

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
MICHEL DÉRY

ORIGINE ET SIGNIFICATION DES PHOTOCOURANTS MESURÉS DANS LES
JONCTIONS MÉTAL/BACTÉRIORHODOPSINE;
COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PRÉPARATION ET
D'ORIENTATION ET ÉVALUATION DU POTENTIEL TECHNOLOGIQUE EN MATIÈRE
DE DISPOSITIFS PHOTOÉLECTRIQUES.

AVRIL 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

Résumé.

L'*Halobacterium Halobium* est une bactérie particulière qui vit dans des environnements très salés et qui, dans des milieux anaérobiques se sert de la lumière comme source d'énergie en créant un potentiel transmembranaire en pompant des protons de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane bactérienne. La molécule responsable de cette transformation de l'énergie lumineuse en gradient électrochimique de proton est la bactériorhodopsine. La bactériorhodopsine est une molécule transmembranaire arrangée sous forme de trimère à l'intérieur de la membrane pourpre qui lui sert de support.

Pour arriver à la transduction énergétique du rayonnement lumineux en gradient de proton, la bactériorhodopsine effectue un cycle photochimique caractérisé par une séquence discrète de plusieurs transitions auxquelles sont associées des déplacements de charges internes à la molécule. Le photocycle et le pompage de protons de la bactériorhodopsine sont influencés par le pH ou la présence d'anesthésique. Ainsi à pH 3.0 et pH 2.0 la bactériorhodopsine voit son maximum d'absorption passer de 570 nm à 605 nm et une absence de pompage de protons dans le cas de pH 2.0. En présence d'Enflurane (anesthésique) la bactériorhodopsine a un maximum d'absorption à 480 nm avec un blocage de son intermédiaire M réduisant son activité de pompage.

La membrane pourpre contenant la bactériorhodopsine possède une asymétrie de charges de chaque côté de son plan membranaire ce qui lui confère un dipôle électrique permanent. Cette asymétrie de charge est modulable en fonction du pH, permettant ainsi l'inversion du dipôle permanent de la membrane entre pH 7.0 et pH 3.0. C'est l'existence de ce dipôle électrique permanent qui permet l'orientation des membranes pourpres lors de leur déposition par procédé d'adsorption ionique ou leur électrodéposition.

Récemment, des photocourants de bactériorhodopsine mesurés à partir de dépositions pas séchage sans procédé d'orientation ont été observés. L'interprétation de ces courants fut faite sur la base qu'il n'avait pas d'orientation préférentielle des membranes pourpres.

Dans notre travail, nous démontrons en comparaison avec les techniques connues d'orientation, qu'il y a orientation spontanée des membranes pourpres par simple séchage. De plus cette orientation peut être inversée par inversion du dipôle électrique permanent de la membrane pourpre avec des conditions de séchage à pH 7.0 ou pH 3.0.

Nous montrons aussi que les dépositions par séchage, et séchage avec procédé d'orientation par adsorption ionique, ont une explication de l'origine des photocourants différente des dépositions par électrodéposition. Cette dernière différence dans l'origine des photocourants nous permet de démontrer que de tous nos procédés d'orientation, il n'y a que l'électrodéposition qui nous donne une mesure directe des courants de déplacement dus au pompage de protons à l'intérieur de la bactériorhodopsine. Par le fait même, l'électrodéposition nous permet d'identifier les différentes phases de courants associées aux différences de photocycle pour la bactériorhodopsine dans des conditions de pH 2.0, pH 3.0, pH 7.0 et sous Enflurane.

Remerciements

Merci à mon directeur de thèse François Boucher, pour sa grande disponibilité et son support financier, mais surtout pour ses grandes qualités scientifiques qui ont été si précieuses tout au long de ces années. Maintenant ma formation académique terminée, j'espère François que nous aurons à collaborer ensemble de nouveau.

Bien sûr un travail de recherche ne se fait pas seul. Il y a tous ces gens autour de moi qui ont fait parti du même centre de recherche et avec lesquels j'ai échangé sur différents sujets dont, bien entendu, la science. Il y a tous ces gens extérieurs à ce monde de recherche mais tout aussi importants pour leur soutien et l'équilibre qu'ils m'ont permis de garder. À toutes ces personnes, dont plusieurs sont de grands amis, je vous remercie de votre appui et j'espère vous avoir apporté autant.

Parmi les nombreuses personnes auxquelles je fais référence, il y en a une que je me dois de faire ressortir. Ceux qui me connaissent savent de qui il s'agit, Normand Beaudoin, mon complice. Il me serait difficile de résumer tout ce que Normand m'a apporté au long de ces années en terme d'encouragement et encore plus d'évaluer la part qui lui revient de ce travail sur le plan de la stimulation intellectuelle. Merci pour cette grande et belle amitié.

