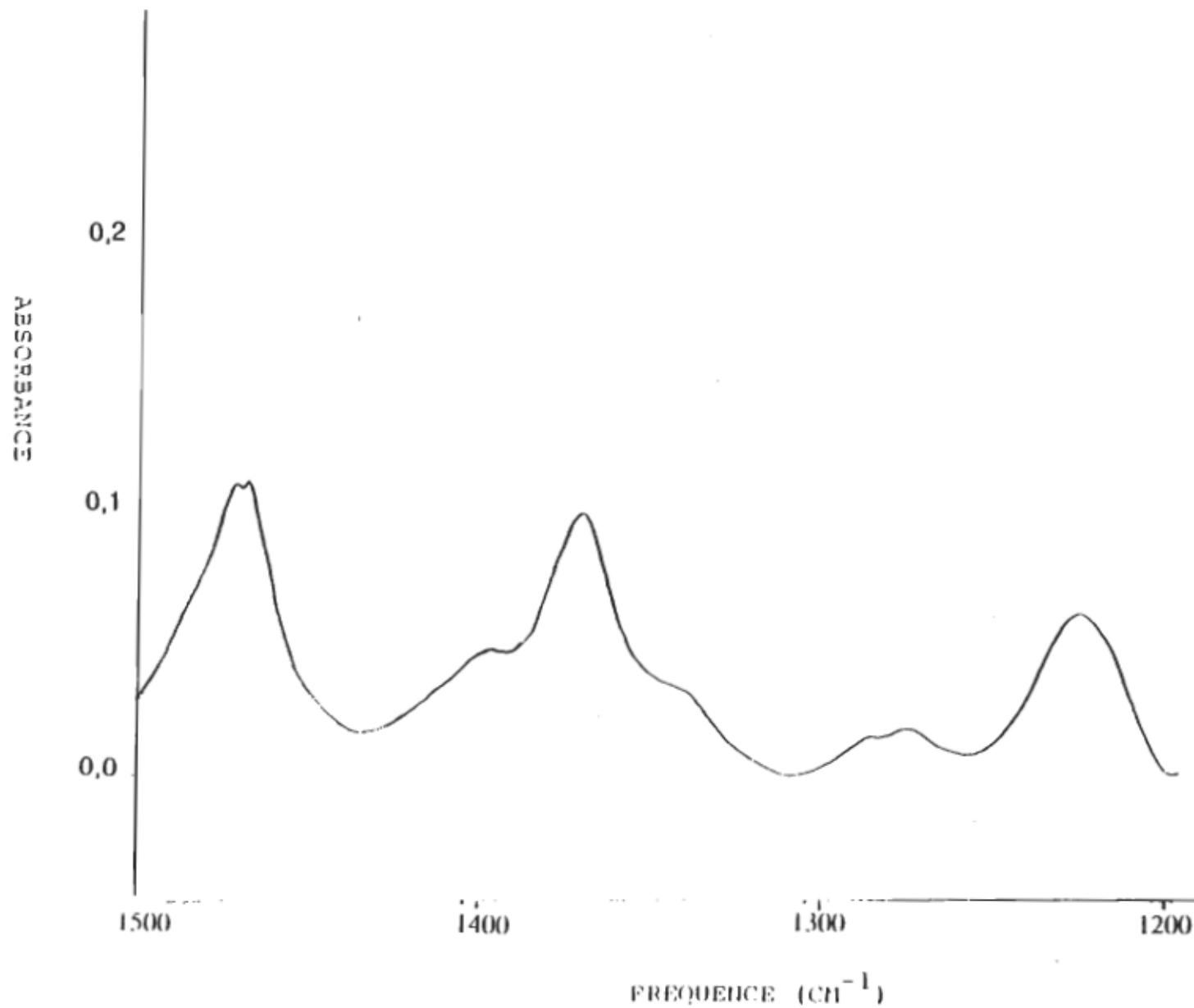


Fig. 20 Spectre FTIR de NRBA dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}).

