

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A  
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
ISABELLE DAIGLE

ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DE LA  
PERTURBATION DES MEMBRANES PHOTORECEPTRICES  
PAR LES ANESTHESIQUES GENERAUX

AVRIL 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

## RESUME

Les anesthésiques généraux sont des molécules agissant au niveau du système nerveux. Malgré de nombreuses années d'utilisation de ces molécules en médecine, le mécanisme moléculaire de même que la cible précise de leur action restent encore à définir. La cible ultime de l'action des anesthésiques se situe au niveau des protéines membranaires. Trois mécanismes d'action potentiels des molécules d'anesthésiques sur les protéines cibles sont envisagées, soit une action indirecte sur les protéines via une perturbation de la phase lipidique, une action à l'interface lipides/protéines ou une action directe par interactions avec les protéines cibles.

Les expériences effectuées au cours de ce travail utilisent les membranes pourpres des Halobactéries de même que les membranes discales des bâtonnets rétiens comme systèmes modèles permettant l'étude de l'action membranaire des anesthésiques généraux. Ces membranes contiennent un pigment, la bactériorhodopsine et la rhodopsine respectivement, possédant chacun le rétinol comme chromophore.

Des études antérieures ont montré une action des anesthésiques généraux sur les MP se manifestant par une modification de leur spectre d'absorption dans l'UV-visible (Pande et al., 1989b). Les études effectuées en résonance Raman ont permis de localiser plus précisément cette action au niveau des interactions entre le rétinol et l'opsine. Il fut montré que le lien de base de Schiff entre le rétinol et l'opsine n'était pas modifié par l'ajout d'anesthésiques alors que ces molécules diminuaient les interactions latérales entre le rétinol et la protéine. L'action des anesthésiques se manifeste également au niveau de la structure globale des membranes traitées, tel qu'observé lors des études de sédimentation. Ces études ont permis de mettre en évidence une augmentation du volume des membranes riches en lipides alors que dans les MP, où chaque bR n'est entourée que par 7 molécules de lipides, les anesthésiques semblent provoquer une contraction des membranes.

L'aspect fonctionnel de ces membranes photoréceptrices est également affecté par le traitement avec les anesthésiques et ceci, dans le sens d'une accélération de la photochimie des pigments qu'elles renferment. L'action des anesthésiques au niveau fonctionnel est différente de l'action exercée sur ces membranes par un détergent, l'octyl glucoside et les résultats sont également distincts de ceux obtenus lors de la délipidation des membranes pourpres (Henry et al., 1988). De plus, l'influence des anesthésiques diffère selon le type de membranes photoréceptrices étudié.

Les études effectuées au cours de ce travail ont permis de situer l'action des anesthésiques au niveau des protéines membranaires ou à l'interface lipides/protéines plutôt qu'au niveau de la phase lipidique. Dans les membranes pourpres, les modifications apportées à la protéine semblent se faire au niveau des interactions latérales entre le rétinol et l'opsine. Enfin, les études comparatives utilisant différents types de membranes ont mis en évidence une action différente des anesthésiques selon le type de membrane utilisé.

## Remerciements

Mes remerciements s'adressent principalement au directeur de ces travaux, le professeur François Boucher, pour ses conseils et ses encouragements. Ils se destinent également à tous ceux et celles qui ont collaboré de près ou de loin à ces travaux.

J'aimerais également remercier le CRSNG ainsi que l'UQTR pour leur soutien financier au cours de ce projet.

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	viii

## CHAPITRES

## 1- INTRODUCTION

1.1 Mécanisme de l'anesthésie générale	1
1.2 Caractéristiques des modèles expérimentaux	3
1.3 Résultats antérieurs concernant l'action des anesthésiques	9
1.4 Objet du travail	10

## 2- METHODES EXPERIMENTALES

2.1 Préparation des membranes	
2.1.1 Préparation des membranes pourpres	12
2.1.1.1 Culture de bactéries halophiles	12
a) pré-inoculation	13
b) inoculation et induction de la synthèse de MP	13
2.1.1.2 Récolte des bactéries	13
2.1.1.3 Purification des membranes pourpres	14
2.1.1.4 Culture sur gélose	15
2.1.1.5 Conservation et utilisation des membranes pourpres	15
2.1.2 Préparation des disques des photorécepteurs visuels	15
2.2 Traitement des membranes par les anesthésiques	17
2.3 Méthodes spectroscopiques	
2.3.1 Mesure de l'absorption	18
2.3.2 Spectroscopie de résonance Raman	18
2.3.2.1 Appareillage	18
2.3.2.2 Echantillons	18
2.3.2.3 Spectres	19

2.3.3 Photolyse éclair	19
2.4 Méthodes hydrodynamiques	
2.4.1 Vitesse de sédimentation	21
2.4.2 Centrifugation isopycnique	22
3- RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1 Qualité des préparations membranaires utilisées	23
3.3.1 Membranes pourpres	23
3.3.2 Membranes discales	24
3.2 Modification des spectres d'absorption en présence d'anesthésiques	27
3.3 Analyses spectroscopiques	
3.3.1 Spectroscopie de résonance Raman	30
3.3.1.1 Information que l'on peut obtenir	
3.3.1.2 Résultats expérimentaux	34
3.3.1.3 Discussion	37
3.3.2 Photolyse éclair	42
3.3.2.1 Photolyse des membranes visuelles	42
3.3.2.2 Photolyse des membranes pourpres	49
3.3.2.3 Discussion	50
3.4 Analyses hydrodynamiques	56
3.4.1 Vitesse de sédimentation	58
3.4.2 Centrifugation isopycnique	64
3.4.3 Discussion	68
4- CONCLUSIONS	69
REFERENCES	73

## LISTE DES FIGURES

Fig.1: Structure du rétinol en configuration tout-trans, 13-cis et 11-cis	7
Fig.2: Structure cristalline de la bR dans la membrane pourpre	7
Fig.3: Séquence de photoréactions observées pour la rhodopsine et la bR	8
Fig.4: Spectre d'absorption des membranes pourpres purifiées	25
Fig.5: Spectre d'absorption des membranes discales non-solubilisées	26
Fig.6: Spectres d'absorption comparés des membranes pourpres natives et traitée à l'aide d'anesthésiques	29
Fig.7: Assignation des modes vibrationnels observés dans le spectre de résonance Raman de la bR <sub>568</sub>	32
Fig.8: Corrélation entre la fréquence d'élongation des liens éthyléniques des pigments rétinien et leur maximum d'absorption	33
Fig.9: Spectre de résonance Raman de bR <sub>568</sub> et bR <sub>480</sub>	39
Fig.10: Etude du déplacement isotopique des modes vibrationnels de la base de Schiff pour la bR native et traitée avec l'enflurane dans l'eau et l'eau lourde	40
Fig.11: Spectre d'absorption des membranes pourpres natives et traitées avec l'enflurane utilisées pour les études de résonance Raman	41
Fig.12: Croquis des spectres des intermédiaires de la photolyse de la rhodopsine indiquant les absorptions transitoires qu'il est possible d'observer à différentes longueurs d'onde	44
Fig.13: Exemple de tracé de la transmittance en fonction du temps obtenu pour les échantillons de membranes discales traitées avec l'enflurane	46
Fig.14: Graphique semilogarithmique de la différence d'absorbance en fonction du temps pour la transition métarhodopsine I -> métarhodopsine II pour des échantillons de membranes discales traitées avec des concentrations croissantes d'enflurane	47
Fig.15: Graphique semilogarithmique de la différence d'absorbance en fonction du temps pour les membranes discales traitées avec des concentrations croissantes d'octyl glucoside, pour cette même transition	48
Fig.16: Exemple de tracé obtenu en photolyse éclair pour des échantillons de membranes pourpres traitées avec des concentrations croissantes d'enflurane	52
Fig.17: Graphique semi logarithmique de la différence d'absorbance en fonction du temps pour un échantillon de MP traité avec 0.25 % d'enflurane	53
Fig.18: Modifications apportées à la composante <u>rapide</u> de la réaction M -> bR par la présence d'enflurane et d'OG	54



Fig.19: Modifications apportées à la composante <u>lente</u> de la réaction M -> bR par la présence d'enflurane et d'OG	5 5
Fig.20: Schéma d'un tracé théoriquement obtenu lors de la détermination de la vitesse de sédimentation en utilisant la mesure d'absorbance	6 0
Fig.21: Exemples de tracés obtenus pour la détermination de la vitesse de sédimentation des MP natives et traitées avec l'enflurane, pour un même essai	6 1
Fig.22: Graphique semilogarithmique du déplacement de la frontière de particules en fonction du temps de sédimentation pour l'expérience illustrée à la figure précédente	6 2
Fig.23: Coefficients de sédimentation (S en $\text{sec}^{-1}$ ) déterminés pour les divers essais effectués, à partir de la pente des droites	6 3
Fig.24: Détermination de l'emplacement de la fraction membranaire dans le gradient de sucrose par la mesure de l'absorbance à 568 nm	6 6
Fig.25: Densités moyennes des MP et des vésicules natives et traitées avec l'enflurane, déterminées par centrifugation isopycniqque sur gradient de sucrose	6 7

**LISTE DES ABREVIATIONS**

MP = membrane pourpre

bR = bactériorhodopsine

S.E.B. = segment externe des bâtonnets

BS = base de Schiff

OG = octyl glucoside

Enf = enflurane

D.O. = densité optique

## 1-INTRODUCTION

### 1.1 Mécanisme de l'anesthésie générale

L'anesthésie générale est une pratique qui s'est beaucoup répandue depuis sa première utilisation il y a plus d'un siècle par un dentiste américain. Les molécules anesthésiantes utilisées à cette époque, l'éther et le chloroforme, sont les ancêtres des anesthésiants modernes de plus en plus nombreux et diversifiés. Malgré le fait que l'anesthésie générale produise quantité d'effets secondaires indésirables, imputables à la toxicité des molécules employées, elle demeure essentielle à la pratique de la médecine moderne. La technique s'est beaucoup raffinée depuis ses débuts; l'administration, la dose et les effets physiologiques sont mieux contrôlés et les molécules employées jouent un rôle plus spécifique et mieux déterminé. On sait que les anesthésiques généraux agissent sur le système nerveux, mais quel est leur mécanisme exact d'action ? Cette question ne saurait être résolue par l'étude directe de l'action des anesthésiques sur le système nerveux. En effet, le système nerveux étant très complexe, l'étude de l'action des anesthésiques requiert l'emploi de modèles plus simples et mieux définis. Ces modèles permettront d'en connaître davantage sur les mécanismes d'action des molécules anesthésiantes et les hypothèses ainsi formulées pourront un jour être transposées au niveau du système nerveux.

Le mécanisme moléculaire de l'action des anesthésiques généraux fait encore l'objet de controverse, d'abord parce qu'on n'en connaît pas le fonctionnement exact mais également parce que la cible d'action demeure inconnue. Une grande gamme de molécules de structures chimiques très différentes ont des pouvoirs anesthésiants. L'hypothèse première émise concernant l'action des anesthésiques généraux suggérait une action unique sur les membranes biologiques, sans égard à la structure de la molécule en question. Peu d'évidences appuient cette hypothèse. On a alors suggéré l'hypothèse d'une perturbation plus générale, c'est-à-dire qu'en se dissolvant dans une phase membranaire, l'anesthésiant interfère avec les fonctions normales associées à cette phase (Hille, 1982). Cette phase doit donc être identifiée ainsi que les perturbations qui y surviennent. Deux classes de perturbations générales sont imaginées avec comme cible ultime une protéine, soit une perturbation de la bicouche lipidique conduisant indirectement à la perturbation de la protéine cible ou encore une perturbation directe de cette protéine par des interactions avec l'anesthésique.

Les premières hypothèses suggéraient une action de perturbation de la bicouche lipidique. Le choix de cette région membranaire était favorisé d'abord par le fait que la plupart des molécules anesthésiantes sont plus solubles dans une phase hydrophobe que dans une phase hydrophile (Bangham et al., 1982) et que, selon la relation de Meyer-Overton, le pouvoir anesthésiant d'une molécule est relié à son coefficient de partition entre l'huile d'olive et l'eau. De plus, des calculs hydrodynamiques favorisent une action dans la phase lipidique aux dépens de la phase aqueuse (Trudell, 1982). Les nombreuses études concernant les perturbations causées à une phase lipidique par des anesthésiques généraux démontrent qu'elles peuvent se faire à plusieurs niveaux. D'abord, la fluidité membranaire peut être mise en cause. Selon plusieurs études, il semble qu'elle soit augmentée par la présence d'anesthésiques généraux, théorie appuyée par la réversibilité de l'action des anesthésiques par la pression. Cependant, une augmentation plus importante de la fluidité membranaire est occasionnée par une augmentation de température de quelques dixièmes de degrés. Comme une anesthésie n'est pas occasionnée par la présence de fièvre, qui pourtant élève la température et donc augmente la fluidité membranaire, il semble peu probable que la perturbation de ce paramètre soit le mode d'action des anesthésiques (Trudell, 1982). Ces perturbations peuvent également se manifester au niveau de la structure générale de la bicouche, en augmentant le volume par exemple. L'hypothèse formulée, celle du volume critique, veut que l'anesthésie survienne lorsque le volume d'une région hydrophobe augmente au-delà d'un certain volume critique par absorption de molécules d'une substance inerte (Franks et Lieb, 1982). Certains auteurs ont rapporté une augmentation substantielle du volume membranaire mais des calculs subséquents ont démontré que cette augmentation était du même ordre de grandeur que le rayon de Van der Waals des molécules incorporées (Trudell, 1982). Pour les fervents de l'hypothèse de l'action sur les lipides, l'avenue la plus prometteuse semble être le changement de perméabilité des membranes associé à l'incorporation d'anesthésiques (Franks et Lieb, 1982; Bangham et al., 1982). L'hypothèse de perturbation de la structure est démentie par les études effectuées par Franks et Lieb (1978) en diffraction des rayons X et des neutrons, qui n'ont montré aucune modification perceptible de la structure de la bicouche lipidique aux concentrations cliniques. Des études en résonance Raman n'en décèlent pas non plus, jusqu'à des concentrations neuf fois supérieures aux concentrations cliniques (Lieb et al., 1982). D'autres études (Richards et al., 1978) démontrent également la faible probabilité que les paramètres moléculaires des lipides soient la cible première de l'action des anesthésiques. Même si ces paramètres sont modifiés, les modifications sont si minimes qu'on imagine mal comment elles pourraient

affecter les protéines. Des interactions directes entre les anesthésiques et les protéines sont donc envisagées.

Franks et Lieb (1978) ont suggéré, suite aux études de corrélation entre le pouvoir anesthésiant et le coefficient de partition entre l'eau et différents solvants, que le site d'action des anesthésiques devait avoir des propriétés à la fois polaires et non polaires. Ceci vient du fait que la corrélation est encore mieux respectée avec l'octanol comme solvant organique plutôt que l'huile d'olive, et ce site amphiphile implique sans doute la participation des protéines. Janoff et ses collaborateurs (1981) ont montré que la corrélation est également bien respectée entre l'action des anesthésiques et la solubilité dans les membranes de phosphatidylcholine. Dans ces lipides, 40 % de la masse est occupée par les têtes polaires. Ainsi, selon ces auteurs, la solubilité dans l'octanol de même que dans ces lipides pointent conjointement vers un site d'action de nature amphiphile.

Pour certaines protéines, telle l'hémoglobine et la luciférase, une action directe avec l'anesthésique est déjà établie. Pour la luciférase, l'action de l'anesthésique se fait par compétition avec le substrat pour le site de liaison sur la protéine (Franks et Lieb, 1984). Il fut de plus montré que ce site de liaison est de taille restreinte, puisqu'il peut accommoder une grosse molécule d'anesthésique ou deux petites. Ce site de taille restreinte peut expliquer l'effet de "cutoff" observé dans une série d'homologues, pour lesquels un pouvoir anesthésiant est conféré aux molécules jusqu'à l'atteinte d'une certaine taille. Il permet également de fournir une explication à la réversibilité de l'action des anesthésiques par la pression, puisque les molécules anesthésiantes seraient simplement expulsées du site de liaison par une augmentation de la pression. Ainsi, ces auteurs suggèrent qu'une poche amphiphile de taille restreinte se trouve sur la protéine et que l'anesthésique compétitionne avec le ligand endogène pour la liaison sur ce site (Franks et Lieb, 1985).

Il semble peu probable que la structure contrainte de la plupart des protéines puisse à elle seule permettre le genre d'environnement nécessaire à la création d'un site amphiphile tel que proposé par la solubilité dans l'octanol. Mais, pour les protéines intrinsèques, l'association intime avec les lipides membranaires peut constituer un environnement amphiphile à l'interface protéine/lipides favorable à l'action des anesthésiques. Cet interface constitue une troisième cible possible pour l'action des anesthésiques généraux.

## 1.2 Caractéristiques des modèles expérimentaux

Afin de discriminer parmi ces trois cibles potentielles laquelle est vraiment touchée par l'action des anesthésiques généraux, des systèmes modèles simples peuvent être employés. Les modèles expérimentaux utilisés dans ce travail sont les membranes discales des segments externes des bâtonnets rétiens de bovins ainsi que les membranes pourpres des bactéries halophiles extrêmes. Ces membranes renferment un pigment, la rhodopsine et la bactériorhodopsine (bR) respectivement, et toutes deux contiennent un même chromophore, le rétinol, lié à la protéine par un lien de base de Schiff protoné en proportion d'un rétinol par protéine (Oesterhelt et Stoeckenius,1971). D'autres interactions sont également présentes entre le rétinol et l'opsine puisque le maximum d'absorption du chromophore est modulé par la présence de l'opsine. Différents isomères du rétinol sont illustrés à la première figure.

Ces deux pigments servent de transducteurs d'énergie. La rhodopsine joue un rôle dans le processus de la vision en convertissant l'énergie lumineuse captée par l'oeil en signal électrique transmis au cerveau. La bactériorhodopsine, quant à elle, convertit cette même énergie lumineuse en gradient électrochimique par le pompage de protons à travers la membrane bactérienne, lequel gradient sera utilisé pour la synthèse d'ATP ou pour d'autres activités vitales, telle la locomotion (Stoeckenius et al.,1979; Stoeckenius et Bogomolni, 1982).

La rhodopsine est connue depuis très longtemps mais ce n'est qu'il y a une vingtaine d'années que la bactériorhodopsine fut découverte dans les bactéries halophiles (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971). Ces bactéries produisent la membrane pourpre lorsque l'atmosphère est déficiente en oxygène. Elles croissent dans des conditions de forte salinité, avec comme principaux cations le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{Mg}^{++}$ , en concentration optimale de 3.4 à 4.3 M en NaCl et de 0.1 à 0.5 M en  $\text{MgSO}_4$ , à un pH de 6 à 8 (Torsvik et Dundas,1982). La concentration saline interne de la bactérie est de force ionique similaire à celle du milieu extracellulaire, le cation dominant étant le  $\text{K}^+$  (Stoeckenius et al.,1979). Cette propriété de la bactérie permet de lyser facilement la membrane plasmique en diminuant la force ionique du milieu, alors que la membrane pourpre résiste à ce traitement. En effet, la bR se retrouve sous forme d'agrégats formant un réseau cristallin dans la membrane. Même isolés, ces agrégats portant le nom de membrane pourpre conservent leur structure (Stoeckenius et Bogomolni,1982). Dans les membranes pourpres, la bR représente 75% du poids sec et ne

laisse place qu'à 25% de lipides (Oesterhelt et Stoeckenius,1971) avec lesquels les interactions sont très fortes.

La bactériorhodopsine est la première protéine membranaire dont les structures primaire, secondaire et tertiaire furent élucidées à la fin des années 1970, et la séquence des gènes qui la codent est également connue (Ovchinnikov et al.,1979; Abdulaev et al.,1982; Dunn et al.,1981). La bR est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 26 kD et sa séquence comporte 248 résidus d'acides aminés qui se positionnent dans la membrane en sept hélices  $\alpha$  transmembranaires. Les unités de bR se regroupent en trimères, qui s'organisent en un réseau hexagonal bidimensionnel cristallin (Oesterhelt et Stoeckenius,1971; Henderson et Unwin,1975; Blaurock et Stoeckenius,1971) (Figure 2). Le site d'attachement du chromophore se situe sur le résidu de lysine 216, retrouvé dans la septième hélice (Abdulaev et al.,1982) et on sait que le rétinale se retrouve en conformation tout-trans lorsque la bR est adaptée à la lumière et contient un mélange de cet isomère et de la forme 13-cis lorsqu'adaptée à l'obscurité (Stoeckenius et Bogomolni,1982). A partir des techniques élaborées pour la bactériorhodopsine, Ovchinnikov (1982) est parvenu à l'élucidation de la structure de la rhodopsine, de sa topographie dans la membrane de même que du site d'attachement du rétinale à l'opsine. On sait donc que sa séquence comporte 348 résidus et que le rétinale est en conformation 11-cis (Wald et al., 1950). Tout comme dans le cas de la bR, la protéine se replie en sept hélices transmembranaires et le site d'attachement du rétinale est positionné sur la septième, soit sur la lysine 296 (Abdulaev et al.,1982).

L'absorption d'un photon par l'un ou l'autre de ces pigments initie une série de photoréactions tel qu'illustré à la troisième figure. Dans le cas de la bR, cette série de photoréactions est à l'origine du transport vectoriel de protons de part et d'autre de la membrane. Le photon capté par la bR<sub>568</sub> 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 initiale de la bR, le tout étant accompagné de changements conformationnels dans la protéine elle-même. C'est lors du passage à l'intermédiaire M qu'est formé le gradient de protons. La série de photoréactions subie par la rhodopsine comporte certains intermédiaires communs avec ceux de la bR. Son cycle est cependant linéaire et les réactions produisent son blanchiment, c'est-à-dire le passage de la forme rhodopsine en rétinale accompagné d'opsine. Les deux premiers méta-intermédiaires retrouvés dans cette série de

réactions forment un équilibre qui peut persister quelques minutes et son établissement est sensible à l'environnement.

Les membranes contenant la rhodopsine et la bactériorhodopsine constituent des modèles intéressants pour l'étude de l'action des anesthésiques. D'abord, leur composition en lipides, très différente, permet d'établir la contribution de ceux-ci à l'effet observé. Les membranes discales sont riches en lipides, elles contiennent environ 80 phospholipides à 50 % insaturés par molécule de rhodopsine alors que la structure cristalline de la membrane pourpre ne laisse place qu'à 7 molécules de lipides saturés par protéine. Ensuite, le maximum d'absorption des pigments est sensible aux interactions rétinol-opsine de même qu'à l'environnement de la protéine. Les changements causés par le traitement à l'aide d'anesthésiques pourront ainsi être enregistrés aisément par diverses méthodes spectroscopiques. Enfin, l'action des anesthésiques peut être étudiée à travers les modifications apportées à la photochimie de ces pigments.



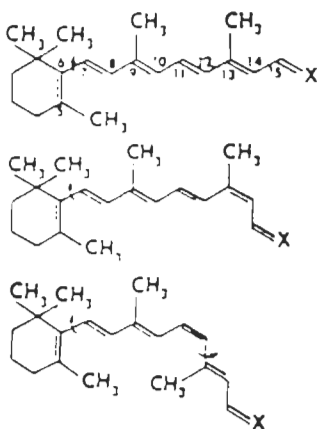


Figure 1 : Structure du rétinol en configuration tout-trans, 13-cis et 11-cis.

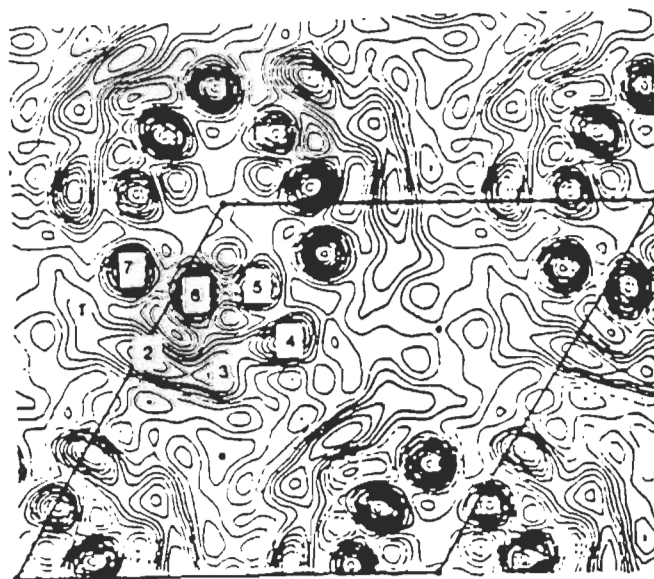


Figure 2 : Structure cristalline de la bR dans la membrane pourpre. Dans une unité de bR, quatre hélices  $\alpha$  sont à l'extérieur et trois à l'intérieur du trimère (Unwin et Henderson, 1975).