Merci à ma famille pour son support de toutes sortes et principalement à ma conjointe Chantal. J'aimerais te remettre au centuple ce que tu as fait, tu peux entreprendre tout ce que tu veux, je serai toujours là pour t'appuyer et je suis sûr de convaincre Marc-Antoine de faire de même.

Table des matières

1	Introduction.	2
1.1	Le soleil: source de toute vie sur terre.	2
1.2	Un peu de généalogie.	2
1.3	Halobacterium halobium.	3
1.4	La membrane pourpre.	5
1.5	La bactériorhodopsine.	7
1.5.1	Structure de la bactériorhodopsine.	7
1.5.2	Activité photochimique de la bactériorhodopsine.	13
1.6	De la bactériorhodopsine 570 à sa forme 480.	19
1.7	Structure et photochimie de la bR480.	21
1.8	Objectif de la recherche.	23
2	Matériel et méthodes.	29
2.1	Produits utilisés:	29
2.2	Culture et récolte des halobactéries et obtention de la membrane pourpre.	29
2.2.1	Milieu de culture.	30
2.2.2	Pré-inoculation.	30
2.2.3	Inoculation.	31
2.2.4	Induction de la membrane pourpre.	31
2.2.5	Récolte des bactéries.	32
2.2.6	Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires.	32
2.2.7	Purification de la membrane pourpre.	33
2.3	Cellule électrolytique.	33
2.4	Déposition de la membrane pourpre sur électrode.	35
2.4.1	Déposition par séchage.	35
2.4.2	Electrodéposition.	36
2.5	Procédés d'orientation des membranes pourpres	37

2.6	Photocourant en régime continu.	38
2.7	Spectre d'action.	42
2.7.1	Procédure de normalisation pour l'intensité incidente de la lampe à arc.	42
2.8	Photocourant transitoire.	44
2.8.1	Réponse du système (amplificateur-cellule).	50
2.9	Dichroïsme électrique.	52
2.10	Photolyse éclair	56
3	Précisions sur les photocourants de la bactériorhodopsine.	62
3.1	Définition des photocourants en régime continu et transitoire.	62
3.2	Revue des photocourants de bactériorhodopsine obtenus par divers procédés de déposition.	63
3.2.1	État de la question.	63
3.2.1.1	Travaux de l'équipe de Miyasaka et Koyama.	64
3.2.1.2	Travaux de Robertson et Lukashev.	68
3.2.2	Travaux récents de notre laboratoire.	71
3.3	Possibilité d'interprétation:	73
3.4	Démarche expérimentale.	73
4	Résultats et discussion.	76
4.1	Dichroïsme électrique de la membrane pourpre en fonction du pH.	76
4.2	Spectres d'action	80
4.3	Résultats des photocourants en régime continu.	89
4.3.1	Modulation de la réponse photoélectrique de la bactériorhodopsine en fonction du pH de séchage à la déposition.	89
4.3.2	Possible orientation spontanée de la membrane pourpre.	91
4.3.3	Photocourants avec électrolyte à pH 7.0; Comparaison des différentes orientation.	92
4.3.4	Photocourants avec électrolyte à pH 7.0 et présence d'Enflurane.	95

4.3.5 Photocourants avec électrolyte à pH 3.0.	98
4.3.6 Vue d'ensemble des résultats et discussion.	100
4.4 Photocourant transitoire.	103
4.4.1 Photocourants transitoires rapides avec électrolyte à pH 7.0 (cinétiques rapides, B1).	106
4.4.2 Photocourants transitoires rapides avec différents électrolytes (cinétiques rapides, B1)	108
4.4.3 Photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 7.0 (cinétiques lentes, B2, B3).	115
4.4.4 Photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 3.0 (cinétiques lentes, B2, B3)	124
4.4.5 Photocourants transitoires avec électrolyte à pH 2.0.	129
4.4.6 Photocourants transitoires avec membrane pourpre électrodéposée: électrolyte à pH7 et à pH3.	133
4.4.7 Comparaison entre les photocourants avec et sans Enflurane pour les dépôts par séchage; solution électrolytique à pH7.	145
4.4.8 Comparaison entre les photocourants avec Enflurane (bR480) et sans Enflurane (bR570) pour les films préparés par électrodéposition: solution électrolytique à pH7.	150
5 Conclusion générale.	159
5.1 Dichroïsme et photocourant en régime continu.	159
5.2 Photocourant transitoire.	159
5.2.1 Photocourant transitoire partie rapide.	159
5.2.2 Photocourant transitoire partie lente.	160
5.2.2.1 Dépôt pas séchage.	160
5.2.2.2 Électrodéposition.	161
5.3 Avenues de recherche et potentiel technologique.	162
5.3.1 Avenues de recherche.	162