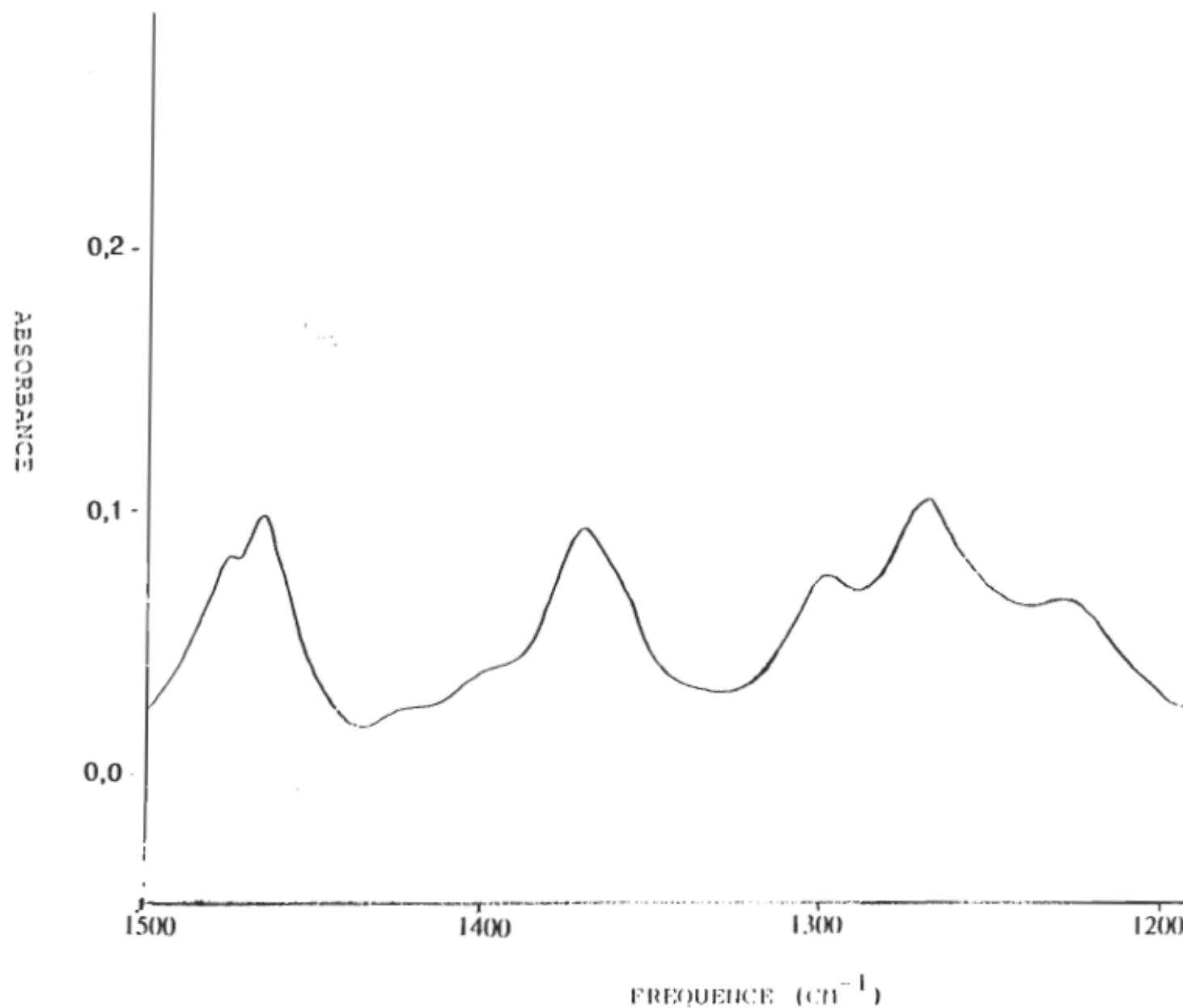


Fig. 21 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}).