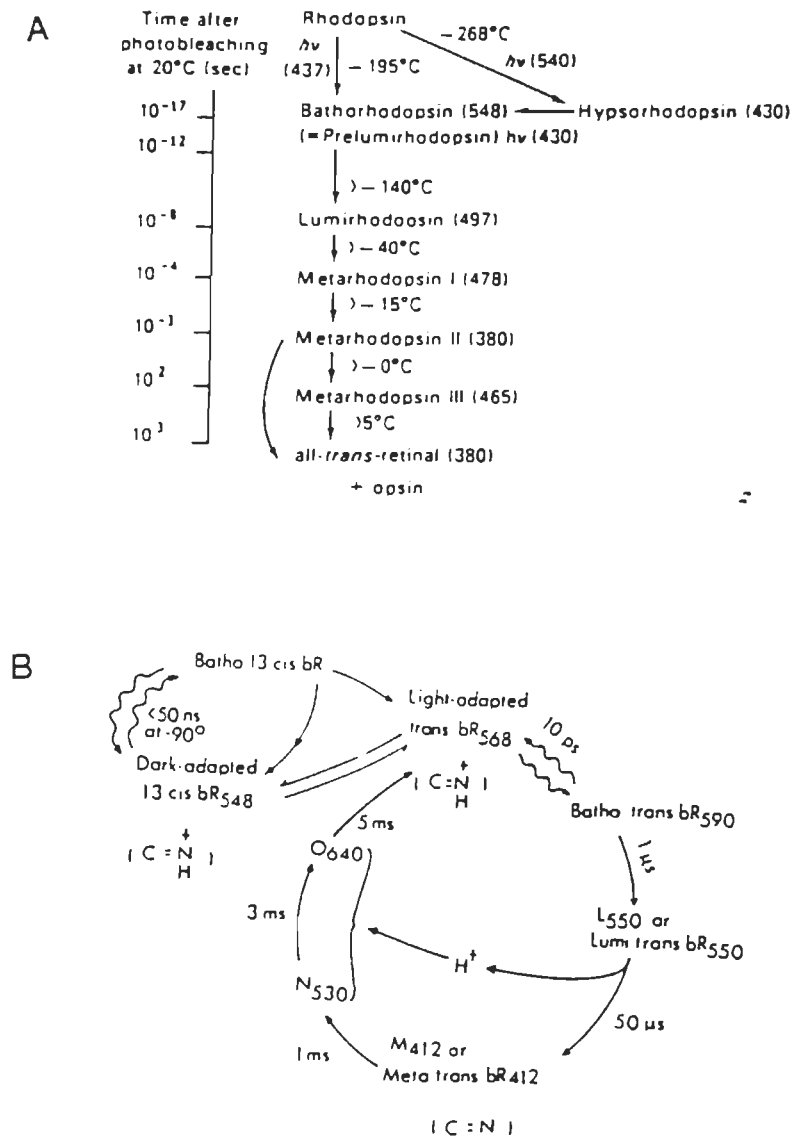


Figure 3 : Séquence de photoréactions observées pour la rhodopsine (A) et la bR (B) (Shichi,1983). Les indices correspondent au maximum d'absorption du pigment sous cette forme. La mention trans pour les intermédiaires batho, lumi et méta de la bR adaptée à la lumière dénote le fait que ces intermédiaires sont issus de la forme de la bR adaptée à la lumière et n'indique pas la configuration du chromophore. Le rétinale est en forme 13-cis dans ces intermédiaires.

### 1.3 Résultats antérieurs concernant l'action des anesthésiques

Les membranes pourpres et les membranes discales ont déjà fait l'objet d'études concernant l'action des anesthésiques volatils. Ces molécules d'hydrocarbures halogénés sont soupçonnées d'agir directement sur les protéines, en provoquant le bris de liaisons hydrogène, ce qui se traduit par une augmentation de la quantité de molécules libres dans un complexe formé par des liaisons hydrogène, tel que montré par des études en infrarouge (DiPaolo et Sandorfy, 1974; Sandorfy, 1982). Ce comportement a été observé avec différents anesthésiques dans beaucoup de modèles expérimentaux, naturels et artificiels. Ceci ne correspond pas à l'hypothèse d'une action uniquement hydrophobe puisque la formation ou le bris de liaisons hydrogène demandent des interactions polaires. Une corrélation du même type que dans la relation de Meyer-Overton existe entre le potentiel anesthésiant d'une molécule de fluorocarbure et le bris des liaisons hydrogène (Buchet et Sandorfy, 1985). Les fluorocarbures présentant un proton acide, donc briseurs de liens hydrogène en tant que donneur de protons, ont un pouvoir anesthésiant supérieur. Ceux n'en présentant pas doivent se contenter de liaisons polaires réalisées avec les atomes d'halogènes (Sandorfy, communication personnelle).

Des changements induits à la bR par le traitement avec des anesthésiques ont déjà été rapportés. Henry et ses collaborateurs (1988) ont établi que la réaction des anesthésiques avec la bR se fait préférentiellement avec la forme de la bR adaptée à la lumière, suggérant une action directe des anesthésiques sur la protéine. La réaction à partir de la bR adaptée à l'obscurité est également possible, mais plus lente. Elle requiert l'isomérisation de la forme 13-cis du chromophore en forme tout-trans, et cette isomérisation constitue l'étape limitante de la réaction. La préférence pour la forme adaptée à la lumière fut observée lors du traitement avec des anesthésiques volatils, mais également avec le DMSO (Pande et al., 1989a).

Nishimura et ses collaborateurs (1985) ont observé des changements structuraux de la bR induits par la présence d'anesthésiques volatils. Ces changements se traduisent par une modification du spectre d'absorption, le maximum étant déplacé vers les plus basses longueurs d'onde. Les changements induits par la réaction avec les anesthésiques sont, à première vue, semblables à ceux observés suite à la délipidation de la bR (Henry et al., 1988), et des études de délipidation et de reconstitution dans les détergents montrent que les interactions lipides-protéine préviennent le déplacement du maximum d'absorption vers 480 nm (Baribeau et Boucher, 1985). La délipidation induit de subtils changements au

niveau du site de liaison du chromophore, mais pas de perturbations importantes de la structure secondaire de la bR. Un léger relâchement au niveau du lien de base de Schiff aurait pour effet de diminuer les interactions retinal-opsine et pourrait entraîner le déplacement hypsochrome du maximum d'absorption (Pande et al., 1989b).

Les perturbations causées aux membranes pourpres par les anesthésiques sont-elles du même type que celles causées par la délipidation ? Ces molécules agissent-elles au niveau de la phase lipidique ou par interaction avec la protéine, ou l'interface entre les deux ? Les études effectuées ont tenté de répondre à ces questions et les renseignements obtenus furent analysés à la lumière des résultats d'études antérieures sur l'action de ces molécules de même que lors d'études de délipidation.

Par ailleurs, on sait peu de choses sur l'effet de l'incorporation d'anesthésiques généraux dans les membranes visuelles. Il est bien établi que l'anesthésie générale modifie les fonctions visuelles. En effet, l'électrorétinogramme de patients anesthésiés ou d'animaux soumis à l'anesthésie est modifié de façon marquée (Kirschfeld, 1987; Raitta et al., 1979). Toutefois, au niveau moléculaire, la seule étude qui, à notre connaissance, ait été effectuée a simplement démontré que le changement de pH associé à l'établissement de l'équilibre entre les métarhodopsines I et II était diminué par l'incorporation d'halothane ou d'enflurane à des suspensions aqueuses de segments externes de bâtonnets (Mashimo et al., 1984).

#### 1.4 Objet du travail

La controverse entourant le mécanisme de même que la cible d'action des anesthésiques généraux suscite de nombreuses recherches. Au cours de ce travail, nous avons cherché à mieux comprendre, d'une part, les interactions moléculaires dans les membranes photoréceptrices en les perturbant à l'aide d'anesthésiques et, d'autre part, à préciser le mécanisme par lequel les anesthésiques généraux modifient les propriétés des systèmes à l'étude.

Les objectifs spécifiques visent à augmenter les connaissances particulièrement sur l'action des anesthésiques généraux sur ces deux types de membranes. Les anesthésiques généraux employés sont de type hydrocarbures halogénés, tel l'halothane et principalement l'enflurane ( $\text{CF}_2\text{HOCF}_2\text{CFClH}$ ). L'étude des changements structuraux ou fonctionnels causés à

ces membranes visent d'abord à permettre de discriminer entre les trois cibles membranaires potentielles laquelle ou lesquelles sont touchées par l'action de ces anesthésiques mais également, et surtout, à apporter des éléments nouveaux dans notre compréhension de la structure et du fonctionnement des protéines intrinsèques de ces membranes.

L'atteinte de ces objectifs sera réalisée par l'emploi de techniques diversifiées, puisque les propriétés membranaires susceptibles d'être affectées par ces molécules sont également diverses. Les changements structuraux apportés aux membranes seront étudiés d'abord par des techniques spectroscopiques, telles la mesure directe de l'absorbance ainsi que les études en résonance Raman, de même que par des techniques hydrodynamiques comportant la détermination de la vitesse de sédimentation et la centrifugation isopycnique. La technique de photolyse éclair permettra enfin d'étudier l'influence des anesthésiques généraux sur la photochimie de chacun des pigments.

## 2- METHODES EXPERIMENTALES

### 2.1 Préparation des membranes

#### 2.1.1 Préparation des membranes pourpres

##### 2.1.1.1 Culture des bactéries halophiles

La bactériorhodopsine est obtenue à partir de cultures bactériennes de *Halobacterium halobium* de souche Sg ou ET001, souches mutantes dépourvues de vacuoles, gracieusement offertes par le professeur Walter Stoeckenius de l'université de la Californie à San Francisco. La croissance des bactéries en vue de l'extraction de la bactériorhodopsine s'effectue dans un milieu de culture riche en sels préparé en dissolvant dans l'ordre les ingrédients suivants:

NaCl, Cristaux séchés.....	25% p/v
KCl .....	0.2% p/v
Na . Citrate . 2H <sub>2</sub> O .....	0.3% p/v
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	2.0% p/v
Sulfate ferreux .....	0.1% v/v

(0.5g / 10 ml H<sub>2</sub>O + 3 gouttes de HCl 1N)

Peptones (Bacteriological peptones, Oxoid).....	1.0%p/v
---	---------

Une solution de 10 litres est habituellement préparée pour la culture et son pH est ajusté entre 6.5 et 6.7. Etant donné la forte concentration en sels, ce milieu est austère à la croissance de bactéries autres que les bactéries halophiles désirées et il n'est donc pas nécessaire de le stériliser. Les peptones sont conservés au frais et ne sont ajoutés qu'à la dernière minute, ce qui minimise la possibilité de dégradation prématurée. La verrerie servant à la culture bactérienne doit être lavée avec de l'acide sulfochromique afin d'éliminer toute trace de détergent qui nuirait à la croissance bactérienne.

#### a) Pré-inoculation

La culture des bactéries débute par une pré-inoculation à partir de géloses ayant été ensemencées et incubées à 39 °C. Deux échantillons de 100 ml chacun sont d'abord préparés ( dans un erlenmeyer de 500ml) par inoculation de une ou deux boucles pleines de bactéries provenant de la gélose. Le milieu doit être préchauffé pour ne pas faire subir le choc d'un refroidissement aux bactéries, ce qui ralentirait ou même empêcherait leur croissance. Ces inoculats sont incubés (incubateur: Psycrotherm de New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) à une température d'environ 39 °C pour 3-4 jours. L'incubateur est muni d'un plateau rotatoire et une agitation de 180 rpm est maintenue afin d'oxygéner les préparations. Les bactéries ont atteint la phase logarithmique de croissance lorsque la densité optique à 660 nm est de 1 (ceci est en fait une mesure de turbidité plutôt que d'absorbance puisque les bactéries en suspension diffusent la lumière). L'inoculation proprement dite est alors effectuée.

#### b) Inoculation et induction de la synthèse de MP

Les bactéries obtenues suite à la pré-inoculation sont transférées dans deux erlenmeyers de 4000 ml contenant 1100 ml de milieu peptoné, tempéré et auquel sont ajoutés quelques millilitres d'antimousse (Dow Corning, AntiFoam 1410). Ceci leur fournit un plus grand volume de milieu frais contenant tous les nutriments nécessaires à leur croissance. Ces inoculats sont alors réincubés dans les mêmes conditions. Lorsque la phase logarithmique de croissance est atteinte, les échantillons sont séparés en six portions et transférés dans 1200 ml de ce même milieu peptoné pour une autre incubation. Lorsque le nombre de bactéries est suffisant, l'agitation est diminuée à 90 rpm afin de réduire l'apport en oxygène et les cultures sont exposées à une lumière intense (fluorescents : 7 X 32 W) pour 3 à 4 jours, toujours à la même température. Ceci nécessite l'utilisation d'un système de réfrigération pour maintenir la température constante, puisque les fluorescents dégagent de la chaleur. Ces conditions non-idéales induisent la synthèse des membranes pourpres par les bactéries.

#### 2.1.1.2 Récolte des bactéries

Une triple centrifugation de la suspension bactérienne dans une solution basale de sels (10 000 g, 10 min. à 4 °C dans un rotor GSA, Sorvall Instrument) permet de séparer les

bactéries de leur milieu de croissance. Les culots sont mis en présence de trois fois leur poids frais de solution basale de sels. Cette solution est composée de NaCl 25 % p/v, KCl 0.2 % p/v, et  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2 % p/v et le pH est ajusté à 7.0. Les bactéries en suspension sont additionnées de 10 mg d'ADNase (Sigma Chemical Co.). Le mélange pâteux obtenu après agitation d'une heure à l'obscurité à 4 °C est dialysé seize heures à cette même température contre de l'eau distillée et déminéralisée, en prenant soin de changer l'eau après une heure trente. Ceci permet d'éliminer le sel et provoque la lyse des cellules mises en présence d'un milieu hypotonique (Oesterhelt et Stoeckenius, 1974) de sorte qu'on obtient des fragments de membranes plasmiques et les membranes pourpres, qui résistent à ce traitement.

#### 2.1.1.3 Purification des membranes pourpres

La séparation des membranes pourpres des débris cellulaires se fait en s'inspirant des techniques développées par Oesterhelt et Stoeckenius (1971; 1974), Becher et Cassim (1975) et Kushwaha et al. (1975). Cette procédure implique de nombreuses centrifugations qui, à moins d'indications contraires, s'effectuent à 4 °C dans un rotor de type SS-34 (Sorvall Instrument). Le dialysat obtenu est d'abord centrifugé (10 000 rpm, 20-25 min) afin de se débarrasser des constituants cellulaires qui se retrouvent dans le culot et le surnageant contenant la fraction membranaire est recentrifugé (19 000 rpm, 1h30). Le culot obtenu contient les membranes pourpres et est centrifugé de la même façon en resuspendant dans de l'eau distillée jusqu'à ce que le surnageant dans lequel se retrouve le principal contaminant, la membrane contenant la bactériorubérine, soit clair.

Le culot final obtenu contient peu de membranes plasmiques mais une purification subséquente est effectuée afin d'éliminer les traces restantes selon la technique développée par Becher et Cassim (1975). Les deux types de membranes sont séparées par ultracentrifugation (20 000 rpm, 48 hres dans un rotor à godets oscillants SW-28) sur un gradient discontinu de sucrose contenant 7 ml de sucrose 1.5 M recouvert de 21 ml de sucrose 1.3 M et d'une mince couche d'eau distillée. Les membranes pourpres sont recueillies à l'interface entre les deux solutions de sucrose tandis que les membranes plasmiques se situent à l'interface entre la solution la moins concentrée et l'eau. La bande recueillie est dialysée de la même façon que précédemment dans le but d'éliminer le sucrose. Le culot obtenu suite à la centrifugation du dialysat (19 000 rpm, 1h30) est suspendu dans la solution basale de sels pour la conservation. Le rendement de la préparation de même que sa pureté peuvent être évalués spectrophotométriquement puisque, selon Oesterhelt et Stoeckenius, le coefficient d'extinction molaire est de  $54\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$ .



#### 2.1.1.4 Culture sur gélose

Les bactéries doivent être repiquées périodiquement pour leur fournir les nutriments essentiels à la continuité de la souche. Les géloses sont fabriquées à partir du milieu de culture initial auquel 1.5 % de peptones et 1.5 % d'agar-agar (DIFCO) sont ajoutés. Cette solution est chauffée jusqu'à dissolution complète de l'agar puis coulée dans les boîtes de pétri. Le dessus de la gélose est passé à la flamme afin d'éliminer les bulles d'air.

Lors du repiquage, les géloses ensemencées sont incubées à 39 °C jusqu'à l'obtention de colonies bien visibles. Afin d'éviter l'assèchement lors de l'incubation, les pétris sont enrobés de ruban adhésif et placés dans un sac de plastique renfermant un contenant d'eau. Ces cultures sont ensuite conservées au réfrigérateur.

#### 2.1.1.5 Conservation et utilisation des membranes pourpres

Les membranes pourpres obtenues sont conservées au réfrigérateur en solution concentrée dans la solution basale de sels.

Le sel doit être éliminé avant l'utilisation des membranes pourpres. Ceci s'effectue par trois lavages successifs effectués en centrifugeant les membranes à 19 000 rpm, en resuspendant les culots chaque fois dans de l'eau ou du tampon avec lequel on désire travailler. Les centrifugations durent respectivement 15, 30 et 90 minutes puisque les membranes pourpres sédimentent moins rapidement lorsque la concentration en sels diminue.

#### 2.1.2 Préparation des disques des photorécepteurs visuels

Toutes les manipulations concernant les disques des photorécepteurs visuels sont effectuées à 4 °C sous lumière rouge tamisée afin d'éviter que ne prenne place une série de photoréactions pouvant conduire à la destruction de la rhodopsine qu'ils contiennent.

Les rétines desquelles sont extraits les disques sont obtenues par dissection d'yeux de bovins frais provenant d'un abattoir avoisinant. Les yeux sont conservés quelques heures à l'obscurité à la température de la pièce afin de permettre la régénération de la rhodopsine et la diminution de l'interpénétration des segments externes des bâtonnets et de l'épithélium pigmentaire qui les supporte. L'adhésion entre les deux sera moins forte et les rétines seront extraites plus facilement et plus proprement. La dissection s'effectue de la façon

suivante: une incision est pratiquée dans l'oeil pour découper tout le globe oculaire, puis celui-ci est inversé pour libérer l'humeur aqueuse. La rétine est délicatement décollée du fond de l'oeil de façon à ne pas emporter l'épithélium pigmentaire qui contaminerait l'échantillon. La purification est effectuée telle que décrite par Salesse et al.(1983). Les rétines sont additionnées d'environ 0.75 ml de tampon d'isolement par rétine (tampon HEPES 10mM pH 7.5, contenant 0.15 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM d'EDTA et 1 % de NaCl ). La suspension rétinienne est ensuite mélangée par inversions répétées afin de libérer les segments externes des bâtonnets (SEB). En effet, la connection ciliaire entre les segments interne et externe est fragile et se brise par simple agitation. Une solution de sucrose à 80 % p/v est alors ajoutée en quantité égale à la quantité de suspension rétinienne, pour une concentration finale de sucrose de 40 %. La solution est distribuée dans des tubes à centrifuger et recouverte d'une mince couche de tampon d'isolement. Une centrifugation subséquente (10 000 rpm, 40 minutes dans un rotor à godets oscillants SB-110) permet de séparer les SEB des autres constituants rétiniens, ceux-ci se retrouvant à l'interface sucrose-tampon alors que le reste sédimente. La bande recueillie à cet interface est diluée avec du tampon d'isolement pour être sédimentée (17 000 rpm, 30 minutes), ce qui élimine le sucrose recueilli concurramment et permet d'éliminer les constituants cellulaires ayant contaminé les SEB.

Ces deux étapes sont répétées au moins deux fois, la pureté de l'échantillon étant mesurée spectrophotométriquement. Un spectre de la suspension pris entre 650 et 350 nm ne devrait présenter qu'un pic bien défini avec un maximum d'absorption se situant à une longueur d'onde approximative de 500 nm.

Lorsque la préparation semble assez pure, le culot obtenu est suspendu dans de l'eau déionisée et bidistillée pour être sédimenté à deux reprises (15 000 rpm, 40 minutes). La mise en solution hypotonique des SEB cause un bris de leur membrane externe tandis que la membrane des disques qui y sont contenus n'est pas affectée. Les membranes sédimentent et sont recueillies dans le culot. Ce nouveau culot est mis en suspension avec agitation pour une nuit dans environ 1 ml de Ficoll 5 % dans de l'eau déionisée et bidistillée par rétine de départ. Après ultracentrifugation de cette solution recouverte d'une pellicule d'eau (20 000 rpm, 2 heures dans un rotor à godets oscillants SB-110), la bande opaque à l'interface Ficoll-eau est recueillie. Elle est constituée des disques visuels et leur quantité est estimée par unité de densité optique (D.O.) à une longueur d'onde d'environ 500 nm (maximum d'absorption). Ceci est possible puisque l'absorption est proportionnelle à la concentration ( $A = \epsilon c l$  et  $\epsilon$  est connu:  $\epsilon = 40\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$  ).

## 2.2 Traitement des membranes par les anesthésiques

Les anesthésiques utilisés sont des hydrocarbures halogénés très hydrophobes. Mis en présence d'une suspension membranaire aqueuse, ils se solubilisent préférentiellement dans les membranes, causant ainsi certaines perturbations. Les anesthésiques sont ajoutés à la suspension membranaire à l'aide d'une seringue. Pour les études où une saturation en anesthésique est requise, la quantité utilisée est plus importante que la solubilité dans l'eau, de sorte que des gouttelettes se retrouvent au fond de la solution. Afin de permettre à l'anesthésique de franchir la barrière aqueuse pour se solubiliser et interagir avec les membranes, une agitation vigoureuse est appliquée soit par l'utilisation d'un vortex ou par aspiration dans une pipette.

Dans le cas des membranes pourpres, elles doivent être exposées à la lumière d'un projecteur pour environ 10 minutes afin de les adapter à la lumière avant "l'anesthésie". Ceci permet une réaction plus complète entre l'anesthésique et les membranes en déplaçant l'équilibre vers l'isomère tout-trans avec lequel ceux-ci réagissent (Henry et al., 1988). La réaction entre l'anesthésique et les membranes pourpres est rapide, le temps d'incubation est de l'ordre de 15 minutes à quelques heures tout au plus. Pour ce qui est des membranes visuelles, la réaction est plus lente et nécessite une incubation d'au moins 12 heures. Bien entendu, les échantillons sont scellés afin de minimiser l'évaporation des anesthésiques qui sont très volatils.

## 2.3 Méthodes spectroscopiques

### 2.3.1 Mesure de l'absorption

Les spectres d'absorption UV-visible sont enregistrés sur un spectrophotomètre UV-visible Pye Unicam SP 8-100 . Le balayage s'effectue sur une gamme de longueurs d'ondes s'échelonnant entre 700 et 250 nm pour les membranes pourpres et 650 et 350 nm pour les disques visuels. Les cellules utilisées sont de quartz et le côté dépoli est employé pour les échantillons dont il faut minimiser la diffusion.

### 2.3.2 Spectroscopie de résonance Raman

Les études de spectroscopie de résonance Raman ont été effectuées au département de chimie de l'Université du Québec à Montréal, avec la collaboration du Dr Serge Alex et du professeur Daniel Vocelle.

#### 2.3.2.1 Appareillage

Les spectres de résonance Raman sont obtenus par l'intermédiaire d'un spectrographe SPEX Triplemate1877b muni d'un réseau de diffusion à 1800 raies/mm, ce qui fournit une résolution de l'ordre de  $5 \text{ cm}^{-1}$ . Les échantillons sont excités par la lumière d'un laser CW  $\text{Ar}^+$  ( Spectra-Physics, modèle 2016) à une longueur d'onde de 488.8 nm et une puissance à la source de 50 mW. Les signaux sont enregistrés par un détecteur multicanaux ( EG & G Princeton Applied Research , modèle 1422 ) et sont ensuite traités à l'aide d'un système informatique relié à l'appareil.

#### 2.3.2.2 Echantillons

Les échantillons de membranes pourpres purifiées sont suspendus dans un tampon à pH 7.8 (HEPES 5 mM) pour une concentration finale d'environ  $60 \mu\text{M}$  en bactériorhodopsine, soit une densité optique à 568 nm de l'ordre de 3.5. Les études isotopiques sont effectuées avec les culots de membranes pourpres suspendus dans l'eau lourde ( Sigma, 99.96 % D). La concentration en membranes pourpres est similaire à celle de l'échantillon sans deutérium et du tampon HEPES 1M à pH 7.8 est ajouté à la suspension pour obtenir une même concentration finale. L'ajout de ce tampon influence peu le contenu en eau de l'échantillon

puisque le volume ajouté est minime comparativement à la quantité d'eau piégée dans le culot membranaire. L'échange isotopique entre l'hydrogène de la base de Schiff protonée et le deutérium de l'eau lourde est favorisé par l'exposition de l'échantillon à la lumière qui induit le cycle photochimique de la bR. Ainsi, l'azote perd son hydrogène lors de la formation de l'intermédiaire M pour se reprotéger en emportant un atome lourd lors du retour vers la forme bR<sub>568</sub>, puisque ces atomes sont en excès par rapport à l'hydrogène.

Les études portent sur les membranes pourpres natives préparées dans l'eau ou l'eau lourde, de même que sur les membranes traitées aux anesthésiques dans ces mêmes solvants. Le traitement est effectué tel que décrit à la section 2.2, en utilisant 5 % v/v d'enflurane, puisque la solution membranaire est très concentrée. Pour cet échantillon, on peut calculer un rapport molaire de l'anesthésique par protéine de 6800.