5.3.2 Potentiel technologique.	162
--	-----

Liste des tableaux

Tableau 4.1	Constantes de temps pour les photocourants rapides avec différents électrolytes.	114
Tableau 4.2	Constantes de temps pour photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 7.0.	120
Tableau 4.3	Constantes de temps associées à l'apparition et à la disparition de l'intermédiaire M412.	120
Tableau 4.4	Constantes de temps pour photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 3.0.	127
Tableau 4.5	Constantes de temps pour photocourants transitoires avec électrolyte à pH 2.0.	132
Tableau 4.6	Constantes de temps pour photocourants avec membranes pourpres électrodéposées avec électrolyte à pH 7.0 et pH 3.0.	142
Tableau 4.7	Constantes de temps pour photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 7.0 avec ou sans Enflurane.	148
Tableau 4.8	Constantes de temps pour photocourants avec membranes pourpres électrodéposées et électrolyte à pH 7.0 avec et sans Enflurane.	154
Tableau 4.9	Constantes de temps associées à l'apparition et à la disparition de l'intermédiaire M412.	154
Tableau 4.10	Constantes de temps pour photocourants avec membranes pourpres électrodéposées et électrolyte à pH 7.0 avant et après avoir enlevé l'Enflurane.	157

Liste des figures

Figure 1.1	Petit arbre généalogique.	3
Figure 1.2	Schéma d'une cellule d' <i>Halobacterium halobium</i>	4
Figure 1.3	Diagramme de densité électronique montrant la structure cristalline hexagonale de la membrane pourpre d' <i>Halobacterium halobium</i> ainsi que les trimères de bactériorhodopsine avec une résolution de 0.7 nm. Les limites de la maille unitaire (de dimensions 6.2 nm x 6.2 nm) sont indiquées par des lignes pleines et les axes de symétrie par de petits triangles. La figure fait clairement apparaître un trimère de bactériorhodopsine par maille élémentaire du réseau. (Unwin et Henderson, 1975).	6
Figure 1.4	Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine.	8
Figure 1.5	Schéma des structures primaire et secondaire de la bactériorhodopsine native enchassée dans la membrane pourpre. On compte 248 acides aminés dont nous remarquons plus particulièrement la lysine-216 qui sert de point d'ancrage au rétinol. (Ovchinnikov et al., 1979)	9
Figure 1.6	Structure tridimensionnelle de la bactériorhodopsine où l'on voit l'arrangement spatial des sept segments hélicoïdaux de la molécule. L'espace libre transmembranaire, ou cavité centrale, est occupé par le chromophore (rétinal). (Structure déposée par R. Henderson à Protein Data Bank, Brookhaven, 1997. La structure est comparable à celle publiée par: Edholm et al., 1995)	10
Figure 1.7	Schéma de la liaison entre le rétinol et la lysine-216 de la bactériorhodopsine. Le groupement aldéhyde du rétinol et l'amine de la lysine 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.	11
Figure 1.8	Modèle des interactions bactériorhodopsine-rétinal. Ce modèle de charge ponctuelle externe a été proposé par Nakanishi en 1980 pour les interactions rétinol-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. Ce modèle a été révisé par Lugtenburg et al en 1986. Ils proposent l'ajout d'un dipôle près du carbone-7.	12

Figure 1.9	Photocycle de la bactériorhodopsine.	15
Figure 1.10	Canal à proton de la bactériorhodopsine selon Le Coultre et Gerwert, 1996. .	18
Figure 1.11	Spectre d'absorption UV-visible des formes natives (bR570) et modifiées (bR480) de la bactériorhodopsine.	20
Figure 1.12	Activité de pompage de protons, après une excitation laser, par mesure de la variation transitoire d'absorbance du paranitrophénol.	22
Figure 2.1	Schéma de la cellule électrolytique.	34
Figure 2.2	Schéma de montage pour photocourant en régime continu.	39
Figure 2.3	Amplificateur d'ajustement de niveau.	40
Figure 2.4	Déclencheur et synchroniseur de l'obturateur.	41
Figure 2.5	Intensité de la lampe à arc en fonction de la longueur d'onde.	43
Figure 2.6	Schéma de montage pour photocourant transitoire.	45
Figure 2.7	Synchroniseur optique.	46
Figure 2.8	Dispositif de tir répétitif du laser.	47
Figure 2.9	Schéma interne des cages de Faraday (blindage électromagnétique).	49
Figure 2.10	Schéma de montage pour réponse des amplificateurs.	51
Figure 2.11	Réponse du système amplificateur-cellule.	52
Figure 2.12	Schéma pour dichroïsme électrique.	53
Figure 2.13	Cellule de dichroïsme.	54
Figure 2.14	Amplificateur d'ajustement de niveau.	55
Figure 2.15	Principe de la photolyse éclair.	57
Figure 2.16	Schéma de montage de la photolyse éclair.	58

