

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

ERIK HARVEY-GIRARD

"DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE POMPAGE DE PROTONS

DE LA FORME SPECTRALE 480 DE LA BACTÉRIORHODOPSINE DES *Halobacterium* "

MARS 1990

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

*À mes parents ,
À Normand ,
et , et à Guylou.*

Résumé

L'affaiblissement des interactions lipides-bactériorhodopsine rend accessible le site de titration de l'équilibre bR_{568} - bR_{480} . Une titration ultérieure de ce site amène le relâchement de la structure tridimensionnelle de l'apoprotéine, ce qui cause la diminution des interactions bactériopsine-rétinal. Il y a ainsi formation de bR_{480} . Cette altération de la bactériorhodopsine inactive sa pompe à protons. Cette perte d'activité de pompage de protons est totale lorsque la bactériorhodopsine est sous forme bR_{480} ; elle est cependant complètement réversible si la bactériorhodopsine reprend sa forme native. De plus, lorsque les interactions lipides-bactériorhodopsine sont nulles, la demi-vie du méta-intermédiaire de la bR_{480} est 30 fois plus longue que pour la forme native.

REMERCIEMENTS

Merci, tout le monde!

J'espère que j'oublie personne!

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iv
Remerciements.....	v
Table des matieres.....	vi
Liste des graphiques.....	ix
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Un autre monde sur terre: les bactéries halophiles	1
1.2. Anatomie d'une halobactérie.....	2
1.3. La membrane pourpre.....	6
1.4. La bactériorhodopsine	8
1.4.1. Sa structure	8
1.4.2. Son activité photochimique	10
1.5. Interactions de la bactériorhodopsine.....	17
1.5.1. Trimères versus Monomères.....	17
1.5.2. Interactions bR-lipides. Une nouvelle forme: bR480.....	18
1.6. But du travail	21
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
2.1. Méthodes de préparation.....	24
2.1.1. Production et purification des membranes pourpres.....	24
2.1.1.1. Culture des halobactéries extrêmes.....	25
2.1.1.1.1. Milieu de culture.....	25
2.1.1.1.2. Souche bactérienne et sa conservation.....	26
2.1.1.1.3. Pré-inoculations et inoculation.....	27
2.1.1.1.4. Induction des membranes pourpres	28
2.1.1.2. Récolte des cellules et purification des membranes pourpres	28
2.1.1.2.1. Récolte des cellules.....	28
2.1.1.2.2. Séparation des membranes pourpres des débris cellulaires	29
2.1.1.2.3. Purification des membranes pourpres.....	30
2.1.1.2.4. Conservation des membranes pourpres	30

2.1.1.2.5.	Dessalement des membranes pourpres	32
2.1.2.	Traitements des membranes pourpres purifiées	32
2.1.2.1.	Délipidation de la bactériorhodopsine.....	33
2.1.2.2.	Reconstitution en vésicules.....	34
2.1.2.2.1.	Pré-purification de la bactériorhodopsine au déoxycholate.....	34
2.1.2.2.2.	Film cholate-phosphatidylcholine d'oeuf.....	35
2.1.2.2.3.	Formation des vésicules	35
2.1.2.3.	Traitement aux anesthésiques généraux	36
2.1.2.4.	Solubilisation à l'aide de détergent	36
2.2.	Méthodes expérimentales	37
2.2.1.	Pompage de protons à l'état photostationnaire.....	37
2.2.1.1.	Principe de la méthode.....	37
2.2.1.1.1.	Technique expérimentale.....	38
2.2.1.1.2.	Traitement des données.....	38
2.2.2.	Pompage de protons en photolyse éclair	39
2.2.2.1.	Principe de la méthode.....	39
2.2.2.1.1.	Technique expérimentale.....	40
2.2.2.1.2.	Traitement des données.....	43
2.2.3.	Pompage de protons transvésiculaire.....	45
2.2.3.1.	Principe de la méthode.....	45
2.2.3.1.1.	Technique expérimentale.....	46
2.2.3.1.1.1.	Titrage des vésicules de bactériorho- dopsine-phosphatidylcholine.....	46
2.2.3.1.1.2.	Détermination de spectres d'action.....	47
2.2.3.1.2.	Traitement des données.....	48
2.2.3.1.2.1.	Titration des vésicules de bactériorho- dopsine-phosphatidylcholine	48
2.2.3.1.2.2.	Détermination de spectres d'action.....	48
3.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	50
3.1.	Pompage de protons à l'état photostationnaire	51
3.2.	Pompage transitoire en photolyse éclair	54
A.	... en présence d'enflurane	57
B.	... en présence d'octyl-B-D-glucoypyranoside.....	57
C.	Cinétiques.....	60
D.	Discussion.....	60

3.3. Pompage à travers des vésicules.....	63
4. Conclusion.....	72
Annexe 1: Correction des soustractions Echantillon-Référence.....	74
Annexe 2: Transformation de ΔI en ΔA	76
Bibliographie.....	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Schéma d'une halobactérie du genre <i>Halobacterium</i>	3
Figure 1.2: Schéma des principaux lipides des halobactéries.....	5
Figure 1.3: Schéma de la membrane pourpre développé par analyse cristallographique.....	7
Figure 1.4: Schéma des structures primaire et secondaire de la bactériorhodopsine native.....	9
Figure 1.5: Schéma de la liaison entre le rétinal et la lysine-216 de la bactériorhodopsine native.....	11
Figure 1.6: Spectre d'absorption UV-Visible de la bR ₅₆₈	12
Figure 1.7: Modèle des interactions bactériopsine-rétinal.....	13
Figure 1.8: Modèle du cycle photochimique de la bactériorhodopsine native.	15
Figure 1.9: Spectre d'absorption UV-Visible de la bR ₄₈₀	19
Figure 2.1: Montage expérimental utilisé en photolyse éclair.....	42
Tableau 3.1: Résumé des résultats obtenus en photolyse à l'état station- naire.....	52
Figure 3.2: Spectres d'absorption UV-Visible des échantillons utilisés en photolyse éclair.....	55
Figure 3.3: Exemples de courbes expérimentales en photolyse éclair.....	56
Figure 3.4: Tableau des résultats obtenus en photolyse éclair.....	58
Figure 3.5: Exemple de courbe expérimentale obtenue en photolyse à l'aide de vésicules.....	65
Figure 3.6: Activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine lors du titrage.....	66
Figure 3.7: Spectre d'action à pH=8,00.....	69
Figure 3.8: Spectre d'action à pH=8,40.....	70
Figure 3.9: Spectre d'action à pH=6,90.....	71

1. INTRODUCTION

1.1. UN AUTRE MONDE SUR TERRE: LES BACTÉRIES HALOPHILES

Les bactéries sont les plus simples organismes trouvés dans les milieux naturels. Elles vivent dans une variété considérable de niches écologiques et font preuve d'une richesse inégalée dans leur composition fondamentale. On peut distinguer deux groupes de parenté éloignée: d'une part, les *eubactéries*, qui sont les formes courantes habitant le sol, l'eau et les organismes vivants, et d'autre part, les *archéobactéries*, que l'on retrouve dans des milieux environnants plus inhospitaliers les uns que les autres.

La "monstrueuse" parenté des archéobactéries est divisée en quatre familles distinctes. Premièrement, il y a les bactéries méthanogènes qui vivent au fond des marais. Ce sont des bactéries anaérobies qui réduisent le CO₂ en méthane. Deuxièmement, il y a les bactéries sulfureuses qui ont élu domicile dans les sources chaudes acides et près des volcans des fonds océaniques. Elles utilisent le soufre au lieu de l'oxygène dans leur chaîne respiratoire et possèdent des lipides à deux têtes polaires. Troisièmement, il y a les bactéries métallurgiques qui retirent l'énergie dont elles ont besoin de l'oxydation des métaux en minerai. Finalement, il y a les bactéries halophiles extrêmes, qui non moins étranges que les précédentes, vivent dans la Mer Morte (enfin, moins morte que prévu!). Elles ont développé un mécanisme original de captation de la lumière afin de subvenir à leur besoin énergétique. Ce mécanisme, utilisant de la vitamine A comme piège à énergie lumineuse, est concentré dans un type spécial de membrane plasmique et fera l'objet de ce travail.

La famille des bactéries halophiles extrêmes est appelée *Halobacteriaciæ*. Les principales espèces qui la composent sont regroupées en deux genres: *Halobacterium* et *Halococcus* [1].

1. Introduction

Les halobactéries ont une croissance maximale à des concentrations de NaCl entre 20 et 30% [2,3,4]. Dans la nature, on les retrouve dans les eaux très salines, telle la Mer Morte et les endroits où le sel est obtenu par l'évaporation de l'eau de mer. Dans ces habitats, elles sont soumises à un rayonnement solaire intense et à de basses concentrations en oxygène, dû à la faible solubilité de l'oxygène dans les solutions salines [5]. Elles possèdent une pigmentation rouge causée par la présence de caroténoïdes.

Les *Halobacterium*, contrairement aux *Halococcus*, sont particulièrement sensibles aux faibles concentrations en sel dans lesquelles elles se lysent rapidement [3]. Ce sont donc surtout les *Halobacterium* qui ont fait l'objet d'études poussées puisqu'il est plus facile d'en étudier les constituants cellulaires.

1.2. ANATOMIE D'UNE HALOBACTÉRIE

Halobacterium halobium est l'espèce la plus étudiée de toutes les halobactéries. C'est une cellule en forme de bacille d'environ 5µm de long et 1µm de large sertie de flagelles kophotriches (voir la figure 1.1). Sa croissance est maximale dans une solution à 25% en NaCl; elle est inviable sous 17%. En plus de nutriments tels des acides aminés et des peptides, le milieu de croissance requiert de petites concentrations de potassium, de magnésium et de calcium ainsi que des traces de fer et de manganèse. Les cellules ne métabolisent pas les sucres anaérobiquement (par fermentation).

L'enveloppe des espèces d'*Halobacterium* est exempte d'acide diamopimélique, d'acide muramique, de D-aminoacide et d'acide teichoïque (ces composés entrent dans la composition du peptidoglycane). Les cellules ne contiennent donc pas de peptidoglycane rigide dans leur enveloppe cellulaire [6,7,8]. Néanmoins, les *Halobacterium* possèdent une enveloppe cellulaire qui consiste en une paroi cellulaire à la surface externe et en une membrane formée d'unités typiques aux halobactéries du côté cytoplasmique [9,10]. Cette enveloppe est extrêmement sensible à la force ionique du milieu dû à

1. Introduction

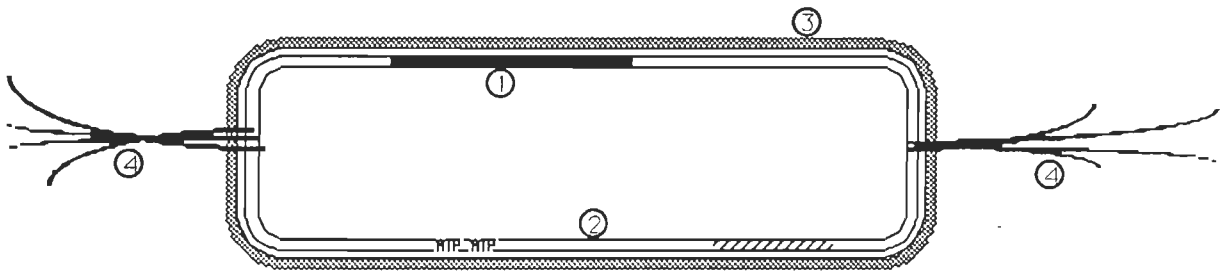


Figure 1.1: Schéma d'une halobactérie du genre *Halobacterium*.
On remarque en (1) la membrane pourpre contenant la bactériorhodopsine, en (2) la membrane rouge avec l'ATPase et la chaîne respiratoire, en (3) la paroi cellulaire exempte de peptidoglycane et en (4) les flagelles kophotriches.

1. Introduction

l'absence de peptidoglycane rigide. Suspendues dans l'eau distillée, l'enveloppe des *Halobacterium* se désintègre rapidement en fragments membranaires de grandeurs variables [7].

La membrane plasmique est constituée principalement de deux types de membranes: la membrane rouge et la membrane pourpre. La membrane rouge est le siège de la plupart des processus physiologiques membranaires. Entre autres, c'est là que l'on retrouve les enzymes de la chaîne respiratoire et l'ATPase. La membrane pourpre contient essentiellement un seul type de protéine, la bactériorhodopsine (qui est absente de la membrane rouge) [9,11]. La membrane rouge prédomine lorsque les cellules croissent en aérobiose. Par contre, dans des conditions de lumière intense et de basse concentration en oxygène, les cellules développent, à partir de la membrane rouge, des pièces de membrane pourpre d'environ 0,5µm de diamètre. La membrane pourpre peut ainsi occuper plus de 50% de la surface de la membrane plasmique [12,13]. Dans ces conditions, l'apport énergétique fourni par la dégradation des sucres est insuffisant (on se rappelle que les halobactéries sont incapables de fermenter les sucres); l'action de la bactériorhodopsine contenue dans la membrane pourpre supplée à ce manque d'énergie.

Nous discuterons plus amplement de cette action de la bactériorhodopsine dans les sections ultérieures. Voyons d'abord la composition lipidique des membranes des halobactéries.

Quatre-vingt-dix pourcents des lipides membranaires sont chargés négativement – le dix pourcents qui reste étant des lipides neutres. Les phospholipides, en particulier le phosphatidyl glycérophosphate, constituent la plus grande fraction des lipides polaires. La portion hydrophobe des lipides polaires est exceptionnelle: c'est un dérivé du 2,3-di-O-phytanyl-sn-glycérol. Ce composé est un diéther de glycérol (-C-O-C-) plutôt qu'un diester de glycérol (-C-O-CO-) que l'on retrouve dans les autres types de membranes biologiques. Ses deux chaînes hydrocarbonées sont des groupements phytanyl (chaîne saturée composée de quatre unités isoprène) (voir la figure 1.2) [14]. De plus, on retrouve dans les membranes pourpres un type de lipide unique dans la nature: il s'agit du sulfate de glycolipide [14].

1. Introduction

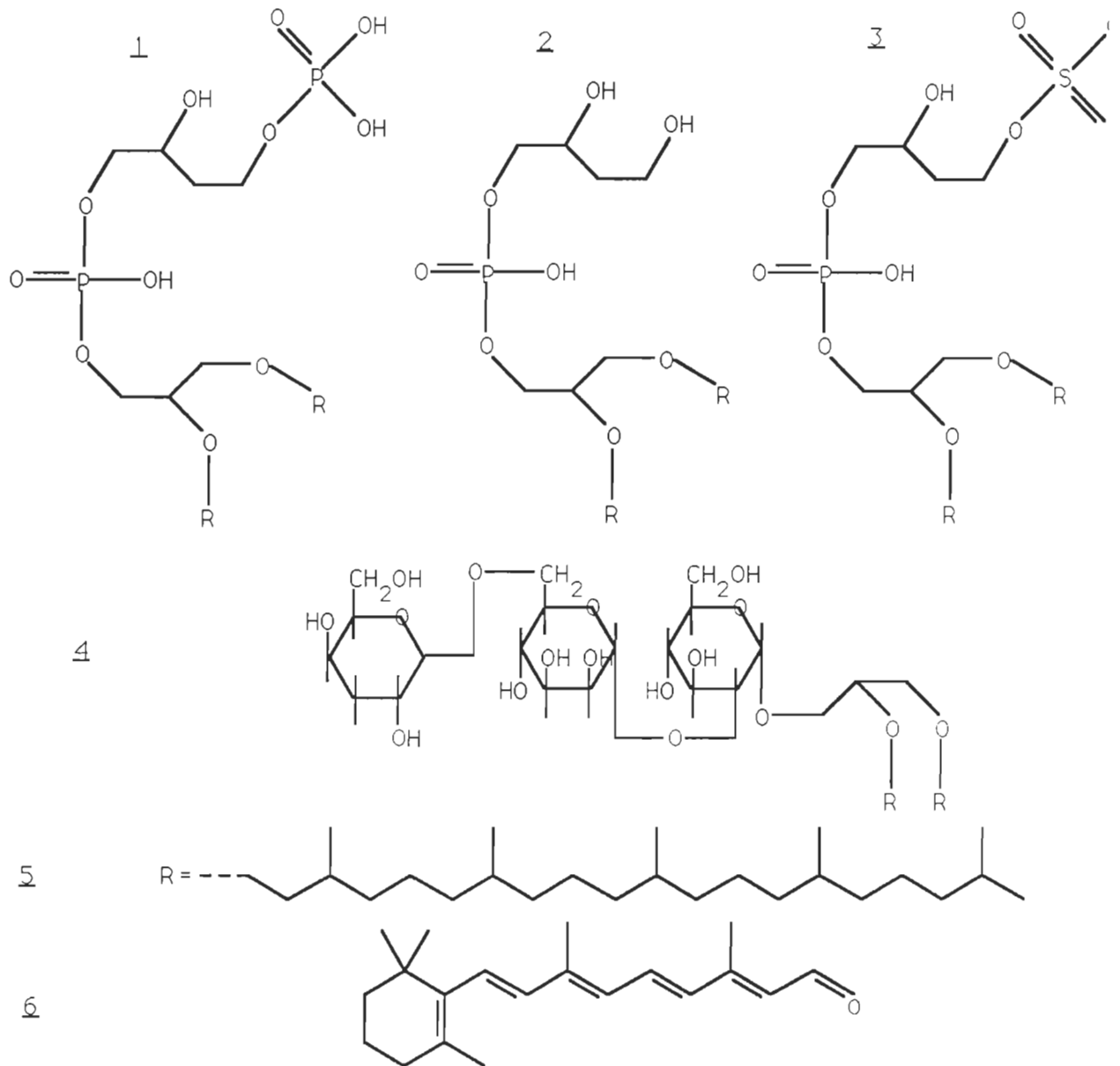


Figure 1.2: Schéma des principaux lipides des halobactéries. Cette figure présente les principaux lipides polaires (1 à 5) et l'isomère tout-trans du rétinale (6). On remarque en (1) le phosphatidyl glycérophosphate, en (2) le phosphatidyl glycérol, en (3) le phosphatidyl glycérosulfate et en (4) le sulfate de glycolipide. En (5), on voit le groupement phytanyl qui compose les queues des lipides polaires. Les charges négatives sont situées sur les lipides (1) à (4) à pH neutre.

Les lipides neutres principaux sont le rétinal, la bactériorubérine et divers dérivés du squalène. La bactériorubérine est un caroténoïde à 50 carbones précurseur du rétinal contenue essentiellement dans la membrane rouge. Le rétinal (voir la figure 1.2), l'aldéhyde de la vitamine A, est contenu uniquement dans la membrane pourpre [14]. En solution organique, le rétinal a une coloration jaune; il absorbe principalement aux alentours de 380nm. L'absorption UV-Visible du rétinal est causée par le moment de transition des électrons π que l'on retrouve le long de sa chaîne de liaisons doubles conjuguées (voir la figure 1.2).

1.3. LA MEMBRANE POURPRE

La membrane pourpre est le siège d'une activité photochimique très intense. Lorsque la bactériorhodopsine capte l'énergie de la lumière, elle initie un cycle réactionnel qui entraîne le transport d'un proton de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Un gradient électrochimique est ainsi généré par la bactériorhodopsine. Ce gradient est ensuite récupéré par l'ATPase afin de synthétiser de l'ATP. Les halobactéries s'assurent ainsi d'un apport énergétique suffisant pour leur métabolisme dans des conditions où la dégradation des sucres est inefficace.

La membrane pourpre est d'une épaisseur de 48Å. Elle possède une structure en réseau cristallin d'un aspect assez singulier. Des trimères de bactériorhodopsine sont disposés hexagonalement dans le plan de la membrane (voir la figure 1.3) [15]. Cet arrangement est extrêmement rigide, ce qui immobilise presque entièrement les lipides environnants. On croit que cette structure contribue à maintenir l'intégrité de la bactériorhodopsine [16,17].