### 2.3.2.3 Spectres

Les spectres de résonance Raman sont obtenus en utilisant la méthode statique, c'est-à-dire que l'échantillon est déposé dans un capillaire de verre, lui-même placé dans un porte échantillon dont la température est maintenue entre 5 et 10 °C. Le capillaire est scellé, de sorte que l'évaporation de l'anesthésique ou l'échange d'eau lourde avec celle de l'air sont minimisés. Les spectres sont enregistrés par balayages successifs de 3 secondes pour une période de 15 minutes, soit 300 balayages par spectre. Le réseau utilisé permet une fenêtre de lecture comprise entre 1000 et 1800 cm<sup>-1</sup>

### 2.3.3 Photolyse éclair

Le faisceau actinique utilisé pour l'excitation des échantillons provient d'un laser Néodymium/YAG "Q-Switched" à fréquence doublée (Laser System 2000, JK Lasers, Rugby, Angleterre). La raie d'excitation se situe à 532 nm et l'impulsion de 10 nsec dégage 30 mW d'énergie par éclair. La paroi givrée des cellules de quartz permet la diffusion du faisceau lumineux dans tout l'échantillon. Le faisceau d'analyse provient d'une lampe au Xénon de 150 W et d'un monochromateur à réseau (Photon Technology Inc., Princeton, N.J.). Il permet d'effectuer l'analyse spectrophotométrique à angle droit par rapport au faisceau actinique. La lumière transmise par l'échantillon traverse un filtre interférentiel, est captée par une photodiode et amplifiée avant d'être acheminée vers un oscilloscope digital (Nicolet 4094, Nicolet Instruments Corp., Mississauga, Ontario). La présence entre le faisceau d'analyse et

le porte échantillon d'un obturateur synchronisé permet de contrôler le temps d'analyse et d'éviter la surexposition de l'échantillon à la lumière.

Les échantillons de membranes visuelles sont suspendus dans l'eau et des concentrations croissantes d'anesthésiques ou d'octyl glucoside y sont ajoutées pour une incubation de 12 heures à 4 °C, à l'obscurité. La concentration en membranes est de 0.3 D.O. et le pH est ajusté à 6.5 juste avant l'expérience, avec un tampon phosphate concentré pour une concentration finale de 1 mM. Le tampon sert à maintenir un pH constant malgré les passages d'un intermédiaire vers un autre subséquent et est ajouté à la dernière minute pour éviter l'agrégation des membranes. Les membranes pourpres sont quant à elles suspendues dans le tampon HEPES à pH 7.8 pour une concentration finale de 5mM et la D.O. finale est également de 0.3. Les échantillons avec l'OG sont incubés pour 12 heures tandis que les anesthésiques ne nécessitent que 30 à 40 minutes d'incubation. Dans le cas des membranes pourpres, le tampon est utilisé pour prédéterminer le pH puisque la réaction avec l'anesthésique est dépendante du pH (Lee et al., en préparation). L'analyse spectrophotométrique se fait à 410 et 450 nm pour les membranes visuelles et à 410 nm pour les membranes bactériennes. Ces longueurs d'onde permettent de mesurer les vitesses d'apparition et de disparition des intermédiaires métarhodopsine I et II dans les membranes discales et de la metabactériorhodopsine dans les membranes pourpres.

De plus, pour les membranes visuelles, une seule excitation est effectuée par échantillon tandis que les résultats pour les membranes pourpres proviennent de la moyenne de quatre excitations, étant donné que ces échantillons ne se dégradent pas à la lumière comme dans le cas des membranes visuelles.



## 2.4 Méthodes hydrodynamiques

Il existe plusieurs techniques hydrodynamiques. L'utilisation d'une bonne variante de celles-ci permet de déterminer certains paramètres caractérisant la molécule à l'étude et des changements dans ces paramètres peuvent être observés. C'est précisément la comparaison entre les membranes pourpres natives et traitées aux anesthésiques qui nous intéresse dans cette étude. Les disques visuels ne seront pas étudiés par cette technique à cause d'une part du système optique utilisé et d'autre part du fait que l'enflurane entraîne une légère agrégation de ces membranes.

### 2.4.1 Vitesse de sédimentation

Pour les études de vitesse de sédimentation, les membranes pourpres sont suspendues dans le tampon HEPES à pH 7.8 et sont d'abord soniquées 10 minutes dans un bain à ultrasons contenant de l'eau glacée (Branson 1200) puis mélangées à une solution de sucrose pour obtenir une D.O. finale de 0.5 à 568 nm (soit 0.24 mg/ml) et une concentration de 0.4 M en sucrose et 5 mM en tampon. Le sucrose permet de ralentir la vitesse de sédimentation des membranes en augmentant la viscosité et la densité du milieu. Les échantillons natifs ou traités aux anesthésiques (1% v/v d'enflurane) sont placés dans les compartiments d'une cellule à double secteur s'adaptant au rotor analytique à quatre sections. Trois échantillons sont étudiés lors d'une même expérience avec du tampon dans le secteur de référence. Les secteurs des cellules ont les côtés inclinés de façon à ce qu'ils soient parallèles aux lignes de forces centrifuge. La quatrième section du rotor contient une contrebalance permettant de calibrer la mesure des distances à partir du centre de rotation. L'ultracentrifugation s'effectue à 20 °C à une vitesse rotatoire de 4800 rpm sur une ultracentrifugeuse analytique (Beckman Model E Analytical Ultracentrifuge). Des spectres sont enregistrés par la mesure d'absorbance de l'échantillon à 280 nm au temps zéro et par intervalles de 10 ou 15 minutes jusqu'à ce que la sédimentation soit terminée. Le tracé pour un échantillon nécessite 3 minutes et il faut donc en tenir compte lors des calculs de la vitesse de sédimentation. Au temps zéro, le chariot de l'enregistreur est inversé avant la fin du tracé pour diminuer l'intervalle de temps entre les tracés de chaque échantillon. Le système de balayage photoélectrique fournit un tracé de l'absorbance de l'échantillon en comparant avec celle du solvant en fonction du temps.

### 2.4.2 Centrifugation isopycnique

La centrifugation sur gradient de sucrose s'effectue avec des gradients continus dont les concentrations s'étalent entre 1.0 et 2.0 M pour les échantillons de membranes pourpres et entre 0.7 et 1.4 M pour les vésicules contenant les MP. Ces vésicules sont obtenues selon la technique de préparation décrite par Racker et al.(1973 et 1974). Les gradients sont formés en plaçant un poids égal de chaque solution dans un formeur de gradients linéaires (Gradient Mixer GM-1, Pharmacia Fine Chemicals) dont la sortie est reliée à une pompe péristaltique à 6 canaux (Manostat Cassette Pump). Six gradients identiques d'environ 35 ml sont ainsi formés simultanément et les échantillons concentrés sont déposés à la surface. Les échantillons sont traités avec 5% v/v d'enflurane et les gradients sont additionnés de 1% v/v de ce même anesthésique dans le sucrose. L'ultracentrifugation s'effectue à 4 °C dans un rotor à godets oscillants de type SW-28 à une vitesse rotatoire de 20 000 rpm et ce, pour au moins 24 heures et au plus 72 heures (ultracentrifuge Damon IEC Model B-60). L'insertion d'un capillaire relié à la pompe péristaltique permet de recueillir les fractions en commençant par le fond du tube avec un collecteur de fractions (Gilson micro fractionator). La localisation précise de l'emplacement de la bande de membranes sur le gradient se fait par la lecture de l'absorbance à 568 nm et l'indice de réfraction de cette fraction permet d'en déterminer la densité, après correction pour la température et conversion selon les tables appropriées. Pour les membranes traitées avec les anesthésiques, l'absorbance de la fraction est tout de même mesurée à 568 nm puisque ces molécules s'évaporent lors de la collection des fractions, mais ceci n'a pas d'influence sur la position des membranes ou l'indice de réfraction mesuré.



### 3- RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Qualité des préparations membranaires utilisées

##### 3.1.1 Membranes pourpres

Les conditions de culture des bactéries halophiles sont critiques et il est important de bien les connaître et les contrôler puisque la présence de même que la quantité de membranes pourpres qu'elles produisent y sont étroitement reliées. Selon Becher et Cassim (1975), la pureté d'une préparation de MP peut être évaluée d'abord par le spectre d'absorption UV-visible de la suspension membranaire, de même que par le rapport des absorbances à 280 et 568 nm. Le spectre d'absorption des membranes pourpres présente une bande dans le visible dont le maximum se situe à environ 568 nm et qui correspond à l'absorbance du chromophore dans sa forme adaptée à la lumière de même que la bande d'absorption typique des résidus aromatiques de l'opsine, située à 280 nm (Oesterhelt et Stoeckenius, 1974). Une contamination par la bactériorubérine, le caroténoïde contenu dans les membranes des halobactéries et constituant le principal contaminant, se traduirait dans le spectre par la présence d'épaulements à des longueurs d'onde correspondant aux pics retrouvés dans son propre spectre, soit à 470 et 498 nm. La pureté de la préparation se reflète également dans le rapport entre les absorbances à 280 et à 568 nm et ce rapport devrait diminuer avec une plus grande pureté de la préparation. Les valeurs rapportées par Oesterhelt et Stoeckenius (1974) sont de l'ordre de 2.0 à 2.1 tandis que Becher et Cassim obtiennent des valeurs comprises entre 1.5 à 2.0, ce rapport n'étant pas influencé par la concentration de membranes pourpres. La figure 4 présente le spectre d'une préparation de membranes pourpres obtenue selon la méthode décrite dans la section 2.1. Ce dernier est dépourvu de l'épaulement caractéristique de la présence de bactériorubérine vers 470 et 498 nm et le rapport des absorbances pour les diverses préparations variait entre 1.55 et 1.65. Ces deux observations indiquent la très haute qualité de ces préparations, similaire ou supérieure à celle rapportée par les autres équipes.

Le rendement en MP peut également être évalué spectrophotométriquement. L'absorbance à 568 nm fournit les outils nécessaires pour déterminer la quantité de membranes produites. Pour Oesterhelt et Stoeckenius, une culture typique de 10 l produit entre 200 et 500 mg de membranes et nous obtenons un rendement similaire, variant entre 240 et 480 mg dépendamment de la préparation et du nombre de passages en culture de la souche. En effet,

bien que la membrane pourpre se développe naturellement chez les souches de *Halobacterium halobium* utilisées, de nombreux passages en culture provoquent l'apparition de mutants qui perdent le plasmide responsable de ce trait et sont alors incolores (Torsvik et Dundas, 1982). Il faut donc, pour conserver un rendement de synthèse de membranes pourpres adéquat, reprendre la souche de départ qui, après quelques passages sur gélose, est utilisable pour leur préparation.

### 3.1.2 Membranes discales

La préparation des membranes discales se fait selon la technique décrite par Salesse et al. (1983). Le critère de pureté établi par ces auteurs est également relié aux propriétés spectroscopiques des membranes. Le rapport de l'absorbance des résidus aromatiques des protéines (280 nm) et du chromophore (500 nm) doit être le plus bas possible. Cependant, la détermination de ce paramètre nécessite la solubilisation des membranes discales, compte tenu du fait que la diffusion importante de la lumière par les membranes discales de grande taille prévient la mesure précise de leur absorption dans le proche UV. Par ailleurs, on sait également que l'intensité de l'absorption par la rhodopsine à 280 nm dépend du détergent utilisé pour la solubilisation. Pour des raisons pratiques, nous avons donc utilisé le rapport des absorbances à 500 et 400 nm et la présence d'un épaulement vers 420 nm, indicateur de contamination par l'hémoglobine ou des cytochromes mitochondriaux, comme critère de pureté. Seules les préparations exemptes de contaminations décelables et satisfaisant au critère  $A_{500} / A_{400} \leq 2$  ont été retenues aux fins d'expérimentation. La figure 5 présente les spectres d'absorption obtenus lors de la purification des membranes discales. Le spectre des segments externes des bâtonnets présente la bande principale d'absorption de la rhodopsine (500 nm) ainsi qu'un épaulement très marqué vers 420 nm. On remarque également que la ligne de base du spectre à cette étape de la purification est très distordue par la diffusion de la lumière. Après éclatement des membranes plasmiques et flottaison sur Ficoll, on ne décèle que la présence de rhodopsine dans le spectre de l'échantillon de membranes discales, la plus grande partie des contaminations se retrouvant dans le culot. Le spectre de ce culot de flottaison montre qu'il renferme effectivement la plus grande partie des contaminants de même qu'une quantité appréciable de rhodopsine.

La diffusion de la lumière UV est beaucoup moins prononcée pour les membranes discales que pour les SEB, ce qui suggère l'influence de la qualité des préparations membranaires sur la fiabilité des signaux optiques dans cette région spectrale.

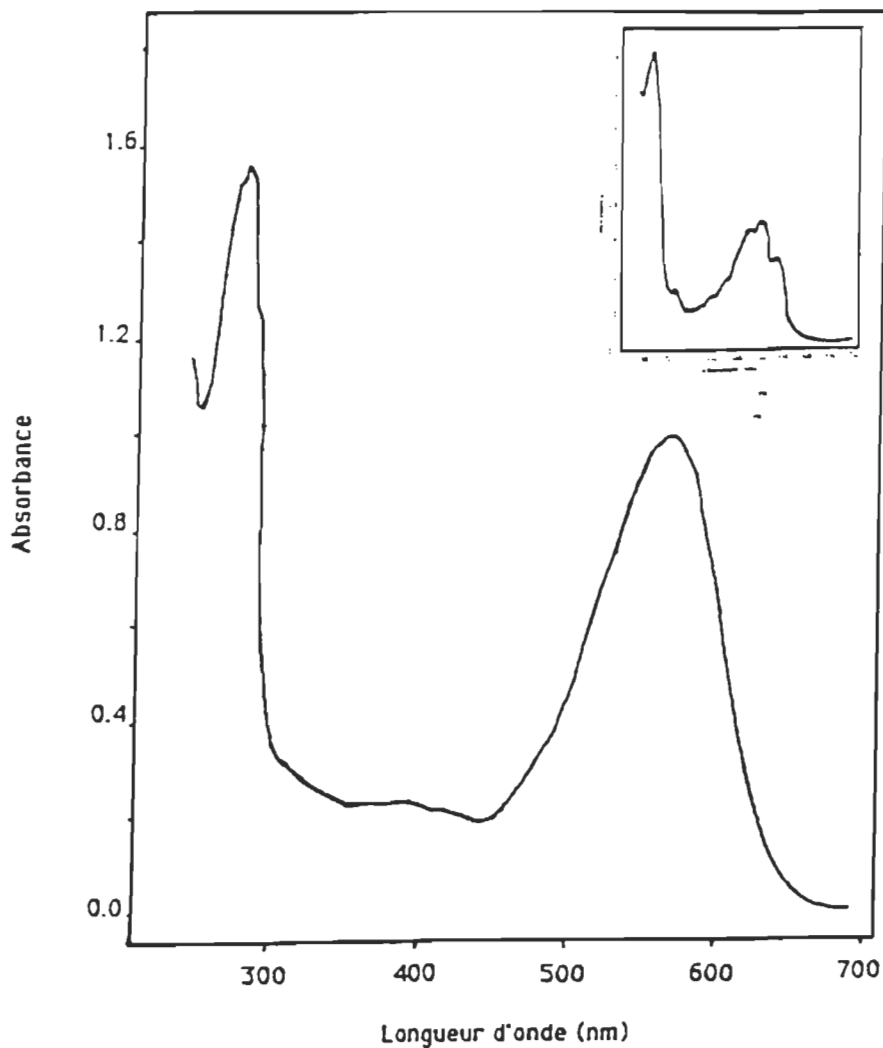


Figure 4 : Spectre d'absorption des membranes pourpres purifiées. La préparation présentait les caractéristiques spectrales des membranes pourpres, sans épaulements à 470 et 498 nm. Dans le cas présenté, le rapport des absorbances à 280 et 568 nm était de 1.61. Encart : spectre de la bactériorubérine contenue dans les membranes des bactéries halophiles (Oesterhelt et Stoeckenius,1974).

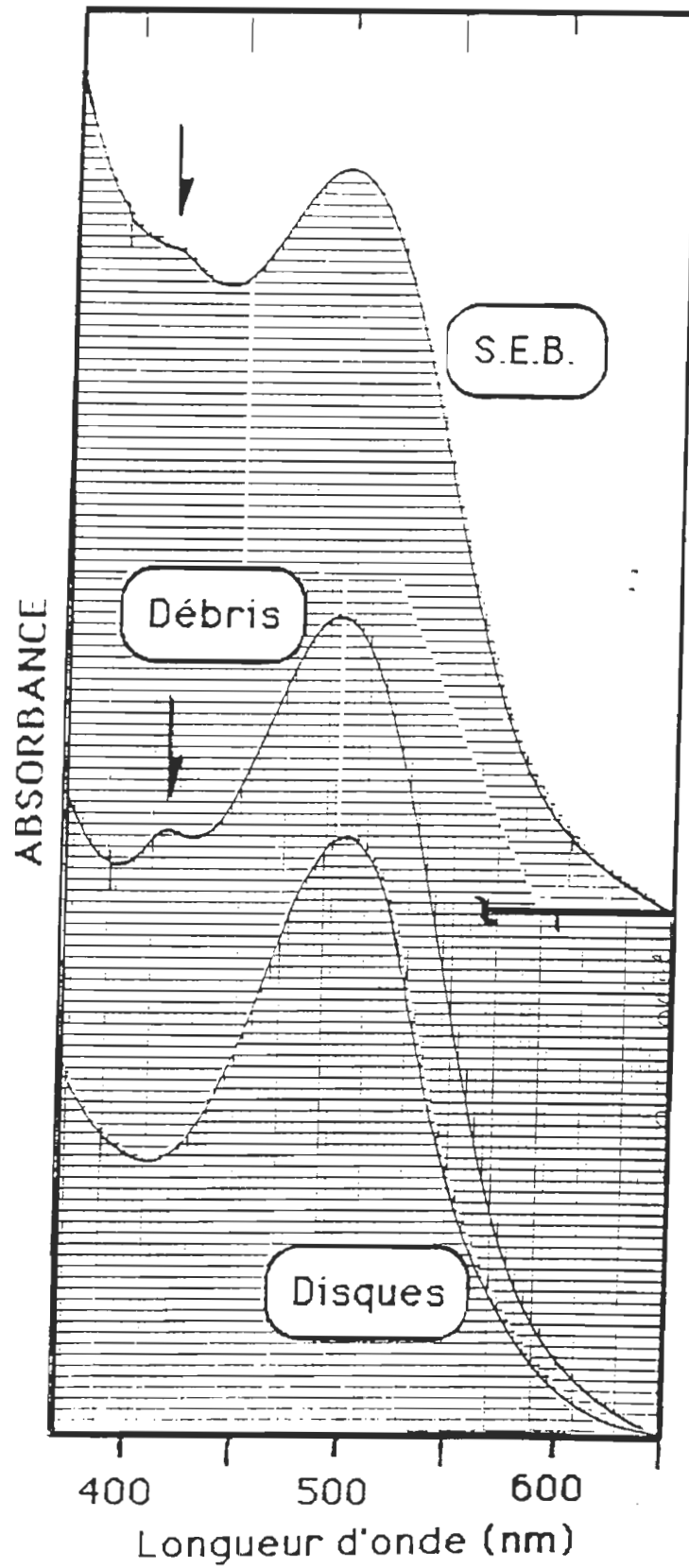


Figure 5 : Spectre d'absorption des membranes discales non-solubilisées. La flèche indique l'épaule occasionnée par la présence d'hémoglobine ou de cytochromes mitochondriaux.

### 3.2 Modification des spectres d'absorption en présence d'anesthésique

Dans les membranes visuelles, l'addition d'anesthésiques halogénés ne modifie pas le spectre d'absorption de façon importante. Par contre, dans les membranes pourpres, ils produisent des changements dans la protéine, dont la couleur passe alors du pourpre au rouge. Comme on s'y attend, ces changements sont observables dans le spectre d'absorption des membranes puisque le changement de couleur est visible à l'oeil nu ! D'abord, le maximum d'absorption du chromophore se trouvant initialement à 568 nm subit un déplacement hypsochrome pour se situer à 480 nm (bR<sub>480</sub>), avec un point isosbeste à 510 nm pour des concentrations croissantes d'enflurane (Nishimura et al.,1985). Cette diminution du maximum d'absorption indique un affaiblissement des interactions entre le rétinol et l'opsine (Heyde et al., 1971). En effet, ce sont ces interactions rétinol-protéine qui déterminent le maximum d'absorption des pigments et ceci est illustré par le fait que la longueur d'onde d'absorption maximale du rétinol est augmentée lors de la formation d'une base de Schiff protonée et encore plus lors de la liaison avec l'opsine. Le mécanisme de régulation du maximum d'absorption des pigments contenant le rétinol est principalement contrôlé par le degré de délocalisation des électrons  $\Pi$  dans la chaîne polyénique (Aton et al.,1977). La délocalisation des électrons a pour conséquence de diminuer l'énergie de l'état excité ( $\Pi^*$ ) plus que celle de l'état fondamental et produit donc un déplacement du maximum d'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde. L'augmentation de la délocalisation des électrons dans le pigment comparativement aux composés modèles est causée d'une part par la protonation de la BS accompagnée d'un contre-ion et d'autre part, par la présence d'une charge positive délocalisée le long du système électronique, laquelle ne se retrouve pas en absence de l'opsine (Callender et Honig,1977). D'autres phénomènes peuvent également être présents et contribuer à l'augmentation de la délocalisation. Un des autres mécanismes de régulation de la position du maximum d'absorption des pigments rétinoliens pourrait être la présence d'une ou plusieurs charges ponctuelles négatives externes situées près de l'anneau ionone tel que proposé par le groupe de Nakanishi (Nakanishi et al., 1980). Enfin, il est opportun de signaler que récemment, le groupe de Richard Mathies proposait qu'une paire d'ions interagissant fortement avec le rétinol au voisinage des carbones 5 et 7 soit principalement responsable de la modulation du maximum d'absorption du pigment (Lugtenburg et al., 1988).

De plus, l'intensité de l'absorbance de la forme rouge à 480 nm est moindre que celle de la bR native à 568 nm, puisque le coefficient d'extinction molaire du chromophore dans la protéine, originalement de  $5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  est réduit à  $4.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  pour la

forme traitée avec les anesthésiques, ce qui se rapproche de la valeur observée pour la forme rouge induite par la délipidation des membranes (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971; Dupuis, communication personnelle; Henry et al., 1988). Le traitement des membranes avec les anesthésiques provoque également une diminution de l'absorbance de la protéine à 280 nm de l'ordre de 15 %, le coefficient d'extinction passant de  $1.26 \times 10^5$  à  $1.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Dupuis, communication personnelle). Ces changements sont présentés à la figure 6 dans laquelle sont comparés les spectres d'absorption des membranes natives et traitées avec l'enflurane. On y constate le déplacement de la bande à 568 nm vers le bleu de même que son affaiblissement. L'absorbance à 280 nm est ici réduite de 17 % par la présence d'enflurane.

Les anesthésiques étant peu solubles dans l'eau, il devient difficile de franchir la barrière aqueuse afin de transformer toutes les membranes et ce, encore plus lorsque la suspension est concentrée. Même en adaptant préalablement les membranes à la lumière, l'effet n'est pas complet et il est possible de quantifier la quantité restante de membranes pourpres natives puisqu'un épaulement vers 568 nm demeure et témoigne de leur présence. La distance entre cet épaulement et l'extrapolation de la bande d'absorption à 480 nm permet de calculer le pourcentage restant sous forme native.

Ces changements dans le spectre de la bR résultent d'interactions, directes ou indirectes, entre les molécules d'anesthésiques et la protéine. De plus, ils sont complètement réversibles lorsque l'anesthésique est retiré de la préparation par exposition à un vide modéré (Henry et al., 1988). Ces interactions et les changements qu'elles produisent ont été analysés par plusieurs techniques et les résultats obtenus sont présentés dans les pages qui suivent.