Figure 2.17	Amplificateur courant-voltage de la photolyse éclair.	59
Figure 2.18	Schéma de blindage de la photolyse éclair.	60
Figure 3.1	Signal type des photocourants en régime continu, obtenu par Miyasaka et al., 1991.	64
Figure 3.2	Spectre d'action obtenu par Miyasaka et al., 1991.	65
Figure 3.3	Photocourant avec et sans orientation, Koyama et al., 1994.	67
Figure 3.4	Signal type des photocourants en régime continu, obtenu par Robertson et Lukashev.....	69
Figure 3.5	Signal type des photocourants en régime continu à pH3, Robertson et Lukashev, 1995.	70
Figure 3.6	Photocourants en régime continu.	72
Figure 4.1	Différence d'intensité lumineuse transmise entre la lumière polarisée horizontalement et verticalement pour différents pH.	77
Figure 4.2	Pente d'orientation en fonction du pH.	79
Figure 4.3	Photocourant en fonction du temps.	81
Figure 4.4	Photocourant en fonction du temps.	82
Figure 4.5	Spectre d'action pH 7.0.	83
Figure 4.6	Spectre d'action pH 3.0.	84
Figure 4.7	Spectre d'absorption pour la membrane pourpre dans sa forme native et bleu.	85
Figure 4.8	Spectre d'action en présence d'Enflurane.	87
Figure 4.9	Photocourants en régime continu des excitations à 570 nm et 470 nm.	87
Figure 4.10	Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine pour différentes concentrations d'Enflurane.	88
Figure 4.11	Photocourants en fonction du pH de séchage de membrane pourpre.	90

Figure 4.12	Photocourants à pH7 pour diverses méthodes de déposition.	94
Figure 4.13	Photocourants à pH7 avec Enflurane pour diverses méthodes de déposition.	96
Figure 4.14	Photocourant membrane pourpre électrodéposée.	97
Figure 4.15	Photocourants à pH3 pour diverses méthodes de déposition.	99
Figure 4.16	Courbe de courant maximum en fonction du diamètre d'obturateur.	103
Figure 4.17	Représentation schématique des composantes B1, B2 et B3	105
Figure 4.18	Photocourants rapides pour nos cinq types de déposition de membrane pourpre.	106
Figure 4.19	Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine nu.	109
Figure 4.20	Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 7.0 avec platine traité à la poly-L-lysine.	109
Figure 4.21	Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre électrodéposée sur platine.	110
Figure 4.22	Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 3.0 sur platine nu.	110
Figure 4.23	Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 3.0 avec platine traité à la poly-L-lysine.	111
Figure 4.24 (première échelle de temps).	Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.	116
Figure 4.25 (deuxième échelle de temps).	Cinétiques lentes. Déposition par séchage des membranes pourpres.	116
Figure 4.26	Exemple d'intégration. Membrane pourpre séchée à pH 7.0.	118
Figure 4.27	Identification des phases lentes avec électrolyte à pH 7.0.	119
Figure 4.28	Modèle de déplacement de charges pour photocourant avec variation de pH. ...	121
Figure 4.29 (première échelle de temps).	Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.	125

Figure 4.30 (deuxième échelle de temps). Photocourants lents. Dépôt par séchage des membranes pourpres.	125
Figure 4.31 Identification des phases lentes avec électrolyte à pH 3.0.	126
Figure 4.32 (première échelle de temps) Photocourant avec électrolyte à pH 2.0.	129
Figure 4.33 (deuxième échelle de temps) Photocourant avec électrolyte à pH 2.0.	130
Figure 4.34 (troisième échelle de temps) Photocourant avec électrolyte à pH 2.0.	130
Figure 4.35 (première échelle de temps) Photocourants lents. Électrodépôt des membranes pourpres.	134
Figure 4.36 (deuxième échelle de temps) Photocourants lents. Électrodépôt des membranes pourpres.	134
Figure 4.37 (troisième échelle de temps) Photocourants lents. Électrodépôt des membranes pourpres.	135
Figure 4.38 (quatrième échelle de temps) Photocourants lents. Électrodépôt des membranes pourpres.	135
Figure 4.39 Photocourant. Membrane pourpre électrodéposée, électrolyte à pH7.	138
Figure 4.40 Photocourant. Membrane pourpre électrodéposée, électrolyte à pH3.	140
Figure 4.41 Schéma des déplacements de protons pour la membrane pourpre électrodéposée avec électrolyte à pH 7.0	143
Figure 4.42 Schéma des déplacements de protons pour la membrane pourpre électrodéposée avec électrolyte à pH 3.0	144
Figure 4.43 Photocourants lents. Dépôt par séchage des membranes pourpres.	146
Figure 4.44 Photocourants lents. Dépôt par séchage des membranes pourpres.	146
Figure 4.45 Photocourants lents. Dépôt par séchage des membranes pourpres.	147
Figure 4.46 Photocourants lents. Dépôt par séchage des membranes pourpres.	147
Figure 4.47 (première échelle de temps) Photocourants lents. Membranes pourpres électrodéposées.	150
Figure 4.48 (deuxième échelle de temps) Photocourants lents. Membranes pourpres électrodéposées.	151
Figure 4.49 Bactériorhodopsine électrodéposée, électrolyte à pH 7.0 avec ou sans Enflurane.	153