La membrane pourpre contient environ 80% de protéine et 20% de lipides, ce qui correspond à 7 molécules lipidiques par molécule de bactériorhodopsine (21 molécules par trimère)[14]. Les lipides remplissent les espaces entre les molécules de bactériorhodopsine [18]. D'après l'emplacement des trimères de bactériorhodopsine

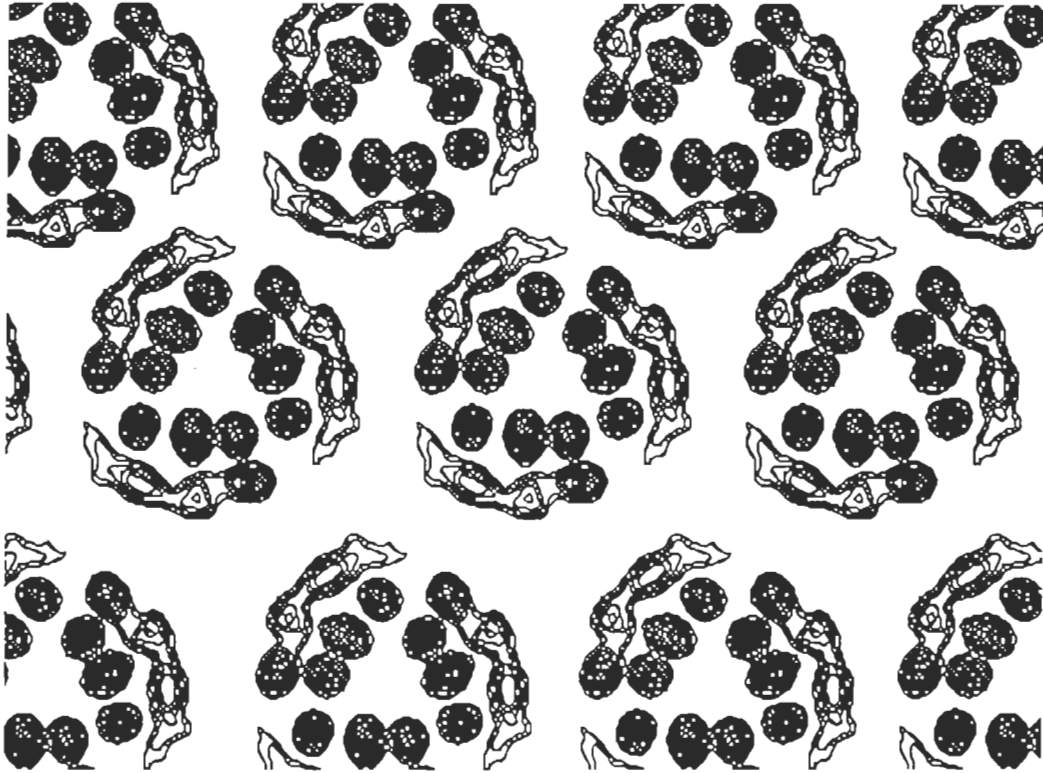


Figure 1.3: Schéma de la membrane pourpre développé par analyse cristallographique. Les zones de haute densité électronique (en noir) représentent les protéines, les zones de basse densité électronique (en blanc) contiennent les lipides. On remarque que les trimères de bactériorhodopsine sont agencés en réseau cristallin hexagonal dans le plan de la membrane et que les espaces entre les protéines sont comblés par les lipides.

dans la membrane pourpre, il est évident qu'il n'y a pas d'interactions directes protéine-protéine, mais plutôt des contacts indirects protéine-lipide-protéine [19]. Les molécules de lipides doivent adopter des positions relativement précises par rapport aux molécules de protéine. Les modèles proposés supposent une couche limitante de lipides ayant une épaisseur maximale d'une molécule de lipide [19,20]. La compréhension des interactions lipide-protéine prend donc une place prépondérante dans l'étude de l'activité de la bactériorhodopsine.

1.4. LA BACTÉRIORHODOPSINE

1.4.1. SA STRUCTURE

Comme on l'a vu plus haut, la bactériorhodopsine est la seule protéine contenue dans la membrane pourpre.

Une molécule de bactériorhodopsine est composée d'une chaîne polypeptidique de 26 kilodaltons à laquelle est lié à un groupement prosthétique, le rétinol. Sa structure tridimensionnelle est formée par la juxtaposition de sept hélices alpha, ayant chacune de 35 à 40Å de long, perpendiculaires au plan de la membrane pourpre et qui s'étalent sur presque toute l'épaisseur de la bicouche (voir la figure 1.4). Sa chaîne polypeptidique – appelée bactériopsine – est constituée de 248 acides aminés [21,22]. Elle ne contient pas d'histidine ni de cystéine et 70% de ses acides aminés sont hydrophobes. L'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique est exposée à la surface extracellulaire alors que l'extrémité C-terminale est du côté cytoplasmique (voir la figure 1.4) [23].

Dans la protéine native, la bactériopsine lie le tout-trans-rétinol. La liaison entre la bactériopsine et le rétinol est située au niveau de la lysine-216 de la chaîne polypeptidique (voir la figure 1.4) [23]. C'est une base de Schiff résultant de la

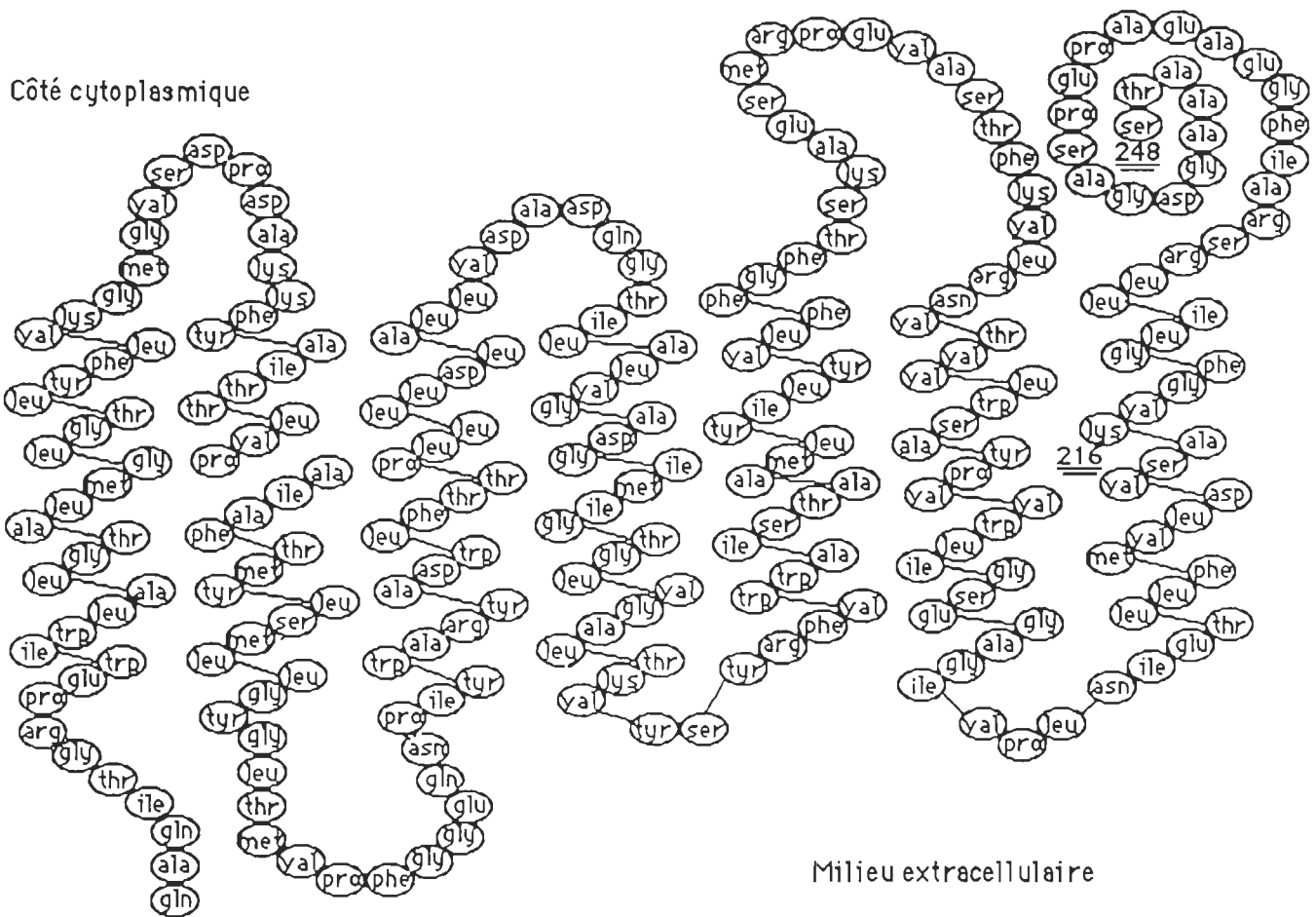


Figure 1.4: Schéma des structures primaire et secondaire de la bactériorhodopsine native enchassée dans la membrane pourpre. Elle est composée de 248 acides aminés. On remarque la lysine-216 qui est le point d'ancrage du chromophore (le rétinale) [21,22,23,27].

condensation du groupement aldéhyde du rétinol et de l'amine de la lysine-216 (voir la figure 1.5) [12].

La bactériorhodopsine est responsable de la coloration de la membrane pourpre. Cette coloration est causée, plus spécifiquement, par les interactions entre la chaîne polypeptidique et le tout-trans-rétinal. Comme on l'a vu, le tout-trans-rétinal absorbe aux environs de 380nm (voir la section 1.2). Lorsqu'il interagit avec la chaîne polypeptidique de la bactériorhodopsine native, son moment de transition se trouve modifié par les charges de certains groupements de la chaîne polypeptidique. Il en résulte que le spectre d'absorption UV-Visible de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière (voir la section 1.4.2), présente un pic maximal à 568nm (voir la figure 1.6). On a proposé un modèle de charges ponctuelles externes afin d'expliquer le maximum d'absorption du tout-trans-rétinal dans la bactériorhodopsine native [24,25]. Dans ce modèle, la base de Schiff entre le tout-trans-rétinal et la lysine-216 est protonée. La charge positive de l'azote de la base de Schiff (protoné) est stabilisée par un contre-ion négatif situé à environ 3Å de l'atome d'azote. Une autre charge négative est située à environ 3,5Å de l'anneau-béta-ionone du rétinol. Un contre-ion positif serait également présent près du carbone-7 du rétinol. Ces trois charges sont fournies par des groupements – encore inconnus – de la chaîne polypeptidique de la bactériorhodopsine (voir la figure 1.7).

La structure tridimensionnelle de la bactériorhodopsine est semblable à un bouquet de sept hélices alpha au centre desquels le tout-trans-rétinal, dont la base de Schiff est protonée, se loge. Les interactions que l'apoprotéine établit avec le rétinol modulent le spectre d'absorption UV-Visible de la bactériorhodopsine.

1.4.2. SON ACTIVITÉ PHOTOCHEMIQUE

Dans la membrane pourpre, la bactériorhodopsine peut exister en deux formes stables distinctes: la bR₅₆₈ que l'on qualifie d'adaptée à la lumière et la bR₅₆₀ qui est adaptée à l'obscurité. Comme on l'a vu précédemment (voir la section 1.4.1), la bactériorhodopsine adaptée à la lumière (bR₅₆₈) possède un pic d'absorption centré à 568nm et contient du tout-trans-rétinal (voir les figures 1.6 et 1.7). Quant à elle, la

1. Introduction

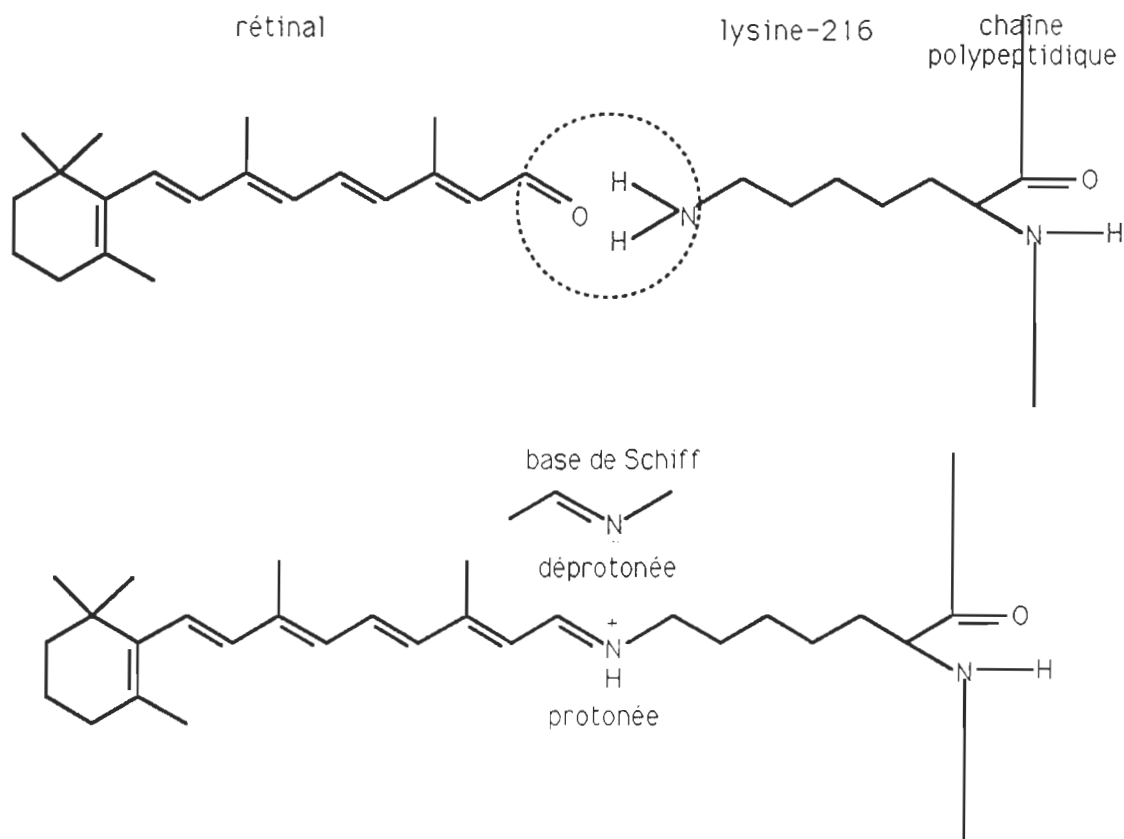


Figure 1.5: Schéma de la liaison entre le rétinal et la lysine-216 de la bactériorhodopsine. Le groupement aldéhyde du rétinal et l'amine de la lysine (en haut) se condensent en une base de Schiff (en libérant une molécule d'eau). Une fois formée, la base de Schiff peut être protonée ou déprotonée.

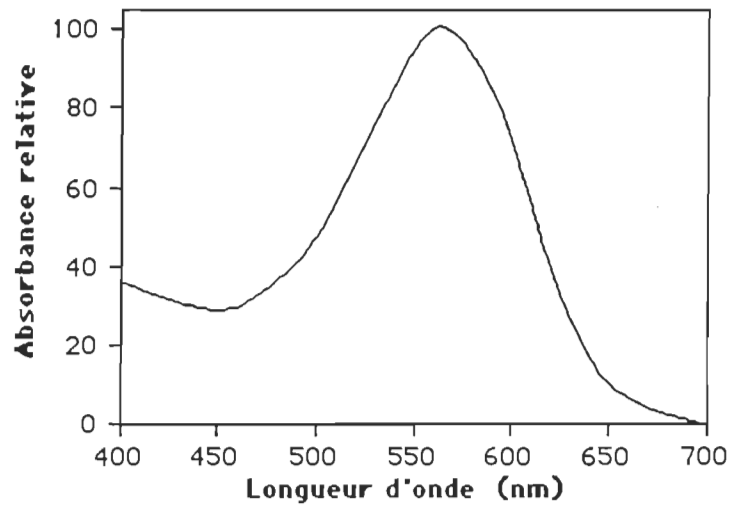


Figure 1.6: Spectre d'absorption UV-Visible de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière (bR₅₆₈). Le maximum d'absorption est situé à 568nm. Cette bande est produite par le rétinal et modulée par les interactions rétinal-bactériopsine.

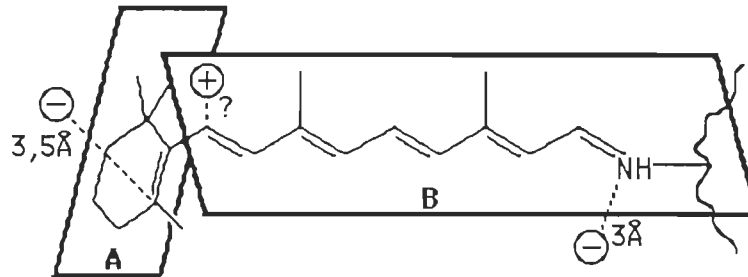


Figure 1.7: Modèle des interactions bactériorhodopsine-rétinal.

Ce modèle de charge ponctuelle externe a été proposé par Nakanishi en 1980 pour les interactions rétinal-apoprotéine. Il y a un angle de 45° entre l'anneau- β -ionone et la chaîne du polyène. Deux charges négatives sont situées respectivement à 3 Å de l'azote protoné de la base de Schiff et à 3,5 Å du carbone-5 de l'anneau [25].

Ce modèle a été révisé par Lugtenburg et al. en 1986. Ils proposent l'ajout d'un dipôle près du carbone-7 [26].

1. Introduction

bactériorhodopsine adaptée à l'obscurité (bR_{560}) absorbe maximalement à 559nm. Elle contient un mélange équimolaire de deux formes: la bR_{568} et la bR_{540} . Cette dernière forme (bR_{540}) absorbe principalement à 540nm et est composée de 13-cis-rétinal. Les deux formes, adaptée à la clarté (bR_{568}) et adaptée à l'obscurité ($bR_{560} = bR_{568} + bR_{540}$), sont interconvertibles (voir la figure 1.8). La réaction $bR_{560} \rightarrow bR_{568}$ nécessite une courte exposition à une source lumineuse de longueur d'onde entre 500 et 600nm. La conversion inverse ($bR_{568} \rightarrow bR_{560}$) est une réaction thermique lente ayant une demi-vie d'environ 20 minutes à 35°C [28]. Ces réactions impliquent l'isomérisation 13-cis-rétinal \leftrightarrow tout-trans-rétinal de la moitié des chromophores.

Le rôle physiologique de la bactériorhodopsine est de générer un gradient électrochimique de protons de part en part de la membrane plasmique. Pour produire ce gradient, elle transfère un proton du cytoplasme à l'extérieur de la cellule. L'énergie nécessaire à ce transport actif est fournie par la lumière captée par le chromophore de la bactériorhodopsine (le rétinal). Lorsque le tout-trans-rétinal de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière (bR_{568}) capte un photon, la bactériorhodopsine initie un cycle réactionnel passant par plusieurs intermédiaires. Ce cycle photochimique résulte en un pompage d'un proton et se termine par la réapparition de la bR_{568} . Il implique la photoisomérisation et l'isomérisation thermique du rétinal, la déprotonation et la reprotonation de la base de Schiff et des changements concomitants dans la conformation de la protéine. Ces divers événements résultent en des changements du spectre d'absorption UV-Visible et peuvent être reconnus comme plusieurs intermédiaires métastables correspondant à des changements successifs de l'interaction rétinal-protéine [26].

Lorsque le tout-trans-rétinal (dont la base de Schiff est protonée) de la bR_{568} absorbe un photon, il se convertit très rapidement (en moins de 10psec) en 13-cis-rétinal. Nous sommes alors en présence de la batho-bactériorhodopsine (K_{625}). La bande d'absorption de cet intermédiaire a subi un déplacement bathochrome par rapport à la bR_{568} (d'où le nom batho-) pour être centré à 625nm. Lors du cycle photochimique, seules la formation de ce premier intermédiaire et la transformation inverse (de $K_{625} \rightarrow bR_{568}$) impliquent la captation d'un photon; tous les autres intermédiaires résultent de réactions thermiques (voir la figure 1.8).

La K_{625} se transforme en lumi-bactériorhodopsine (L_{550}) [29,30,31]. La durée de cette réaction thermique est d'environ 2 μ sec. La L_{550} contient, elle aussi, du

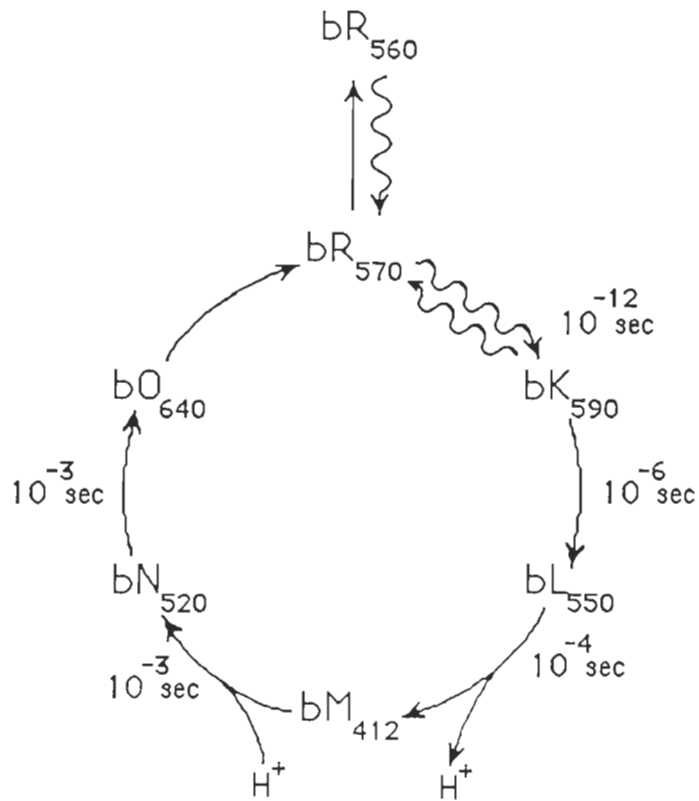


Figure 1.8: Modèle du cycle photochimique de la bactériorhodopsine native. Les maxima d'absorption UV-Visible des intermédiaires sont indiqués par les nombres en indice. Les temps correspondent à la demi-vie des intermédiaires à la température de la pièce. Au cours du cycle photochimique, le proton de la base de Schiff est relâché dans le milieu et un autre est repris par la suite.

1. Introduction

13-cis-rétinal et une base de Schiff protonée. Elle se convertit, en environ 40 μ sec, en méta-bactériorhodopsine (M₄₁₂). Lors de cette transformation, la base de Schiff se déprotone; son azote perd sa charge positive. Le proton perdu est éjecté à l'extérieur de la cellule via un mécanisme encore très mal connu.

La M₄₁₂ retournerait à la bR₅₆₈ par deux ou trois intermédiaires encore mal caractérisés. Le premier serait N₅₂₀ dont l'absorption maximale est centrée à 520nm. Cette réaction (M₄₁₂ \rightarrow N₅₂₀) dure environ 5msec. N₅₂₀ produit ensuite O₆₄₀ (pic d'absorption maximale à 640nm). Le chromophore de O₆₄₀ est bien caractérisé: c'est le tout-trans-rétinal dont la base de Schiff est protonée. Comme l'isomère du rétinal de N₅₂₀ n'est pas encore déterminé, on ne sait pas encore lors de quelle transition (M₄₁₂ \rightarrow N₅₂₀ ou N₅₂₀ \rightarrow O₆₄₀) le proton cytoplasmique est repris. Cette portion du cycle (M₄₁₂ \rightarrow N₅₂₀ \rightarrow O₆₄₀) demeure obscure dans la littérature; certains auteurs auraient montré la présence d'un deuxième cycle photochimique ayant comme point initial le N₅₂₀ [32].