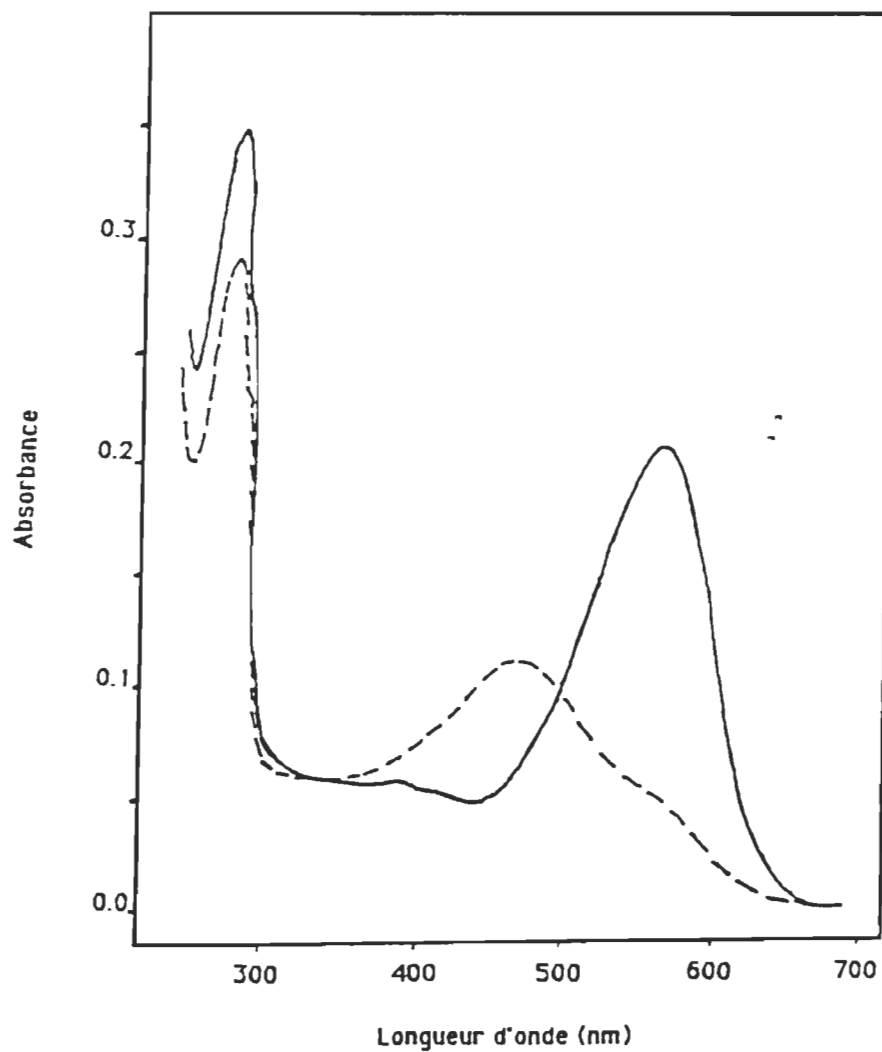


Figure 6 : Spectres d'absorption comparés des membranes pourpres natives et traitées à l'aide d'anesthésique. Le maximum d'absorption se situant à 568 nm pour les membranes natives ( \_\_\_ ) dans un tampon Hepes à pH 7.8, 10 mM, passe à 480 nm suite à l'addition de 0.2 % d'enflurane ( \_ \_ \_ ).

### 3.3 Analyses spectroscopiques

#### 3.3.1 Spectroscopie de résonance Raman

Il est clair que le chromophore de la bactériorhodopsine et/ou son environnement subissent un changement structural important lors du traitement par l'enflurane. Afin d'en préciser l'ampleur, nous avons utilisé la spectroscopie de résonance Raman. Cette technique constitue un outil de choix pour l'analyse du chromophore des pigments rétinien (Pour une revue, voir Callender et Honig, 1977 ou Warshel, 1977)

##### 3.3.1.1 Information que l'on peut obtenir

En résonance Raman, l'échantillon est illuminé dans la région d'absorption du chromophore polyénique, le rétinol, ce qui amplifie sélectivement sa réponse et la lumière diffusée de façon inélastique à des fréquences inférieures à celle de la bande de diffusion Rayleigh est mesurée (raies anti-Stokes). Ces raies sont choisies car le flux de photons diffusés y est plus important que pour les raies Stokes (Lewis, 1982). L'intensité de la diffusion dans un intervalle de fréquences donné est mesurée et le déplacement en fréquence par rapport à la raie Rayleigh correspond aux fréquences vibrationnelles du chromophore absorbant. La spectroscopie de résonance Raman permet donc d'étudier spécifiquement les modes vibrationnels du chromophore, en les amplifiant, ainsi que des résidus d'opsine adjacents qui sont couplés à sa bande d'absorption dans le visible (Oseroff et Callender, 1974; Lewis, 1982; Callender et Honig, 1977). Le spectre de résonance Raman du pigment sera ainsi modulé par la structure du chromophore de même que par son environnement protéique.

Le spectre du rétinol est connu depuis plusieurs années déjà. Rimai et ses collaborateurs (1971) ont initié l'étude des différents isomères du rétinol par résonance Raman en montrant que les spectres étaient sensibles au groupement terminal ainsi qu'à la configuration de l'isomère. Depuis, des études utilisant les substitutions chimiques ou le marquage isotopique des chromophores simples, de leur BS de même que des pigments complets ont permis d'assigner chaque bande observée dans le spectre à un mode vibrationnel particulier et d'arriver à obtenir plus de détails sur la structure du chromophore dans son environnement protéique. Le spectre de la bR pour lequel toutes les bandes ont été assignées à un mode vibrationnel particulier par Mathies et son équipe (Lugtenburg et al., 1988) est présenté à la figure suivante(7).



Les vibrations les plus importantes pour les polyènes se situent entre 800 et 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Une bande principale se retrouvant dans la région de 1500 à 1600  $\text{cm}^{-1}$  correspond aux mouvements en phase d'élongation éthyléniques (C=C) de la chaîne polyénique (Callender et Honig, 1977). La fréquence de ce mode vibrationnel dépend, tout comme le maximum d'absorption, de la densité électronique dans les doubles liaisons et donc, de leur délocalisation. Lorsque l'ordre de liaison diminue, c'est-à-dire lorsque la délocalisation est augmentée, la fréquence à laquelle sont retrouvés les mouvements éthyléniques est également diminuée. Il existe une corrélation linéaire inverse entre la fréquence de ces élongations et le maximum d'absorption des pigments, déterminé par les interactions rétinal-protéine (figure 8) (Aton et al., 1977). Selon cette relation inverse, la bande C=C dans la bR<sub>568</sub> se retrouve à 1530  $\text{cm}^{-1}$  et il est possible d'interpoler sa position à 1550  $\text{cm}^{-1}$  pour un pigment absorbant à 480 nm.

Entre 1600 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  se situent les modes d'élongation de la base de Schiff (C=N ou C=N-H). De faible intensité, ces modes sont sensibles au degré de protonation et donc, à la deutériation. Ils se retrouvent vers 1650  $\text{cm}^{-1}$  pour la BS protonée en solution et vers 1625  $\text{cm}^{-1}$  pour la BS non-protonée (Cookingham et al., 1978; Aton et al., 1977). Dans un pigment cependant, cette fréquence est diminuée par rapport aux chromophores modèles, probablement suite à des interactions entre un résidu protéique et le proton de la BS (Marcus et Lewis, 1978) ou avec d'autres parties du rétinal. Ces dernières interactions se produisent loin de la BS puisque son mode d'élongation est moins sensible au maximum d'absorption du pigment que celui des élongations C=C (Callender et Honig, 1977). Lorsque les membranes sont suspendues dans l'eau lourde, le proton de l'azote de la BS, lorsque présent, est échangé pour un atome de deutérium et la mesure du déplacement isotopique de la bande caractéristique du mouvement d'élongation C=N, qui se déplace vers les plus basses fréquences, constitue une mesure du degré de protonation de la BS (Oseroff et Callender, 1974). Ce déplacement isotopique est une des évidences spectroscopiques de la protonation de la BS. Le déplacement calculé et observé pour la bR et ses intermédiaires est de l'ordre de 20  $\text{cm}^{-1}$ , ce qui est inférieur au déplacement observé pour la rhodopsine visuelle (30  $\text{cm}^{-1}$ ) (Oseroff et Callender, 1974; Pande et al., 1981; Stockburger et al., 1979; Callender et Honig, 1977) et indique que cette valeur reflète l'environnement immédiat de la BS, qui varie selon la protéine (Kakitani et al., 1983).

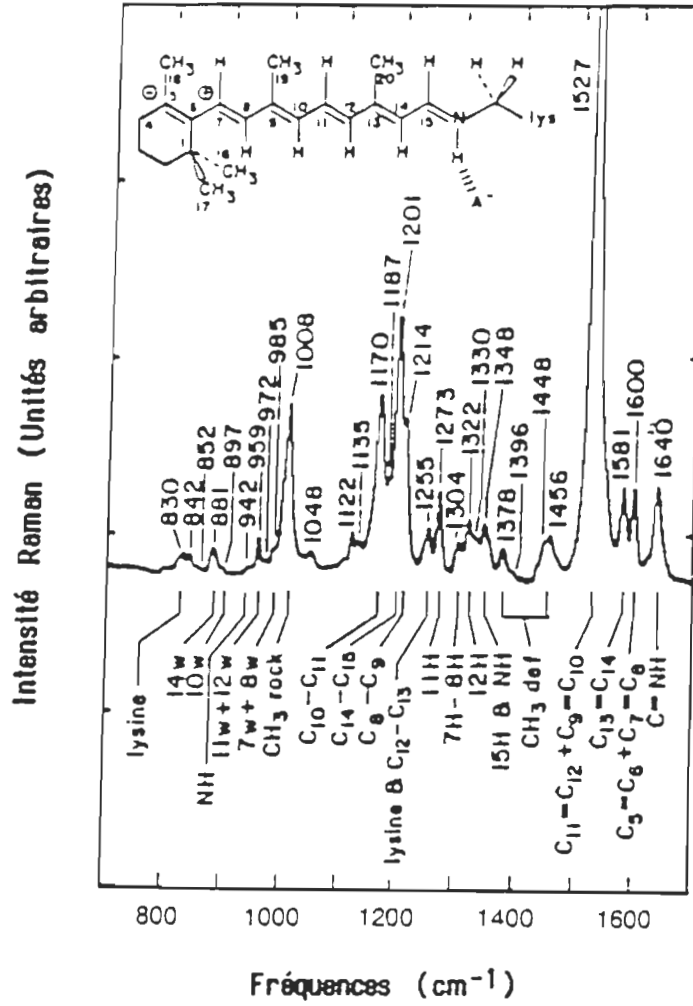


Figure 7 : Assignment des modes vibrationnels observés dans le spectre de résonance Raman de la bR<sub>568</sub> (Lugtenburg et al., 1988).

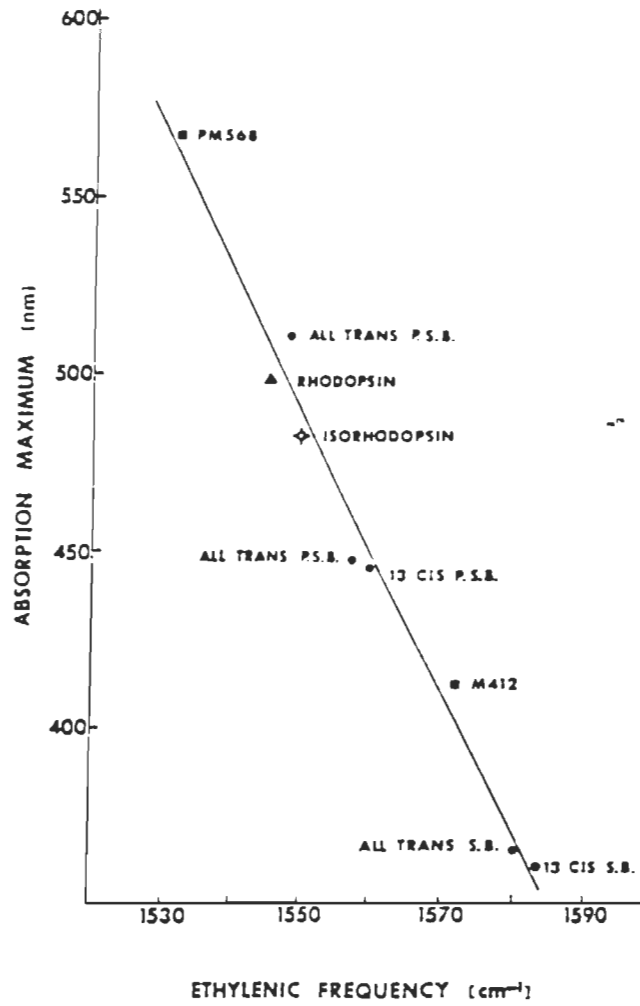


Figure 8 : Corrélation entre la fréquence d'élongation des liens éthyléniques des pigments rétiniens et leur maximum d'absorption (Aton et al., 1977).

Malgré le fait que la liaison C=N fasse partie du système de doubles liaisons conjuguées du polyène, il n'existe pas vraiment de relation fréquence-maximum d'absorption pour cette vibration comme dans le cas des élongations éthyléniques. Une même relation serait prévisible, mais l'inverse est parfois observé : l'élongation de la liaison C=N-H se produit à une fréquence supérieure à celle de la liaison C=N ! Ceci reflète le couplage des mouvements d'élongation C=N avec les mouvements de pliement C=N-H, qui modulent la fréquence de ces vibrations. Le degré de couplage entre ces deux mouvements est influencé par l'environnement de la BS. Dans le cas des composés modèles non-protonés où ce pliement est absent, une corrélation existe entre cette fréquence et le maximum d'absorption (Heyde et al., 1971).

Vers les plus basses fréquences se retrouvent, entre 1300 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ , les modes vibrationnels causés par les déformations des groupements méthyles du rétinol. Ensuite, la région comprise entre 1100 et 1300  $\text{cm}^{-1}$  constitue "l'empreinte" du chromophore (fingerprint) puisque les vibrations retrouvées à ces fréquences sont sensibles à sa structure, soit son groupement terminal et sa forme isomérique (Callender et Honig, 1977; Pande et al., 1981; Pande et al., 1989b; Marcus et Lewis, 1978). Les interactions du chromophore avec la protéine peuvent également modifier le patron des modes vibrationnels dans cette région par rapport aux chromophores modèles (Pande et al., 1981). Les bandes observées dans cette région sont dues aux mouvements de pliement des liens C-C-H couplés à ceux des élongations des liens C-C, simples ou doubles, dans le même plan (Callender et Honig, 1977; Cookingham et al., 1978).

### 3.3.1.2 Résultats expérimentaux

Les spectres de résonance Raman observés pour les formes 568 et 480 nm de la bactériorhodopsine dans les conditions décrites à la section 2.3.2 sont présentés aux figures 9 et 10. De façon générale, on remarque d'abord que ceux des membranes natives présentent un bon rapport signal/bruit, qui est diminué dans celui des membranes traitées aux anesthésiques. La différence de concentration entre les échantillons peut influencer le rapport signal/bruit, bien que sans effet sur les fréquences d'élongation. Mais la concentration ne peut être responsable de ce phénomène dans le cas présent puisque les deux types de membranes provenaient de la même suspension. Ce plus faible rapport serait alors engendré par le fait que le phénomène Raman est faible, étant donné le peu de photons

diffusés inélastiquement. Lorsqu'une lumière de longueur d'onde comprise dans la bande d'absorption du pigment est employée comme source d'excitation, le phénomène est amplifié mais les probabilités que le chromophore réabsorbe la lumière diffusée inélastiquement restent très élevées, puisque la longueur d'onde de cette lumière est encore dans le spectre d'absorption du chromophore (Callender et Honig, 1977; Stockburger et al., 1979). Dans notre cas, les deux chromophores sont en résonance puisque la raie d'excitation (488.8 nm) se situe dans la bande d'absorbance pour chacun (figure 11), mais elle est encore plus près du maximum pour les membranes rouges, ce qui peut diminuer le signal en augmentant la probabilité de réabsorption. En plus de ce faible rapport signal sur bruit, une dégénérescence a été observée dans le spectre des membranes rouges; elle est habituellement causée par la fluorescence de l'échantillon, le détecteur étant très sensible. Néanmoins, ce n'est sans doute pas le cas pour les membranes traitées par l'énflurane, puisque cette molécule est un bon quencher de fluorescence (Dr Ki Hwan Lee, communication personnelle). Une meilleure explication repose probablement sur la diffusion accrue de la lumière dans les échantillons traités avec les anesthésiques puisque l'énflurane a tendance à causer une certaine agrégation des membranes. La correction de ce phénomène a été effectuée en soustrayant du spectre original un polynôme d'ordre trois correspondant à la courbure de la ligne de base causée par ce phénomène, ce qui la ramène droite. Le spectre des membranes rouges est également moins bien résolu en raison de la présence d'une quantité résiduelle de membranes pourpres (voir épaulement dans la figure 11)

La technique utilisée est statique, mais les molécules restent tout de même en mouvement : elles peuvent entrer et sortir du champ du faisceau laser sous l'action de la diffusion et des mouvements de convection (Callender et Honig, 1977). Malgré tout, l'absorption de photons par l'échantillon initie le photocycle de la bR, de sorte que les spectres obtenus contiennent les modes vibrationnels de la bR<sub>568</sub> ou bR<sub>480</sub> accompagnés de ceux de certains intermédiaires. Ce problème de photolabilité peut être résolu soit par l'emploi de basses températures (Oseroff et Callender, 1974; Pande et al., 1981) ou par une technique de flux des molécules (Stockburger et al., 1979; Marcus et Lewis, 1978) permettant d'étudier une seule forme à la fois. Pande et ses collaborateurs (1981) ont observé que lors de l'emploi d'une longueur d'onde d'excitation inférieure à 530 nm, une bande située vers 1564 cm<sup>-1</sup> apparaissait dans le spectre. A cause de la relation existant entre le maximum d'absorption et la fréquence des elongations éthyléniques, l'absorption de l'intermédiaire dont les modes vibrationnels étaient observés peut être estimée à 440 nm, ce qui correspond environ au maximum d'absorption de l'intermédiaire M<sub>412</sub>. Dans le présent cas, la longueur d'onde utilisée était inférieure à 530 nm et les spectres présentaient les caractéristiques de

l'intermédiaire  $M_{412}$ , aussi bien pour la forme rouge que pour la forme pourpre. Cependant, il est à remarquer que les élongations éthyléniques pour l'intermédiaire M formé à partir de la forme  $bR_{480}$  se situent à une fréquence légèrement supérieure à celles observées pour l'intermédiaire M formé par la bR native. Ceci indique un métaintermédiaire différent pour les membranes "anesthésiées", lequel aurait un maximum d'absorption inférieur. Il a déjà été montré que cet intermédiaire formé à partir des membranes rougies à l'aide d'anesthésique présente un maximum d'absorption vers 380 nm (Henry et al., 1988). Il fut vérifié que les bandes observées dans le spectre de la bR étaient bien celles de l'intermédiaire  $M_{412}$  en générant ce dernier par l'emploi de MP dans la solution basale de sels à laquelle sont ajoutées quelques gouttes de diéthyl éther (Aton et al., 1977). Le spectre était semblable à ceux rapportés dans la littérature pour  $M_{412}$ , avec le pic le plus important situé à  $1560\text{ cm}^{-1}$  (figure 9, encart). De plus, la bande observée était sensible à la puissance du faisceau laser utilisé, ce qui est en accord avec l'hypothèse de la présence de M puisque l'intensité lumineuse module l'équilibre entre la forme  $bR_{568}$  et l'intermédiaire M (résultats non présentés).

Les modes d'élongation éthyléniques de la chaîne polyénique de la bR, surpassés en intensité par ceux de l'intermédiaire M ( $1560\text{ cm}^{-1}$ ), se situent à une fréquence de  $1524\text{ cm}^{-1}$  pour la bR native et  $1545\text{ cm}^{-1}$  pour la forme rouge. Ces valeurs correspondent à celles observées dans la littérature et répondent également à la corrélation existant entre le maximum d'absorption et la fréquence d'élongation.

Les modes vibrationnels du lien de base de Schiff se situent à une fréquence correspondant à celle d'une BS protonée dans un pigment. Les spectres obtenus suite à l'échange isotopique confirment l'état de protonation de la base de Schiff dans les membranes natives de même que dans les membranes traitées aux anesthésiques puisqu'un déplacement isotopique du mode vibrationnel C=N-H est observé (figure 10). Ce déplacement isotopique est du même ordre de grandeur dans les deux cas, soit  $22\text{ cm}^{-1}$  environ, passant de  $1636$  à  $1613\text{ cm}^{-1}$  et de  $1634$  à  $1612\text{ cm}^{-1}$  respectivement. Cette bande d'élongation positionnée à environ  $1636\text{ cm}^{-1}$ , en se déplaçant vers les plus basses fréquences par la présence de deutérium, se superpose à celle de l'intermédiaire M. En soustrayant le spectre de M, la bande restante à cette position peut être attribuée à ces élongations (résultats non présentés). Ceci diffère de ce qui a été observé pour la  $bR_{480}$  générée par la délipidation de la MP. La forme délipidée présente des vibrations de la BS se situant à des fréquences supérieures à celles observées dans les membranes natives, et le déplacement isotopique est plus important que celui observé pour la bR native, ce qui a porté les auteurs à conclure à un plus fort degré de

protonation de la BS pour cette forme que pour la forme native (Pande et al., 1989b). Ainsi, dans les membranes rougies aux anesthésiques, les interactions entre la BS et l'opsine ne sont pas modifiées significativement puisque les elongations de la BS se situent aux même fréquences et présentent le même déplacement isotopique que pour les membranes natives.

La région du fingerprint est également intéressante pour l'étude de l'action des anesthésiques. Le massif retrouvé aux fréquences près de  $1200\text{ cm}^{-1}$ , complexe et d'intensité importante pour la bR<sub>568</sub>, semble s'effondrer dans le spectre de la bR<sub>480</sub>. Ceci indique une diminution des interactions latérales entre le rétinol et l'opsine puisque le spectre du rétinol seul présente lui aussi des bandes beaucoup moins importantes dans cette région. Malheureusement, étant donné que le spectre obtenu est celui d'un mélange de bR et de son intermédiaire M, il est impossible de distinguer les caractéristiques de l'une ou l'autre des conformations du rétinol dans cette région, puisque la préparation contient un mélange de la forme tout-trans pour la bR et de la forme 13-cis pour son intermédiaire M.

#### 3.3.1.3 Discussion

Les études de résonance Raman nous fournissent trois informations distinctes. D'abord, elles permettent de corroborer la présence de l'intermédiaire M dans le cycle de la bR traitée aux anesthésiques. La forme bR<sub>480</sub> présente donc une activité photochimique complète, le cycle étant intact. L'activité physiologique reliée à ce photocycle est cependant inhibée par le traitement avec les anesthésiques, puisque le pompage de protons n'a pas lieu (Harvey-Girard, 1990). Ils montrent également que cette forme possède une BS protonée à un degré similaire à celle retrouvée dans la bR native. Ceci diffère des résultats obtenus pour la bR délipidée. Ainsi, l'effet de l'anesthésique ne semble pas être d'amoinrir ou d'enrayer les interactions entre la protéine et les lipides l'entourant, comme le fait la délipidation. Par contre, l'intensité des interactions rétinol-opsine est diminuée, tel que démontré par l'affaiblissement du massif dans la région du fingerprint. Cette diminution ne se fait pas sentir dans la région de la BS pour laquelle les fréquences de vibrations, de même que le degré de protonation, demeurent inchangés.

Signalons au passage que certains résultats d'études en spectroscopie Raman (Lieb et al., 1982) ont montré plus directement que des concentrations jusqu'à neuf fois supérieures aux concentrations cliniques d'anesthésiques (halothane et chloroforme) n'induisent pas de changements significatifs dans l'organisation des chaînes lipidiques d'une bicouche. Ainsi,

ces résultats, de même que les nôtres permettent de croire que les anesthésiques n'agissent pas en perturbant la bicouche lipidique ou ses interactions avec la protéine mais bien en modifiant les interactions plus fines entre le rétinol et l'opsine. Les interactions latérales semblent principalement affectées, puisque l'interaction via le lien de BS demeure intacte.



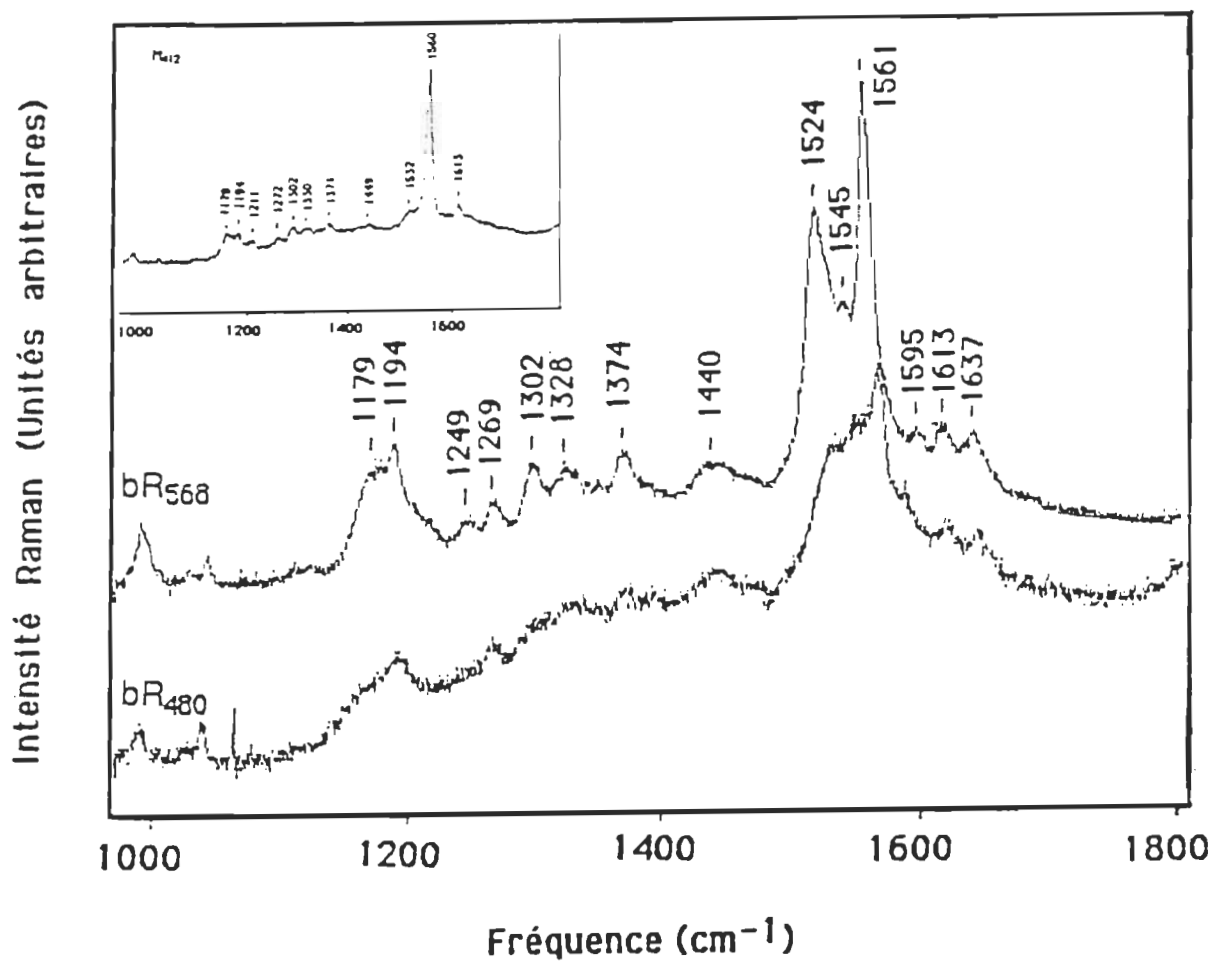


Figure 9 : Spectre de résonance Raman de bR<sub>568</sub> et bR<sub>480</sub> (traitée avec l'enflurane). Le spectre de l'intermédiaire M (encart) permet d'identifier sa présence dans les spectres précédents. La concentration en bR est estimée à 60  $\mu\text{M}$  et l'excitation se fait à une longueur d'onde de 488.8 nm.