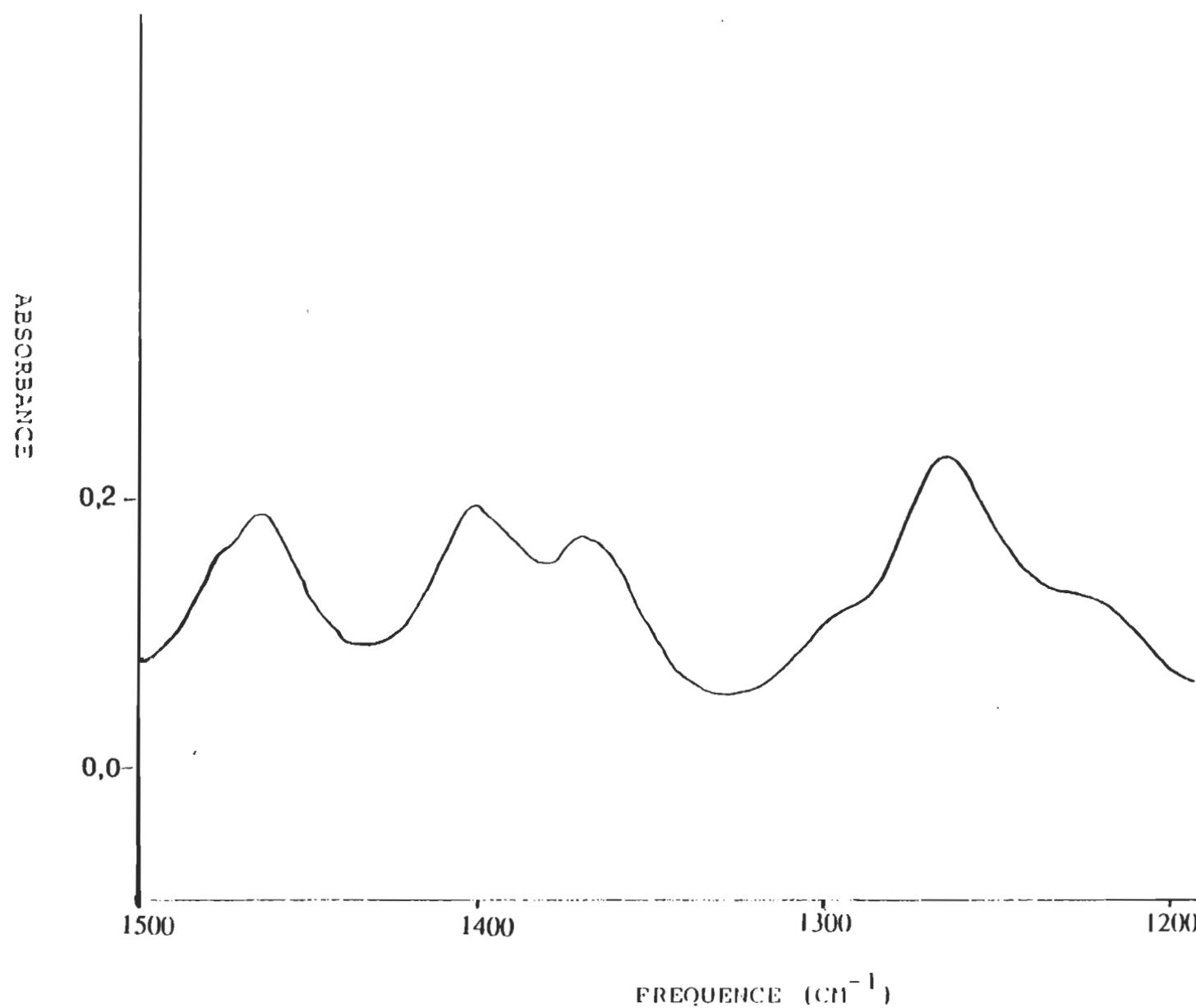


Fig. 22 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 1 eau dans le KBr (1200-1500 cm⁻¹).