Finalement, l'intermédiaire O₆₄₀ produit le pigment original, la bR₅₆₈. Cette transition durerait 5msec environ et se ferait possiblement via un nouvel intermédiaire P [33] dont la présence reste à être confirmée.

En résumé, le cycle photochimique de la bactériorhodopsine native s'initie lorsque le chromophore de la forme adaptée à la clarté (bR₅₆₈) capte un photon. Le cycle photochimique est couplé avec le transport vectoriel de protons. Ce couplage est dû à la réaction de protonation-déprotonation subie par la base de Schiff lors du passage à l'intermédiaire M₄₁₂ [34]. Des variations concomitantes de la structure tridimensionnelle de l'apoprotéine amènent des variations des interactions apoprotéine-rétinal qui transforment le spectre UV-Visible de la bactériorhodopsine tout le long du cycle.

1.5. INTERACTIONS DE LA BACTÉRIORHODOPSINE

1.5.1. TRIMÈRES VERSUS MONOMÈRES

Pour connaître les fonctions de la bactériorhodopsine, ses interactions avec les lipides environnants et l'effet de sa formation trimérique sur son activité physiologique et sa structure, plusieurs chercheurs ont tenté de solubiliser la membrane pourpre à l'aide de détergents.

Ils se sont buté à deux obstacles majeurs: la difficulté à solubiliser la membrane pourpre et l'instabilité de la bactériorhodopsine dans beaucoup de détergents. En effet, la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre est très stable dans une vaste gamme de températures et de pH, mais devient très fragile lorsqu'on solubilise la membrane pourpre.

Plusieurs détergents ont été essayés [35], mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec les détergents non-ioniques qui simulent l'environnement hydrophobe de la bicouche lipidique, tels que le triton-X-100, l'octyl- β -D-glucopyranoside [36] et le déoxycholate. Ces détergents monomérisent la bactériorhodopsine; ce faisant, ils affectent les interactions rétinol-apoprotéine de telle sorte qu'ils induisent un déplacement hypsochrome de 10 à 20nm du maximum d'absorption de la bactériorhodopsine [37,38,39,40].

La solubilisation par les détergents non-ioniques ne semble pas altérer la bactériorhodopsine. En effet, les fonctions et la structure de la bactériorhodopsine monomérique sont très semblables à celles de la bactériorhodopsine trimérique: le cycle photochimique possède les mêmes intermédiaires quoiqu'il soit légèrement accéléré [38]; la capacité de pomper des protons et à générer un gradient électrochimique de protons demeurent du même ordre de grandeur [41]; la structure secondaire contient toujours aux environs de 70% d'hélices α [36,38].

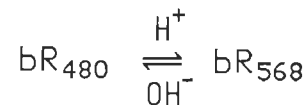
Puisque les fonctions et la structure du monomère de bactériorhodopsine sont conservées lors de la monomérisation, il est clair que l'unité fonctionnelle de la

bactériorhodopsine (unité minimale nécessaire à l'activité d'une protéine) est le monomère.

1.5.2.INTERACTIONS BR-LIPIDES. UNE NOUVELLE FORME: BR480

Les études de la bactériorhodopsine à l'aide de détergents (voir la section 1.5.1) ont amené l'élaboration d'une méthode de délipidation à 99% de la bactériorhodopsine. Cette méthode consiste à solubiliser la membrane pourpre dans le triton-X-100 pour ensuite la déposer sur un tamis moléculaire dans lequel la purification s'effectue lors de l'éluion au déoxycholate [37,42]. On obtient ainsi la bactériorhodopsine délipidée solubilisée à l'aide du déoxycholate. Ensuite, par chromatographie hydrophobe sur gel de phényl-sépharose, on substitue le déoxycholate par de l'octyl- β -D-glucopyranoside. La bactériorhodopsine – qui est très hydrophobe – s'adsorbe au phényl-sépharose avant d'être éluée par l'octyl- β -D-glucopyranoside [43,44]. On élimine l'octyl- β -D-glucopyranoside par dialyse pour, finalement, obtenir seulement la bactériorhodopsine délipidée (cette méthode est expliquée à la section 2.1.2.1). Grâce à cette méthode, on peut étudier l'influence des interactions lipide-protéine sur les fonctions et la structure de la bactériorhodopsine.

La bactériorhodopsine délipidée peut exister sous deux formes spectrales stables distinctes. La première est la bR₅₆₈ qui a été décrite précédemment (voir la section 1.4). La deuxième est une toute nouvelle forme: la bR₄₈₀. Sa bande d'absorption maximale est centrée à 480nm (voir la figure 1.9) [43,44,45]. Ces deux formes sont en équilibre acido-basique, tel que:



La bR₄₈₀ se retrouve en milieu basique, alors que la bR₅₆₈ se retrouve en milieu acide. Lorsque la bactériorhodopsine est complètement délipidée et en suspension dans l'eau, le pK_a apparent de l'équilibre est 2,5. À pH neutre, la bactériorhodopsine délipidée en suspension dans l'eau se retrouve donc sous la forme bR₄₈₀. Dans la membrane pourpre, cet équilibre possède un pK_a très élevé – autour de 13. Seule la bR₅₆₈ y est donc présente (à pH élevé, la protéine se dénature avant de pouvoir

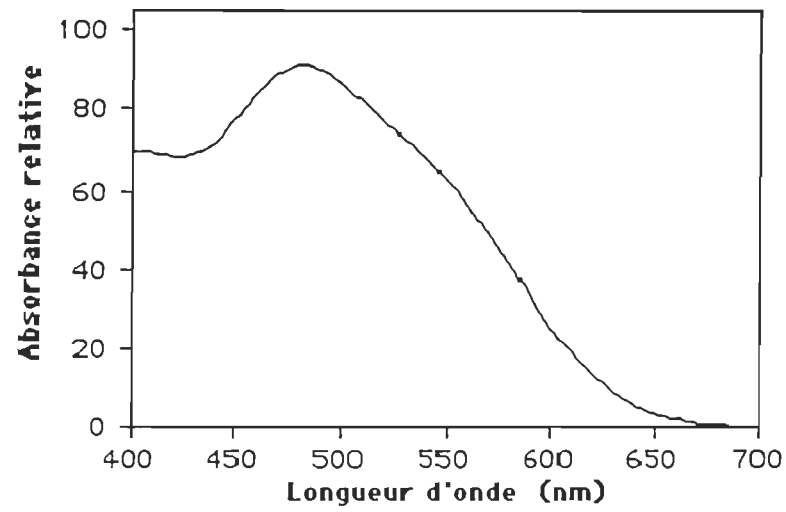


Figure 1.9: Spectre d'absorption UV-Visible de la bR₄₈₀. Le maximum d'absorption est situé à 480nm. Cette bande est produite par des interactions rétinal-bactériopsine affaiblies.

1. Introduction

prendre la forme de bR₄₈₀). Des études ont donc été menées afin de mesurer la dépendance de cet équilibre acido-basique face à l'environnement hydrophobe de la bactériorhodopsine [43,44]. En la solubilisant avec des détergents à queue hydrophobe de plus en plus longue, le pK_a se déplace de plus en plus vers des valeurs basiques, jusqu'à être maximal lorsque la bactériorhodopsine est dans sa membrane pourpre. De plus, lorsque les queues hydrophobes possèdent des liaisons doubles – alors que celles de la membrane pourpre sont ramifiées – le pK_a revient vers des valeurs plus acides. On voit donc qu'en ajoutant des détergents imitant de mieux en mieux les lipides de la membrane pourpre, on déplace le pK_a vers des valeurs plus basiques. Par conséquent, on conçoit que les lipides de la membrane pourpre protègent le site de titration de la protéine du milieu aqueux [43,44].

Il existe une deuxième méthode, plus simple que la délipidation de la membrane pourpre, pour générer la bR₄₈₀. Elle utilise des anesthésiques généraux. À une suspension de membranes pourpres – durant nos travaux, nous nous sommes aperçu qu'elle devait être dessalée –, une petite quantité d'anesthésique est ajoutée. Nous avons surtout utilisé l'éther et l'enflurane. D'après l'hypothèse généralement admise, les molécules d'anesthésiques viennent s'insérer dans la zone hydrophobe de la bicouche lipidique. La membrane pourpre est fluidifiée et les interactions lipide-bactériorhodopsine sont atténuées. L'équilibre acido-basique entre la bR₅₆₈ et la bR₄₈₀ peut alors prendre place. À pH neutre, il y a formation rapide de la bR₄₈₀.

La bR₄₈₀ est donc un sujet de prédilection pour l'étude des interactions lipide-protéine affectant la bactériorhodopsine. Des études ont donc été faites afin de caractériser la bR₄₈₀. La spectroscopie de Résonance Raman a mis en évidence l'éloignement des contre-ions (de l'apoprotéine) du rétinal et le fait que le rétinal de la bR₄₈₀ se comporte comme une base de Schiff en solution [45,46]. Ces faits montrent que les interactions rétinal-protéine sont fortement diminuées au sein de la bR₄₈₀.

Par spectroscopie d'émission, on a observé que les acides aminés tryptophane, exposés au milieu hydrophobe dans la bactériorhodopsine native, sont exposés à un environnement aqueux dans la bR₄₈₀. D'autre part, lorsque la bR₄₈₀ est soumise, à l'obscurité, à l'action de l'hydroxylamine ou du borohydrure de sodium – substances très réactives aux bases de Schiff –, il se forme une nouvelle espèce entre 330 et 360 nm (dénotant une dénaturation). La forme native ne réagit à ces produits que durant son cycle photochimique – c'est-à-dire lors de changements conformationnels.

1. Introduction

L'hydroxylamine et le borohydrure de sodium ont donc accès à la base de Schiff au sein de la bR₄₈₀, mais pas à celle de la forme native.

Pour donner accès aux réactifs, exposer des groupements tryptophane au milieu aqueux et montrer une diminution des interactions rétinal-apoprotéine, la bR₄₈₀ doit avoir une structure beaucoup plus relâchée que celle de la bactériorhodopsine native. Ce relâchement est modulé par les interactions de la bactériorhodopsine avec ses lipides environnants [43,44].

Finalement, les études par spectroscopie de Résonance Raman ont permis de conclure que le site de titration responsable de l'équilibre entre les deux formes spectrales n'était pas l'azote de la base de Schiff, puisque celle-ci demeure protonée dans les deux formes [44].

Malgré toutes les modifications de la structure de la protéine, la bR₄₈₀ possède une activité photochimique complète, laquelle est, cependant, quelque peu ralentie comparativement à la bactériorhodopsine native. La bR₄₈₀ présente un batho-intermédiaire (absorbant principalement à 530nm) et un méta-intermédiaire (qui absorbe à 380nm).

1.6. BUT DU TRAVAIL

Lors de la délipidation de la bactériorhodopsine, les changements structuraux produits impliquent des groupements de la protéine qui jouent un rôle dans le contrôle du maximum d'absorption du rétinal de la bactériorhodopsine, sans toutefois que la bactériorhodopsine délipidée perde ses propriétés photochimiques. Ce phénomène indique que le groupement responsable du déplacement spectral – lors de la titration – n'a pas de relation directe avec les événements se produisant lors de la photoréaction de la bactériorhodopsine.

Ainsi, sachant que la base de Schiff du rétinal de la bR₄₈₀ demeure protonée, que les interactions rétinal-protéine sont atténuées au sein de la bR₄₈₀, sachant aussi que les lipides modulent un déploiement de la structure tertiaire de la bactériorhodopsine qui affecte les interactions rétinal-protéine, la question qui se pose est: est-ce que

1. Introduction

l'activité de la pompe à protons est conservée lors du passage de la forme bR568 à la forme bR480 ?

La réponse à cette question permettrait de voir l'importance de l'influence des interactions lipides-protéine sur l'activité de la pompe à protons, et deuxièmement, de voir la relation entre la forme spectrale de la bactériorhodopsine et son activité de pompage de protons.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans un premier temps, toute étude traitant de la bactériorhodopsine nécessite la préparation de quantités suffisantes de bactériorhodopsine traitées pour les besoins expérimentaux. Les méthodes de préparation de la bactériorhodopsine feront l'objet de la première partie (2.1).

Dans un deuxième temps, on passera aux techniques utilisées lors de l'étude de l'activité relative de la pompe à protons de la bR₄₈₀. Ces techniques expérimentales, utilisées dans le cadre de mes travaux, seront détaillées à la deuxième partie (2.2).

2.1. MÉTHODES DE PRÉPARATION

Les méthodes de préparation de la bactériorhodopsine se divisent en deux groupes: premièrement, la production et la purification de la membrane pourpre, et deuxièmement, les méthodes de traitement de la membrane pourpre.

Les méthodes de production et de purification de la membrane pourpre servent à produire des quantités importantes de membrane pourpre exemptes des autres constituants cellulaires (autres types de membranes, enzymes cytosoliques, ADN et ARN, etc...) et d'impuretés chimiques de toutes sortes. Ces méthodes seront présentées à la section 2.1.1.

Les méthodes de traitement des membranes pourpres purifiées permettent d'étudier la bactériorhodopsine sous diverses conditions. Elles seront présentées à la section 2.1.2. Il s'agit de la délipidation de la bactériorhodopsine (2.1.2.1), de la reconstitution en vésicules (2.1.2.2), de la solubilisation à l'aide de détergents (2.1.2.3) et du traitement aux anesthésiques généraux (2.1.2.4).

2.1.1. PRODUCTION ET PURIFICATION DES MEMBRANES POURPRES

La production et la purification des membranes pourpres permettent d'obtenir une suspension stock utilisable pour une série d'expérimentations ultérieures.

Dans un premier temps, on cultive les halobactéries dans un milieu très particulier, en trois étapes successives, afin d'obtenir une quantité importante de cellules; de là, on induit la synthèse de membrane pourpre. Cette méthode de culture

2. Matériel et méthodes

est celle établie par Kushawa et coll. [14] et fait l'objet de la première section (2.1.1.1).

Dans un deuxième temps, on récolte, lave et lyse les cellules cultivées. Grâce à une série de centrifugations, on sépare et purifie les fragments de membrane pourpre des autres constituants cellulaires et membranaires. Finalement, on suspend ces fragments dans une solution saline permettant leur conservation. Cette méthode de purification, mise au point par Oesterhelt et Stoeckenius [12], consitue la deuxième section (2.1.1.2).

2.1.1.1. CULTURE DES HALOBACTÉRIES EXTRMES

2.1.1.1.1. MILIEU DE CULTURE

Comme on l'a vu dans l'introduction (voir la section 1.1), les bactéries halophiles extrêmes ont une croissance maximale à des concentrations de NaCl entre 20 et 30%. La culture *in vitro* de ces organismes, nécessite donc un milieu dont la concentration en sels est de l'ordre de 25%. Pour obtenir un litre de ce milieu, les composés suivants sont dissouts dans l'eau distillée par ordre d'apparition:

- 1 - NaCl 250g
- 2 - KCl 2g
- 3 - Na-citrate 3g
- 4 - MgSO₄·7H₂O 20g
- 5 - 1ml d'une solution contenant 0,5g de FeSO₄·7H₂O dans 10ml d'eau distillée acidifiée avec 3 gouttes de HCl 1N
- 6 - pH est ajusté à 6,5-6,7 avec NaOH ou HCl
- 7 - Cette solution de sels est stérilisée à l'autoclave, mais ce n'est pas absolument nécessaire puisque seules des halobactéries peuvent croître dans ce milieu.

2. Matériel et méthodes

- 8 - Oxoid peptone 10g

Les peptones sont ajoutées seulement après la stérilisation et préférentiellement, juste avant l'inoculation.

Il faut faire au moins 9,6 litres de ce milieu de culture pour suffire aux besoins de la méthode.

Tout au long de la culture des halobactéries, il faut laver la vaisselle à l'acide de façon à ce qu'aucun détergent ne soit présent dans le milieu de culture. Cette attention est nécessaire car la croissance des halobactéries est inhibée par les détergents.

2.1.1.1.2. SOUCHE BACTÉRIENNE ET SA CONSERVATION

Il existe plusieurs espèces d'halobactéries extrêmes (voir les sections 1.1 et 1.2). Cependant, ce travail a été réalisé à l'aide de la souche mutante S₉ de *Halobacterium halobium* (gracieuseté du Dr W. Stoeckenius, Université de Californie à San Francisco), car cette souche donne un excellent rendement en membrane pourpre.

Les souches d'halobactéries extrêmes peuvent se conserver très longtemps pourvu qu'on les repique à tous les trois mois environ. Ce repiquage permet de garder un milieu toujours frais (sans trop de déchets toxiques) et ayant tous les nutriments nécessaires à la "bonne santé de nos petites bêtes".

Pour fabriquer des géloses aptes à la croissance de ces microorganismes, on dissout 3g d'oxoid peptone et 3g de Bacto Agar dans 200ml de milieu de culture sans peptone (voir la section précédente 2.1.1.1.1.). Sous agitation mécanique continue, cette solution est chauffée jusqu'à ce qu'elle s'éclaircisse. Ensuite, elle est coulée dans des boîtes de Pétri (environ 20ml chacune). Ces géloses sont conservées dans un sac de plastique pour éviter qu'elles ne s'assèchent.

La croissance des halobactéries extrêmes sur des géloses s'effectue dans un incubateur (Fisher Scientific Co, modèle Isotemp) à 37°C durant 10 jours au moins.

2. Matériel et méthodes

L'atmosphère doit être très humide pour éviter que les géloses s'assèchent. Les géloses sont ensuite conservées à 4°C dans un sac de plastique.

2.1.1.1.3. PRÉ-INOCULATIONS ET INOCULATION

La croissance des bactéries s'effectue en trois phases successives. Les deux premières phases, dites pré-inoculations, servent à augmenter la population de bactéries. Elles consistent à accroître le volume de milieu de culture peu à peu pour permettre aux bactéries d'avoir un environnement frais et riche en nutriments.

La marche à suivre est la suivante:

-1- Deux pleines bouclées de colonies pourpres sont prélevées d'une gélose ensemencée (souche S₉ de *H. halobium*) (voir la section précédente: 2.1.1.1.2.) et sont inoculées dans 100ml de milieu de culture (avec peptone!) (voir la section 2.1.1.1.1.) contenu dans un erlenmeyer de 500ml. Deux aliquots de ce type sont préparés.

-2- La croissance s'effectue dans un incubateur muni d'un plateau à agitation rotatoire (New Brunswick Scientific Co. Inc., modèle Psycrotemp) à une vitesse d'agitation de 180 rpm, à une température de 37°C et à l'obscurité. Cette agitation forte permet une bonne oxygénation du milieu, ce qui permet aux halobactéries de croître rapidement. Cette phase dure 3 ou 4 jours. Lorsque le milieu possède une densité optique d'environ une unité à 660nm, la population de cellules est suffisamment importante dans les pré-inoculums. On peut alors passer à l'inoculation suivante.

-3- Les deux inoculums de 100ml sont alors ajoutés à deux volumes de 1100ml de milieu de culture contenus dans des erlenmeyer de 4000ml. La croissance de ces deux nouveaux inoculums de 1200ml (1100ml + 100ml) se fait dans les mêmes conditions que précédemment (voir étape -2-): c'est-à-dire une agitation de 180rpm, une température de 37°C, le tout à l'obscurité durant 3 ou 4 jours jusqu'à l'obtention d'une densité optique d'une unité à 660nm.

-4- Par la suite, on inocule six erlenmeyers de 4000ml, contenant chacun 1200ml de milieu de culture avec 400ml des deux inoculums précédents. Les six

2. Matériel et méthodes

inoculum de 1600ml (400ml + 1200ml) ainsi obtenus, sont incubés dans les mêmes conditions que précédemment (voir l'étape -2- et -3-).

2.1.1.1.4. INDUCTION DES MEMBRANES POURPRES

La population des halobactéries est maintenant maximale. Par des changements des conditions de culture, on provoque la production des membranes pourpres:

-1- On ramène l'agitation des fioles de culture de 180 rpm à 90 rpm afin d'atténuer l'aération des milieux (diminution de la quantité d'oxygène dissout).

-2- De plus, on éclaire les milieux à l'aide de huils fluorescents, ce qui stimule la synthèse de bactériorhodopsine. Après 3 ou 4 jours, les fragments de membrane pourpre sont présents à la surface des cellules en quantité suffisante pour que l'on récolte les bactéries.

2.1.1.2. RÉCOLTE DES CELLULES ET PURIFICATION DES MEMBRANES POURPRES

2.1.1.2.1. RÉCOLTE DES CELLULES

La récolte des cellules consiste à les concentrer et à les laver de leur milieu de culture – qui contient toutes sortes de produits indésirables – sans les altérer.

Le milieu de culture contenant les bactéries est centrifugé à 10000g pendant 10 minutes à une température de 4°C (8500 rpm avec le rotor Sorvall HB4). Les cellules précipitent en culot. Le milieu de culture, formant le surnageant, est jeté. On recommence ces étapes jusqu'à ce que le milieu soit épuisé. Par la suite, les cellules sont lavées deux fois dans une solution basale de sels afin d'enlever le milieu de culture restant.

2. Matériel et méthodes

La solution basale de sels, dite solution de Kushner (en référence à celui qui l'utilisa la première fois), a la composition suivante pour un volume d'un litre:

- 1 - NaCl	250g
- 2 - KCl	2g
- 3 - MgSO ₄ ·7H ₂ O	20g
- 4 - pH est ajusté à 7,0	

Les cellules lavées sont ensuite déposées dans un bécher (600ml), où on les immerge dans un volume de solution de Kushner égale à trois fois leur poids. Par agitation mécanique, on homogénéise la suspension de cellules et on y ajoute 10mg d'ADNase. Cette agitation dure une heure à température de la pièce.