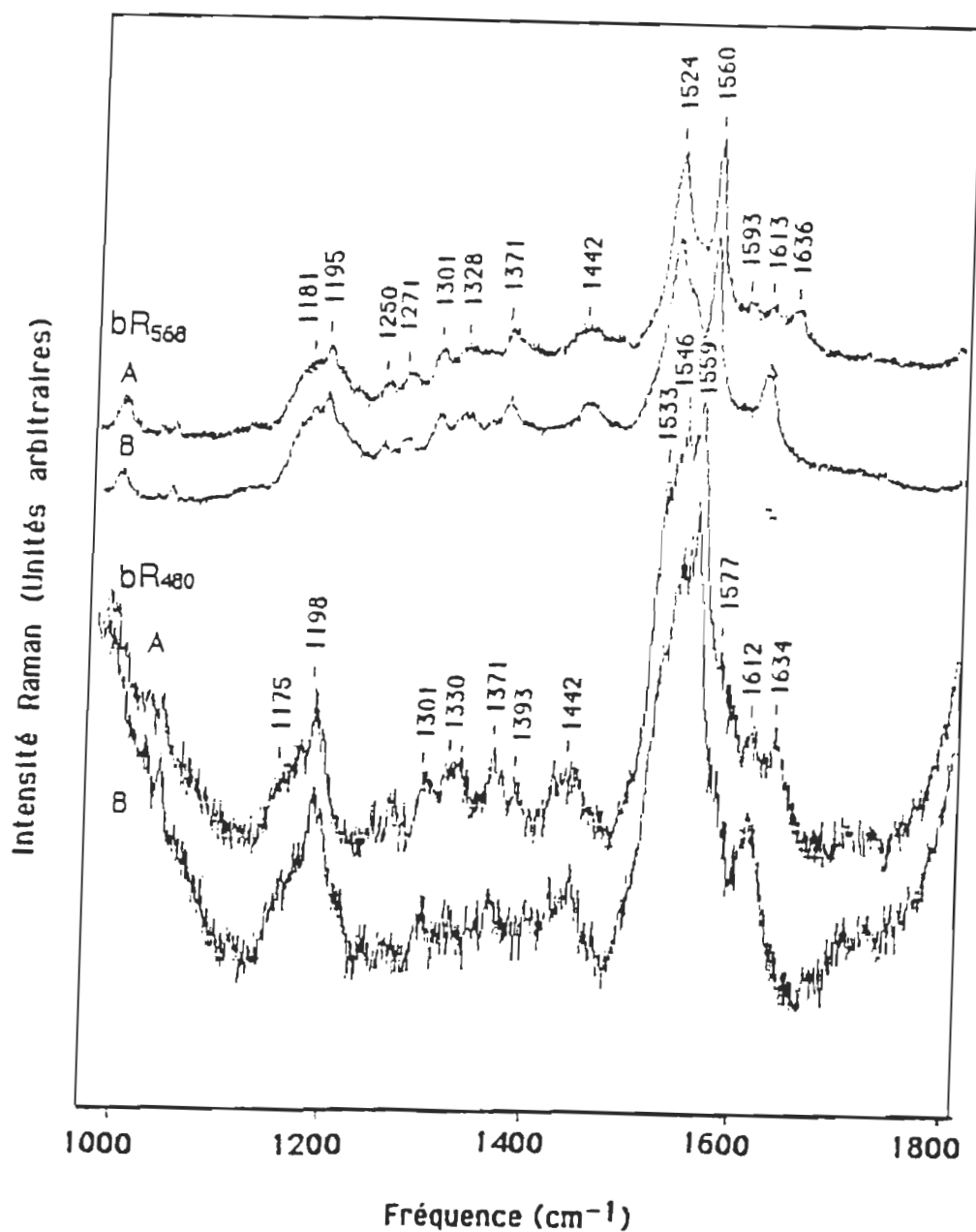


Figure 10 : Etude du déplacement isotopique des modes vibrationnels de la base de Schiff pour la bR native et traitée avec l'enflurane dans l'eau (H<sub>2</sub>O, A) et l'eau lourde (D<sub>2</sub>O, B). Le déplacement de la bande d'élongation C=N est d'environ 22 cm<sup>-1</sup> dans les deux cas. L'excitation se fait à 488.8nm et la concentration en bR est d'environ 60 μM.

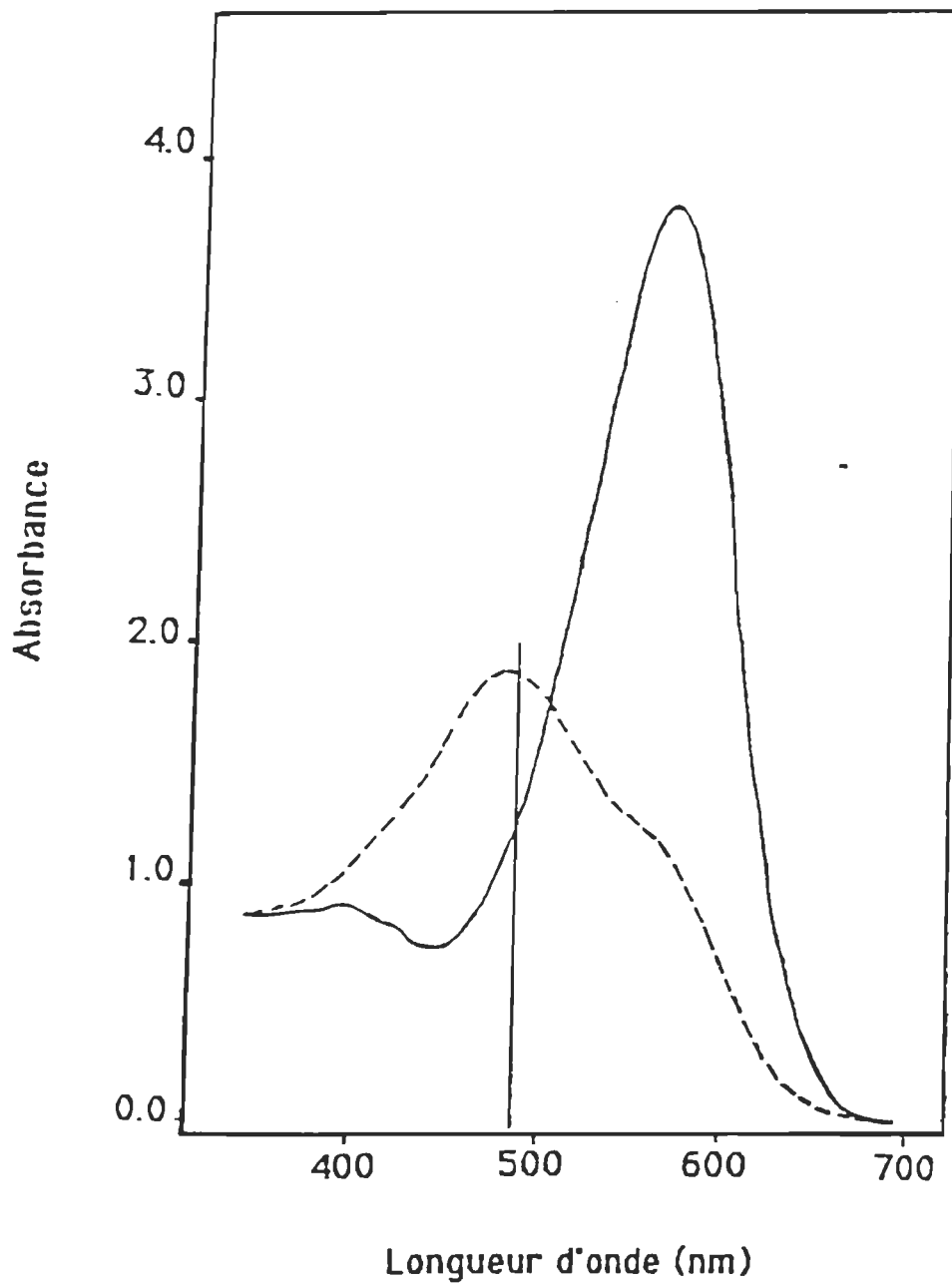


Figure 11 : Spectre d'absorption des membranes pourpres natives (—) et traitées avec l'enflurane (- -) utilisées pour les études de résonance Raman. La longueur d'onde d'excitation (488.8 nm) se situe dans la bande d'absorption dans les deux cas.

### 3.3.2 Photolyse éclair

La photolyse éclair permet d'étudier la cinétique des modifications transitoires d'absorbance lors des différentes étapes de transformation de la rhodopsine et de la bR en présence de lumière et d'analyser les perturbations apportées à la photochimie de ces protéines par un traitement avec les anesthésiques. Parallèlement, il nous est apparu opportun de comparer ces résultats avec les modifications apportées à l'aspect cinétique de l'activité des pigments lors de leur solubilisation progressive par un détergent. En effet, si on devait être amené à croire que les anesthésiques perturbent de façon importante la dynamique des domaines lipidiques des membranes photoréceptrices, on devrait peut-être s'attendre à observer des effets comparables en présence d'anesthésiques et de détergent. Ainsi, nous avons étudié le comportement cinétique des membranes photoréceptrices lors de leur solubilisation progressive par l'octyl glucoside (OG), un détergent non-ionique utilisé en raison de sa réaction rapide avec les membranes. Il est relativement doux et une dénaturation des protéines en sa présence n'est observée qu'après plusieurs jours. Dans les membranes pourpres, il a été montré que l'OG monomérisait la bR et accélère son photocycle en modifiant les interactions entre la protéine et les lipides (Applebury et al., 1974; Dencher et Heyn, 1978). Un déplacement du maximum d'absorption d'environ 10 nm vers les plus courtes longueurs d'onde a également été observé pour le traitement des membranes pourpres solubilisées par l'octyl glucoside (Lam et Packer, 1982).

#### 3.3.2.1 Photolyse des membranes visuelles

Les étapes de la photolyse de la rhodopsine ayant retenu notre attention sont la lumirhodopsine et les métarhodopsines I et II. La figure 12 est un croquis des spectres d'absorption de ces intermédiaires. L'analyse de ce croquis explique pourquoi nous avons mesuré l'absorption transitoire à deux longueurs d'onde, soit 410 et 450 nm. A ces longueurs d'onde, deux phénomènes sont observés. A 410 nm, ceux-ci ont la même orientation et causent une augmentation de l'absorbance en fonction du temps. Le premier phénomène observé est le passage de l'intermédiaire lumirhodopsine vers métarhodopsine I. Ce phénomène très rapide, de l'ordre de 10  $\mu$ sec, cause une brusque augmentation de l'absorbance de l'échantillon et constitue peut-être une réaction à l'équilibre, bien qu'une réaction à sens unique soit généralement admise dans la littérature. Le second phénomène est plus lent et se traduit par une augmentation progressive de l'absorbance jusqu'à l'atteinte d'un plateau. C'est l'établissement de l'équilibre entre les formes métarhodopsine I et II qui est observé et sa vitesse est de l'ordre de quelques millisecondes. La cinétique de

l'établissement de cet équilibre semble être biphasique. A 410 nm cependant, on ne peut observer plus d'une composante puisque cette cinétique se confond avec la passage de l'intermédiaire lumi vers méta I. Ce deuxième phénomène est possiblement encore plus complexe que seulement l'établissement de l'équilibre tautomérique entre les intermédiaires méta : un autre intermédiaire est peut-être présent et la possibilité d'une réaction d'équilibre avec la lumirhodopsine n'est pas négligeable. L'analyse à 450 nm s'avère donc plus informative.

A 450 nm, les deux phénomènes observés se produisent en sens inverse. Le passage de lumirhodopsine vers métarhodopsine I provoque une brusque augmentation de l'absorbance tandis que l'établissement de l'équilibre entre les métarhodopsines I et II se traduit par une lente diminution de ce paramètre pour revenir vers le niveau initial. La figure 13 présente un exemple de cinétiques observées à 450 nm pour les membranes discales. La mesure de la transmittance en fonction du temps est représentée pour les membranes discales natives et traitées avec 0.1 et 0.5 % v/v en enflurane.

Le calcul des constantes de vitesse pour l'établissement de l'équilibre entre les intermédiaires méta I et II se fait selon la méthode décrite par Lam et Packer (1982) en tenant compte, pour les membranes visuelles, de l'inclinaison infligée à la courbe par la blanchiment de la rhodopsine suite à l'exposition à l'éclair actinique (voir figure 13). Ces calculs visent à tracer un graphique semilogarithmique de la différence d'absorbance à un temps donné par rapport à l'absorbance maximale observée pour un temps infini en fonction du temps, ce qui correspond au pourcentage de la réaction à compléter en fonction du temps. La pente de la droite obtenue par ce graphique constitue la constante de vitesse.

La figure 14 présente un graphique semilogarithmique obtenu lors du traitement des membranes discales avec des concentrations croissantes d'enflurane. La réaction de transformation des métarhodopsines I et II constitue une approche d'équilibre et contient au moins deux composantes observables sur le graphique semilogarithmique, qui se traduisent par une allure sigmoïde de la courbe en fonction du temps. La cinétique présente d'abord une composante rapide (représentée dans deux cas seulement) et une composante plus lente qui, lorsqu'extrapolée au temps zéro, correspond à environ 60-65 % du total de la réaction. La pente de la droite correspondant à cette réaction lente peut être évaluée et correspond à la constante de vitesse. Le traitement des membranes discales avec des concentrations croissantes d'anesthésiques a pour effet d'accélérer chacune de ces deux composantes, tel qu'observé à la figure 14. La vignette présentée dans cette figure représente l'amplitude totale relative de la transition méta I-méta II, laquelle décroît en augmentant la

concentration d'enflurane dans l'échantillon. Cette amplitude est calculée en déterminant le rapport des amplitudes absolues des transitions lumi-méta I et méta I-méta II. Ce rapport est fixé à 1 pour les membranes natives.

Ainsi, ces résultats dévoilent une accélération de la vitesse de la réaction méta I  $\rightarrow$  II, ce qui suppose que l'équilibre est déplacé vers l'intermédiaire méta II. Les mesures d'amplitudes relatives indiquent cependant une action opposée, soit un déplacement de l'équilibre vers l'intermédiaire méta I, puisque l'amplitude de la transition méta I vers méta II est diminuée pour des concentrations croissantes d'enflurane. Ces résultats sont apparemment contradictoires. En effet, dans tous les travaux qui se sont intéressés à l'aspect cinétique de cette transition, on a toujours observé qu'une accélération de la vitesse par la solubilisation des membranes déplaçait l'équilibre vers la forme méta II tandis qu'un déplacement de l'équilibre vers la forme méta I, induit par l'agrégation de la rhodopsine ou par une solvatisation pauvre par des lipides exogènes, était toujours accompagné d'un ralentissement de la vitesse, voire même d'un blocage, de la transition (Baker et al., 1977; Baldwin et Hubbell, 1985; Litman et al., 1981; O'Brien et al., 1977; Motoyama et al., 1985).

Une hypothèse envisagée pour tenter d'expliquer ces résultats contradictoires serait de proposer que dans ces membranes riches en lipides, l'enflurane sépare des domaines lipidiques mobiles, qu'il fluidifie, des domaines protéiques dans lesquels la solvatisation d'une importante quantité de rhodopsine par les lipides est insuffisante pour permettre la transition étudiée. Ces conditions permettraient d'expliquer une transition plus rapide entre les intermédiaires méta, résultant de la solvatisation des pigments opérant cette transition par des lipides plus mobiles, puisque solubilisés par l'enflurane. D'autre part, l'amplitude de la transition est inférieure lors du traitement des membranes, puisque celle-ci ne s'opère pas dans les pigments non-solvatés contenus dans les domaines protéiques.

L'étude de cette transition par les membranes traitées avec l'OG confirme ce qui était déjà connu à propos de l'action de ce détergent sur les membranes discales. Ce détergent, comme plusieurs autres, ne produit pas d'agrégation de la rhodopsine et mobilise ou remplace les lipides l'entourant. Le traitement des membranes avec l'OG produit une accélération de la transition méta I-méta II de même qu'une augmentation de son amplitude, tel qu'on s'y attendrait (figure 15). Il est à noter que les concentrations des deux agents employés s'échelonnent sur une gamme à première vue différente (enflurane : 0-0.5%; OG : 0-2.5 mM), mais connue pour produire des effets comparables sur les membranes.

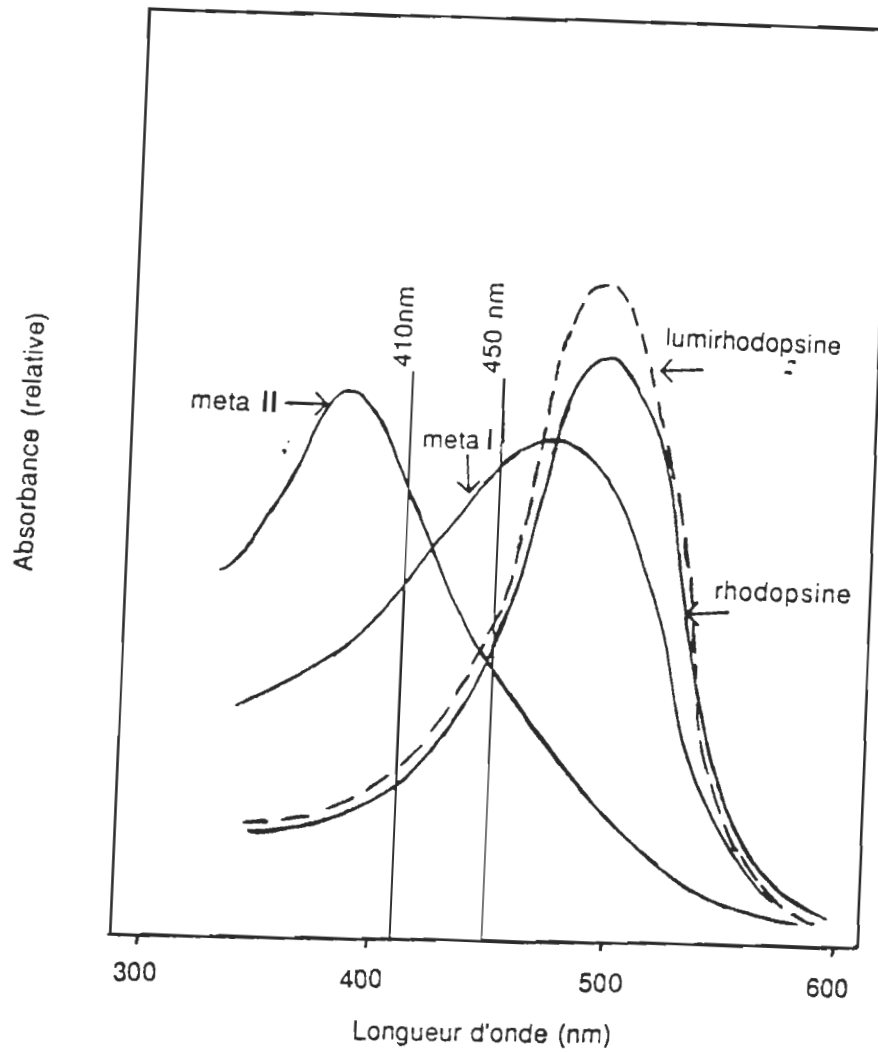


Figure 12 : Croquis des spectres des intermédiaires de la photolyse de la rhodopsine indiquant les absorptions transitoires qu'il est possible d'observer à différentes longueurs d'onde.

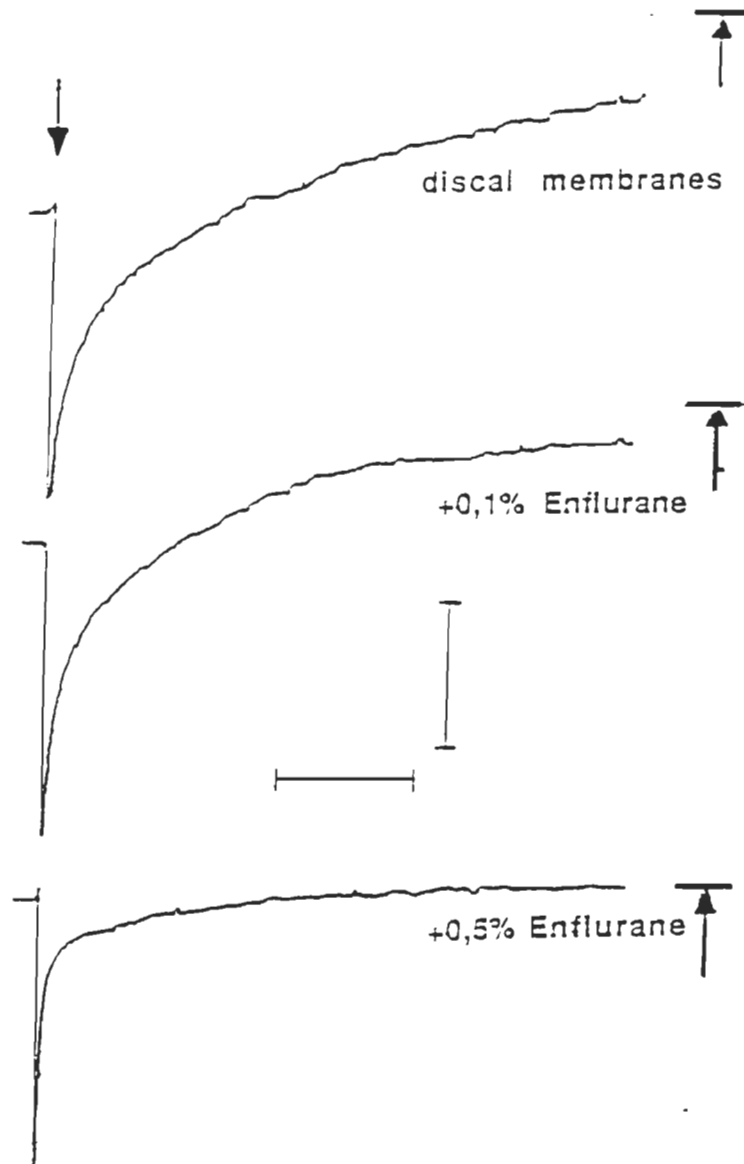


Figure 13 : Exemple de tracé de la transmittance (450 nm) en fonction du temps obtenu pour les échantillons de membranes discales traitées avec l'enflurane. La flèche vers le bas indique le moment de l'éclair laser, celles qui pointent vers le haut indiquent le niveau où le signal se stabilise après un temps de 300 ms. Les barres représentent horizontalement 2 ms et verticalement 0.25 % de transmittance. Toutes les études en photolyse éclair ont été réalisées à une température d'environ 22 ° C.