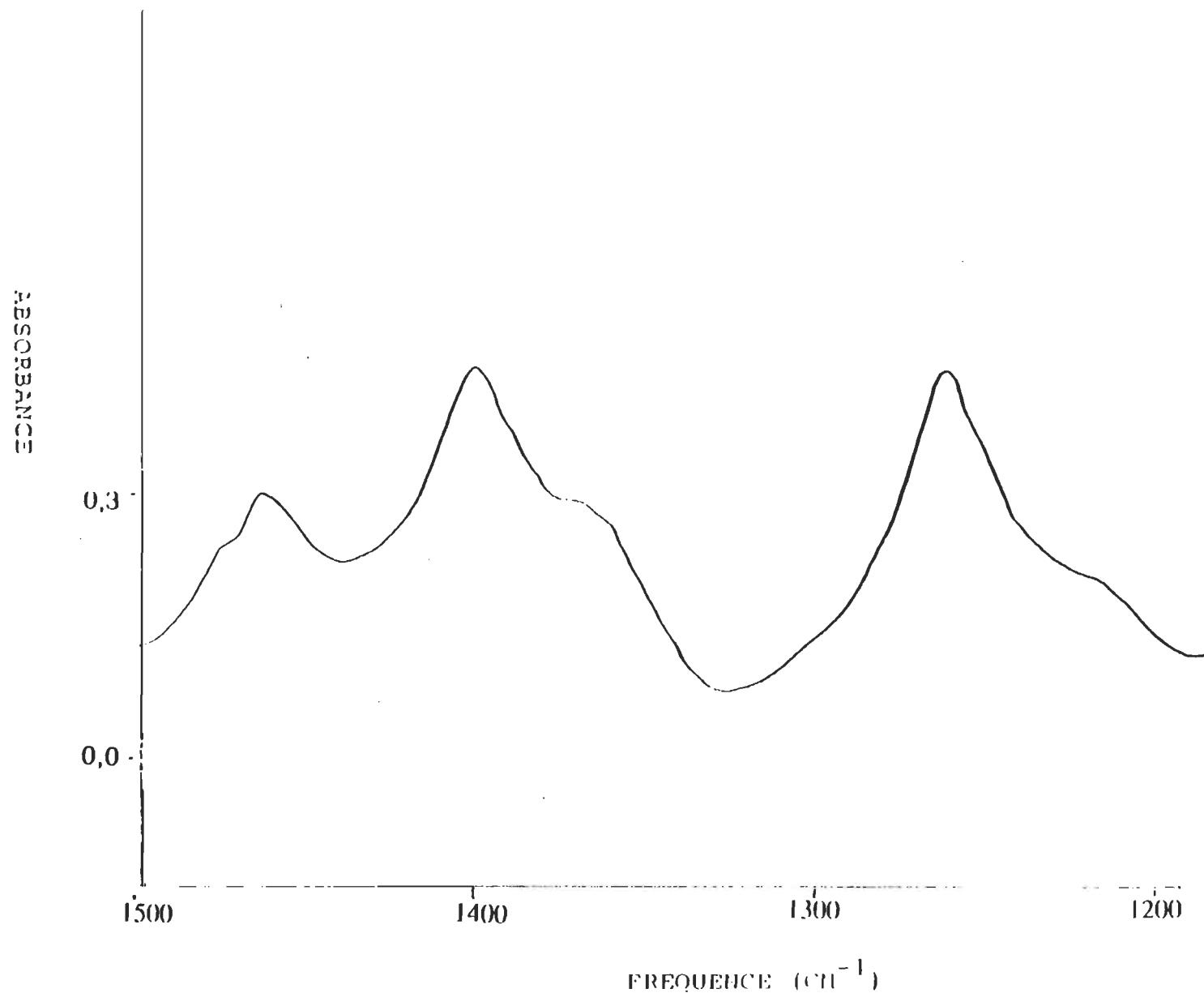


Fig. 23 Spectre FTIR de 1 NRBA/1 acide acétique/ 4 eau dans le KBr (1200-1500 cm^{-1}).