Par la suite, la suspension est dialysée pendant 16 heures à 4°C contre de l'eau distillée avec un changement d'eau après 90 minutes. À ce moment, les halobactéries subissent un important choc osmotique (passage d'une solution à 25% en sels à de l'eau distillée) et se lysent (phénomène de plasmolyse). Les brins d'ADN ainsi libérés, sont détruits à l'ADNase. À la fin de la dialyse, on retrouve un mélange de fragments membranaires (rouges, bruns et pourpres) et de constituants cytosoliques libres (enzymes, nucléotides, etc...).

2.1.1.2.2. SÉPARATION DES MEMBRANES POURPRES DES DÉBRIS CELLULAIRES

Afin d'obtenir les membranes libérées des constituants cellulaires, le dialysat obtenu (voir la section précédente 2.1.1.2.1.) est centrifugé à 12000g pendant 20 à 25 minutes (10000 rpm avec le rotor Sorvall SS-34). Les membranes plus légères demeurent dans le surnageant, alors que les constituants cellulaires, plus denses, constituent le culot.

On recueille le surnageant que l'on centrifuge à nouveau. Cette centrifugation s'effectue à 40000g, à 4°C, pendant 90 minutes (19000 rpm avec le rotor Sorvall SS-34). Le culot est alors principalement constitué de fragments de membrane pourpre (plus denses), tandis que le surnageant contient les fragments de membranes rouges (plus légers). Après avoir jeté le surnageant, le culot est resuspendu avec de

2. Matériel et méthodes

l'eau distillée et recentrifugé dans les mêmes conditions (40000g, 4°C, 90 minutes). Cette étape est répétée jusqu'à que le surnageant soit presque incolore (3 ou 4 fois).

Finalement, on obtient un culot composé principalement de fragments de membrane pourpre contaminés par de petites quantités de membranes rouges et de constituants cellulaires.

2.1.1.2.3. PURIFICATION DES MEMBRANES POURPRES

À cette étape, on élimine les traces de membranes rouges et de constituants intracellulaires qui contaminent le culot de membrane pourpre (voir la section précédente: 2.1.1.2.2.). Cette purification s'effectue sur gradient discontinu de sucrose.

Les tubes de gradient discontinu de sucrose se préparent comme suit: -1- On dépose 7ml de solution froide de sucrose 1,5M; -2- on ajoute délicatement 21ml de solution froide de sucrose 1,3M en la faisant couler très lentement sur la paroi du tube.

Le culot de membrane pourpre (dans 2ml d'eau distillée) est déposé (voir section 2.1.1.2.2.) sur les gradients discontinus de sucrose. La centrifugation dure 48 heures à 20000rpm à 15°C (20000rpm avec le rotor IEC modèle SB-110). Après ce laps de temps, les fragments de membrane pourpre se retrouvent à l'interface 1,3M-1,5M (puisqu'ils sont plus denses que la solution 1,3M sucrose, mais moins que celle de 1,5M); les fragments de membranes rouges demeurent à la surface du gradient (étant très légers); alors que les traces de constituants cellulaires sont au fond des tubes (étant très denses).

Une fois la bande pourpre recueillie, on la dialyse contre de l'eau distillée à 4°C pendant 16 heures avec un changement d'eau après deux heures. Cette dialyse permet d'éliminer le sucrose.

2. Matériel et méthodes

2.1.1.2.4. CONSERVATION DES MEMBRANES POURPRES

Maintenant, on a une quantité importante de fragments membranaires pourpres qui ne demande rien de mieux que d'être stockée pour des utilisations ultérieures.

Le dialysat obtenu précédemment (voir la section 2.1.1.2.3.) est centrifugé à 40000g pendant 90 minutes (19000rpm avec le rotor Sorvall SS-34) afin d'être concentré.

Le culot est alors resuspendu avec la solution de Kushner (voir section 2.1.1.2.1.). Les fragments de membrane pourpre, ainsi suspendus, peuvent être conservés des années.

Le rendement, de toute cette méthode de production et de purification des membranes pourpres, est évalué grâce au coefficient d'extinction molaire à 560nm de 54000 L mol⁻¹cm⁻¹ tel que suggéré par Oesterhelt et Stoeckenius [12].

2.1.1.2.5. DESSALEMENT DES MEMBRANES POURPRES

Chaque fois que l'on a besoin d'une quantité de membrane pourpre pour des fins expérimentales, il faut éliminer les sels de la solution d'entreposage. Cette élimination s'effectue grâce à une série de centrifugations à 40000g (19000 rpm avec le rotor Sorvall SS-34), à 4°C.

La première centrifugation dure 15 minutes, la deuxième 30 minutes et la troisième 90 minutes. Après la centrifugation, on garde seulement le culot; le surnageant, contenant les sels est jeté. Ensuite, le culot est resuspendu dans l'eau distillée. En resuspendant les membranes pourpres dans l'eau distillée, on peut considérer que la teneur en sels est négligeable.

2.1.2. TRAITEMENTS DES MEMBRANES POURPRES PURIFIÉES

Les méthodes de traitement des membranes pourpres permettent d'obtenir des échantillons de bactériorhodopsine ayant les caractéristiques requises lors des expérimentations. Il s'agit de la délipidation de la bactériorhodopsine (2.1.2.1), de la reconstitution en vésicules (2.1.2.2), de la solubilisation à l'aide de détergents (2.1.2.3) et du traitement aux anesthésiques généraux (2.1.2.4).

La délipidation de la bactériorhodopsine et le traitement aux anesthésiques généraux ont pour but de produire de la bR₄₈₀. La reconstitution en vésicules vise à créer un milieu fermé tout en permettant le passage de la forme native à la forme bR₄₈₀.

2.1.2.1. DÉLIPIDATION DE LA BACTÉRIORHODOPSINE

Par cette méthode, on élimine totalement les lipides de la membrane pourpre. Ainsi, on obtient la bactériorhodopsine exempte de lipides. Cette méthode a été élaborée par Huang et coll. [37] et améliorée par Baribeau et Boucher [43,44,45].

Un culot de membranes pourpres dessalées (20 DO ou 8 à 9mg) [voir la section 2.1.1.2.5.] est solubilisée dans 0,5ml d'une solution contenant 5% de triton-X-100 et 100mM de tampon acétate (pH=5,0). Cet aliquot est gardé deux jours à la température ambiante et agité périodiquement. Le triton-X-100 remplace les lipides endogènes de la membrane pourpre et brise les trimères en monomères; cependant il dénature la bactériorhodopsine. La solubilisation avec le triton-X-100 permet d'obtenir des micelles contenant des monomères de bactériorhodopsine exempts – ou presque – de lipides endogènes.

La deuxième étape consiste à centrifuger l'aliquot à 40000g (19000 rpm avec le rotor Sorvall SS-34) à 4°C durant 90 minutes, ce qui sépare les protéines monomérisées solubilisées (contenues dans le surnageant) des fragments

2. Matériel et méthodes

membranaires contenant les protéines non-solubilisées (culot) encore sous forme de trimères.

Le surnageant est ensuite chargé, à 4°C, sur un tamis moléculaire dans le but de séparer les micelles contenant la bactériorhodopsine des micelles contenant les lipides. Le tamis moléculaire est composé de Biogel A-0,5M (colonne 1,5cm x 100cm) prééquilibré avec du tampon tris-HCl 10mM, NaCl 150mM, acide déoxycholique 0,25% et NaN₃ 0,025% à pH=8,0. On utilise le même tampon pour l'éluion. Les fractions ayant un pic d'absorption à 540nm (jusqu'à 545nm) sont retenues. Les fractions ayant un pic trop près de 550nm (indiquant la présence de lipides) ou un pic important à 380nm (dénaturation de la bactériorhodopsine) sont rejetées.

Les fractions retenues sont ensuite adsorbées sur une colonne à chromatographie hydrophobe. L'objectif de cette chromatographie est de changer le détergent, l'acide déoxycholique, pour un autre détergent, l'octyl-β-D-glucopyranoside (O-G) – ce dernier étant beaucoup plus facile à dialyser. La colonne (1,5cm x 20cm) est composée de phényl-sépharose propre (attention, il faut bien laver le gel afin qu'il n'y ait pas de lipides adsorbés) pré-équilibré avec le même tampon que celui utilisé pour le tamis moléculaire. La bactériorhodopsine s'adsorbe au phényl-sépharose. On lave le tout avec du tampon phosphate 50mM pH=7,0 de façon à éliminer l'acide déoxycholique. Finalement, l'éluion se fait à l'aide d'une solution d'O-G 50mM dans un tampon PO₄ 50mM pH=7,0. Les fractions contenant la bactériorhodopsine sont retenues comme précédemment.

Ensuite, afin d'éliminer l'octyl-β-D-glucopyranoside, on dialyse les fractions restantes contre de l'eau distillée durant deux jours, à 4°C, avec quatre changements d'eau (après 2 heures, 10 heures, 20 heures et 30 heures respectivement). Le dialysat, qui est composé d'aggrégats rouges, est finalement centrifugé à 40000g (19000 rpm avec le rotor Sorvall SS-34) durant 30 minutes à 4°C.

2.1.2.2. RECONSTITUTION EN VÉSICULES

Notre objectif était de reconstituer des vésicules de bactériorhodopsine dans lesquelles l'équilibre bactériorhodopsine native-bR₄₈₀ était facile à moduler.

Il existe plusieurs méthodes de reconstitution de vésicules de bactériorhodopsine [47]. Les plus efficaces pour orienter les molécules de bactériorhodopsine dans les vésicules sont les méthodes employant des détergents. De celles-ci, la méthode de Huang et Stoeckenius [37] reconstituant des vésicules de bactériorhodopsine-phosphatidylcholine d'oeuf à l'aide de cholate et de bactériorhodopsine pré-purifiée au déoxycholate, est celle qui donne les vésicules les plus asymétriques et, par conséquent, l'activité de pompage y est maximale.

2.1.2.2.1. PRÉ-PURIFICATION DE LA BACTÉRIORHODOPSINE AU DÉOXYCHOLATE

Dans un premier temps, on élimine 50% des lipides endogènes de la membrane pourpre [47]. Pour ce faire, on solubilise les membranes pourpres dessalées (12 DO ou 5 mg) dans un millilitre de solution contenant 10%(p/v) en déoxycholate pH=8,0 durant 24 heures, à la température de la pièce. Ensuite, on dépose la bactériorhodopsine solubilisée sur un gradient continu de sucrose 30%-60%(p/v). La centrifugation dure 15 heures, à 4°C, à 65000g (20000rpm avec le rotor SB-283). La portion orange qui flotte sur le dessus est composée de lipides: on la jette. La bande pourpre, au centre, contient la bactériorhodopsine pré-purifiée qui servira pour la reconstitution des vésicules.

2.1.2.2.2. FILM CHOLATE-PHOSPHATIDYLCHOLINE D'OEUF

Ce film est un mélange de PC d'oeuf et de cholate. Il se prépare comme suit:

Quarante milligrammes de PC d'oeuf sont solubilisés dans un mélange chloroforme-méthanol (1:1, v:v), puis mélangés à 0,4ml d'une solution de 10% (p/v) cholate pH=8,0 dans un ballon (25ml) adaptable à un évaporateur rotatif (Brinkmann,

2. Matériel et méthodes

modèle: rotavapor R110). Le tout est ensuite évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le film de PC-cholate est lavé et séché deux fois à l'éther éthylique afin d'en éliminer les traces de chloroforme très néfastes à la bactériorhodopsine (Huang et coll., [37]).

2.1.2.2.3. FORMATION DES VÉSICULES

Au film de PC-cholate, on ajoute 2mg (500 dans le plus petit volume possible) de bactériorhodopsine pré-purifiée au déoxycholate que l'on a recueillie du gradient continu de sucrose (voir la section 2.1.2.2.). De plus, on ajoute une solution concentrée en sels (et de l'eau distillée) afin d'obtenir un mélange final contenant 150mM KCl, 2mM EDTA pH=6,9. Le volume total est de 2ml. Le tout est incubé une heure à la température de la pièce sous agitation.

Cet aliquot est ensuite dialysé contre un litre de solution dialysante, sous agitation constante, 3-4 jours, à une température jouant entre 15-20°C. La solution dialysante est composée de 150mM KCl, et 2mM EDTA (pH=6,9). On change la solution dialysante deux fois par jour. Cette dialyse extrait le cholate des nouvelles vésicules en formation. Lors du dernier changement d'eau, on ajoute 2g d'Amberlite-XAD-2 à la solution dialysante pour éliminer les traces d'ions bivalents [47,48].

Finalement, on obtient une suspension pourpre très turbide qui est composée de vésicules de bactériorhodopsine-PC d'oeuf. L'utilisation de ces vésicules permettra de mesurer l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine à l'aide d'une électrode et d'un pHmètre (voir section 2.2.3).

2.1.2.3. TRAITEMENT AUX ANESTHÉSIOUES GÉNÉRAUX

Comme on l'a vu dans l'introduction (voir la section 1.5.2), certains anesthésiques généraux induisent le passage de la bactériorhodopsine native à la forme bR₄₈₀. Ceux que nous avons utilisé au cours de ces travaux sont l'éther éthylique et l'enflurane.

Pour induire la forme bR₄₈₀, on ajoute 1%(v/v) d'anesthésique au volume de la suspension de membrane pourpre de densité optique inférieure à 2. On agite fortement une trentaine de secondes. La solution tourne au rouge montrant la présence de la bR₄₈₀.

2.1.2.4. SOLUBILISATION À L'AIDE DE DÉTERGENT

La solubilisation de la bactériorhodopsine, soit délipidée ou soit dans la membrane pourpre, s'est faite avec du triton-X-100 ou de l'octyl-β-D-glucopyranoside.

À une suspension concentrée – ou même un culot – de bactériorhodopsine délipidée (voir section 2.1.2.1) ou de membrane pourpre (voir section 2.1.1.2.-E-), contenant la quantité désirée de protéine, on ajoute un volume donné d'une solution concentrée en détergent. Une solution concentrée en sels (NaCl, KCl, etc...) peut être ajoutée si nécessaire. Le pH est alors ajusté à la valeur désirée. Le tout est ensuite dilué avec de l'eau distillée afin d'obtenir le volume prévu au départ. Finalement, on incube le tout une nuit à la température de la pièce en agitant doucement.

2.2. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Notre étude de l'activité de la pompe à protons de la bR₄₈₀ repose essentiellement sur trois techniques expérimentales.

La première est l'étude du pompage de protons ralenti à l'éther (décrite à la section 2.2.1). Elle s'inspire des travaux de D. Oesterhelt et B. Hess [28]. La deuxième technique est la mesure, en photolyse éclair, des variations transitoires du pH lors du photocycle de la bR₄₈₀ (décrite à la section 2.2.2). Elle a été élaborée à partir des travaux de Drachev et coll. [49,50]. Finalement, on a mesuré l'activité de pompage de protons à travers des vésicules à l'aide d'un pHmètre et d'une électrode combinée (voir section 2.2.3).

2.2.1. POMPAGE DE PROTONS À L'ÉTAT PHOTOSTATIONNAIRE

2.2.1.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les travaux de Oesterhelt et Hess, publiés en 1973 [28], visaient la détermination de l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine native (imbriquée dans la membrane pourpre). Pour ce faire, ils ont utilisé une méthode originale.

Ils ont découvert que l'éther éthylique ajouté à une suspension de membrane pourpre ralentit le cycle photochimique de la bactériorhodopsine à l'intermédiaire méta (voir la section 1.4.2) (la composition en sels de leur suspension était à 21%(p/v) NaCl, 1,7%(p/v) MgSO₄·7H₂O, 0,17%(p/v) KCl et 0,25%(p/v) en citrate tri-sodique; ce qui représente une dilution 5/6 de la solution de Kushner (voir section 2.1.1.2.1.)). L'intermédiaire M₄₁₂ est déprotoné. L'accumulation de celui-ci amène, par conséquent, une diminution du pH de la solution (accumulation de H⁺). Cette diminution du pH est mesurable à l'aide d'un pHmètre et est proportionnelle à l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine native. Par leur méthode, ils étaient donc capables de déterminer l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine native.

D'autre part, nous savions que l'enflurane induisait la formation de bR₄₈₀ à partir de la bactériorhodopsine native (voir section 1.5.2. et section 2.1.2.3). Nous avons donc combiné les deux méthodes afin de déterminer l'activité de pompage de protons de la bR₄₈₀.

2.2.1.1.1. TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

La quantité requise de membrane pourpre est lavée de la solution stock (voir section 2.1.1.2.5.). Le culot est suspendu avec 3ml de diverses solutions salines. En fait, ces solutions salines servant à suspendre le culot de membrane pourpre, sont différentes dilutions de la solution de Kushner (voir section 2.1.1.2.1.). La densité

2. Matériel et méthodes

optique finale des diverses suspensions de membrane pourpre est d'une unité à 570nm. Le pH joue entre 6,4 et 7,0 environ.

L'enflurane et l'éther sont ajoutés à la suspension de membrane pourpre comme expliqué à la section 2.1.2.3. On en détermine le spectre d'absorption UV-Visible (Pye Unicam, SP8/100 UV/VIS). Ensuite, la suspension est illuminée par un projecteur (Kodak, Ektagraphic) durant 2 minutes. Elle est constamment agitée afin de s'assurer de l'homogénéité de l'illumination des molécules de bactériorhodopsine. La mesure du pH est faite avec un pHmètre (Fisher Accumet 830) muni d'une petite électrode combinée en verre. Elle est prise durant les 3 minutes précédant l'illumination, durant les 2 minutes d'illumination – temps nécessaire à la saturation de la variation du pH – et lors des 5 minutes suivantes – temps requis pour une relaxation complète. Des spectres d'absorption sont pris à divers temps de séjour à l'obscurité.

2.2.1.1.2. TRAITEMENT DES DONNÉES

Les pH initiaux jouent entre 6,4 et 7,0. Comme nous voulions déterminer la quantité absolue de protons relâchés lors de l'accumulation de l'intermédiaire M_{412} , il nous fallait calculer les concentrations initiale et finale de protons. Le calcul nous permettant d'obtenir la quantité de protons relâchés est le suivant:

$$[H]_{\text{pompe}} = 10^{-\text{pH}_{\text{final}}} - 10^{-\text{pH}_{\text{initial}}}$$

où $[H]_{\text{pompe}}$ représente le gradient de protons pompés.

2.2.2. POMPAGE DE PROTONS EN PHOTOLYSE ÉCLAIR

2.2.2.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les travaux de Drachev et coll., publiés en 1985 et 1986 [49,50], nous ont grandement inspirés pour ces mesures en cinétiques rapides. Dans leurs travaux, ils comparaient les cinétiques de diverses réponses photo-induites de la

2. Matériel et méthodes

bactériorhodopsine native; celles qui nous intéressaient particulièrement étaient les changements spectraux de la bactériorhodopsine lors du photocycle et les variations transitoires, et concomitantes, du pH de la suspension de membranes pourpres ouvertes (non vésiculaires). Ils ont confirmé que les cinétiques de largage et de prise de H^+ par la bactériorhodopsine sont intimement liées à l'apparition et à la disparition de l'intermédiaire M_{412} .

La méthode qu'ils ont utilisée pour mesurer les variations transitoires de pH (de l'ordre de la milliseconde) est très ingénieuse. À une suspension de fragments ouverts de membrane pourpre (100mM NaCl, pH=6,8), ils ont ajouté du para-nitrophénol. Le para-nitrophénol est un indicateur de pH ayant un pK_a de 6,1 et dont la forme basique absorbe maximale à 400nm et la forme acide à 315nm. Un faisceau d'analyse, à 400nm, éclairait constamment l'échantillon. Le cycle photochimique de la bactériorhodopsine était initié par une impulsion laser perpendiculaire au faisceau d'analyse. Les variations d'absorbance à 400nm enregistrées provenaient des changements spectraux de la bactériorhodopsine et de ceux dus au para-nitrophénol. Pour obtenir les variations dues seulement au para-nitrophénol, la cinétique d'une référence (membrane pourpre sans para-nitrophénol) était soustraite de la cinétique de l'échantillon (membrane pourpre - para-nitrophénol). L'amplitude de la soustraction obtenue est proportionnelle à l'activité de la pompe à protons des fragments ouverts de membrane pourpre.

Par cette série d'expériences en photolyse éclair, notre objectif était de mesurer le pompage transitoire de protons de la bR_{480} , relativement à la bactériorhodopsine native. Pour ce faire, nous avons pensé modifier l'équilibre bR_{568} - bR_{480} . Nous avons vu précédemment que l'équilibre entre la bactériorhodopsine native et la bR_{480} pouvait être modulé en changeant certaines caractéristiques de la membrane pourpre à l'aide d'anesthésiques généraux. Dans ces conditions, nous pouvons induire le passage de la forme native vers la forme bR_{480} . D'autre part, il est possible de moduler l'équilibre bR_{568} - bR_{480} à partir de la bactériorhodopsine délipidée ; c'est-à-dire d'induire le passage de la forme bR_{480} à la forme bR_{540} (forme solubilisée) (voir les sections 1.5 et 2.1.2.1).

2. Matériel et méthodes

Dans la première série d'expériences, nous induirons le passage de la bR₅₆₈ à la bR₄₈₀ à l'aide de l'enflurane; ce faisant nous mesurons l'activité de la pompe à protons de la bactériorhodopsine sous la forme bR₅₆₈ et bR₄₈₀. Dans la deuxième série, nous solubiliserons la bactériorhodopsine avec un détergent, l'octyl- β -D-glucopyranoside, afin d'induire le passage à la forme bR₅₄₀ (forme solubilisée). L'activité de pompage sera mesurée à diverses concentrations en octyl- β -D-glucopyranoside. On solubilisera aussi des fragments de membrane pourpre afin d'obtenir des valeurs témoins.