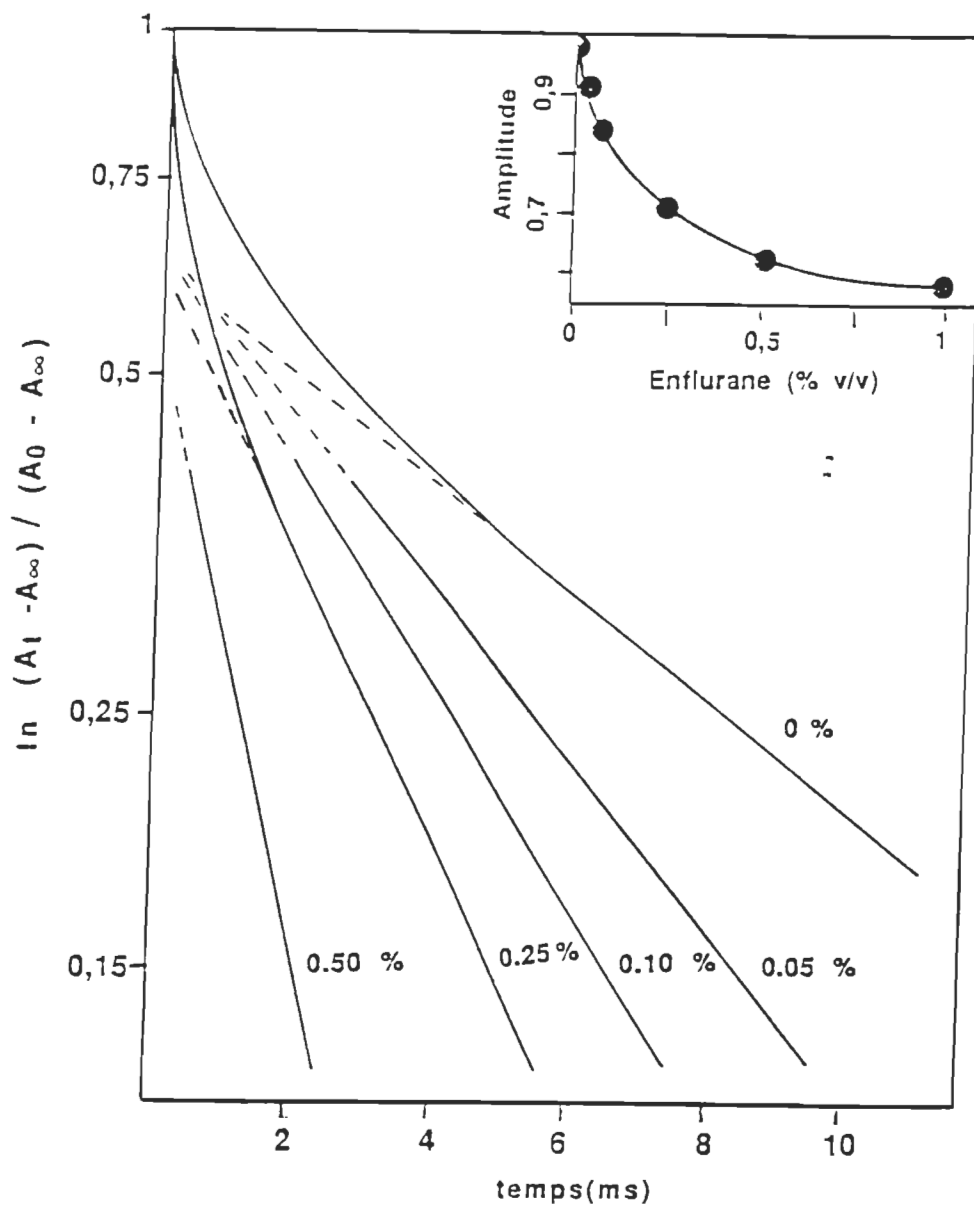


Figure 14 : Graphique semilogarithmique de la différence d'absorbance(450 nm) en fonction du temps pour la transition métarhodopsine I -> métarhodopsine II pour des échantillons de membranes discales traitées avec des concentrations croissantes d'enflurane. L'encart représente l'amplitude relative de cette transition en fonction de la quantité d'enflurane.

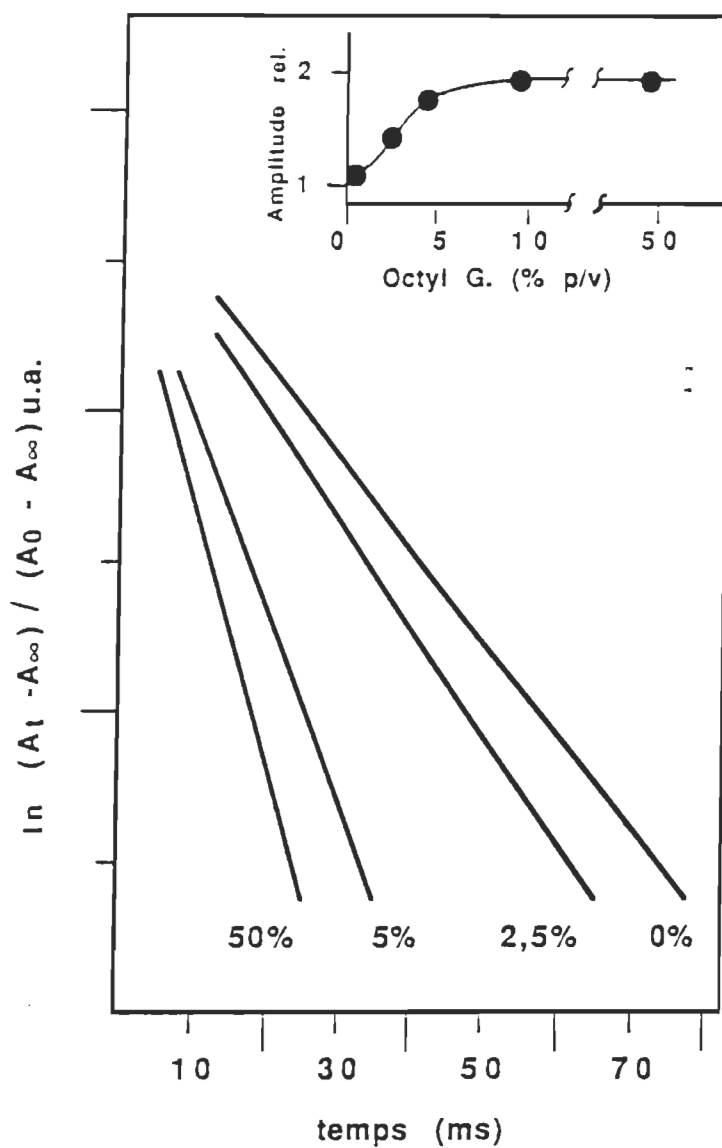


Figure 15 : Graphique semilogarithmique de la différence d'absorbance(450 nm) en fonction du temps pour les membranes discales traitées avec des concentrations croissantes d'octyl glucoside, pour cette même transition. Le graphique en encart présente l'amplitude relative de cette transition en fonction de la concentration en OG.

### 3.3.2.2 Photolyse des membranes pourpres

L'étude de la bR est beaucoup simplifiée par rapport à celle de la rhodopsine. D'abord, la courbe n'est pas dégénérée puisque les réactions photochimiques de la bR sont cycliques. De plus, ce même phénomène permet de faire la moyenne plusieurs cinétiques d'un même échantillon pour ainsi augmenter la qualité du tracé. L'analyse se fait à une longueur d'onde de 410 nm, ce qui correspond au maximum d'absorption de l'intermédiaire M<sub>412</sub>.

L'intermédiaire auquel on s'intéresse est le méta-intermédiaire. Deux réactions sont observées : la première est la transformation de la bR<sub>568</sub> en méta-bR par l'absorption de photons provenant de l'éclair actinique. Après un certain temps, cet intermédiaire retourne vers la forme initiale. Le passage de bR vers méta-bR produit une brusque augmentation de l'absorbance, puisque cette réaction est très rapide ( $\mu\text{sec}$ ) et le retour vers bR se traduit par une diminution progressive de l'absorbance pour retourner vers le niveau de base. Les tracés enregistrés sont une mesure de la transmittance en fonction du temps et un exemple est présenté pour le traitement des membranes pourpres avec des quantités croissantes d'enflurane (figure 16).

La première réaction est très rapide et il fut montré que sa cinétique était insensible au traitement par les détergents ou les anesthésiques (Henry et al., 1988). La seconde par contre est modifiée par ces deux types de molécules. Dans les membranes pourpres natives, le passage de l'intermédiaire méta vers la forme bR obéit à une cinétique d'ordre 1, qui correspond à une seule exponentielle dans un graphique semi logarithmique de la différence d'absorption en fonction du temps. Lors de la solubilisation par un détergent ou lors du traitement par les anesthésiques, la cinétique de cette transformation correspond désormais à celle d'une réaction d'ordre 2 et une double exponentielle est observée graphiquement. Deux composantes peuvent être résolues dans le temps à partir de ce graphique. La figure 17 présente un exemple d'un tel graphique. Henry et al.(1988) ont proposé que cette double exponentielle indiquait qu'une partie des molécules sous forme M retourne rapidement directement vers la forme bR alors qu'une seconde partie emprunte un chemin branché via l'intermédiaire "O". Le retour vers bR serait alors plus lent. Dans les membranes pourpres natives, les molécules empruntant ce chemin branché sont moins nombreuses et la composante lente n'est pas visible. Dans ces membranes, la seule composante est rapide. Lors de l'ajout d'agent perturbateur, la proportion de cette composante, initialement de 100 %, diminue pour faire place à la composante lente qui augmente en importance pour des quantités croissantes de ces agents. La pente des droites obtenues graphiquement correspond

à la constante de vitesse de la réaction alors que l'ordonnée à l'origine permet d'estimer la proportion de la réaction occupée par chaque composante.

Les figures 18 et 19 présentent les résultats de la photolyse des MP traitées avec des concentrations croissantes d'enflurane, comparativement aux membranes solubilisées par l'OG pour les composantes rapide (18) et lente (19). L'analyse porte sur les changements induits au niveau de la proportion de la réaction occupée par chaque composante de même qu'au niveau cinétique de la transformation de l'intermédiaire M vers la forme bR. L'examen des courbes obtenues pour la composante rapide dévoile une accélération progressive de cette composante en présence d'agents perturbateurs, de même qu'une diminution de la proportion de la réaction totale occupée par celle-ci. La proportion occupée par cette réaction diminue de façon légèrement plus importante lors du traitement avec l'OG. De façon générale, le traitement des membranes avec l'enflurane et l'OG induit des changements similaires à la composante rapide de la transformation étudiée. Ceci porte à croire à une action comparable de ces deux agents sur les membranes pourpres. Un examen plus approfondi révèle cependant des modifications différentes apportées à la composante lente par ces deux types de molécules. La proportion de cette seconde composante est évidemment augmentée par l'emploi de ces agents, et de façon plus importante pour les membranes traitées avec l'OG puisque la composante rapide diminue en importance. En ce qui concerne la cinétique, l'action de l'enflurane va dans le sens d'une accélération tout comme dans le cas de la composante rapide, ce qui produit une accélération globale de la transformation de l'intermédiaire M vers la forme bR. L'OG par contre a peu d'effet sur la cinétique de la composante lente. L'effet est donc différent de celui produit par l'enflurane.

### 3.3.2.3 Discussion

Les résultats en photolyse éclair ont d'abord permis de corroborer la présence de pigments présentant des réactions photochimiques complètes dans les membranes photoréceptrices traitées avec l'enflurane. Bien que complètes, ces réactions sont modifiées par la présence de molécules d'anesthésiques dans le sens d'une accélération de leur cinétique.

Les résultats obtenus lors du traitement des membranes pourpres avec l'enflurane diffèrent de ceux obtenus lors de la solubilisation par l'octyl glucoside. L'action de l'enflurane n'est donc pas comparable à celle d'un détergent dans ces membranes, et ces résultats pointent

vers une cible de l'action des anesthésiques autre que la phase lipidique. Ces résultats suggèrent donc une action des anesthésiques plus directe sur la protéine cible.

L'action de ces agents est également différente lors du traitement des membranes discales. L'OG agit en mobilisant ou remplaçant les lipides solvatant les molécules de rhodopsine alors que les résultats de l'action de l'enflurane s'expliquent mieux par une séparation des différents domaines membranaires.

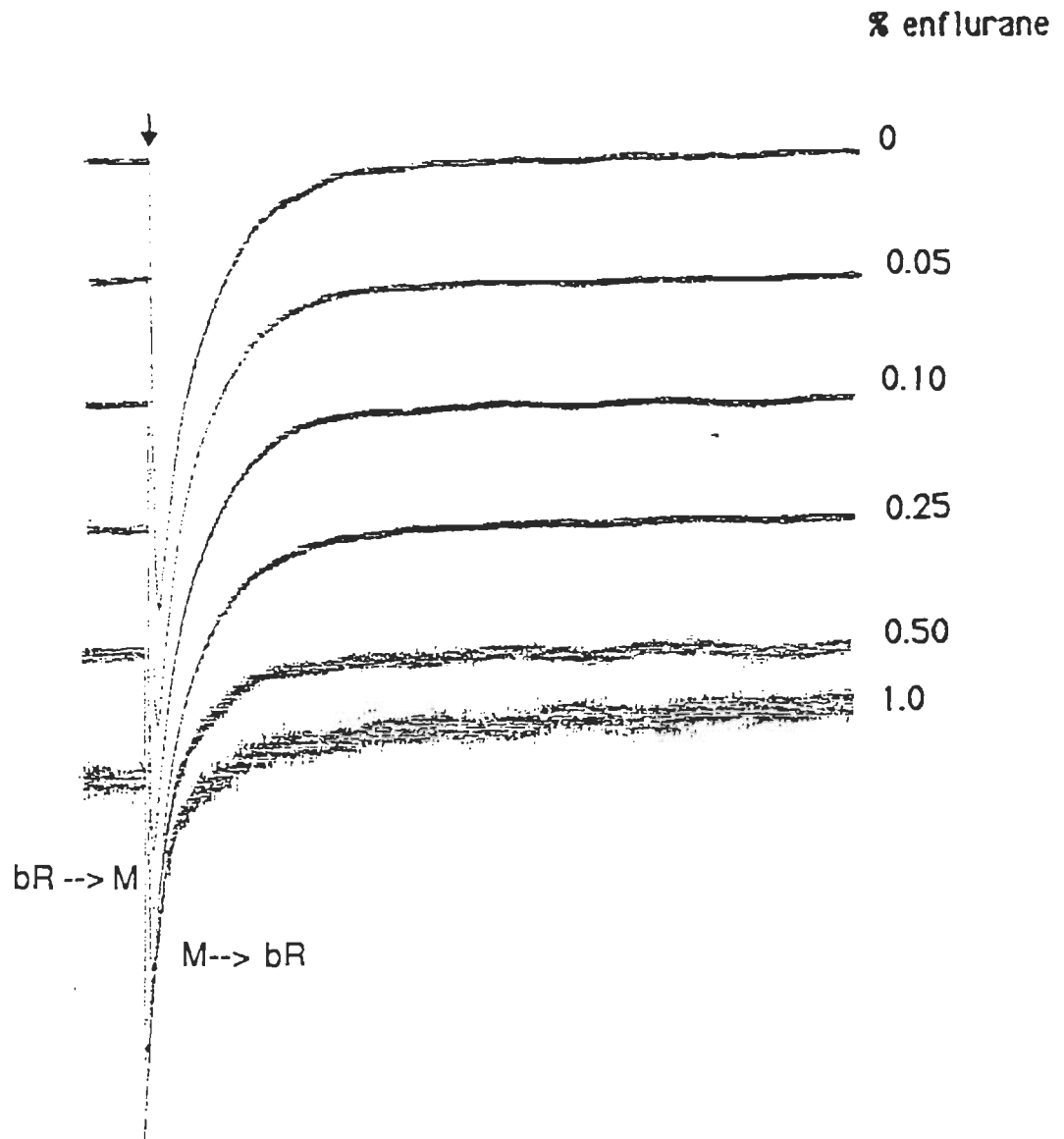


Figure 16 : Exemple de tracé obtenu pour des échantillons de membranes pourpres traitées avec des concentrations croissantes d'enflurane. La mesure de la transmittance se fait à 410 nm. Les valeurs sont normalisées et la fleche indique l'éclair actinique.

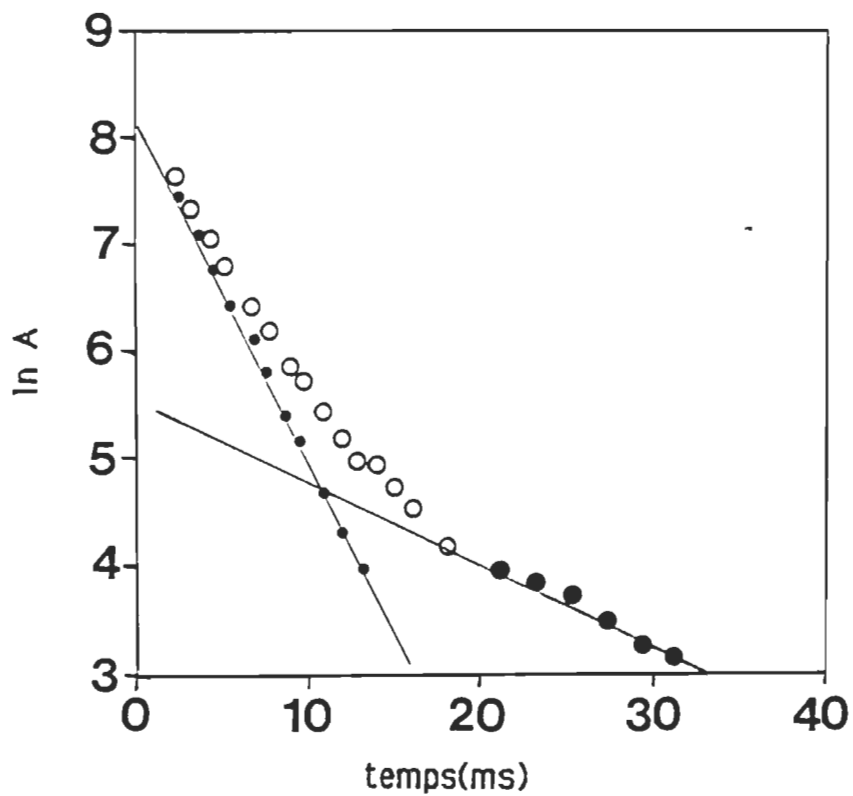


Figure 17 : Graphique semilogarithmique de la différence d'absorbance en fonction du temps pour un échantillon de MP traité avec 0.25 % d'enflurane. Il est possible de décomposer la double exponentielle et la pente des droites obtenues constitue la constante de vitesse de chaque composante de la réaction.

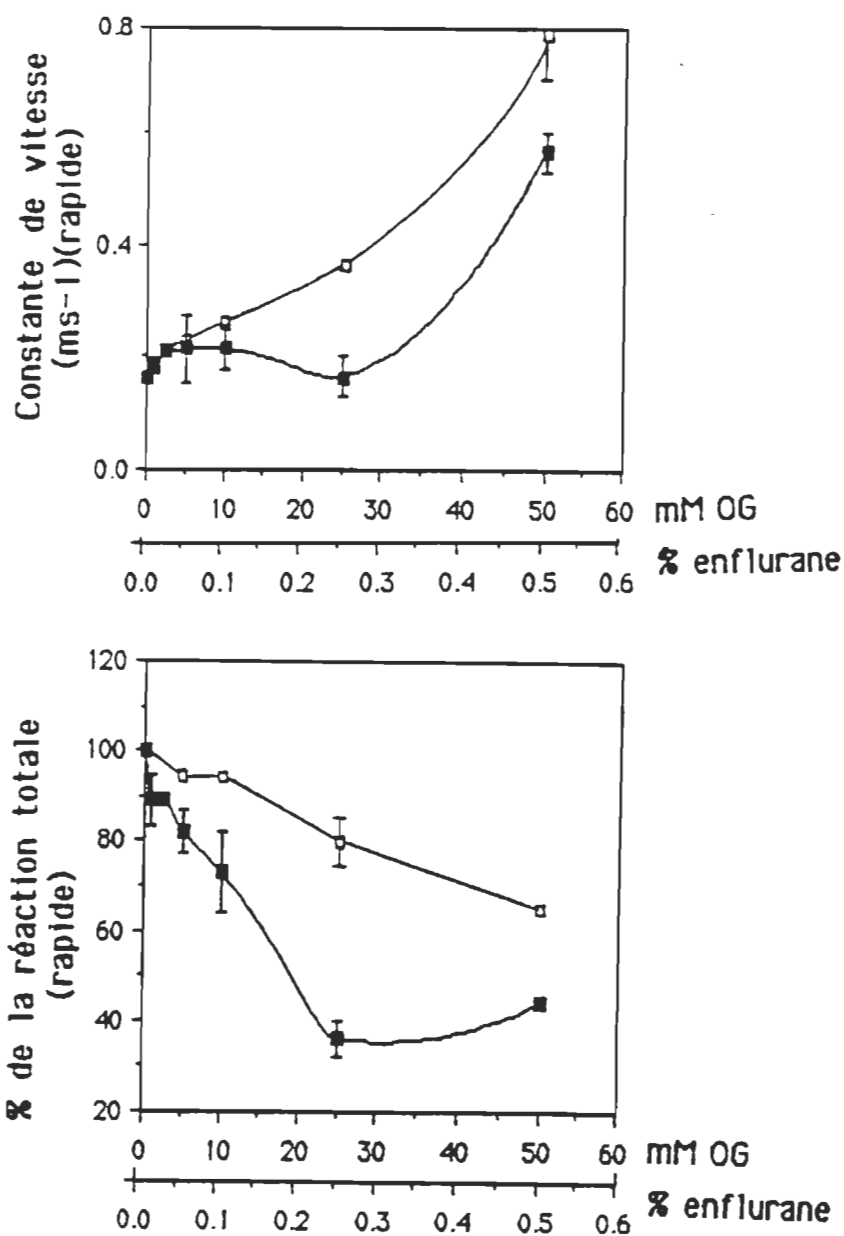


Figure 18 : Modifications apportées à la composante rapide de la réaction  $M \rightarrow bR$  par la présence d'enflurane ( $\square$ ) et d'OG ( $\blacksquare$ ). Les constantes de vitesse correspondent à la pente des droites obtenues graphiquement alors que le pourcentage de la réaction occupé par cette composante peut être estimé par l'ordonnée à l'origine.



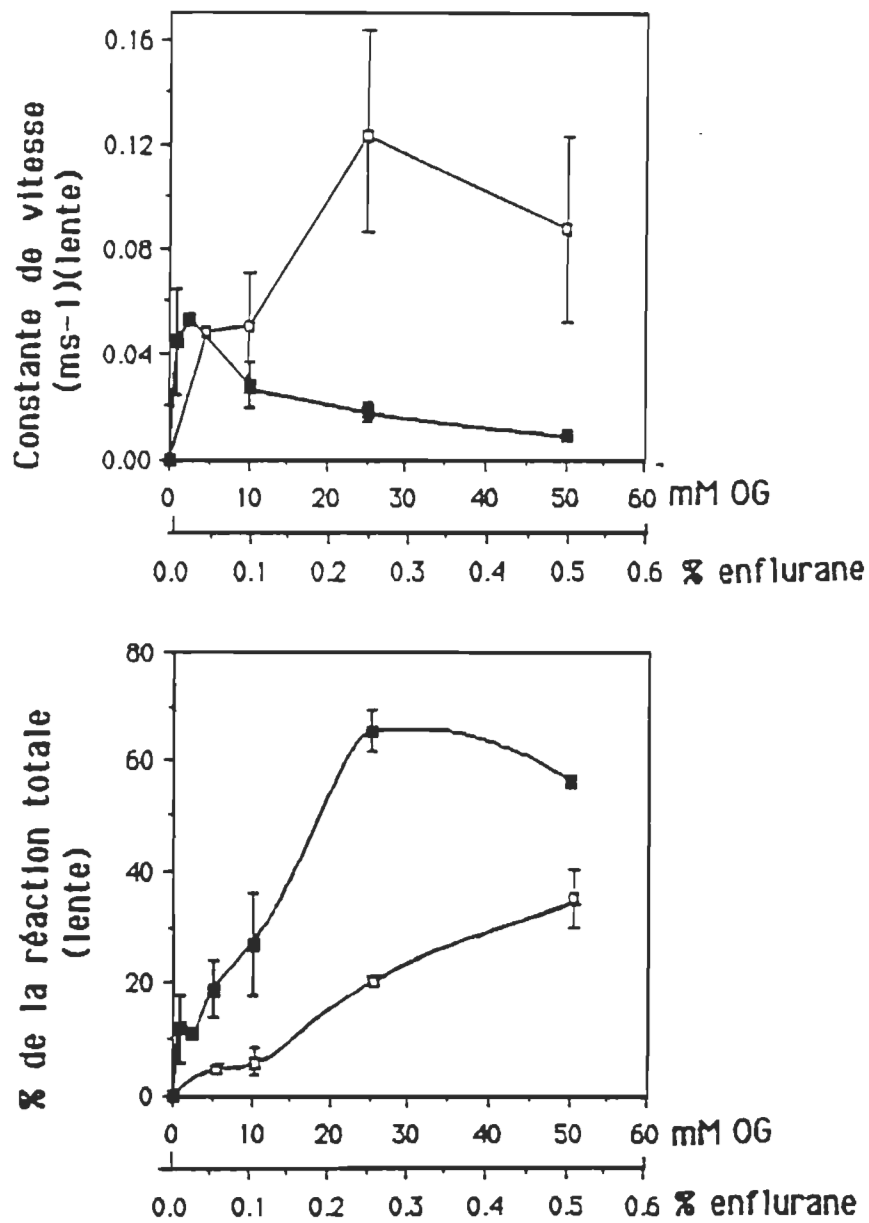


Figure 19 : Modifications apportées à la composante lente de la réaction  $M \rightarrow bR$  par la présence d'enflurane ( $\square$ ) et d'OG ( $\blacksquare$ ).