Figure 4.50 (première échelle de temps)	
Photocourants lents avant et après Enflurane. Membranes pourpres électrodéposées.	156
Figure 4.51 (deuxième échelle de temps)	
Photocourants lents avant et après Enflurane. Membranes pourpres électrodéposées.	156



Chapitre 1

Introduction

1 Introduction.

1.1 Le soleil: source de toute vie sur terre.

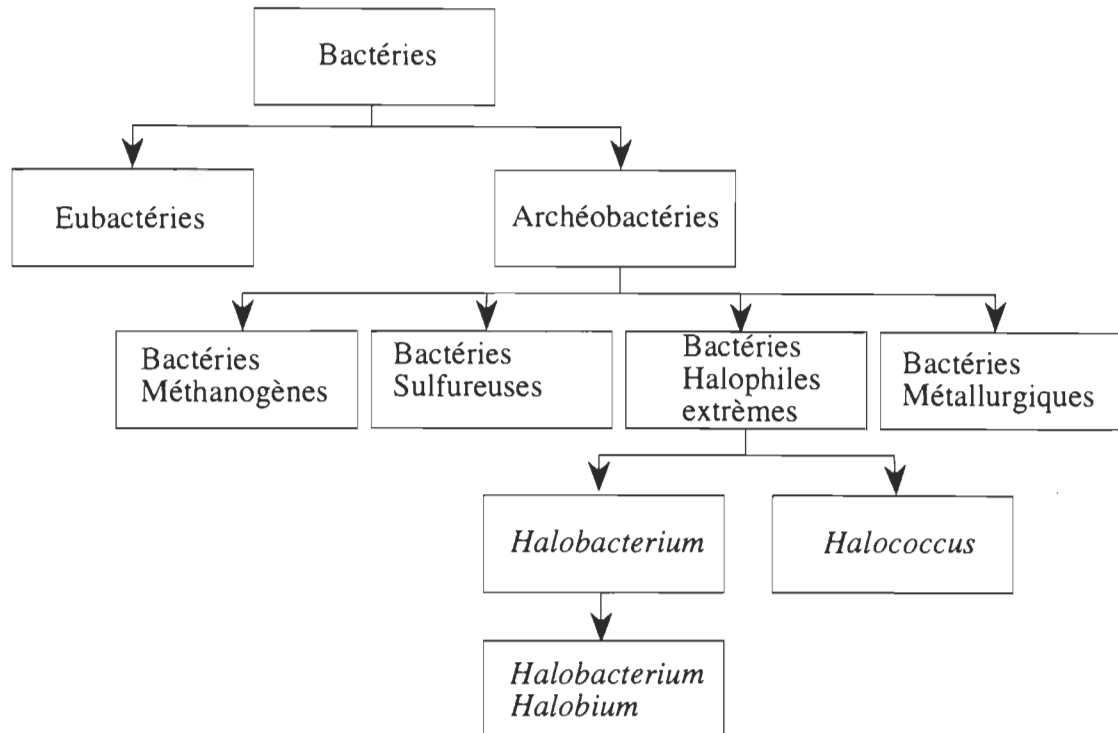
Mis à part l'énergie nucléaire, toute forme d'énergie sur terre nous vient du soleil, soit directement soit indirectement. Par conséquent, la vie jusqu'à ce jour est totalement dépendante de l'énergie solaire. C'est le règne végétal, premier maillon de la chaîne alimentaire qui est entièrement responsable de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique utilisable par les autres formes de vie.

Ainsi, le règne animal se voit entièrement dépendant du règne végétal. Mais une exception vient briser la règle. Cette exception se retrouve dans le monde microscopique des bactéries, monde de grandes diversités aux richesses inestimables et encore mal connues. Ces bactéries sont les *Halobacteriaciæ* ou bactéries halophiles extrêmes.