2.2.2.1.1. TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les fragments de membrane pourpre ont été préparés et dessalés comme précédemment (voir la section 2.1.1.2.5). La bactériorhodopsine délipidée fut préparée selon le procédé en 2.1.2.1.

Dans la première partie de l'expérimentation, nous avons utilisé l'enflurane pour induire le passage de la bactériorhodopsine native à la forme bR₄₈₀. Les membranes pourpres ont été incubées dans 6ml d'une solution 100mM en NaCl, pH=6,8. Le tout donne une absorbance de 0,5. Une heure avant le flash actinique, la suspension a été séparée en trois portions égales. On a alors ajouté le para-nitrophénol à deux de ces portions, à raison de 25 μ M et 50 μ M respectivement. Un échantillon ne contenant pas de para-nitrophénol (0 μ M) sert de référence.

Dans la deuxième partie de l'expérimentation, nous avons utilisé l'octyl- β -D-glucopyranoside pour induire le passage de la forme bR₄₈₀ à la forme bR₅₆₈. On a incubé la bactériorhodopsine délipidée dans des solutions de 6ml à différentes concentrations en octyl- β -D-glucopyranoside. Ces solutions étaient respectivement composées de 0mM, 1mM, 10mM et 50mM d'octyl- β -D-glucopyranoside, dans 100mM NaCl (pH=6,8). À l'instar de la série précédente, une heure avant le flash actinique, les diverses suspensions de bactériorhodopsine resolubilisée étaient séparées en trois portions égales auxquelles on ajoutait le para-nitrophénol. On obtenait ainsi quatre séries, à diverses concentrations en octyl- β -D-glucopyranoside, de trois échantillons de bactériorhodopsine resolubilisée contenant différentes

2. Matériel et méthodes

concentrations en para-nitrophénol. On a déterminé le spectre d'absorption UV-Visible (spectrophotomètre Pye Unicam, SP8/100 UV/VIS) de chaque série d'échantillons.

Ensuite, à la température de la pièce, on a déterminé, lors du cycle photochimique de la bactériorhodopsine, les cinétiques d'absorbance à 400nm. Comme on l'a vu plus haut, ces cinétiques d'absorption permettent de déterminer l'activité de pompage de la bR480. Le montage expérimental est présenté à la figure 2.1. Il est constitué d'une lampe à arc et d'un monochromateur à réseaux (Photon Technology Inc., Princeton, N.J.). Ce système projette un faisceau lumineux dont la longueur d'onde est centrée à 400nm – la largeur de la bande est de 8nm. Le faisceau est convergé à l'aide d'une lentille sur la cuvette de l'échantillon. Cette dernière est faite en quartz et son parcours optique est de 10 millimètres.

Le faisceau d'analyse est détecté à l'aide d'une photodiode. Par l'intermédiaire d'un amplificateur, la photodiode transmet à l'oscilloscope (Nicolet 4094, Nicolet Instruments Corp., Mississauga, Ontario) un courant qui est proportionnel à l'intensité de la lumière détectée – c'est-à-dire proportionnel à la transmittance. Lors que l'échantillon est au repos, son absorbance est constante, le courant transmis à

2. Matériel et méthodes

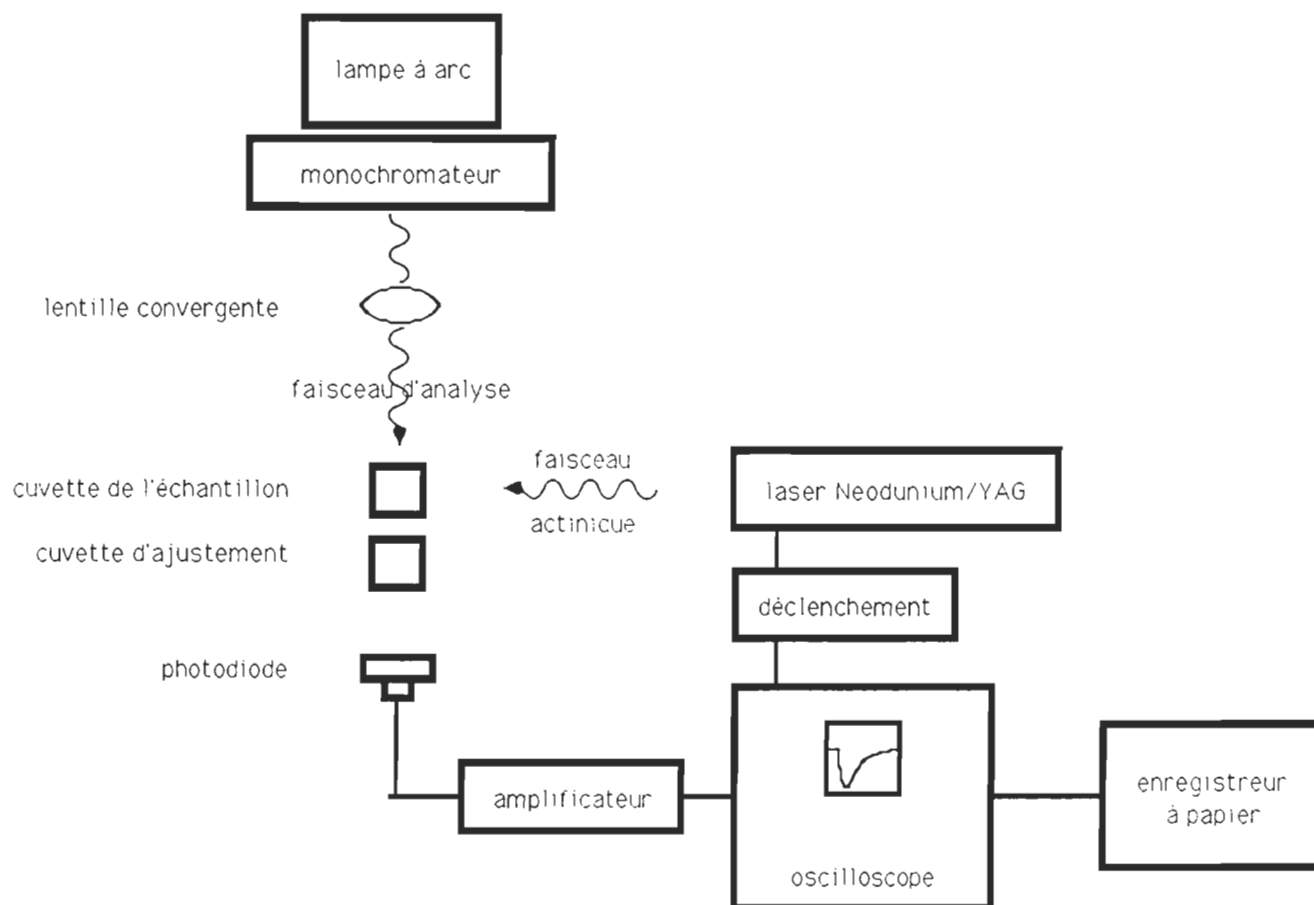


Figure 2.1: Montage expérimental utilisé en photolyse éclair.

2. Matériel et méthodes

l'oscilloscope est lui aussi constant. Ce niveau de courant constant est le niveau de base. Les variations des cinétiques sont mesurées à partir de ce niveau.

La transmittance des échantillons d'une même série varie énormément en fonction de la concentration de para-nitrophénol (0 μ M, 25 μ M et 50 μ M). Pour soustraire correctement deux cinétiques, dont les concentrations en para-nitrophénol diffèrent, il nous fallait un niveau de transmittance de base qui demeure constant pour une même série d'échantillons. Cet astuce est réalisé en plaçant dans l'axe du faisceau d'analyse, à l'arrière de l'échantillon, une cuvette contenant une solution de para-nitrophénol. En jouant sur la concentration en para-nitrophénol de cette cuvette, on réussait à obtenir un niveau de transmittance de base constant.

L'éclair actinique est produit par un laser Neodymium/YAG (raie 532nm, fréquence doublée, impulsion 10ns "Q-switched"; énergie de 30mW/éclair) (Laser System 2000, JK Lasers, Rugdy, Angleterre). Le faisceau actinique est perpendiculaire au faisceau d'analyse. Le laser et l'oscilloscope sont couplés par un système de déclenchement électronique permettant de moyennner plusieurs cinétiques. Pour chaque échantillon, neuf tirs étaient moyennés.

Chaque cinétique moyennée est enregistrée sur papier avant d'être traitée afin d'extraire la cinétique de la variation d'absorption du para-nitrophénol.

2.2.2.1.2. TRAITEMENT DES DONNÉES

Les cinétiques obtenues doivent être traitées pour en extraire l'amplitude de l'activité de pompage. La cinétique de transmittance des échantillons (bactériorhodopsine + 25 μ M ou 50 μ M en para-nitrophénol) est due à la bactériorhodopsine et au para-nitrophénol. À l'aide de l'oscilloscope Nicolet (qui est capable de faire quelques traitements mathématiques), on lui soustrait la cinétique obtenue avec la référence (bactériorhodopsine, 0 μ M en para-nitrophénol). On obtient ainsi la cinétique de transmittance due seulement à l'indicateur de pH.

$$\Delta S = \Delta I_{\text{échantillon}} - \Delta I_{\text{référence}} \quad \text{à un temps } t \text{ donné}$$

2. Matériel et méthodes

où ΔS représente la soustraction faite par l'oscilloscope, $\Delta I_{\text{échantillon}}$ représente un point de la cinétique de l'échantillon et $\Delta I_{\text{référence}}$ un point de la cinétique de la référence (voir l'annexe 1).

Cependant, cette cinétique, d'amplitude relativement faible, contient certaines erreurs causées par la différence entre les niveaux de base respectifs de l'échantillon et de la référence – ce malgré le fait que les niveaux ont été ajustés le mieux possible à l'aide de la cuvette d'ajustement. Pour pallier à cette erreur, on a déterminé une cinétique corrigée de la variation de la transmittance du para-nitrophénol, ΔI , qui tient compte de cette légère différence des niveaux de base. On a déterminé ΔI à 30 temps t différents à l'aide de l'équation suivante (voir annexe 1 pour la démonstration):

$$\Delta I = \Delta S + \Delta I_e \left(\frac{I_r - I_n}{I_e - I_n} - 1 \right)$$

où I_r représente le niveau de base de l'amplificateur de la référence, I_e le niveau de base de l'échantillon, I_n le niveau de base à l'obscurité et ΔI_e la variation de transmittance de l'échantillon au temps t .

Ensuite, l'amplitude maximale de la cinétique corrigée est transformée en variation d'absorbance du para-nitrophénol selon l'équation suivante (voir annexe 2 pour la démonstration):

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\text{Log} \left(\frac{I}{I - \Delta I} \right)}{A_{p\text{-NP}}}$$

où $\Delta A/A$ est la variation d'absorbance réduite à 400nm du para-nitrophénol, ΔI l'amplitude de la variation de la transmittance et I la transmittance de l'échantillon et $A_{p\text{-NP}}$ l'absorbance à 400nm due seulement au para-nitrophénol. $\Delta A/A$ est une valeur proportionnelle à l'activité de pompage de protons et peut être comparée entre les différents échantillons en supposant le pH constant.

2.2.3. POMPAGE DE PROTONS TRANSVÉSICULAIRE

2.2.3.1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Par cette série d'expérimentations, notre objectif était de mesurer l'activité de pompage de vésicules contenant la bactériorhodopsine tout en modulant l'équilibre bR₅₆₈-bR₄₈₀.

Les vésicules ont l'énorme avantage de créer un milieu interne fermé. Le pompage de la bactériorhodopsine, placée dans la bicouche lipidique de la vésicule, établit un gradient électrochimique de protons de part en part de la bicouche. Dans le milieu externe, le pompage de protons se traduit par une variation de pH mesurable simplement à l'aide d'une électrode et d'un pHmètre. Cette variation de pH est directement proportionnelle à l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine.

D'autre part, l'équilibre bR₅₆₈-bR₄₈₀ peut être modulé par le pH. Cet équilibre est d'autant plus facile à déplacer que les interactions entre la bactériorhodopsine et les lipides environnants sont faibles. Or, les interactions moléculaires entre la bactériorhodopsine et la phosphatidylcholine sont très faibles. L'équilibre bR₅₆₈-bR₄₈₀ est donc très simple à moduler dans les vésicules de bactériorhodopsine-PC d'oeuf [voir la section 1.5].

La préparation de vésicules de bactériorhodopsine-PC d'oeuf est décrite à la section 2.1.2.2. Les suspensions produites ont une densité optique de 0,5 à 570nm, un pH de 6,9, une composition en KCl à 150mM et sont exemptes de tampon.

L'étude de l'activité de la pompe à protons de la bR₄₈₀ dans les vésicules s'est effectuée en deux temps: premièrement, lors du titrage des vésicules de bactériorhodopsine-PC d'oeuf; deuxièmement, par la détermination de spectres d'action.

2. Matériel et méthodes

Le titrage des vésicules permet de déterminer une courbe de l'activité de pompage en fonction du pH.

La deuxième partie nous a permis d'établir des spectres d'action à divers pH. Les spectres d'absorption UV-Visible de la bR₅₆₈ – maximum à 568nm – et de la bR₄₈₀ – maximum à 480nm – sont très bien caractérisés [voir les sections 1.4 et 1.5]. C'est le rétinol qui est responsable de l'absorption dans cette région. Lorsque la bactériorhodopsine native, via le rétinol, absorbe un photon, elle initie son cycle photochimique et pompe un proton à travers la bicouche lipidique [voir la section 1.4]. Donc, à chaque fois que la bactériorhodopsine native capte un photon dans la région UV-Visible, elle pompe un proton. Par conséquent, le spectre d'action – l'activité de pompage de protons en fonction de la longueur d'onde – de la bactériorhodopsine native est identique à son spectre d'absorption. À la lumière de ce raisonnement, si la bR₄₈₀ pompe des protons, son spectre d'action sera identique à celui de son spectre d'absorption.

2.2.3.1.1. TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

2.2.3.1.1.1. Titrage des vésicules de bactériorhodopsine-phosphatidylcholine

La suspension de vésicules est titrée à l'aide de petites quantités de NaOH (0,1N) ou de HCl (0,1N). Lorsque le pH est stabilisé, on prend le spectre d'absorption UV-Visible (Pye Unicam, SP8/100 UV/VIS), ce qui permet d'évaluer les concentrations relatives en bR₅₆₈ et bR₄₈₀.

Ensuite, on mesure l'activité de pompage de la bactériorhodopsine. La solution est illuminée par un projecteur (Kodak, Ektagraphic) durant 2 minutes. La suspension est constamment agitée afin de s'assurer que toutes les molécules de bactériorhodopsine sont saturées de lumière et que la suspension a un pH homogène. La mesure du pH est faite avec un pHmètre (Fisher Accumet 830) muni d'une petite électrode combinée en verre. Elle est prise durant les 3 minutes précédant l'illumination, durant les 2 minutes d'illumination – temps nécessaire à la saturation de la variation du pH – et lors des 5 minutes suivantes – temps requis pour une relaxation complète.

2. Matériel et méthodes

Les variations mesurées, produite par la pompe à protons de la bactériorhodopsine, sont très petites, et par conséquent, très affectées par les distorsions électromagnétiques extérieures. Pour isoler les instruments de ces distorsions, on a emballé de papier d'aluminium la cuvette à échantillon (sauf un trou pour la lumière), l'électrode, le pHmètre et les fils. Le papier d'aluminium, agissant comme une cage de Faraday, élimine le bruit de fond causé par les distorsions.

Les variations mesurées par le pHmètre sont transmises, via un amplificateur, à un enregistreur à papier afin de visualiser les cinétiques de pompage de protons.

2.2.3.1.1.2. Détermination de spectres d'action

La méthode de détermination du pompage de protons est exactement la même, à quelques détails près, que celle décrite à la section précédente. La source lumineuse est une lampe à arc au xénon munie à sa sortie d'un monochromateur à réseau (Photon Technology Inc., Princeton, N.J.). La largeur de bande du faisceau lumineux est de 4nm. Le faisceau est convergé par une lentille avant d'arriver sur l'échantillon. La mesure d'activité de pompage de protons est prise à tous les 20 nanomètres entre 400nm et 650nm. Le montage expérimental mesurant le pompage de protons est le même que celui utilisé lors du titrage (voir la section 2.2.3.1.1.1.).

2.2.3.1.2. TRAITEMENT DES DONNÉES

2.2.3.1.2.1. Titration des vésicules de bactériorhodopsine-phosphatidylcholine

Les signaux que le pHmètre envoie à l'enregistreur à papier sont exprimés en unités de pH. L'activité de pompage de la bactériorhodopsine est exprimée, quant à elle, en moles de H⁺ pompés. Puisque, le pH change lors du titrage, les cinétiques obtenues doivent être transposées en moles de H⁺ pour représenter l'activité de pompage.

Le traitement des données expérimentales obtenues s'effectue comme suit:

On détermine l'amplitude à saturation des cinétiques obtenues aux divers pH. Elles sont calibrées de façon à être exprimées en variation de pH (Δ pH). Ensuite, les

2. Matériel et méthodes

ΔpH sont transposées en pourcentage de variation de moles de protons ($\% \Delta\text{H}^+$) à l'aide de l'équation suivante:

$$H_{\text{pompe}} = \frac{(10^{-(\text{pH} + \Delta\text{pH})} - 10^{-\text{pH}})}{(10^{-(\text{pH} + \Delta\text{pH})} - 10^{-\text{pH}})_{\text{max}}} \times 100\%$$

où H_{pompe} est l'activité relative de pompage de protons exprimés en pourcentage, pH est le pH auquel l'activité de pompage a été mesurée, ΔpH est l'amplitude à saturation de la cinétique exprimée en unités de pH . Le dénominateur représente l'activité de pompage au pH donné, alors que le numérateur représente l'activité maximale de protons.

2.2.3.1.2.2. Détermination de spectres d'action

Dans le cas des spectres d'action, les variations de pH enregistrées sont très petites. De plus, pour un même spectre, le pH demeure constant. Par conséquent, l'amplitude maximale des cinétiques obtenues (exprimée en unité de pH) peut être considérée comme étant proportionnelle à l'activité de pompage de H^+ . D'autre part, l'intensité du faisceau lumineux produit par la lampe au xénon n'est pas constante dans la région UV-Visible.

Les valeurs obtenues pour les différentes longueurs d'onde sont corrigées afin de tenir compte de la variation de l'intensité lumineuse de la source en fonction de la longueur d'onde. L'amplitude maximale de la cinétique d'un échantillon donné, L_{pH} (à longueur d'onde et pH donnés), est transposée en gradient de protons, H_{pompe} , de la façon suivante:

$$H_{\text{pompe}} = \frac{L_{\text{pH}}}{L_{\text{max}}} \times \frac{I_{560}}{I_{\text{l.o.}}} \times 100\%$$

où L_{max} est l'amplitude maximale enregistrée pour tous les échantillons, I_{560} l'intensité à 560nm et $I_{\text{l.o.}}$ l'intensité de la lampe à une longueur d'onde donnée.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette section est divisée en trois parties. Chacune des parties traite en particulier des résultats d'une méthode d'investigation de l'activité de pompage de protons de la bR₄₈₀. La première partie (section 3.1) traite des résultats de la méthode d'analyse à l'état photostationnaire (décrite à la section 2.2.1); la section 3.2 de ceux de la méthode d'analyse en photolyse éclair (voir la section 2.2.2); finalement, la section 3.3 traite de l'activité de pompage de protons à travers des vésicules (méthode décrite à la section 2.2.3).

3.1. POMPAGE DE PROTONS À L'ÉTAT PHOTOSTATIONNAIRE

Durant le cycle photochimique de la bactériorhodopsine, l'activité de pompage des protons est centrée autour du méta-intermédiaire qui correspond à la forme déprotonée du chromophore (voir la section 1.4.2). En suspension aqueuse, les membranes pourpres ont un cycle photochimique qui dure environ 10 millisecondes. Dans ces conditions, il est improbable que, suite à une stimulation lumineuse, une quantité appréciable de méta-bactériorhodopsine s'accumule et que l'activité de pompage de protons puisse être mesurée directement à l'électrode d'un pHmètre par l'acidification du milieu.

Toutefois, tel que décrit à la section 2.2.1, il est possible de ralentir suffisamment le cycle photochimique pour effectuer de telles mesures. Il peut donc devenir possible dans ces conditions de comparer les activités de pompage des formes pourpre et rouge de la bactériorhodopsine.

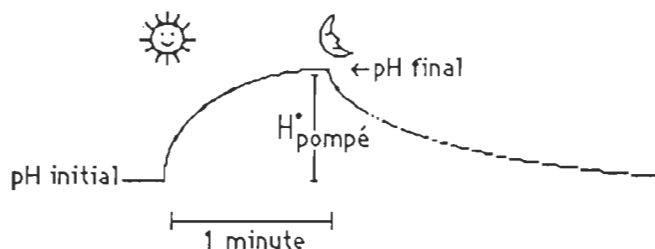
Un exemple de courbe expérimentale est représenté à la figure 3.1-a. Dans les échantillons où une variation de pH était notée, le pH descend rapidement au début de l'illumination et se stabilise en une minute environ. Après avoir éteint la lampe, le pH revient lentement à sa valeur initiale.

Le tableau 3.1-b résume les résultats obtenus. La présence de la coloration pourpre dénote une nette prédominance de la forme bR₅₆₈, alors que la coloration rouge réfère à une prédominance en bR₄₈₀. La mention 'Kushner' montre que la composition en sels de la suspension de membranes pourpres est la même que la solution de Kushner (voir la section 2.1.1.2.1.).