### 3.4 Analyses hydrodynamiques.

Les méthodes hydrodynamiques classiques de la biochimie analytique permettent d'obtenir des renseignements sur les perturbations apportées à la structure plus globale des membranes plutôt qu'aux interactions entre les différentes composantes de celles-ci. Elles apportent donc un complément d'information structurale au niveau macromoléculaire par opposition aux méthodes antérieures qui ont sondé plutôt le niveau intermoléculaire.

Lors d'une expérience de sédimentation, un champ gravitationnel élevé est créé par le rotor en mouvement qui force les molécules à se déplacer. Les molécules subissent l'action de trois forces principales. D'abord, elles sont poussées à s'éloigner du centre de rotation par l'action de la force centrifuge selon l'équation suivante:

$$F_c = mw^2r$$

où : m est la masse moléculaire

w est la vitesse de rotation angulaire ( rad/sec )

r est la distance au centre de rotation ( cm )

Une force de flottaison (buoyancy) créée par la résistance des molécules de solvant au mouvement des particules s'oppose à cette force centrifuge et la réduit de :

$$F_b = w^2rmv\rho$$

où : mv est le volume de la particule

$\rho$  est la densité du solvant

Une troisième force, la force de friction, tend à empêcher le mouvement des particules dans un sens ou dans l'autre et est proportionnelle à la différence entre la vitesse des particules et celle du solvant ( $f_v$  où f est le coefficient de friction et v est la vitesse). La vitesse à laquelle une particule sédimente dépend de l'équilibre entre ces forces qui sont influencées par les paramètres physiques de la molécule en question, soit sa forme, sa masse moléculaire et sa densité par rapport au solvant. De plus, pour une même molécule, la

vitesse de sédimentation dépend de la concentration, de la force ionique du solvant de même que de la force centrifuge. Quand la force nette est nulle, la vitesse de sédimentation constante, alors :

$$fv = F_c - F_b$$

donc :

$$v = \frac{w^2 r m (1 - v \rho)}{f}$$

Le coefficient de sédimentation,  $S$  en  $\text{sec}^{-1}$ , est le rapport de la vitesse de sédimentation sur le champ centrifuge ( $w^2 r$ ) et est caractéristique d'une molécule dans des conditions données:

$$S = \frac{v}{w^2 r} = \frac{m(1 - v \rho)}{f}$$

Lorsque l'équilibre est atteint par l'emploi d'une vitesse de rotation élevée et d'un temps de sédimentation long, les molécules s'immobilisent et les paramètres influençant la vitesse de sédimentation n'agissent plus. Seule la densité de la molécule influence la position de l'équilibre. Les études à l'équilibre peuvent se faire sur centrifugeuse analytique ou encore par centrifugation isopycnique. Ce dernier type de centrifugation s'effectue en utilisant un gradient de sucrose ou de sels comme support dans un rotor à godets oscillants. L'emploi d'un gradient diminue les forces de convections et permet la migration des particules à vitesse constante jusqu'à l'atteinte de l'équilibre. En effet, la viscosité croissante de la solution dans le gradient permet de compenser pour l'accélération des particules avec l'éloignement du centre de rotation. Suite à l'atteinte de l'équilibre, les molécules sont positionnées à l'endroit du gradient où la densité est identique à la leur. Ceci nous permet de déterminer leur densité par mesure de l'indice de réfraction (proportionnel à la densité) du solvant dans la fraction qui les contient. L'utilisation de la centrifugation sur gradient de sucrose permet de mettre en évidence les différences de densité existant entre les membranes pourpres et les vésicules de membranes pourpres, intactes et traitées aux anesthésiques. La pertinence d'une analyse comparative des agrégats de MP et de vésicules contenant la bactériorhodopsine tient dans la différence de composition lipidique des deux types d'échantillons. En effet, les membranes pourpres ne contiennent qu'environ 7 molécules de

lipides par bR tandis que les vésicules obtenues avec ces dernières et la lécithine de soya en contiennent plus de 50 (Hwang et Stoeckenius, 1977). De plus, dans ces vésicules, les interactions lécithine/bR remplacent les interactions natives lipide/bR. Ces vésicules sont donc un système où, par rapport aux MP, les interactions lipides/protéines sont différentes et la phase lipidique est plus importante.

#### 3.4.1 Vitesse de sédimentation

La centrifugeuse analytique utilisée pour la détermination de la vitesse de sédimentation est munie d'un système optique permettant de suivre la distribution des molécules dans la cellule tout au long de la sédimentation. La lumière monochromatique de longueur d'onde choisie traverse l'échantillon alors que les molécules sont en mouvement et le système de balayage enregistre l'intensité lumineuse transmise en tout point de la cellule et la convertit en signaux électriques. Le tracé théorique obtenu suite au balayage d'une cellule à partir du fond ressemble à celui présenté à la figure 20. La cellule comporte deux références externes qui sont indiquées sur le tracé, l'une au fond et l'autre au dessus de la cellule et qui permettent de convertir l'échelle agrandie du papier en échelle réelle de distance. A mesure que la sédimentation s'effectue, le front des molécules s'éloigne du centre de rotation et c'est la mesure de ce déplacement qui permet de déterminer le coefficient de sédimentation (S) des molécules étudiées. Un exemple des tracés de l'absorbance en fonction de la distance, dans le temps, obtenus pour les échantillons de MP est présenté à la figure 21. Sur ces tracés, la frontière formée par les particules en suspension est évasée. Ceci se manifeste plus particulièrement dans les échantillons traités par les anesthésiques de même qu'au cours de la progression de la sédimentation. Comme l'allure de la frontière est représentative des populations particulières présentes en suspension, on peut supposer d'après les frontières observées, qui ressemblent plutôt à une succession de petites frontières qu'à une seule, que les échantillons membranaires sont très peu homogènes. Ce phénomène est plus important pour les échantillons traités avec l'enflurane.

On voit sur les tracés, et les droites obtenues selon les calculs classiques pour la détermination du coefficient de sédimentation le montrent clairement (figure 22), que l'ajout d'enflurane accélère la sédimentation des membranes. De plus, cette accélération est une sous-estimation de la réalité puisque la vitesse de sédimentation des membranes pourpres natives résiduelles est incluse dans le calcul de celle des membranes traitées à l'aide d'anesthésiques. Ces membranes résiduelles sont vraisemblablement responsables de la

partie trainante du front de molécules et le fait que la détermination de la vitesse en mesurant la distance du centre de rotation au bout de la frontière plutôt qu'à la mi-hauteur de celle-ci mène à des différences beaucoup plus faibles entre les échantillons corrobore cette hypothèse. La sous-estimation de l'accélération résulte également du fait que l'enflurane présent dans le milieu peut en augmenter la densité, ce qui diminue le rapport de la densité de la molécule sur celle du solvant et donc, la vitesse de sédimentation.

Quantitativement, les coefficients de sédimentation des divers échantillons ont été calculés à partir de la pente des graphiques semilogarithmiques du déplacement relatif à la position initiale du front en fonction du temps (figure 22). Les valeurs de pente trouvées et les coefficients qu'elles permettent de déterminer sont présentés dans le tableau suivant (figure 23). Les valeurs obtenues varient légèrement d'une expérience à l'autre mais il a été vérifié que les variations ne dépendent pas de la position dans le rotor puisque les valeurs sont constantes pour un même échantillon dans les trois cellules. Malgré ces variations, il est clair que l'enflurane accélère la sédimentation des membranes, ce qui se manifeste par une augmentation de la valeur du  $S$  calculé. De plus, des expériences montrent que le traitement avec une quantité moindre d'enflurane (0.5%) produit une accélération intermédiaire (résultats non présentés). L'écart-type pour la valeur moyenne est plus important pour les membranes traitées que pour les membranes natives, comme c'est le cas dans la plupart des expériences. Ceci vient du fait que la quantité réelle d'enflurane dissoute dans les membranes est difficilement contrôlable : les volumes ajoutés sont très petits, l'anesthésique est très volatil à la température de la pièce et sa solubilité dans l'eau est minime alors qu'elle est de beaucoup plus importante dans les membranes.

Les résultats des expériences de vitesse de sédimentation permettent de comparer les coefficients de sédimentation des membranes intactes ou traitées aux anesthésiques mais sont à elles seules insuffisantes pour déterminer les paramètres de forme ou de taille des particules en question. Pour ce faire, la combinaison des résultats obtenus avec ceux d'une sédimentation à l'équilibre est nécessaire. Les échantillons de membranes pourpres n'ont pas permis d'atteindre cet équilibre mais les résultats obtenus laissent cependant croire à la présence de plusieurs populations dont l'équilibre ne se situerait pas au même endroit. Comme substitut à la sédimentation d'équilibre, la technique de centrifugation isopycnique fut adoptée, en dépit du fait que les résultats ne puissent se combiner à ceux de la centrifugation analytique pour la détermination de paramètres moléculaires.

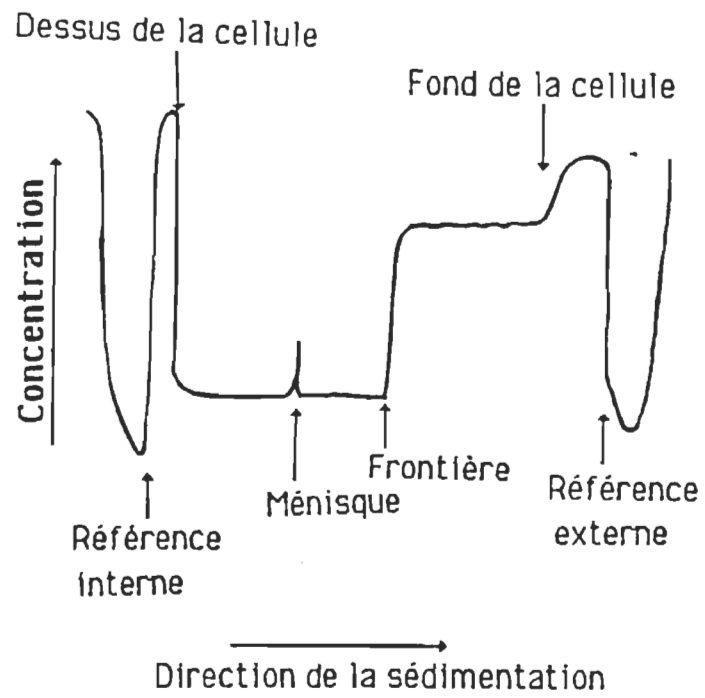


Figure 20 : Schéma d'un tracé théoriquement obtenu lors de la détermination de la vitesse de sédimentation en utilisant la mesure d'absorbance ( Freifelder, 1982 )

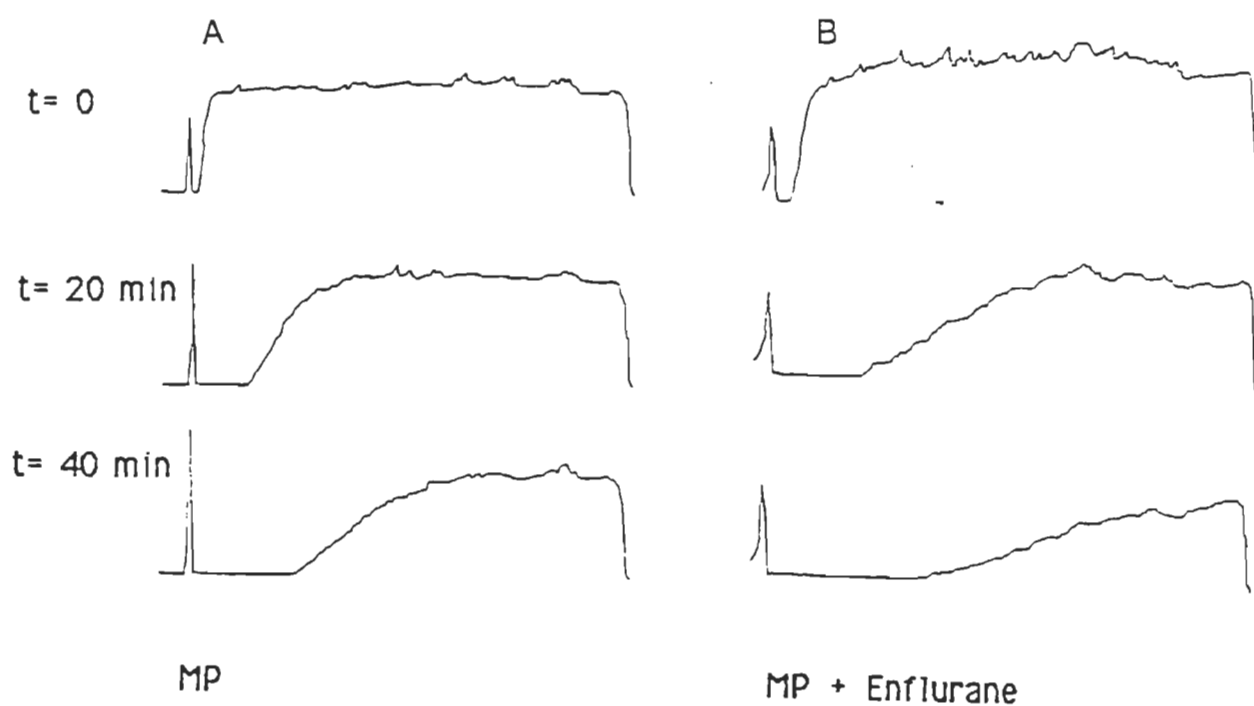


Figure 21 : Exemples de tracés obtenus pour la détermination de la vitesse de sédimentation des MP natives (A) et traitées avec l'enflurane (B), pour un même essai. A mesure que la sédimentation s'effectue, les particules se dirigent vers le fond et ce, plus rapidement pour les particules traitées avec l'enflurane. Seule la région centrale de la cellule est présentée dans cette figure.

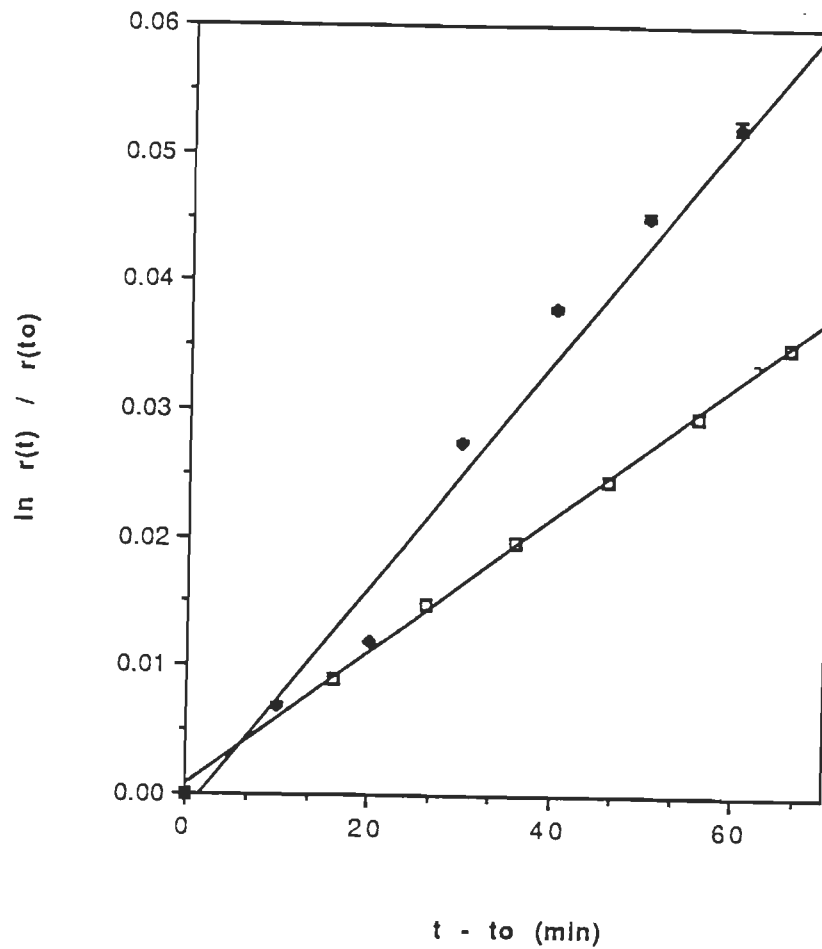


Figure 22 : Graphique semi logarithmique du déplacement de la frontière de particules en fonction du temps de sédimentation pour l'expérience illustrée à la figure précédente. Les incertitudes sur les valeurs sont de l'ordre de la grosseur des points et la pente des droites obtenues permet de déterminer S.

□ MP natives

■ MP traitées avec 1% v/v d'enflurane



Essai \ Echantillon	MP natives	MP +enflurane
1	$6.60 \times 10^{-11}$	$13.2 \times 10^{-11}$
2	$6.60 \times 10^{-11}$ $6.60 \times 10^{-11}$	$19.8 \times 10^{-11}$
3	$3.46 \times 10^{-11}$	$6.11 \times 10^{-11}$
4	$5.71 \times 10^{-11}$	$6.60 \times 10^{-11}$
5	$6.60 \times 10^{-11}$	$13.2 \times 10^{-11}$
6	$5.00 \times 10^{-11}$	$6.03 \times 10^{-11}$

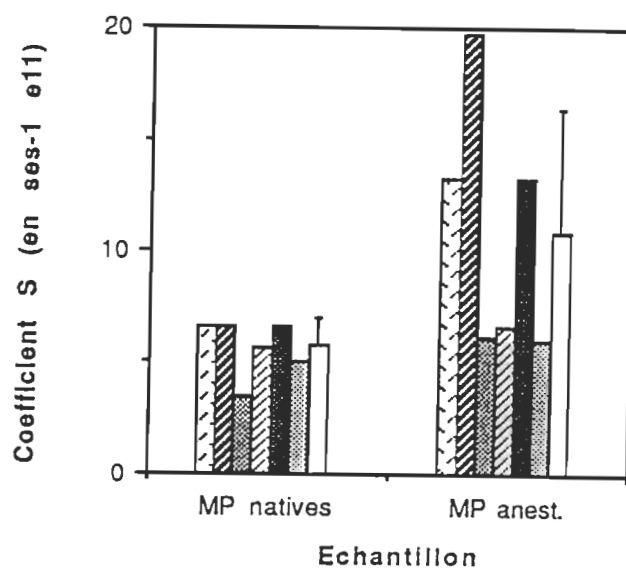


Figure 23 : Coefficients de sédimentation (S en sec<sup>-1</sup>) déterminés pour les divers essais effectués, à partir de la pente des droites. Les valeurs sont illustrées dans l'histogramme et la colonne blanche représente la moyenne, avec l'écart type calculé.

### 3.4.2 Centrifugation isopycnique

La centrifugation isopycnique permet de comparer la densité des échantillons membranaires natifs et rougis à l'enflurane. La figure 24 présente un exemple de graphique permettant de localiser précisément la bande membranaire dans le gradient et de déterminer l'indice de réfraction de cette fraction. On peut constater que le gradient est linéaire dans la zone contenant cette bande. La mesure d'absorbance permet de la localiser avec précision puisque le pic obtenu, très fin, ne laisse place à aucune ambiguïté. L'indice de réfraction de la bande membranaire est donc celle mesurée pour cette fraction. Pour certains échantillons cependant, le pic est moins bien défini et plus d'une fraction contiennent une quantité similaire de membranes pourpres. L'indice moyen est donc considéré comme étant celui des MP. Les résultats moyens des calculs de la densité des échantillons membranaires, soit les membranes pourpres et les vésicules de MP natives et traitées aux anesthésiques, sont présentés dans le tableau suivant. La densité moyenne calculée pour les MP natives est de  $1.187 \pm 0.002 \text{ g/cm}^3$ , ce qui est comparable à ce qu'on retrouve dans la littérature, soit  $1.18 \text{ g/cm}^3$  (Oesterhelt et Stoeckenius, 1974). Dans le cas des membranes pourpres traitées avec les anesthésiques, la bande retrouvée peut être soit rouge avec une densité de  $1.199 \pm 0.001 \text{ g/cm}^3$  ou encore être redevenue pourpre mais avec une densité tout de même supérieure à celle des membranes natives, soit  $1.194 \pm 0.002 \text{ g/cm}^3$ . Pour ces échantillons, il semble qu'une partie de l'anesthésique se soit évaporée de sorte que le changement de couleur n'est plus observable mais la quantité résiduelle demeurant dans les membranes se manifeste par une augmentation de leur densité. Ces deux types de membranes sont vraiment séparables dans un même échantillon puisque la centrifugation sur un gradient discontinu utilisant une solution de sucrose de densité intermédiaire entre celle des membranes natives et des membranes rouges permet de recueillir un culot rouge au fond du tube et les membranes pourpres à l'interface avec l'eau.

Pour ce qui est des vésicules, la densité est diminuée par rapport aux membranes originales et on retrouve les vésicules natives à une densité de  $1.163 \pm 0.003 \text{ g/cm}^3$ . Suite au traitement avec 1 % d'enflurane, la densité des vésicules redevenues pourpres est de  $1.138 \pm 0.002 \text{ g/cm}^3$  tandis que les vésicules rouges se retrouvent à  $1.108 \pm 0.007 \text{ g/cm}^3$ . L'histogramme (figure 25) présente les densités moyenne des divers échantillons, qui ne se recouvrent pas ; les différences observées entre ces échantillons sont donc significatives. On y voit clairement l'effet opposé de l'enflurane sur la densité des membranes pourpres et celle des vésicules.

Dans le cas des membranes pourpres, deux hypothèses sont envisageables. D'abord, en assumant que le volume membranaire n'est pas modifié par l'incorporation des anesthésiques et que l'augmentation de la densité n'est due qu'à la présence d'une molécule très dense (enflurane :  $1.52 \text{ g/cm}^3$ ), il est alors possible de déterminer la quantité d'enflurane incorporée dans les membranes. Les membranes rouges indiquent la quantité maximale approximative pouvant interagir avec les membranes. Les calculs basés sur la fraction membranaire occupée par les molécules d'anesthésiques, pour une augmentation de densité donnée, permettent de calculer le nombre de molécules d'anesthésiques réagissant avec une molécule de bR. Ces calculs ont permis de déterminer que les membranes traitées mais dont la couleur est inchangée renferment 4.4 molécules d'enflurane par unité de bR associée à sept lipides, alors que les membranes rouges en contiendraient environ le double (8.1). Il est difficile d'adopter cette hypothèse, considérant la quantité d'enflurane par unité de bR ajoutée à la phase aqueuse, de plusieurs fois supérieure aux valeurs obtenues. On ne peut cependant pas l'éliminer complètement sur cette seule base, étant donné que la quantité réelle d'enflurane se dissolvant dans les membranes est inférieure à celle ajoutée à la solution, sa solubilité dans l'eau étant très faible.

Une seconde hypothèse, tenant compte de la structure cristalline de la bR, voudrait que les molécules d'enflurane s'incorporent dans la membrane, soit à l'interface lipides-protéine ou sur la protéine elle-même, et causent des perturbations provoquant la contraction de cette dernière.

Dans le cas des vésicules de membranes pourpres, dans lesquelles la bR est entourée de nombreux lipides, l'action des anesthésiques semble obéir à l'hypothèse de perturbation de la phase lipidique. L'incorporation de ces molécules produit une désorganisation de celle-ci, provoquant une augmentation du volume des membranes, ce qui diminue leur densité.

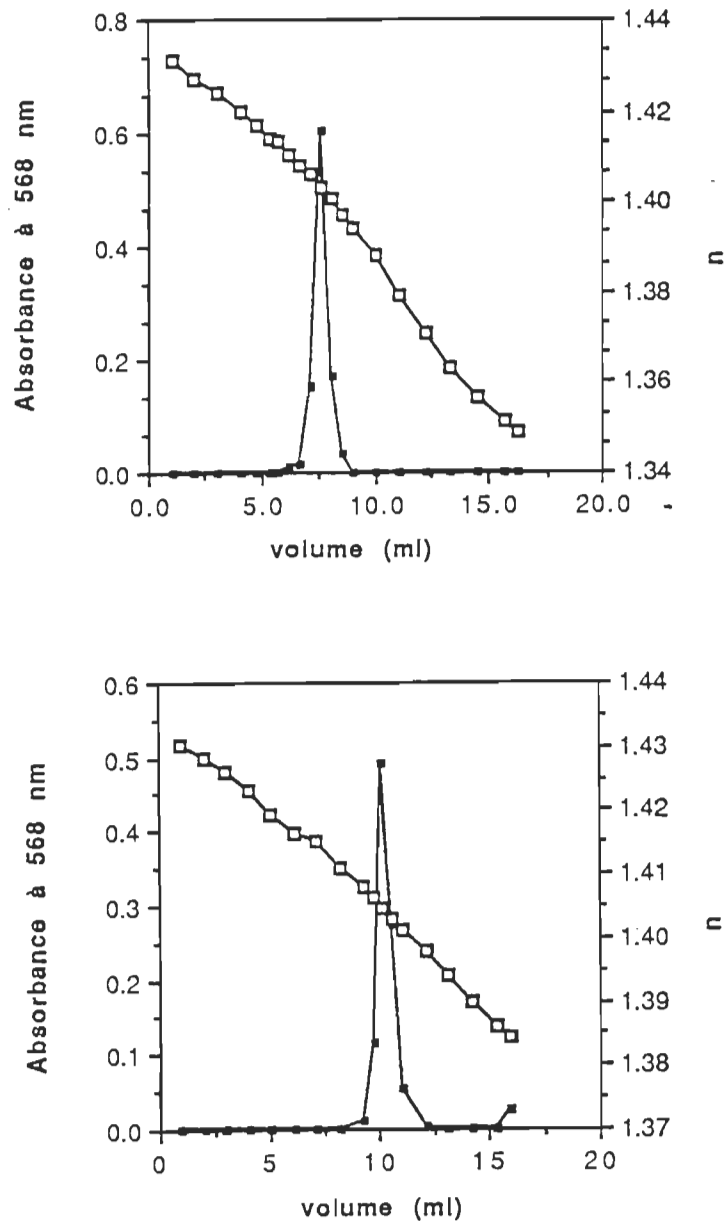


Figure 24 : Détermination de l'emplacement de la fraction membranaire dans le gradient de sucrose par la mesure de l'absorbance à 568 nm. L'indice de réfraction de chaque fraction fournit un aperçu de la linéarité du gradient. Les exemples illustrés sont pour les gradients de membranes pourpres natives (A) et avec enflurane (B) dans le gradient ainsi que dans les membranes. L'ajout d'enflurane dans le gradient n'influence pas la distribution de la concentration de sucrose.