1.2 Un peu de généalogie.

On distingue deux groupes de bactéries: les eubactéries et les archéobactéries. Ces dernières se distinguent par leurs habitats souvent inhospitaliers et hostiles. À leur tour les archéobactéries se divisent en quatre familles: les bactéries méthanogènes, les bactéries sulfureuses, les bactéries métallurgiques et finalement les bactéries halophile extrêmes. Les bactéries halophiles ont développé un mécanisme basé sur la vitamine A pour capter l'énergie lumineuse et ainsi subvenir à leurs besoins énergétiques en milieu anaérobique. Ces bactéries vivent dans des milieux très salés. Dans la nature nous les retrouvons dans la mer Morte ou dans des endroits où l'évaporation de l'eau amène une forte concentration saline. Leur croissance maximum est atteinte à des concentrations de sel de 20 à 30% (Larsen, 1962, 1967; Kushner, 1968). La famille des *Halobacteriaciæ* se divise à son tour en deux genres: les *Halobacterium* et les *Halococcus* (Gibbons, 1974). Dans notre travail nous étudierons une espèce des *Halobacterium*: *Halobacterium halobium*.

Figure 1.1
Petit arbre généalogique.



1.3 *Halobacterium halobium*.

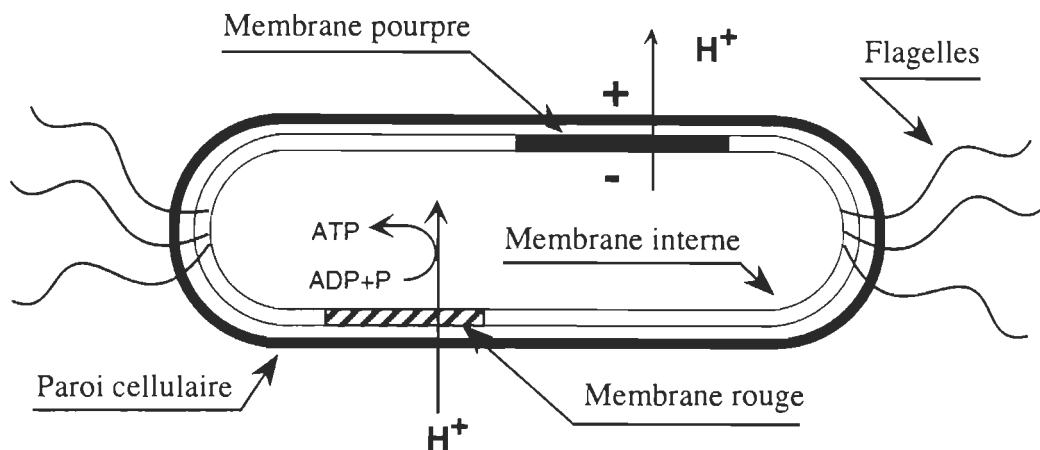
Halobacterium halobium est l'espèce la plus étudiée de toutes les halobactéries. C'est une cellule en forme de bacille (bâtonnet) d'environ 5 µm de longueur par 1 µm de diamètre. Cette cellule possède aussi des flagelles kophotriches comme nous pouvons le voir sur la figure 1.2 (Stoeckenius, 1967). La croissance maximale de cette bactérie est obtenue dans des milieux contenant 25% de NaCl et elle est non viable sous les 17% de NaCl.

L'enveloppe cellulaire de la bactérie est composée d'une paroi cellulaire externe et d'une membrane interne du côté cytoplasmique formée d'unités typiques aux halobactéries. L'enveloppe ne contient pas de peptidoglycane rigide, ce qui rend les parois de la cellule peu résistantes à faible force ionique et qui permet de la briser facilement pour

en récupérer ses composantes (Brown, 1963; Kushner, 1964, 1968).

Figure 1.2

Schéma d'une cellule d'*Halobacterium halobium*.



La membrane plasmique est composée principalement de deux types de membrane: la membrane rouge et la membrane pourpre. La membrane rouge est le siège de la plupart des processus physiologiques membranaires. C'est à ce niveau que l'on retrouve les enzymes de la chaîne respiratoire et l'ATPase. La membrane pourpre, pour sa part, contient presque exclusivement un seul type de protéine appelée la bactériorhodopsine. Signalons que la bactériorhodopsine est absente de la membrane rouge (Stoeckenius, 1967, 1968).

Dans des conditions d'aérobic, la membrane rouge prédomine et est le siège de la phosphorylation oxydative, source d'énergie de la cellule et de la synthèse de l'ATP. Par contre, dans des conditions de lumière intense et de basse concentration en oxygène, l'apport énergétique fournit par la dégradation des sucres est insuffisant. Dans cette situation, afin de pallier à leur manque d'énergie, les bactéries développent à partir de la membrane rouge, la membrane pourpre. Les pièces de membrane pourpre ainsi développées ont un diamètre moyen de 0.5 μm et occupent plus de 50 % de la surface

membranaire plasmique. La bactériorhodopsine contenue dans la membrane pourpre convertit directement l'énergie lumineuse en gradient de potentiel électrique et cela en pompant des protons à travers la membrane cellulaire de la bactérie. Le potentiel électrochimique ainsi produit peut ensuite être utilisé comme source palliative d'énergie à la synthèse de l'ATP et autres processus métaboliques indispensables (Oesterhelt, 1971, 1973, 1975).