Il y a une corrélation directe entre la formation de la bR₄₈₀ suite à l'ajout de l'anesthésique et l'absence de sels dans la suspension. En effet, en suspension dans la solution de Kushner (échantillons 1, 3 et 5), la bactériorhodopsine demeure pourpre malgré l'ajout de l'anesthésique. Tandis que, en suspension dans l'eau distillée (échantillons 2, 4 et 6), la bactériorhodopsine passe de la forme bR₅₆₈ à la forme bR₄₈₀. On voit donc que la présence de sels dans la suspension empêche l'induction de la bR₄₈₀ par les anesthésiques. Cet effet de la concentration en sels sur le maintien de

Résultats et discussion

a)



b)

	Composition en sels de la suspension	Anesthésiques ajoutés	Coloration après l'ajout d'anesthésiques	pH initial	activité de la pompe à protons (unité de pH)
1	'Kushner'	éther	pourpre	6,5	0,12
2	aucun	éther	rouge	6,6	0,0
3	'Kushner'	enflu.	pourpre	6,9	0,14
4	aucun	enflu.	rouge	6,6	0,0
5	'Kushner'	éther+enflu.	pourpre	7,0	0,26
6	aucun	éther+enflu.	rouge	6,8	0,0

Tableau 3.1: Résumé des résultats obtenus en photolyse à l'état photostationnaire. En a): courbe expérimentale. Le soleil représente le début de l'illumination; la lune la fin. Le plateau était atteint en moins d'une minute. En b), tableau des résultats. La mention 'Kushner' réfère à la composition en sels de la solution du même nom (voir la section 2.2.1.2.1.). Avant l'ajout d'anesthésiques les échantillons ont une densité optique d'une unité. La coloration pourpre montre une nette prédominance de la forme bR₅₆₈, alors que la coloration rouge réfère à la forme bR₄₈₀, après l'ajout d'anesthésique.

Résultats et discussion

L'intégrité structurelle et fonctionnelle de la bR₅₆₈ n'est qu'une des innombrables facettes de l'halophilisme propre aux *Halobacterium*. Ce phénomène est encore très mal connu et fait l'objet de recherches intensives dans plusieurs laboratoires. De façon très inattendue, on voit que l'halophilisme est relié à l'équilibre acido-basique entre la bR₅₆₈ et la bR₄₈₀.

D'autre part, le tableau 3.1-b montre que dans l'eau distillée et en présence de bR₄₈₀, la variation de pH mesurée est nulle tandis que dans la solution de Kushner et en présence de bR₅₆₈, la variation de pH mesurée est de l'ordre de 0,1 à 0,3 unité de pH. Dans ces dernières conditions, la variation de pH s'explique par le blocage du photocycle au niveau de la disparition du méta-intermédiaire. Cependant, en présence de bR₄₈₀, l'absence apparente de variation de pH peut être expliquée par plusieurs alternatives. La première est que le cycle photochimique de la bR₄₈₀ est bloqué par l'anesthésique avant l'apparition du méta-intermédiaire. À ce niveau, la bactériorhodopsine n'a pas encore largué son proton. Il est donc impossible de mesurer une variation de pH et, par conséquent, de déterminer s'il y a pompage de protons ou non. Deuxième alternative, il est possible que le cycle photochimique soit bloqué après la disparition du méta-intermédiaire. À ce niveau, comme la bactériorhodopsine a déjà repris son proton, il est tout aussi impossible de mesurer une variation de pH. Finalement, il est possible que le cycle photochimique soit bel et bien bloqué au niveau du méta-intermédiaire et qu'il nous soit impossible de mesurer une variation de pH étant donné que la bR₄₈₀ serait incapable de pomper des protons.

Dans les circonstances, il nous est impossible de conclure en faveur de l'une ou l'autre de ces trois alternatives. Il nous faut donc utiliser une autre méthode enfin de déterminer l'activité de pompage de protons de la bR₄₈₀.

3.2. POMPAGE TRANSITOIRE EN PHOTOLYSE ÉCLAIR

Par opposition aux mesures effectuées à l'état photostationnaire (voir la section 3.1), la photolyse éclair permet de générer pour un court instant (équivalent à son temps de vie) une concentration importante de méta-bactériorhodopsine. Pendant le temps de vie de cet intermédiaire, le pH du milieu est abaissé de façon transitoire, suite à la déprotonation du chromophore et au largage du proton dans le milieu aqueux. Cette acidification transitoire, trop rapide pour être détectée directement par l'électrode d'un pHmètre, peut être facilement analysée si un indicateur de pH tamponne le milieu. Tel que décrit à la section 2.2.2, nous avons utilisé les variations d'absorbance du para-nitrophénol comme indicateur du largage transitoire de protons par la bactériorhodopsine. Dans ces expériences, le cycle photochimique du pigment est initié par un éclair laser et les variations transitoires d'absorbance à 400nm sont enregistrées. Ce signal contient la variation d'absorbance de la bactériorhodopsine et de l'indicateur de pH. Par soustraction, il est donc possible d'obtenir le signal dû seulement à l'indicateur, correspondant à l'éjection et à la reprise de protons par la bactériorhodopsine. L'amplitude de ce signal est une mesure de l'activité de pompage de protons.

Cette méthode n'étant pas limitée par la vitesse du cycle photochimique, nous avons pu l'utiliser aussi bien avec des membranes pourpres natives ou traitées avec des anesthésiques qu'avec des échantillons de bactériorhodopsine purifiée où la transition entre les formes pourpre et rouge du pigment était modulée par la concentration d'amphiphile présent. Les spectres d'absorption de ces échantillons sont présentés à la figure 3.2.

La figure 3.3 montre un exemple de cinétiques obtenues lors de ces deux séries de mesures. L'éclair représente le flash actinique (532 nm). Les amplitudes de ces cinétiques permettent de calculer l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine (voir la section 2.2.2).

Le tableau 3.4 rassemble les résultats obtenus lors des séries d'expérimentations. Le pic d'absorption du chromophore reflète les proportions entre la bR₅₆₈ et la bR₄₈₀. La durée exprimée en millisecondes est le temps requis (suite au flash) pour que la cinétique revienne à son niveau initial. Les abréviations MP, bR_{déj}

Résultats et discussion

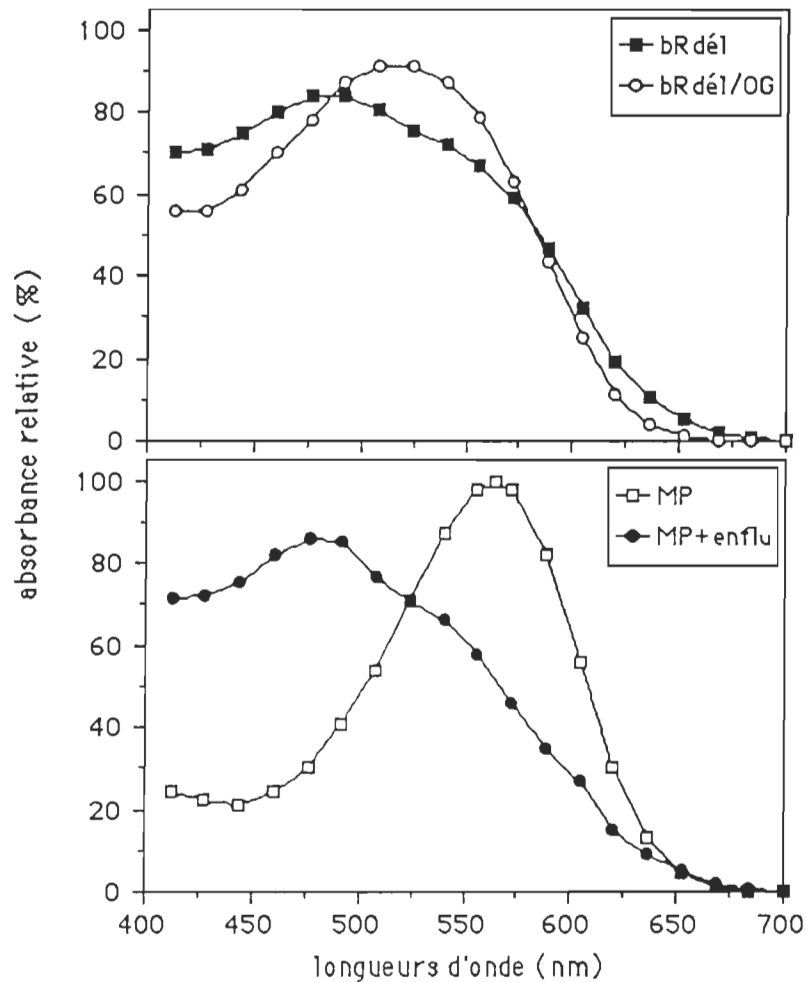


Figure 3.2: Spectres d'absorption UV-Visible des échantillons utilisés en photolyse éclair. La figure du haut présente le spectre de la bactériorhodopsine délipidée en suspension dans l'eau (carrés noirs) dont le pic est centré à 480nm, ainsi que celui de bactériorhodopsine délipidée solubilisée avec 50mM octyl-β-D-glucopyranoside (cercles blancs) avec un maximum à 510nm. La figure du bas présente les spectres de membranes pourpres en suspension dans l'eau (carrés blancs), le pic centré à 568nm, et de membranes pourpres traitées à l'enflurane (cercles noirs) ayant un maximum à 480nm.

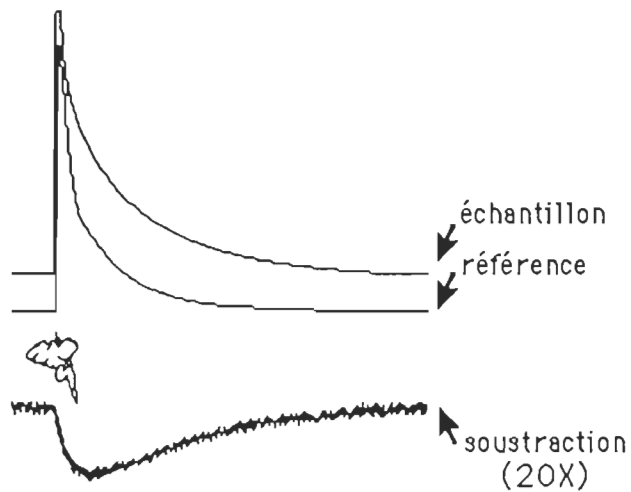


Figure 3.3: Exemple de courbes expérimentales en photolyse éclair. Les cinétiques échantillon (avec para-nitrophénol: $25\mu\text{M}$ ou $50\mu\text{M}$) et référence (sans para-nitrophénol) ont été obtenues selon la méthode décrite en 2.2.3. La soustraction a été calculée à partir des deux cinétiques précédentes. Vue sa petitesse, elle a été grossie environ 20 fois. L'amplitude des cinétiques de la soustraction et de l'échantillon permettent de déterminer l'activité de pompage (voir section 2.2.3). L'éclair représente le flash actinique (532nm). Les mesures sont faites à 400nm . Tous les échantillons contiennent 100mM de NaCl .

Résultats et discussion

et O-6 montrent, respectivement, que les échantillons sont composés de fragments de membrane pourpre, de bactériorhodopsine délipidée (voir la section 2.1.2.1) et d'octyl- β -D-glucopyranoside.

A. ... EN PRÉSENCE D'ENFLURANE

La première partie du tableau 3.4 présente les résultats obtenus à l'aide de l'enflurane. On remarque que, à l'ajout de l'enflurane, la bactériorhodopsine – qui était précédemment sous la forme bR568 – est passée à la forme bR480. Puis, après l'évaporation sous vide de l'enflurane, la bactériorhodopsine revient sous sa forme native bR568.

D'autre part, les résultats démontrent que l'activité de pompage est maximale (100%) lorsque la membrane pourpre est seule en suspension dans l'eau, devient nulle (-3%) en présence d'enflurane et remonte (58%) une fois que l'enflurane est extrait du milieu. La différence d'activité entre les échantillons "avant l'ajout" et "après l'évaporation" est imputable à une dénaturation partielle causée par l'enflurane.

Il apparaît par ces résultats que lorsque la bactériorhodopsine passe de la forme bR568 à la forme bR480, son activité de pompage de protons devient nulle. Ce phénomène est réversible: lorsque la bactériorhodopsine reprend sa forme native (bR568), l'activité de pompage réapparaît.

B. ... EN PRÉSENCE D'OCTYL- β -D-GLUCOPYRANOSIDE

La deuxième partie du tableau 3.4 présente les résultats obtenus à l'aide d'octyl- β -D-glucopyranoside. En présence de faibles concentrations d'octyl- β -D-glucopyranoside, soit 0mM, 1mM et 10mM, la bactériorhodopsine délipidée demeure sous la forme bR480 (pic centré à 480nm). À 50mM d'octyl- β -D-glucopyranoside, la concentration micellaire critique du détergent (40mM) est dépassée: la bactériorhodopsine délipidée se trouve solubilisée. Une certaine portion de bR480 se transforme en bR540 (forme solubilisée de la bR568), tandis que l'autre portion demeure sous la forme bR480. Il y a donc "coexistence" des formes spectrales, comme le démontre le pic d'absorption centré à 510nm une heure après la solubilisation. Cette "coexistence" est par ailleurs instable car la solubilisation de la bactériorhodopsine délipidée par l'octyl- β -D-glucopyranoside dénature totalement la

Résultats et discussion

Composition des échantillons	pH	Pic d'absorption du chromophore (nm)	Activité de pompage de protons (%)	Durée (msec)	Réf. au texte
MP avant ajout enflu	6,80	568	100	3,5	A1
MP avec enflu	6,80	480	-3	1,1	A2
MP enflu enlevé	6,80	568	58	4,0	A3
Br _{dél} / 0mM O-G	6,82	480	15	120	B1
Br _{dél} / 1mM O-G	6,83	480	-13	121	B2
Br _{dél} / 10mM O-G	6,82	480	-18	110	B3
Br _{dél} / 50mM O-G	6,82	510	100	2,0	B4
MP / 0mM O-G	6,80	568	98	4,2	B5
MP / 1mM O-G	6,77	568	100	3,5	B6
MP / 10mM O-G	6,80	568	80	2,5	B7
MP / 50mM O-G	6,78	552	31	4,1 : 100	B8

Figure 3.4: Tableau des résultats obtenus en photolyse éclair. L'activité de pompage de protons est calculée à partir de l'amplitude des cinétiques selon la méthode décrite à la section 2.2.2. Le pic d'absorption du chromophore donne une indication des proportions relatives de bR₄₈₀ et bR₅₆₈. La demi-vie de l'intermédiaire-méta est exprimée en millisecondes. MP, enflu, Br_{dél} et O-G sont les abréviations respectives de membrane pourpre, enflurane, bactériorhodopsine délipidée et octyl-β-D-glucopyranoside. Tous les échantillons avaient une densité optique jouant entre 0,4 et 0,5 et contenaient 100mM de NaCl. Les concentrations en para-nitrophénol étaient de 25μM et 50μM pour chaque type d'échantillons.

Résultats et discussion

protéine en moins d'une journée. (Ce processus de dénaturation est une autre preuve du maintien de l'intégrité de la structure native de la bactériorhodopsine par les lipides endogènes de la membrane pourpre).

D'autre part, à faibles concentrations d'octyl- β -D-glucopyranoside (0mM, 1mM et 10mM), la bactériorhodopsine possède une activité de pompage de protons nulle (15%, -13% et -18% respectivement). À 50mM en détergent, on remarque une reprise de l'activité de pompage (100%). Ces résultats nous permettent de relier les changements de formes spectrales à l'activité de pompage. La bactériorhodopsine ne pompe pas de proton sous la forme bR₄₈₀ et commence à en pomper dès qu'elle se convertit en bR₅₄₀.

À titre de témoin, nous avons fait subir à des fragments de membrane pourpre le même traitement à l'aide d'octyl- β -D-glucopyranoside qu'à la bactériorhodopsine délipidée. Aux concentrations 0mM, 1mM et 10mM, la bactériorhodopsine (enchassée dans la membrane pourpre) est demeurée sous sa forme native bR₅₆₈. À 50mM, la bactériorhodopsine a montré un pic d'absorption centré à 552nm; ce qui dénote la présence de la forme solubilisée bR₅₄₀ mélangée à la forme native bR₅₆₈. Quant à elle, l'activité de pompage de protons est importante aux trois concentrations sous la CMC: soit 98% à 0mM, 100% à 1mM et 80% à 10mM. À 50mM en détergent cependant, l'activité de pompage chute énormément (31%).

Nous avons tenté d'expliquer ces étranges résultats par la formation aléatoire de vésicules formées de fragments de membrane pourpre soudés par le détergent. Dans ces vésicules, les molécules de bactériorhodopsine s'orientent aléatoirement. Comme certaines pompent vers l'extérieur et les autres vers l'intérieur, on ne peut mesurer aucune activité apparente de pompage de protons. Mais, par la microscopie électronique, on n'a observé aucune vésicule à 50mM en octyl- β -D-glucopyranoside. Pire, au lieu d'observer les gros fragments tous pêle-mêle retrouvés à basses concentrations en octyl- β -D-glucopyranoside, nous avons plutôt observé d'innombrables minuscules fragments. La cause de la diminution de l'activité de pompage, lorsque la membrane pourpre est solubilisée, nous est donc demeurée obscure. Cette diminution d'activité de pompage de la bactériorhodopsine enchassée dans la membrane pourpre a déjà été observé par Dencher et Heyn [38]. Ils expliquaient ce phénomène par des changements morphologiques subis dans la membrane pourpre, sans cependant pouvoir réellement identifier la cause.

Résultats et discussion

C. CINÉTIQUES

En plus de déterminer l'activité de pompage de protons, les mesures transitoires en photolyse éclair nous ont permis d'observer un phénomène particulier: l'altération du temps d'apparition et de disparition du méta-intermédiaire. La cinquième colonne présente le temps de demi-vie de l'intermédiaire-méta. L'échantillon de référence est exempt de para-nitrophénol (maximum d'absorption centré à 400nm) et le pic d'absorption du méta-intermédiaire (412nm) est centré tout près de la longueur d'onde d'analyse (400nm). La cinétique de la référence est un excellent instrument pour mesurer le temps d'apparition et de disparition du méta-intermédiaire.

Lorsque la bactériorhodopsine native est dans des fragments de membrane pourpre intacts (sans anesthésiques et non-solubilisée), la demi-vie est de l'ordre de 4msec (échantillons A1, A3, B5-7), ce qui est en accord avec la littérature (voir la section 1.4.2). Lorsque la membrane pourpre est solubilisée (échantillon B8), la bactériorhodopsine montre une cinétique à deux exponentielles: l'une rapide d'une demi-vie d'environ 4msec, l'autre lente de l'ordre de 100 à 400 msec. Cette présence de deux exponentielles semble corroborer la présence de bR₅₆₈ et de bR₅₄₀ dans cet échantillon. Lorsque la bactériorhodopsine est délipidée et non-solubilisée (échantillons B1-3), la cinétique revient à son niveau initial avec une demi-vie extrêmement lente de l'ordre de 100 à 120 msec.

Finalement, lorsque l'enflurane est ajouté à la membrane pourpre (échantillon A2) ou lorsque la bactériorhodopsine délipidée est solubilisée dans 50mM d'octyl- β -D-glucopyranoside (échantillon B4), la bactériorhodopsine a une cinétique, légèrement plus rapide que sous sa forme native, variant entre 1 et 2 msec.

D. DISCUSSION

De tous ces résultats obtenus en photolyse éclair, on peut tirer deux conclusions principales.

La première conclusion est que l'existence de la bactériorhodopsine sous la forme bR₄₈₀ cause la perte totale d'activité de pompage de protons. Les résultats montrent que la bR₅₆₈ pompe convenablement des protons, alors que la bR₄₈₀ en est incapable. Nous arrivions exactement à la même conclusion lors des expériences en photolyse photostationnaire (voir la section 3.1). Malgré cela et à l'instar des expérimentations

Résultats et discussion

antérieures, certaines causes d'erreur rendent cette conclusion incertaine. Comme on peut le voir dans le tableau 3.3, certaines valeurs d'activité de pompage de protons sont négatives et non-négligeables (-13% et -18%). Ceci est théoriquement impossible: la bactériorhodopsine ne peut pas "anti-pomper" des protons; elle pompe ou elle ne pompe pas, voilà tout! D'autres résultats montrent des valeurs non-négligeables (quoique positives) (+15%), alors que la conclusion que l'on en a tirée est une activité de pompage nulle. De façon intuitive et sans chercher plus loin, on peut poser qu'il y a une incertitude minimale de $\pm 20\%$ (mesurée directement sur l'échelle de pourcentage d'activité) qui intervient lors des mesures.