Echantillon		Densité (en g/cm <sup>3</sup> )
Membranes pourpres	- natives	1.187 ± 0.002
	- +enflurane pourpres	1.194 ± 0.002
	rouges	1.199 ± 0.001
Vésicules	- natives	1.163 ± 0.003
	- +enflurane pourpres	1.138 ± 0.002
	rouges	1.108 ± 0.007

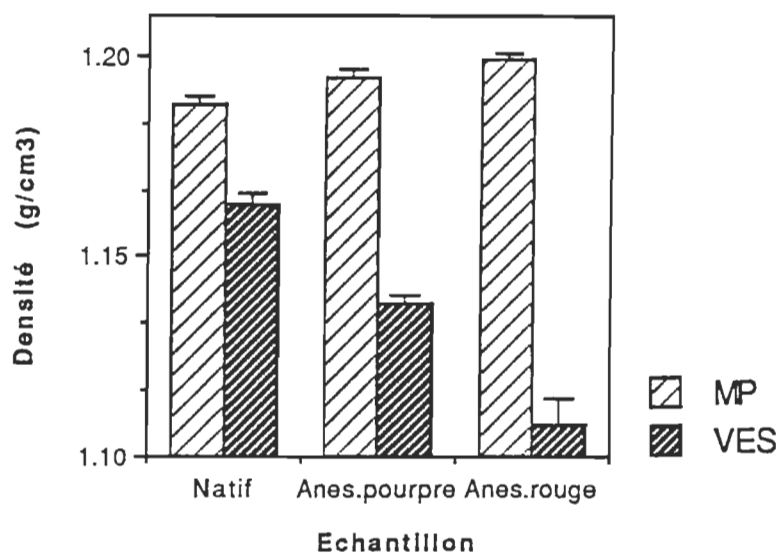


Figure 25 : Densités moyennes des MP et des vésicules natives et traitées avec l'enflurane, déterminées par centrifugation isopycnique sur gradient de sucrose. L'histogramme illustre clairement l'effet inverse de l'enflurane sur la densité de ces deux types de membranes.

### 3.4.3 Discussion

La détermination de la vitesse de sédimentation a permis de constater que le traitement des membranes pourpres avec les anesthésiques affectait leurs propriétés physiques, puisque le coefficient de sédimentation est augmenté.

Les renseignements obtenus suite aux expériences de centrifugation isopycniqne indiquent un comportement différent des anesthésiques dans les membranes dont la composition lipidique est différente. Pour les membranes riches en lipides, les anesthésiques s'incorporent dans la phase lipidique et les perturbations qu'ils y occasionnent provoquent une augmentation du volume des membranes. La densité de ces membranes est donc diminuée graduellement pour des concentrations croissantes d'anesthésiques. Dans les membranes natives cependant, la structure cristalline de la bR ne permet pas une dissolution massive des anesthésiques dans la phase lipidique. Le peu de lipides présents oblige les anesthésiques à réagir directement sur la protéine ou, tout au plus, à l'interface lipides-protéine. Ces interactions causeraient une contraction de la bR, dont la densité serait alors augmentée. Cette augmentation de densité semble être responsable de l'accélération de la sédimentation des membranes traitées avec les anesthésiques.

Mentionnons au passage que le fait que l'enflurane provoque la même perturbation du chromophore (i.e. déplacement du maximum d'absorption) que la bR soit solvatée par les lipides natifs ou des molécules de lécithine élimine pratiquement la spécificité chimique des interactions lipides/protéine comme cible des anesthésiques.

#### 4- CONCLUSIONS

Le spectre d'absorption des membranes pourpres est modifié de façon importante par la présence d'enflurane. Les modifications observées dans la région du proche UV sont difficilement interprétables puisque la bande qu'on y retrouve est attribuable à l'absorption des résidus d'acides aminés de la protéine ayant une chaîne latérale à caractère aromatique mais le rétinol lui-même contribue également à l'absorption dans cette région, ce qui en complique l'étude. Dans la région du visible, la bande d'absorption caractéristique du rétinol est déplacée vers les plus courtes longueurs d'onde suite au traitement des membranes avec l'enflurane. Ceci indique clairement une influence de ces molécules sur les interactions rétinol-opsine. On peut d'abord imaginer que ce déplacement hypsochrome est dû à une déprotonation de la base de Schiff, puisque le déplacement observé est du même ordre de grandeur que le déplacement calculé pour ce phénomène. La deuxième hypothèse suggère que ce déplacement est explicable par une diminution des interactions entre le rétinol et la protéine, puisque des composés modèles étant dépourvus de ces interactions absorbent maximalelement à une longueur d'onde inférieure au maximum d'absorption du pigment. Ceci est prévisible en tenant compte de la relation existant entre le maximum d'absorption du chromophore et la délocalisation des électrons  $\pi$  dans la chaîne polyénique, laquelle est diminuée lorsque les interactions rétinol-opsine sont moindres.

Les études en résonance Raman ont permis d'obtenir des renseignements supplémentaires sur la nature de ces modifications. Lors du traitement des membranes pourpres par l'enflurane, la région du spectre sensible aux interactions latérales entre le rétinol et l'opsine ( $1100-1300\text{ cm}^{-1}$ ) est modifiée dans le sens d'une diminution de ces interactions. Ceci est corroboré par la similarité entre les spectres des MP traitées avec l'enflurane et ceux des composés modèles en solution, qui ne présentent aucune interaction avec la protéine, pour cette région du spectre. Le traitement des MP avec l'enflurane ne semble cependant pas modifier de façon importante l'interaction principale entre le rétinol et l'opsine, c'est-à-dire le lien de base de Schiff. En effet, d'après le spectre de résonance Raman, la position de la bande de la BS correspond à la fréquence vibrationnelle d'une BS protonée et est similaire dans les membranes natives et les membranes traitées. Le déplacement isotopique occasionné par le remplacement de l'hydrogène porté par l'azote de la BS par un atome de deutérium est également similaire pour ces deux types de membranes. Ceci suggère fortement que la BS est intouchée lors du traitement des membranes par les anesthésiques et élimine donc l'hypothèse suggérant que les changements spectraux observés soient la conséquence d'une déprotonation de la BS. Cependant, dans cette expérience, la

résolution spectrale était de  $5 \text{ cm}^{-1}$ . Ainsi, les changements en fréquence inférieurs à cette valeur ne peuvent être décelés. Il serait intéressant d'enregistrer un spectre de la différence des modes vibrationnels de ces deux types de membranes. Ceci permettrait de distinguer entre l'hypothèse d'une action des anesthésiques n'influençant aucunement le lien de BS et une action l'influençant à un niveau tel que nous ne pouvons l'observer directement sur le spectre de résonance Raman.

Une action des anesthésiques au niveau de la structure plus globale des membranes a également été observée grâce aux études de sédimentation. Ces études ont permis de mettre en évidence une accélération de la sédimentation des membranes pourpres lors de l'ajout d'enflurane. Cette accélération a été attribuée à une "contraction" du réseau cristallin formé par les molécules de bR dans les membranes. L'hypothèse d'une telle contraction émerge de l'observation d'une augmentation de la densité des MP, telle que mesurée par centrifugation sur un gradient de densité, suite au traitement avec les anesthésiques. Une même centrifugation a été effectuée avec des vésicules de membranes pourpres, qui renferment un plus grand nombre de lipides par protéine. Dans ces membranes artificielles, la solubilisation d'une plus grande quantité de molécules d'enflurane est permise, puisque la phase lipidique dans laquelle elles sont solubles est plus importante. Si on imagine que l'augmentation de la densité des membranes est attribuable à l'incorporation de molécules très denses, on pourrait alors s'attendre à une augmentation substantielle de la densité des vésicules comparativement aux membranes pourpres, puisque plus de molécules d'enflurane y sont solubilisées. Le résultat obtenu s'oppose à cette prévision : le traitement de ces membranes artificielles par l'enflurane induit une diminution de leur densité, ce qui laisse croire que les molécules d'enflurane gonflent la phase lipidique, entraînant une diminution de la densité des membranes. Ainsi, dans ces membranes riches en lipides, l'action des anesthésiques semble répondre au modèle de perturbation indirecte de la protéine cible via une perturbation de la phase lipidique. Le paramètre modifié dans ce cas-ci serait le volume de cette phase lipidique. Dans les membranes pourpres cependant, le peu de lipides contenu dans le réseau cristallin formé par la bR permet la solubilisation de peu de molécules d'enflurane de sorte qu'une augmentation de volume possiblement causée à la phase lipidique par l'incorporation d'enflurane est difficilement imaginable. L'hypothèse émise suggère que les molécules d'enflurane dissoutes dans la phase lipidique et se trouvant nécessairement à proximité, sinon directement sur la protéine induiraient une contraction de cette dernière, provoquant ainsi une diminution de son volume et donc une augmentation de sa densité.



Les modifications apportées à la bactériorhodopsine elle-même ou à sa disposition dans les MP influencent-elles son activité photochimique ? La présence d'un photocycle complet de la bR dans les membranes traitées avec l'enflurane est d'abord observée dans les spectres de résonance Raman qui sont un mélange des modes vibrationnels de la bR et de son intermédiaire M, et les études en photolyse éclair confirment la présence de ce cycle complet puisque ce même intermédiaire est étudié. Les études de photolyse éclair ont également permis de mettre en évidence une accélération de ce cycle photochimique lors du traitement des membranes avec l'enflurane. Ainsi, dans ces membranes, le cycle de la bR est non seulement complet mais également plus rapide que dans les membranes natives. Cependant, il fut montré récemment que le photocycle opéré par la bR dans les membranes traitées avec les anesthésiques ne conduit pas au pompage de protons de part et d'autre de la membrane (Harvey-Girard, 1990). L'hypothèse émise concernant cette observation voudrait que le proton libéré lors de la formation de l'intermédiaire M dans les membranes traitées ne soit pas relâché dans le milieu mais plutôt emprisonné à l'intérieur de la protéine. La reprotonation de la BS lors du retour vers la forme bR se ferait grâce à l'un de ces protons "captifs" plutôt qu'avec un proton provenant de l'extérieur de la membrane, de sorte que le cycle aurait lieu sans qu'un pompage ne soit perceptible par les mesures conventionnelles.

Afin de localiser plus précisément l'action des anesthésiques dans les membrane pourpres, des études comparatives ont été effectuées entre les perturbations apportées à ces membranes par le traitement avec l'enflurane et celle apportées par la solubilisation progressive par un détergent. Elles ont permis de mettre en évidence une action distincte des anesthésiques comparativement à celle de ce détergent. Les résultats des expériences rapportées dans ce travail concernant l'action des anesthésiques sur les membranes photoréceptrices diffèrent également des résultats obtenus lors de la délipidation de ces dernières (Henry et al., 1988). Ceci suggère une action des anesthésiques se faisant directement sur la protéine cible ou à l'interface de celle-ci avec les lipides plutôt qu'indirectement via la phase lipidique. Les expériences effectuées sont insuffisantes pour discerner laquelle de ces deux cibles moléculaires potentielles est réellement touchée par l'action de l'enflurane. Une action directe sur la protéine nous semble l'hypothèse la plus probable, et l'absence de spécificité de leur action en regard de la nature des molécules de lipides présentes dans la membrane semble également appuyer cette hypothèse. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Pande et al.(1989a) qui suggèrent que l'action des anesthésiques généraux sur les membranes pourpres se situe directement sur la protéine. Ces molécules induiraient un changement de la structure du site de liaison du chromophore

dans la protéine, qui s'ouvrirait légèrement pour permettre l'accès aux molécules de solvant dans ce site. Le contre-ion de la BS serait alors remplacé par le dipôle du solvant et les interactions latérales entre les résidus d'acides aminés de la protéine et le rétinol seraient ainsi diminuées.

Enfin, notre étude a également permis de mettre en évidence une action différente des molécules d'anesthésiques sur les membranes selon leur composition en lipides. Les études de sédimentation ont montré une action différente de l'enflurane sur les membranes pourpres, pauvres en lipides, et les vésicules contenant la bR, riches en lipides. Au niveau fonctionnel, la comparaison a été effectuée en utilisant les MP et les membranes discales des segments externes des bâtonnets rétinien. Ces membranes contiennent une protéine semblable à la bR, la rhodopsine, laquelle est entourée de nombreux lipides. Ainsi, bien que l'action des anesthésiques semble se faire au niveau des protéines membranaires, elle est influencée par la quantité de lipides contenus dans la phase hydrophobe. Les études comparatives de l'action des anesthésiques sur les membranes pourpres et les membranes discales conduisent à des observations très différentes pour ces deux types de membranes comprenant pourtant une protéine similaire au niveau structural et fonctionnel. Les résultats obtenus lors de l'étude de l'action des anesthésiques sur les membranes photoréceptrices permettent de mieux comprendre cette action et constitue un outil pour la caractérisation de ces membranes et des protéines qu'elles renferment. Il est clair cependant que ces membranes sont très différentes des membranes retrouvées dans le système nerveux où agissent normalement les molécules d'anesthésiques et ceci, particulièrement dans le cas des membranes pourpres utilisées dans la plus grande partie des expériences. Les connaissances concernant ces deux types de membranes devront donc être beaucoup plus importantes avant que l'on puisse transposer les hypothèses de l'action des anesthésiques sur les membranes modèles au niveau des membranes du système nerveux.

## REFERENCES

Abdulaev, N.G., Artamonov, I.D., Bogachuk, A.S., Feigina, M.Yu., Kostina, M.B., Kudelin, A.B., Martynov, V.I., Miroshnikov, A.I., Zolotarev, A.S., Ovchinnikov, Yu.A. (1982), Structure of Light-Activated Proteins: Visual Rhodopsin. *Biochem International*, **5** : 693-703

Applebury, M.L., Zuckerman, D.M., Lamola, A.A., Jovin, T.M. (1974). Rhodopsin. Purification and recombination with phospholipids by the metarhodopsin I metarhodopsin II transition. *Biochemistry*, **13** : 3448-3458

Aton, B., Doukas, A.G., Callender, R.H., Becher, B., Ebrey, T.G. (1977), Resonance Raman Studies of the Purple Membrane. *Biochemistry*, **17** : 2995-2999

Baker, N., Donovan, W.J., Williams, T.P. (1977). Extractant effects on some properties of rhodopsin. *Vision Res.* **17** : 1157-1162

Baldwin, P.A., Hubbell, W.L. (1985). Effects of lipid environment on the light-induced conformational changes in rhodopsin. 1. Absence of metarhodopsin II production in dimyristoylphosphatidylcholine recombinant membranes. *Biochemistry*, **24** : 2624-2632

Bangham, A.D., Hill, M.W., Mason, W.T. (1982), A Biochemical and Biophysical View of Anesthesia. *Progress in Anesthesiology*, **2** : 69-77

Baribeau, J., Boucher, F. (1985), Isolation, purification and partial characterization of stable form of monomeric bacteriorhodopsin in lauryl sucrose. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **63** : 305-312

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

Blaurock, A.U., Stoeckenius, W. (1971), Structure of the Purple Membrane. *Nature New Biology*, **233** : 152-154

Buchet, R., Sandorfy, C. (1985), The effect of anesthetics on hydrogen bonds; an infrared study at low anesthetics concentrations. *Biophys. Chem.*, **22** : 249-254

Callender, R.H., Honig, B. (1977), Resonance Raman studies of visual pigments. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **6** :33-55

Cookingham, R.E., Lewis, A., Lemley, T.A. (1978), A Vibrational Analysis of Rhodopsin and Bacteriorhodopsin Chromophore Analogues : Resonance Raman and Infrared Spectroscopy of Chemically Modified Retinals and Schiff Bases. *Biochemistry*, **17** : 4699-4711

Dencher, N.A., Heyn, M.P. (1978). Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergent octyl-glucoside and Triton X-100. *FEBS Lett.*, **108** : 307-310

DiPaolo, T., Sandorfy, C. (1974), Hydrogen Bond Breaking Potency of Fluorocarbon Anesthetics. *J. Med. Chem.*, **17** : 809-814

Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., MaKumdar, A., Chang, S.H., Rajbhandary, U.L., Khorana, H.G. (1981), The bacteriorhodopsin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** : 6744-6748

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

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

Franks, N.P., Lieb, W.R. (1984), Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors ?, *Nature*, **310** : 599-601

Franks, N.P., Lieb, W.R. (1985), Mapping of general anesthetic target sites provides a molecular basis for cutoff effects. *Nature*, **316** : 349-351

Freifelder, D. (1982), **Physical Biochemistry. Applications to Biochemistry and Molecular Biology.** Second Ed., W.H. Freeman and Company. 761 p.

Harvey-Girard, E. (1990), Mémoire de maîtrise, U.Q.T.R.

Henderson, R., Unwin, P.W.T. (1975), Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, **257** : 28-32

Henry, N., Beaudoin, N., Baribeau, J., Boucher, F. (1988), Further Characterisation of Anesthetic-Treated Purple Membrane. *Photochem. Photobiol.*, **47** : 85-90

Heyde, M.E., Gill, D., Kilponen, R.G., Rimai, L. (1971), Raman Spectra of Schiff Bases of Retinal (Models of Visual Photoreceptors), *J. Am. Chem. Soc.*, **93** : 6776-6780

Hille, B. (1982), Theories of Anesthesia : General Perturbations Versus Specific Receptors. *Progress in Anesthesiology*, **2** : 1-5

Honig, B., Greenberg, A.D., Dinur, U., Ebrey, T.G. (1976), Visual-Pigment Spectra : Implications of the Protonation of the Retinal Schiff Base. *Biochemistry*, **15** : 4593-4599

Hwang, S.B., Stoeckenius, W. (1977), Purple membrane vesicles : morphology and proton translocation. *J. Membr. Biol.*, **33** : 325-350

Janoff, A.S., Pringle, M.J., Miller, K.W. (1981), Correlation of general anesthetic potency with solubility in membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, **649** : 125-128

Kakitani, H., Kakitani, T., Rodman, H., Honig, B., Callender, R. (1983), Correlation of Vibrational Frequencies with Absorption Maxima in Polyenes, Rhodopsin, Bacteriorhodopsin, and Retinal Analogues. *J. Phys. Chem.*, **87** : 3620-3628

Kirschfeld, K. (1987), The action of volatile anesthetics on the resting and receptor potentials of insect photoreceptors. *Naturwissenschaften*, **77** : 290-292

Kushwaha, S.C., Kates, M., Martin, W.G. (1975), Characterization and Composition of the Purple and Red Membranes from *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem.*, **53** : 284-292

Lam, E., Packer, L. (1982), Nonionic Detergent Effects on Spectroscopic Characteristics and the Photocycle of Bacteriorhodopsin in Purple Membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **221** : 557-564

Lewis, A. (1982), Resonance Raman spectroscopy of rhodopsin and bacteriorhodopsin : an overview. In *Methods in Enzymology*, **88** : 561-617

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

Litman, B.J., Kalisky, O., Ottolenghi, M. (1981). Rhodopsin-phospholipids interactions : Dependence of rate of the meta I to meta II transition on the level of associated disk phospholipid. *Biochemistry*, **20** : 631-634

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

Marcus, M.A., Lewis, A. (1978), Resonance Raman Spectroscopy of the Retinylidene Chromophore in Bacteriorhodopsin (bR<sub>570</sub>), bR<sub>560</sub>, M<sub>412</sub>, and Other Intermediates : Structural Conclusions Based on Kinetics, Analogues, Models and Isotopically Labeled Membranes. *Biochemistry*, **17** : 4722-4735

Mashimo, T., Tashiro, C., Yoshida, I. (1984), Effects of volatile anesthetics on light-induced proton uptake of rhodopsin in bovine rod outer segment disk membranes. *Anesthesiology*, **61** : 439-443

Motoyama, H., Hamanaka, T., Kawase, N., Boucher, F., Kito, Y. (1985). Effect of phospholipids and detergents on transitions and equilibrium between the bleaching intermediates of rhodopsin. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63** : 1152-1159

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

Nishimura, S., Mashimo, T., Hiraki, K., Hamanaka, T., Kito, Y., Yoshiya, I. (1985), Volatile anesthetics cause conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membrane. *Biochem. Biophys. Acta*, **818** : 412-424

O'Brien, D.F., Costa, L.F., Ott, R.A. (1977). Photochemical functionality of rhodopsin phospholipids recombinant membranes. *Biochemistry*, **16** : 1295-1303

Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1971), Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biology*, **233** : 149-152

Oesterhelt, D. Stoeckenius, W. (1974), Isolation of the Cell Membrane of *Halobacterium halobium* and its Fractionation into Red and Purple Membrane. In *Methods in Enzymology*, **31** : 667-678

- Oseroff, A.R., Callender, R.H. (1974), Resonance Raman Spectroscopy of Rhodopsin in Retinal Disk Membranes. *Biochemistry*, **13** : 4243-4248
- Ovchinnikov, Yu A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Yu., Kiselev, A.V., Lobanov, N.A. (1979), The Structural Basis of the Functioning of Bacteriorhodopsin : an Overview. *FEBS letters*, **100** : 219-224
- Ovchinnikov, Yu A. (1982), Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Letters*, **148** : 179-191
- Pande, J., Callender, R.H., Ebrey, T.G. (1981), Resonance Raman study of the primary photochemistry of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** : 7379-7382
- Pande, C., Callender, R., Henderson, R., Pande A. (1989a), Purple Membrane : Color, Crystallinity, and the Effect of Dimethyl Sulfoxide. *Biochemistry*, **28** : 5971-5978
- Pande, C., Callender, R., Baribeau, J., Boucher, F., Pande, A. (1989b), Effects of lipid-protein interactions on the color of bacteriorhodopsin. *Biochem. Biophys. Acta*, **973** : 257-262
- Racker, E. (1973), A new procedure for the reconstitution of biologically active phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **55** : 224-230
- Racker, E., Stoeckenius, W. (1974), Reconstitution of purple membrane vesicles catalysing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.*, **249** : 662
- Raitta, C., Karhunen, D., Seppalainen, A.M., Naukkarinen, M. (1979), Changes in the electroretinogram and visual evoked potentials during general anesthesia. *Almecht von Graef Archiv. Klin. Exp. Ophtalm.*, **211** : 139-144
- Richards, C.D., Gregory, K.M., Keightley, C.A., Hesketh, T.R., Smith, G.A., Warren, G.B., Metcalfe, J.C. (1978), Degenerate perturbations of protein structure as the mechanism of anesthetic action. *Nature*, **276** : 775-779
- Rimai, L., Gill, D., Parsons, J.L. (1971), Raman Spectra of Dilute Solutions of Some Stereoisomers of Vitamin A Type Molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **93** : 1353-1357
- Salesse, C., Boucher, F., Leblanc, R.M. (1983), Propriétés interfaciales des phospholipides de la membrane des bâtonnets rétinien. *Biol. Exptl.*, **42** : 123-130

Sandorfy, C. (1982), Mechanism of General Anesthesia : Is It All Hydrophobic? Progress in Anesthesiology, **2** : 353-359

Shichi, H. (1983), **Biochemistry of vision**, Academic Press., 279 p.

Stockburger, M., Klusmann, W., Gatterman, H., Massig, G., Peters, R. (1979), Photochemical Cycle of Bacteriorhodopsin Studied by Resonance Raman Spectroscopy. Biochemistry, **18** : 4886-4900

Stoeckenius, W., Lozier, R.H., Bogomolni, R.A. (1979), Bacteriorhodopsin and the Purple Membrane of Halobacteria. Biochem. Biophys. Acta, **505** : 215-278

Stoeckenius, W., Bogomolni, R.A. (1982), Bacteriorhodopsin and Related pigments of Halobacteria. Ann. Rev. Biochem., **51** : 587-616

Torsvik, T., Dundas, I. (1982), The classification of Halobacteria. In Methods in Enzymology, **88** : 360-368

Trudell, J.R. (1982), Biochemical Concepts in Molecular Mechanisms of Anesthesia. Progress in Anesthesiology, **2** : 261-270

Unwin, P.N.T., Henderson, R. (1975), Molecular Structure Determination by Electron Microscopy of Unstained Crystalline Specimens. J. Mol. Biol., **94** : 425-440

Wald, G., Durrell, J., St-George, R.C.C. (1950), The light reaction and the bleaching of rhodopsin. Science, **111** : 179-181

Warshel, A. (1977), Interpretation of Resonance Raman spectra of biological molecules. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **6** : 273-300