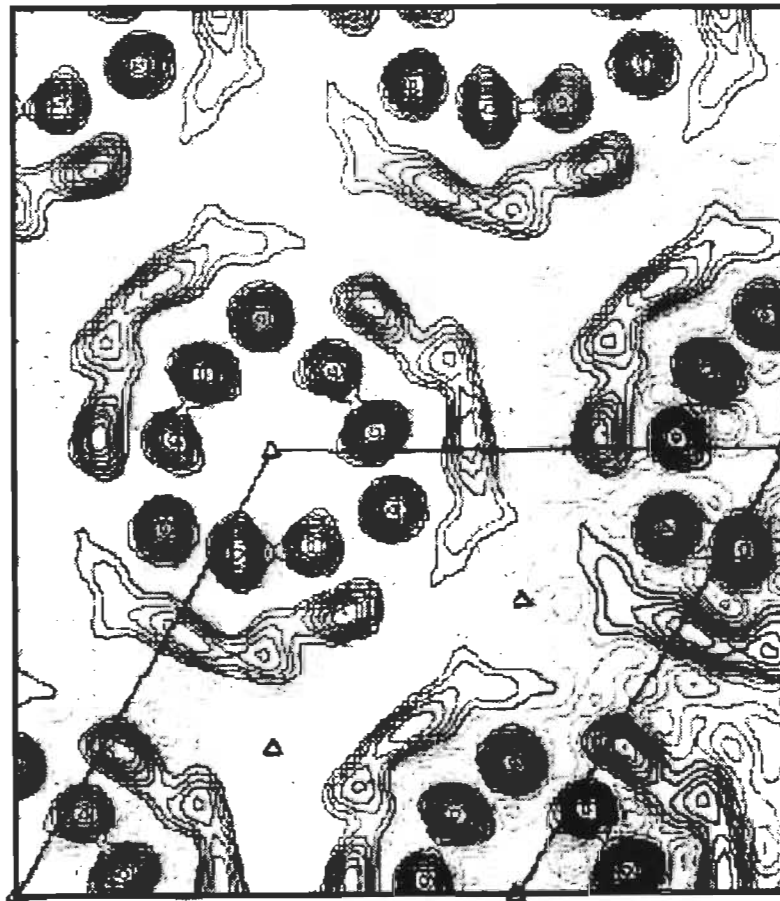
1.4 La membrane pourpre.

Comme nous venons de le mentionner ci-haut, la membrane pourpre est le siège d'une activité photochimique intense dans des conditions d'anaérobie. La membrane pourpre est d'une épaisseur de 4.8 nm et a une structure en réseau cristallin. Des trimères de bactériorhodopsine sont disposés hexagonalement dans le plan de la membrane (voir figure 1.3) (Unwin et Henderson, 1975; Henderson, 1975; Henderson et Unwin, 1975). 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 (Ebrey et al., 1977). Cette régularité structurale de la membrane pourpre lui permet d'avoir un maximum de molécules de bactériorhodopsine par unité de surface. On compte plus de 100000 molécules de bactériorhodopsine par fragment de membrane pourpre de dimension moyenne. Par conséquent, la membrane pourpre est composée d'environ 80% de bactériorhodopsine et le reste des 20% est occupé par des lipides (Kates et al., 1982).

À leur tour, les lipides de la membrane pourpre sont composés à 90% de lipides polaires chargés négativement, le reste étant neutre. Ces lipides sont disposés de façon asymétrique de part et d'autre de la bicouche lipidique, ce qui confère à la membrane pourpre un moment dipolaire électrique important de l'ordre de 10^6 Debye dans des conditions physiologiques normales (Blaurock et King, 1977; Keszthely L., 1980; Kimura et al., 1984).

Figure 1.3

Diagramme de densité électronique montrant la structure cristalline hexagonale de la membrane poupre d'*Halobacterium halobium* ainsi que les trimères de bactériorhodopsine avec une résolution de 0.7 nm. Les limites de la maille unitaire (de dimensions 6.2 nm x 6.2 nm) sont indiquées par des lignes pleines et les axes de symétrie par de petits triangles. La figure fait clairement apparaître un trimère de bactériorhodopsine par maille élémentaire du réseau. (Unwin et Henderson, 1975).