Deux causes majeures ont été retracées pour expliquer ces écarts expérimentaux. La première vient des légères variations de pH. Dans les calculs, nous avons supposé que le rapport $\Delta A/A$ du para-nitrophénol est proportionnel à l'activité de pompage de protons (voir la section 2.2.2 et l'annexe 1) – ce qui est vrai seulement à pH constant. Or, le pH varie légèrement comme on peut le constater au tableau 3.4. Le rapport $\Delta A/A$ est, en fait, très sensible – de façon non-linéaire – à la variation du pH dans la région de pH où l'on a travaillé (le pK_a du para-nitrophénol est de 6,1). Il est donc possible que, malgré toutes les précautions prises, l'effet du pH sur les résultats obtenus soit non-négligeable. Cet effet du pH est très plausible car l'absorbance à 400nm due seulement au para-nitrophénol variait grandement d'un échantillon à l'autre au lieu d'être constante. La deuxième cause d'erreur d'importance est ce qu'on pourrait regrouper, sous l'appellation un peu maladroite, des variations physico-chimiques. L'ajout d'enflurane produit la précipitation d'un mélange hétérogène de micro-goute-lettes de lipides, d'anesthésiques et d'aggrégats de bR480, le tout formant un mélange très turbide; ce qui a pour effet d'abaisser le niveau de base (voir la section 2.2.2.1.1.) de façon importante et de réduire l'amplitude du signal mesuré. Cette réduction amplifie fortement les incertitudes au niveau des calculs de la variation de pH. Lors des mesures transitoires en présence d'octyl- β -D-glucopyranoside, les causes d'erreur sont les mêmes mais sont posées différemment. Les échantillons de bactériorhodopsine délipidée à faibles concentrations en détergent (sous la concentration micellaire critique) sont des suspensions de gros aggrégats de bR480 et sont turbides. À 50mM d'octyl- β -D-glucopyranoside, l'absorption du rétinol à 400nm (longueur d'onde de mesure) augmente par le fait d'une dénaturation importante – qui n'est d'ailleurs pas nécessairement équivalente pour l'échantillon et la référence. Cet effet tend à diminuer le niveau de base mesuré par la photodiode, ce qui rend sensible à l'extrême l'amplitude des cinétiques à toutes espèces de variations des conditions

Résultats et discussion

expérimentales (pH, agrégation, précipitation...). C'est d'ailleurs dans cette série que l'incertitude se fait le plus sentir.

La deuxième conclusion est que la présence de bR₄₈₀ ne permet pas, à elle seule, d'expliquer l'altération du temps d'apparition et de disparition du méta-intermédiaire. La bR₄₈₀ délipidée en suspension dans l'eau (échantillons B1-3) possède une cinétique environ 30 fois plus longue que celle de la bR₅₆₈ native, tandis que la bR₄₈₀ induite par l'enflurane à partir de fragments de membrane pourpre possède une cinétique légèrement plus rapide que celle de la bR₅₆₈ native. Ce phénomène s'explique par le taux d'agrégation des molécules de bactériorhodopsine. Dans les échantillons en présence d'enflurane, les membranes pourpres, très rigides naturellement, sont fluidifiées par les molécules d'enflurane. Dans ce milieu plus fluide, les molécules de bactériorhodopsine peuvent effectuer plus rapidement leur cycle photochimique étant donné qu'elles sont moins contraintes par le milieu. Par ailleurs, dans les échantillons en présence de bR₄₈₀ délipidée, les molécules de protéines forment des agrégats extrêmement rigides. Les molécules de bactériorhodopsine ont un cycle photochimique très ralenti.

On en est au point où l'on peut affirmer qu'il y a une perte d'activité de pompage de protons lorsque la bactériorhodopsine prend la forme bR₄₈₀. Cependant, il nous est encore impossible de déterminer si cette perte d'activité est totale ou partielle car les écarts expérimentaux sont trop importants. La méthode d'investigation à l'état photostationnaire (section précédente) et celle en cinétique transitoire nous ont permis de "débroussailler les environs", mais manquent d'acuité pour déterminer l'importance de la perte d'activité de pompage de protons. Il nous fallait donc une méthode plus incisive et plus sensible.

3.3. POMPAGE À TRAVERS DES VÉSICULES

Comme on l'a vu dans l'introduction (voir les sections 1.3 et 1.5.2), la bactériorhodopsine dans sa membrane pourpre est fortement associée aux lipides endogènes l'entourant. Les interactions entre les lipides endogènes et la bactériorhodopsine sont responsables du maintien de l'intégrité de la forme native dans une vaste gamme de températures et de pH. Lorsque ces interactions sont affaiblies, le site de titration de l'équilibre acido-basique bR₄₈₀-bR₅₆₈ est plus accessible. Par conséquent, il est aisé de varier les proportions de bR₄₈₀ et de bR₅₆₈ en changeant simplement le pH.

Lorsqu'on incorpore des fragments de membrane pourpre ou de la bactériorhodopsine dans des vésicules lipidiques, les interactions lipides-protéine natives disparaissent aux dépens de nouvelles interactions entre le pigment et le lipide qui constitue la vésicule. Dans des vésicules de phosphatidylcholine d'oeuf, les interactions bactériorhodopsine-lipides sont telles qu'il est possible de titrer réversiblement l'équilibre entre les formes pourpre et rouge du pigment

Puisqu'il s'agit de vésicules, il est aisé d'y évaluer l'activité de pompage de protons à l'aide d'un pHmètre puisqu'elle se traduit par une variation significative et durable du pH du milieu. La méthode utilisée (voir à la section 2.2.3) produit des vésicules de type "inside-out", de sorte que l'activité de pompage de protons induit par la lumière se traduit par une alcalinisation du milieu. Comme on peut facilement titrer l'équilibre acido-basique bR₄₈₀-bR₅₆₈, il devient facile d'y comparer l'activité respective des deux formes.

Dans un premier temps, l'analyse du pompage à travers des vésicules visait à étudier la variation de l'activité de pompage de protons lors de la titration de l'équilibre bR₄₈₀-bR₅₆₈. Dans un deuxième temps, elle nous a permis de déterminer des spectres d'action à divers pH.

La figure 3.5 présente un exemple de courbe expérimentale d'activité de pompage prise lors de la titration. Le soleil représente le début de l'illumination et la lune la fin. Le temps nécessaire pour atteindre le plateau est d'environ une minute. La flèche

Résultats et discussion

verticale à droite exprime une variation de pH de +0,001 (c'est-à-dire une alcalinisation du milieu environnant). La longueur de la barre horizontale équivaut à une minute. La mesure d'activité de pompage est prise lorsque la dérive du pH est plus petite que 0,001 unité de pH par minute. L'amplitude à saturation de la cinétique correspond à l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine.

La figure 3.6 résume les résultats obtenus à différents pH lors de la titration. La courbe en carrés blancs représente le rapport des absorbances à 568nm et 480nm (A_{568}/A_{480}). Les cercles noirs symbolisent l'activité de pompage de la bactériorhodopsine aux pH donnés. Le rapport A_{568}/A_{480} est maximum à pH=6,4, passe par une valeur moyenne à pH=7,7 et est minimum aux alentours de pH 9,5-10,0. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été précédemment présenté dans l'introduction (section 1.5.2). Aux pH acides, la bactériorhodopsine se retrouve sous sa forme native bR₅₆₈, alors qu'aux pH basiques, elle est sous la forme bR₄₈₀: le pK_a apparent étant de 7,7.

De son côté, l'activité de pompage (cercles noirs) est maximale (100%) à pH=6,4, dégringole rapidement pour être à 12% à pH=7,6 et à moins de 1% entre pH=9,0 et 10,0. Les résultats montrent que l'activité de pompage est maximale lorsque la bactériorhodopsine existe sous forme bR₅₆₈ et minimale lorsqu'elle prédomine sous la forme bR₄₈₀.

Cette perte d'activité de pompage est totalement réversible. Le même échantillon a été titré dans les deux sens à plusieurs reprises. L'activité de pompage, après avoir été inhibée aux pH basiques, reprenait complètement lors du retour à pH acide. Aucune dénaturation n'a été enregistrée, de même qu'aucune chute d'activité causée par le bris de vésicules.

Un fait demeure cependant étrange. Lorsque la bactériorhodopsine existe en proportions égales de bR₅₆₈ et bR₄₈₀ – c'est-à-dire lorsque le pH de la suspension est au pK_a (7,7) – l'activité de pompage devrait, selon une logique simple, être égale à 50%. Car la moitié de la bactériorhodopsine qui existe sous forme bR₅₆₈, pompe, alors que l'autre moitié, en bR₄₈₀, en est totalement incapable. Pourtant, l'activité de pompage que l'on a enregistré à pH=7,7 (10%) est de beaucoup inférieure à cette estimation. L'explication de ce phénomène réside dans le fait que l'efficacité de la pompe à protons de la bR₅₆₈ diminue lorsque le pH augmente (dans la région de pH étudiée). Les travaux de D. Oesterhelt et B. Hess ont montré que l'efficacité de l'activité

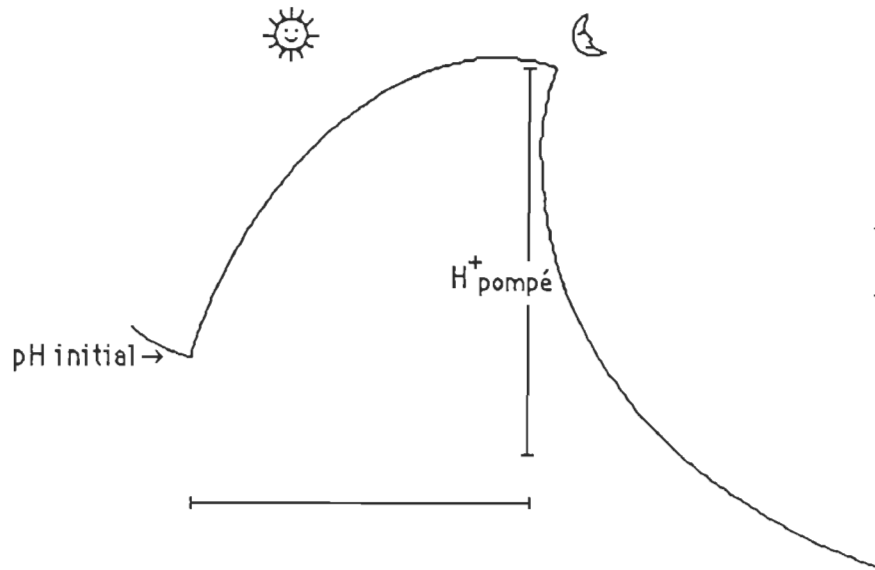


Figure 3.5: Courbe expérimentale obtenue à l'aide de vésicules. Le soleil représente le début de l'illumination et la lune la fin. Le temps nécessaire pour atteindre le plateau est d'environ une minute. La flèche verticale à droite exprime une variation de pH de +0,001 (c'est-à-dire une alcalinisation du milieu environnant). La longueur de la barre horizontale équivaut à une minute. La mesure d'activité de pompage est prise lorsque la dérive du pH est plus petite que 0,001 unité de pH par minute. L'amplitude à saturation de la cinétique correspond à l'activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine.

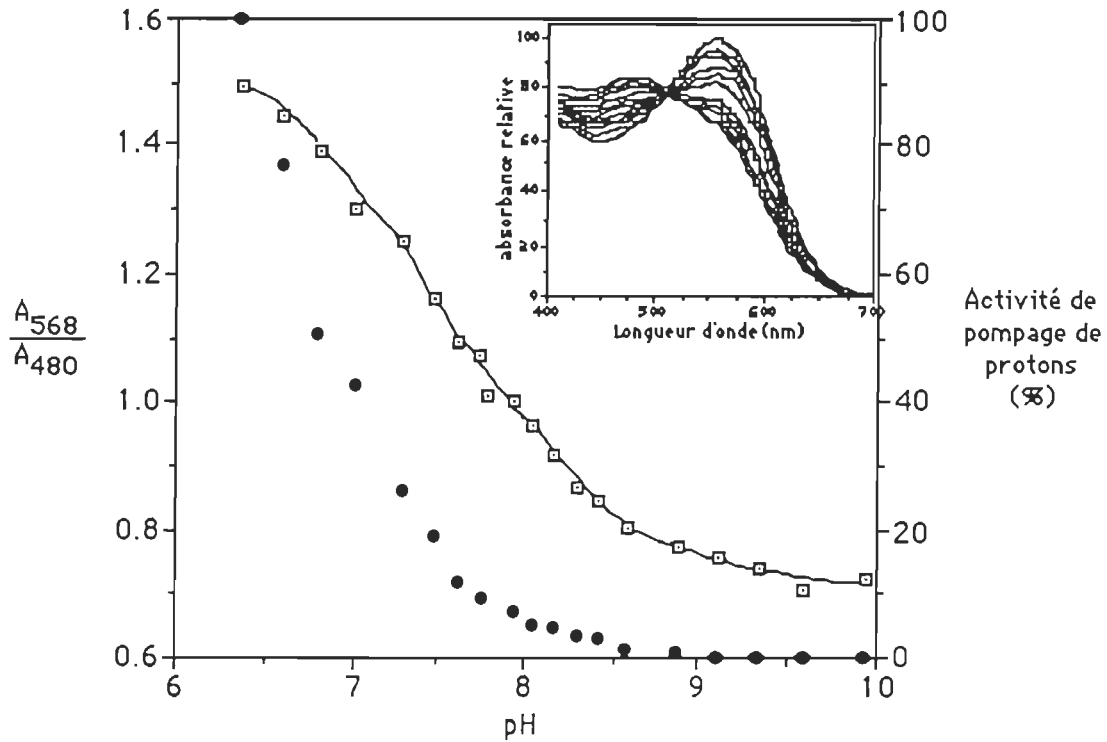


Figure 3.6: Activité de pompage de protons de la bactériorhodopsine lors de la titration. Le graphique à droite présente les spectres d'absorption UV-Visible des échantillons à divers pH durant la titration. La forme bR₅₆₈ prédomine aux pH acides, alors que la forme bR₄₈₀ prédomine aux pH alcalins. Le point isobeste est centré à 512nm. Dans le graphique principale, la courbe en carrés blancs équivaut au rapport des absorbances à 568 et 480nm (A_{568}/A_{480}). Le pK_a apparent est de 7,7. Les cercles noirs symbolisent l'activité de pompage de la bactériorhodopsine aux pH donnés.

de pompage de la bR₅₆₈ native est maximale à pH=6,0; à pH=6,4 l'activité de pompage de la bR₅₆₈ est à 80% de sa valeur maximale; à pH=7,6, elle est à moins de 1% de sa valeur maximale et dépassé pH=7,8 l'activité de la bR₅₆₈ est présente sous forme de traces [51].

La perte d'activité mesurée peut donc avoir plusieurs causes. Premièrement, une diminution de la réactivité de la bR₅₆₈ au fur et à mesure que le pH augmente. Deuxièmement, fonction de l'augmentation du pH, l'induction de la forme bR₄₈₀ qui a une activité de pompage réduite voire nulle. Lors de la titration, le premier phénomène interfère et nous empêche de déterminer si la bR₄₈₀ est partiellement ou totalement incapable de pomper des protons.

D'autre part, il est possible, et ce à l'instar de la bR₅₆₈, que la bR₄₈₀ pompe des protons à pH neutre et perde son activité de pompage à mesure que le pH augmente. Ainsi à pH basique – les conditions utilisées pour induire la bR₄₈₀ –, il serait impossible de vérifier la capacité de pompage de la bR₄₈₀ car elle serait inhibée à pH basique et qu'elle se comporte comme la bR₅₆₈.

Dans ces circonstances, l'établissement de spectres d'action devrait permettre de différencier le pompage de protons dû à la bR₅₆₈ et celui dû à la bR₄₈₀; ce qui, en définitive, devrait permettre d'évaluer l'efficacité de l'activité de pompage de la bR₄₈₀.

La détermination de spectres d'action est une méthode sensible pour identifier l'espèce responsable de l'activité. On a vu plus tôt (voir la section 2.2.3) que l'existence d'une activité de pompage se caractérise par la présence d'un pic d'activité centré à la même longueur d'onde que le pic d'absorption du chromophore. Ainsi, sur un spectre d'action, la bactériorhodopsine sous forme bR₅₆₈, étant capable de pomper des protons, possède un pic d'activité centré à 568nm. De même, si, sous la forme bR₄₈₀, elle est capable de pomper des protons, elle possèdera un pic d'activité centré à 480nm. Dans le cas contraire, aucun pic d'activité ne sera décelé à 480nm.

Les figures 3.7 et 3.8 présentent respectivement des spectres d'action mesurés à pH= 8,00 et 8,40. Les cercles noirs indiquent l'activité de pompage de protons. Cette dernière est exprimée en pourcentage. La ligne pleine montre le spectre d'absorption de l'échantillon. Les rapports d'absorbance A_{568}/A_{480} de ces deux spectres sont respectivement 0,96 et 0,73 pour pH=8,00 et 8,40.

Résultats et discussion

Grâce à ces deux rapports, on peut calculer les proportions de bR₅₆₈ et de bR₄₈₀ retrouvés à chacun des pH. En se basant sur la courbe de titration de la figure 3.5, on obtient des proportions de 67% bR₄₈₀ et 33% bR₅₆₈ à pH=8,00; et 96% bR₄₈₀ et 4% bR₅₆₈ à pH=8,40.

Les spectres d'action présentent, tous les deux, un pic d'activité centré aux alentours de 570nm, ce qui est typique de l'activité de pompage de la bR₅₆₈. Aucun pic d'activité n'est observé à 480nm. Malgré une prédominance marquée de bR₄₈₀ – surtout à pH=8,40 –, seul le pic d'activité à 570nm est enregistré. Sachant que la bR₅₆₈ a une activité négligeable dans cette région de l'échelle du pH, l'absence de pic d'activité centré à 480nm démontre que la bR₄₈₀ est totalement incapable de pomper des protons à ces pH.

Lors de la titration des vésicules, l'hypothèse que la bR₄₈₀ pompe des protons à pH neutre et soit inactive à pH basique nous empêchait de conclure à l'inactivité totale de la bR₄₈₀. Nous avons donc établi un spectre d'action à pH neutre afin de vérifier cette possibilité. La figure 3.9 présente le spectre d'action déterminé à pH=6,90. Le rapport A_{568}/A_{480} est égale à 1,42: ce qui nous donne des proportions de 12% bR₄₈₀ et 88% bR₅₆₈. Le spectre d'action (cercles noirs) a plus de bruit car la sensibilité de l'appareillage était diminué par la quantité plus importante de H⁺ dans la suspension de vésicules. Néanmoins, on peut voir la présence d'un pic aux environs de 570nm dénotant l'activité de la bR₅₆₈. À 480nm, il n'y a pas de pic ou d'épaulement important. La bR₄₈₀ n'a pas d'activité de pompage à pH neutre, ce qui infirme la possibilité qu'elle puisse perdre son efficacité de pompage en étant inhibée à pH basique.

En conclusion, lorsque la bactériorhodopsine passe de la forme bR₅₆₈ à la forme bR₄₈₀, son activité de pompage de protons est inhibée. Les spectres d'action d'échantillons contenant des mélanges de bR₄₈₀ et de bR₅₆₈ à divers pH, démontrent que seule la bactériorhodopsine sous forme bR₅₆₈ est capable de pomper des protons; la bR₄₈₀ en est totalement incapable. L'induction sous la forme bR₄₈₀ inactive totalement la pompe à protons de la bactériorhodopsine. Cette inhibition est complètement réversible.

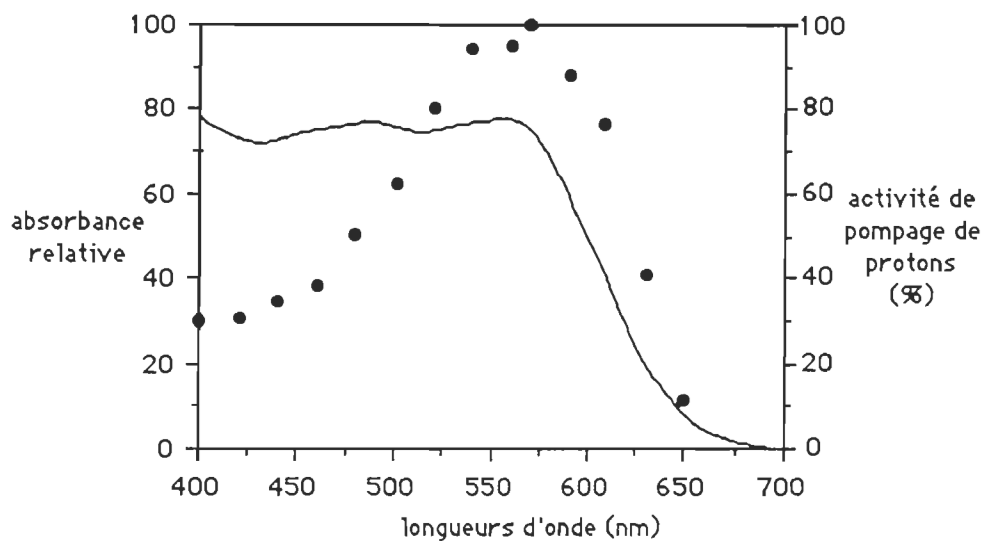


Figure 3.7: Spectre d'action à pH=8,00. Les cercles noirs indiquent l'activité de pompage de protons aux longueur d'onde données. L'activité est exprimée en pourcentage. La ligne pleine présente le spectre d'absorption de l'échantillon à ce pH. Le rapport A_{568}/A_{480} est égal à 0,96.

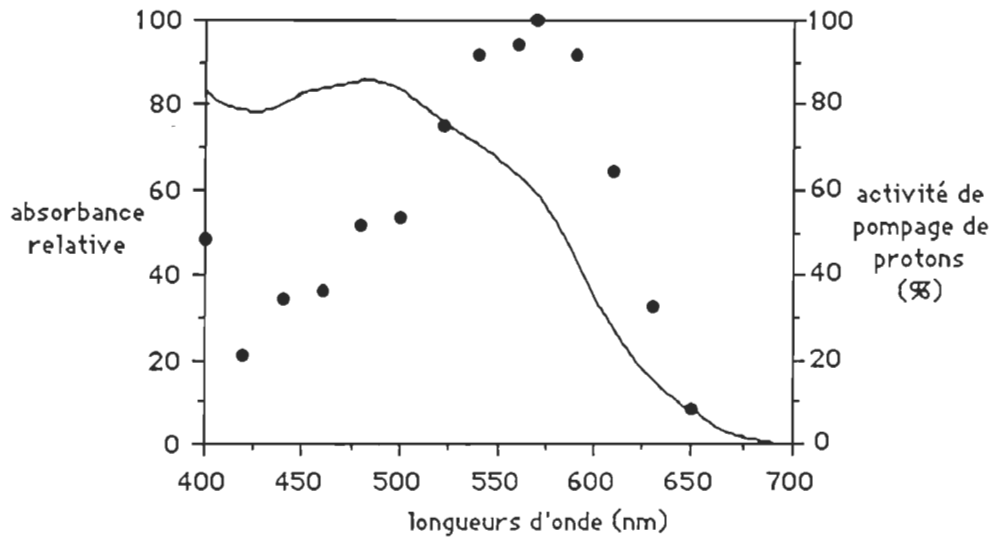


Figure 3.8: Spectre d'action à pH=8,40. Les cercles noirs indiquent l'activité de pompage de protons aux longueur d'onde données. L'activité est exprimée en pourcentage. La ligne pleine représente le spectre d'absorption de l'échantillon à ce pH. Le rapport A_{568}/A_{480} est égal à 0,73.

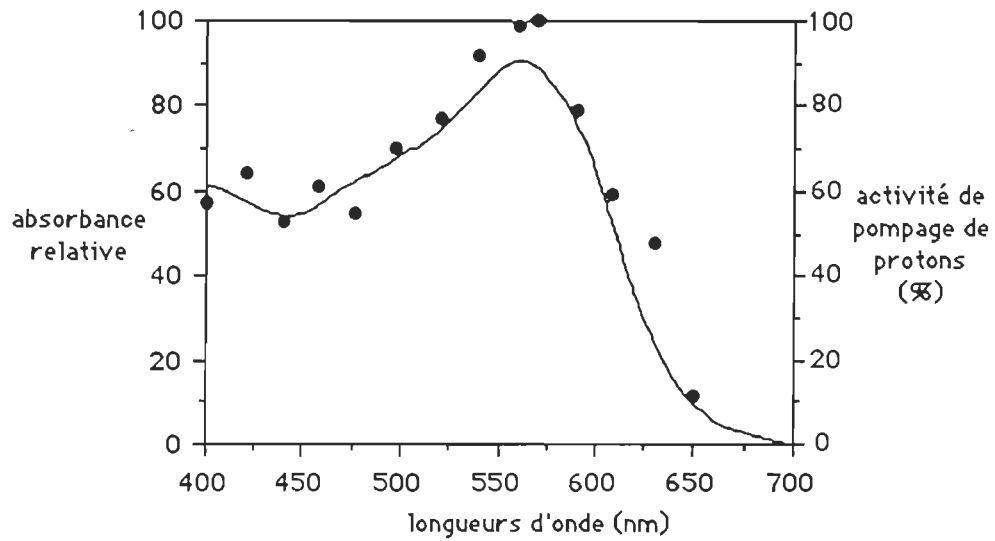


Figure 3.9: Spectre d'action à pH=6,90. Les cercles noirs indiquent l'activité de pompage de protons aux longueur d'onde données. L'activité est exprimée en pourcentage. La ligne pleine représente le spectre d'absorption de l'échantillon à ce pH. Le rapport A_{568}/A_{480} est égal à 1,42.

4. Conclusion

La bactériorhodopsine native, contenue dans la membrane pourpre, sert aux bactéries halophiles de source d'énergie. Elle transforme l'énergie lumineuse en énergie électrochimique sous forme de gradient de protons transmembranaire. Lorsque son rétinal capte un photon, elle initie un cycle photochimique de plusieurs intermédiaires spectralement différents, ce qui l'amène à pomper un proton de l'autre côté de la membrane.

Cette activité physiologique est maintenue, entre autres, par des interactions très fortes et très spécifiques entre les lipides endogènes et la bactériorhodopsine. Lorsque les interactions lipides-bactériorhodopsine sont affaiblies, soit par l'ajout d'anesthésique ou soit en remplaçant les lipides de la membrane pourpre, un équilibre acido-basique s'installe entre la bactériorhodopsine native et la bR₄₈₀. La titration du site de cet équilibre (vers des pH alcalins) induit la formation de la bR₄₈₀ [43,44].

La bactériorhodopsine de la bR₄₈₀ forme un bouquet de sept hélices- α plus relâché que chez la bR₅₆₈. Ce relâchement de l'apoprotéine cause un affaiblissement des interactions apoprotéine-rétinal [43,44]. Toutefois, le cycle photochimique possède les mêmes intermédiaires que la forme native [43,44].

Durant ces travaux, nous avons observé que la bR₄₈₀ est totalement incapable de pomper des protons, et ce, à quelque pH que ce soit. Ces observations ont été faites par trois méthodes différentes.

Premièrement, par photolyse à l'état photostationnaire; nous avons bloqué le cycle photochimique avec des anesthésiques et mesuré les variations de pH du milieu. Lorsque la bactériorhodopsine est sous forme bR₄₈₀, il nous a été impossible de déterminer son activité de pompage de protons. L'apparition de la bR₄₈₀ et l'inhibition concomitante de la pompe se produit seulement en absence de sels; ce qui démontre l'influence de la force ionique du milieu sur le maintien de la forme native.

Conclusion

Deuxièmement, par photolyse éclair, les variations transitoires du pH du milieu ont été mesurées au passage de l'intermédiaire méta. Sous la forme native, la bactériorhodopsine pompe normalement des protons, alors que sous la forme bR_{480} , elle en est incapable. Cette méthode a, de plus, permis de montrer que lorsque les interactions lipides-bactériorhodopsine sont amoindries par l'enflurane, le photocycle de la bR_{480} est légèrement plus rapide que celui de la forme native, tandis que, dans la bactériorhodopsine complètement délipidée et agrégée (bR_{480}), le photocycle est fortement ralenti (65X) – du moins au niveau de l'intermédiaire méta. Ces deux phénomènes montrent que la présence de bR_{480} ne permet pas, à elle seule, d'expliquer l'altération du temps d'apparition et de disparition du méta-intermédiaire. Le type de technique employée pour induire la bR_{480} semble jouer un rôle très important. Ces techniques semblent agir sur des groupements différents de la bactériorhodopsine, ce qui permet d'expliquer les variations de durée du cycle photochimique.

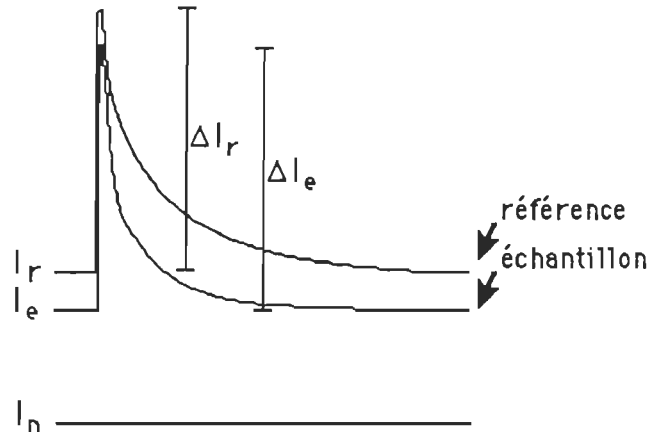
Ces deux premières méthodes manquaient, cependant, de sensibilité causée par de nombreux impondérables expérimentaux. Elles ne nous ont pas permis de déterminer si la perte d'activité de pompage lors de l'induction de la forme bR_{480} est partielle ou totale.

La troisième méthode utilisait des vésicules de phosphatidylcholine d'oeuf incorporant des molécules de bactériorhodopsine orientées. Cette méthode mesurait les variations de pH du milieu environnant (alcalinisation) causées par le pompage de la bactériorhodopsine. Elle a permis de déterminer que la perte d'activité de pompage de protons est totale lorsque la bactériorhodopsine prend la forme bR_{480} . Les mesures lors de la titration ont montré que cette perte d'activité est complètement réversible. Enfin, les spectres d'action ont montré que la bR_{480} est inactive à quelque pH que ce soit.

La bR_{480} est donc une forme spectrale de bactériorhodopsine unique en son genre, car c'est la seule forme connue de bactériorhodopsine où l'on observe, en même temps, une inactivité physiologique totale et une activité photochimique complète. Cette observation montre qu'il existe un couplage moléculaire entre l'activité photochimique et l'activité physiologique dans la bactériorhodopsine. Le fait qu'on puisse le moduler ouvre la voie à l'investigation des interactions moléculaires qui sont à son origine.

ANNEXE 1: CORRECTION DES SOUSTRATIONS ECHANTILLON-RÉFÉRENCE.

Soit le schéma de cinétiques suivant,



Où I_e est la tension (le niveau de base de l'échantillon), produite par l'amplificateur, correspondant à l'intensité de lumière initiale pour l'échantillon; I_r est la tension (le niveau de base de la référence) correspondant à l'intensité de lumière initiale pour la référence; I_n est la tension de base de l'amplificateur, c'est-à-dire à la noirceur; ΔI_e représente la variation de l'intensité de lumière pour l'échantillon; ΔI_r représente la variation de l'intensité de lumière pour la référence.

- Assumons que:
- 1- le pH initial est constant,
 - 2- la concentration de bR est la même pour l'échantillon et pour la référence,
 - 3- la bR est saturée de lumière par le faisceau actinique.

La variation du signal est proportionnelle au niveau de la tension:

$$\begin{aligned}
 \Delta I_r &\propto (I_r - I_n) & \Delta I_e &\propto (I_e - I_n) \\
 \Delta I_r &= R (I_r - I_n) & \Delta I_e &= E (I_e - I_n) \\
 R &= \Delta I_r / (I_r - I_n) & E &= \Delta I_e / (I_e - I_n) \quad \text{éq.1}
 \end{aligned}$$

où R et E sont des constantes de proportionalité.

Pour ramener ΔI_e à la même tension que ΔI_r , c'est-à-dire de $(I_e - I_n)$ à $(I_r - I_n)$

$$\Delta I_e^r = E (I_r - I_n)$$

où ΔI_e^r est la valeur de ΔI_e au niveau de I_r .

En y remplaçant l'équation 1, on obtient:

$$\Delta I_e^r = \frac{\Delta I_e}{(I_e - I_n)} (I_r - I_n) \quad \text{éq.2}$$

La soustraction correcte de la cinétique "échantillon" par la cinétique "référence" est donnée par:

$$\Delta I = \Delta I_e^r - \Delta I_r$$

où ΔI est la différence entre un point de la cinétique "échantillon" et le point correspondant sur la cinétique "référence" et représente la variation de la transmittance due seulement au para-nitrophénol.

ΔI devient

$$\Delta I = \Delta I_e \left(\frac{I_r - I_n}{I_e - I_n} \right) - \Delta I_r \quad \text{éq.3}$$

La soustraction faite par l'oscilloscope est donnée par:

$$\Delta S = \Delta I_e - \Delta I_r$$

où ΔS représente la différence erronée faite par l'oscilloscope

En substituant ΔI_r par l'équation 3, on obtient:

$$\Delta S = \Delta I_e - \left[\Delta I_e \left(\frac{I_r - I_n}{I_e - I_n} \right) \right] - \Delta I$$

$$\Delta I = \Delta S + \left[\Delta I_e \left(\frac{I_r - I_n}{I_e - I_n} \right) \right] - \Delta I_e$$

$$\Delta I = \Delta S + \Delta I_e \left(\frac{I_r - I_n}{I_e - I_n} - 1 \right)$$

Cette dernière équation donne la différence correcte, extraite de celle faite par l'oscilloscope (qui est erronée), à un temps donné, en tenant compte la variation du niveau de base de l'échantillon et de la référence.

ANNEXE 2: TRANSFORMATION DE ΔI EN ΔA

Sachant que $A = 2 - \text{Log}(T\%)$

et que, $T\% = 100 \times (I/I_0)$

donc,

$$A = 2 - \text{Log} \left(\frac{I \times 100}{I_0} \right)$$

$$A = 2 - [\text{Log}(I) + \text{Log}(100) - \text{Log}(I_0)]$$

$$A = \text{Log}(I_0) - \text{Log}(I)$$

On obtient:

$$A = \text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

éq.1

Puisque $(+\Delta A)$ est dû à $(-\Delta I)$, alors;

$$A + \Delta A = \text{Log} \left(\frac{I_0}{I - \Delta I} \right)$$

ce qui donne ensuite:

$$\Delta A = \text{Log} \left(\frac{I_0}{I - \Delta I} \right) - A$$

éq.2

En remplaçant l'éq.1 dans l'éq.2, on a:

$$\Delta A = \text{Log} \left(\frac{I_0}{I - \Delta I} \right) - \text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

$$\Delta A = \text{Log} \left(\frac{I_0}{I - \Delta I} \right) + \text{Log} \left(\frac{I}{I_0} \right)$$

$$\Delta A = \text{Log} \left(\frac{I_0}{I - \Delta I} \frac{I}{I_0} \right)$$

En simplifiant et considérant le cas d'une cinétique obtenue en 2.2.2, on a:

$$\Delta A = \text{Log} \left(\frac{I}{I - \Delta I_{\max}} \right)$$

où ΔA est la variation de l'absorption du para-nitrophénol, ΔI_{\max} représente la variation maximale de la cinétique de la transmittance du para-nitrophénol et I le niveau de base de la référence. Cette équation permet de transformer les ΔI en ΔA , pourvu que les niveau de tension initiaux soient assez comparables pour une même série d'échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gibbons N.E. Family V. *Halobacteriaciae* Fam. nov. In R.E. Buchanan et N.E. Gibbons (Ed.), Bergey's Manual of determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974, 269.
2. Larsen H. Halophilism. In I.C. Gunsalus et R.Y. Stanier (Ed.), The bacteria: a Treatise of structure and fonction. New York: Academic Press, 1962, 297.
3. Larsen H. Biochemical aspects of extreme halophilism. Adv. Microb. Physiol., 1967, 1, 97.
4. Kushner D.J. Halophilic bacteria. Adv. Appl. Microbiol., 1968, 10, 73.
5. Bayley S.T. et Morton R.A. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. CRC Critical reviews in Microbiol., 1978, 151.
6. Brown A.D. et Shorey C.D. The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria. J. Cell Biol., 1963, 18, 681.
7. Kushner D.J., Bayley S.T., Boring J., Kates M. et Gibbons N.E. Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Biochem. P., 1964, 10, 483.
8. Kushner D.J. et Onishi H. Absence of normal cell wall constituents from the outer layers of Halobacterium cutirubrum. Can. J. Biochem., 1968, 46, 997.
9. Stoeckenius W. et Rowen R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. J. Cell Biol., 1967, 34, 365.
10. Cho K.Y., Doy C.H. et Mercer E.H. Ultrastructure of the obligate halophile *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol., 1967, 94, 196.

Bibliographie

11. Stoeckenius W. et Kunau W.H. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. J. Cell Biol., 1968, 38, 337.
12. Oesterhelt D. et Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Nature (London) New Biol., 1971, 233, 149.
13. Oesterhelt D. et Stoeckenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1973, 70, 2853.
14. Kates M., Kushwaha S.C. et Sprott G.D. Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methagenic bacteria. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, 1982, 88, Toronto: Academic Press, 98.
15. Unwin B.A. et Henderson R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. J. Mol. Biol., 1975, 94, 425.
16. Ebrey T.G., Becher B., Mao B. et Kilbride P. Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane. J. Mol. Biol., 1977, 112, 377.
17. Peters R. et Peters J. Light-dark adaptation of bacteriorhodopsin in brown membrane. In S.R. Caplan & M. Ginzburg (Eds.), Energetics and structure of halophilic microorganisms. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978, 315.
18. Stoeckenius W. Bacteriorhodopsin. A light-energy transducing molecule from the cell membrane of Halobacteria (Chapter VII). Proceedings of the Robert A. Welch Conferences on chemical research XXIV. The synthesis, structure and function of biochemical molecules, 1980, 133.
19. Glaeser R.M., Jubb J.S. et Henderson R. Structural comparison of native and deoxycholate-treated purple membrane. Biophys. J., 1985, 48, 775.
20. Jost P.C., Millen D.A. et Morgen W.D. Lipid-protein interactions in the purple membrane. In D.W. Deamer (Ed.), Light Transducing Membranes. New York: Academic Press, 1978, 141.

Bibliographie

21. Khorana H.G., Gerber G.E., Herlihy W.C., Gray C.P., Anderegg R.J., Nihei K. et Biemann K. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 5046.
22. Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Feigina M.Y., Kiselev A.V. et Lobanov N.A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview. FEBS Lett, 1979, 100, 219.
23. Wallace B.A. Comparaison of bacteriorhodopsin and rhodopsin molecular structure. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology. Toronto: Academic Press, 1982, 88, 447.
24. Pettei M.J., Yudd A.P., Nakanishi K., Henselman R. et Stoeckenius W. Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin. Biochemistry, 1977, 16, 1955.
25. Lugtenburg J., Muradin-Szweykowska M., Heeremans C., Pardoën J.A., Hardison G.S., Herzfeld J., Griffin R.G., Smith S.O. et Mathies R.A. Mechanism for the opsin shift of retinal's absorption in bacteriorhodopsin. J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 3104.
26. Callender R.H. An introduction to visual pigments and purple membranes and their primary processes. In R.R. Alfano (Ed.), Biological Events Probed by Ultrafast Laser Spectroscopy. Toronto: Academic Press, 1982, 239.
27. Khorana H.G. Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons. Journal of biological chemistry, 1988, 263, 7439.
28. Oesterhelt D. et Hess B. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophore. Eur. J. Biochem., 1973, 37, 316.
29. Litvin F.F., Balashov S.P. et Sineshchekov V.A. Primary photochemical transformations of bacteriorhodopsin in the purple membrane and cells of *Halobacterium halobium* by low-temperature spectrophotometry. Bioorgan. Chem., 1975, 1, 1967.
30. Stoeckenius W. et Lozier R.H. Light energy conversion in *Halobacterium halobium*. J. Supramol. Struct., 1974, 2, 769.

Bibliographie

31. Iwasa T., Tokugana F. et Yoshizawa T. A new pathway in the photoreaction cycle of transbacteriorhodopsin and the absorption spectra of its intermediates. Biophys. Struct. Mech., 1980, 6, 253.
32. Kouyama T., Nasuda-Kouyama A., Ikegami A., Mathew M.T., Stoeckenius W. Bacteriorhodopsin photoreaction: identification of a long-lived intermediate N (P, R₃₅₀) at high pH and its M-like photoproduct. Biochemistry, 1988, 27, 5855.
33. Drachev L.A., Kaulen A.D., Skulachev V.P., Zorina V.V. Protonation of a novel intermediate P is involved in the M bR step of the bacteriorhodopsin photocycle. FEBS Lett. 1986, 209, 316.
34. Lewis A., Spoohower J., Bogomolni R.A., Lozier R.H. et Stoeckenius W. Tunable laser resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4462.
35. Padros E., Dunack M. et Sabes M. Induction of blue form of bacteriorhodopsin by low concentrations of sodium dodecyl sulfate. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 769, 1.
36. Reynolds J.A. et Stoeckenius W. Molecular weight of bacteriorhodopsin solubilised in Triton-X-100. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 74, 2803.
37. Huang K.S., Bayley H. et Khorana H.G. Delipidation of bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 323.
38. Dencher N.A. et Heyn M.P. Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl-beta-D-glucoside and Triton-X-100. FEBS Lett., 1978, 96, 322.
39. Lam E. et Packer L. Nonionic detergent effects on spectroscopic characteristics and the photocycle of bacteriorhodopsin in purple membranes. Arch. Biochem. Biophys., 1983, 221, 557.
40. Naito T., Kito Y., Kobayashi M., Hiraki K. et Humanaka T. Retinal-protein interactions in bacteriorhodopsin monomers, dispersed in the detergent L-1690. Biochem. Biophys. Acta, 1981, 637, 457.

Bibliographie

41. Dencher N.A. et Heyn M.P. Bacteriorhodopsin monomers pump protons. FEBS Lett, 1979, 108, 307-310.
42. Pabst R., Nawroth T. et Dose K. Rapid detergent exchange in solutions of the membrane protein bacteriorhodopsin by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). Anal. Chem., 1984, 317, 672.
43. Baribeau J. Aspect biochimique et photochimique de la conversion d'énergie par la bactériorhodopsine. Mémoire de maîtrise, U.Q.T.R., 1984.
44. Baribeau J. Les interactions lipides-protéines dans la membrane pourpre: une approche analytique. Thèse de doctorat, U.Q.T.R., 1987
45. Baribeau J. et Boucher F. Isolation, purification, and partial characterization of stable forms of monomeric bacteriorhodopsin in lauryl sucrose. Can. J. Biochem. Cell Biol., 1985, 63, 305.
46. Sperling W., Carl P., Rafferty Ch.N. et Dencher N.A. Photochemistry and dark equilibrium of retinal isomers and bacteriorhodopsin isomers. Biophys. Struct. Mechanism, 1977, 3, 79.
47. Van Dijck P.W.M. et Van Dam K. Bacteriorhodopsin in phospholipid vesicles. In L. Packer (Ed.), Method in Enzymology, Toronto: Academic Press, 1982, 88, 17.
48. Hwang S.B. et Stoeckenius W. Purple membrane vesicles: morphology and proton translocation. J. Membrane Biol., 1977, 33, 325.
49. Drachev L.A., Kaulen A.D. et Skulachev V.P. Correlation of photochemical cycle, H⁺ release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin. FEBS Lett, 1984, 178, 331.
50. Drachev L.A., Kaulen A.D. et Skulachev V.P. Nature of the electrogenic phases of photocycle of bacteriorhodopsin and localization of retinal. Proc. Acad. Sci. USSR, 1985, 281, 176.
51. Oesterhelt D., Hess B. Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Eur. J. Biochem., 1973, 316.