1.5 La bactériorhodopsine.

1.5.1 Structure de la bactériorhodopsine.

La bactériorhodopsine est une protéine composée d'une chaîne polypeptidique de 26 kilodaltons à laquelle est lié un groupement prosthétique c'est-à-dire le rétinol. Le rétinol est un aldéhyde dérivé de la vitamine A, composé d'un noyau aromatique et d'un système conjugué de plusieurs doubles liaisons (voir figure 1.7). La chaîne polypeptidique, appelée bactériopsine, est composée de 248 acides aminés dont la structure tridimensionnelle est formée par la juxtaposition de sept hélices alpha. Cette chaîne ne comporte pas d'histidine ni de cystéine et 70% de ses acides aminés sont hydrophobes. Les hélices alpha ont entre 3.5 et 4.0 nm de long et traversent la membrane perpendiculairement à cette dernière. 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 figure 1.5 et 1.6) (Ovchinnikov et al., 1979; Khorana et al., 1979; Wallace, 1982; Henderson, Protein Data Bank, Brookhaven, 1997; Edholm et al., 1995).

Au coeur de la bactériopsine se trouve une cavité délimitée par les sept hélices alpha où réside le rétinol. Dans sa forme native, la bactériopsine lie le tout-trans-rétinol au niveau de la lysine-216 de la chaîne polypeptidique. Ainsi, la terminaison aldéhyde du rétinol est attachée à l'amine de la lysine-216 pour former une base de Schiff: $C=NH^+$. (voir figure 1.7) Le lien de base de Schiff, combiné à d'autres interactions de nature non covalente au niveau de la cavité du rétinol (contres ions), est entièrement responsable de la coloration spécifique de la membrane pourpre. En fait, le tout-trans-rétinol absorbe aux environs de 380 nm. Mais 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 bactériopsine. Il en résulte un changement dans le spectre d'absorption UV-Visible de la bactériorhodopsine présentant un maximum d'absorption à 570 nm (figure 1.4). Un modèle de charge a été proposé pour expliquer le maximum d'absorption du tout-trans rétinol à l'intérieur de la bactériorhodopsine (Pettei et al., 1977; Lugtenburg et al., 1986). Dans ce modèle, la base de Schiff entre le rétinol et la lysine-216

est protonée. La charge positive de l'azote de la base de Schiff protonée est stabilisée par un contre-ion négatif situé à environ 0.3 nm de l'atome d'azote, probablement fourni par l'aspartate 212. Une autre charge négative est située à environ 0.35 nm de l'anneau bêta ionone du rétinol. Un contre-ion positif serait également présent près du carbone 7 du rétinol (voir figure 1.8).

En résumé, la bactériorhodopsine est une protéine formée de sept hélices alpha disposées en cercle et forment une cavité intérieure dans laquelle se loge le rétinol. Le rétinol est lié à la bactériopsine par une base de Schiff protonée à la lysine-216 et les interactions qu'établit l'apoprotéine entre ses charges et le rétinol module le spectre d'absorption de la bactériorhodopsine.

Figure 1.4

Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine.

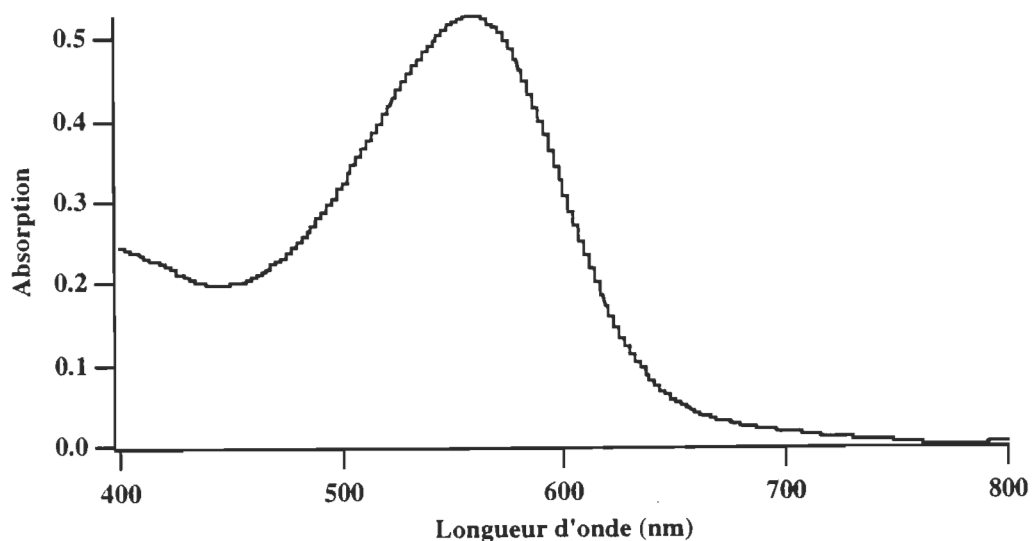


Figure 1.5

Schéma des structures primaire et secondaire de la bactériorhodopsine native enchassée dans la membrane pourpre. On compte 248 acides aminés dont nous remarquons plus particulièrement la lysine-216 qui sert de point d’ancrage au rétinale. (Ovchinnikov et al., 1979)

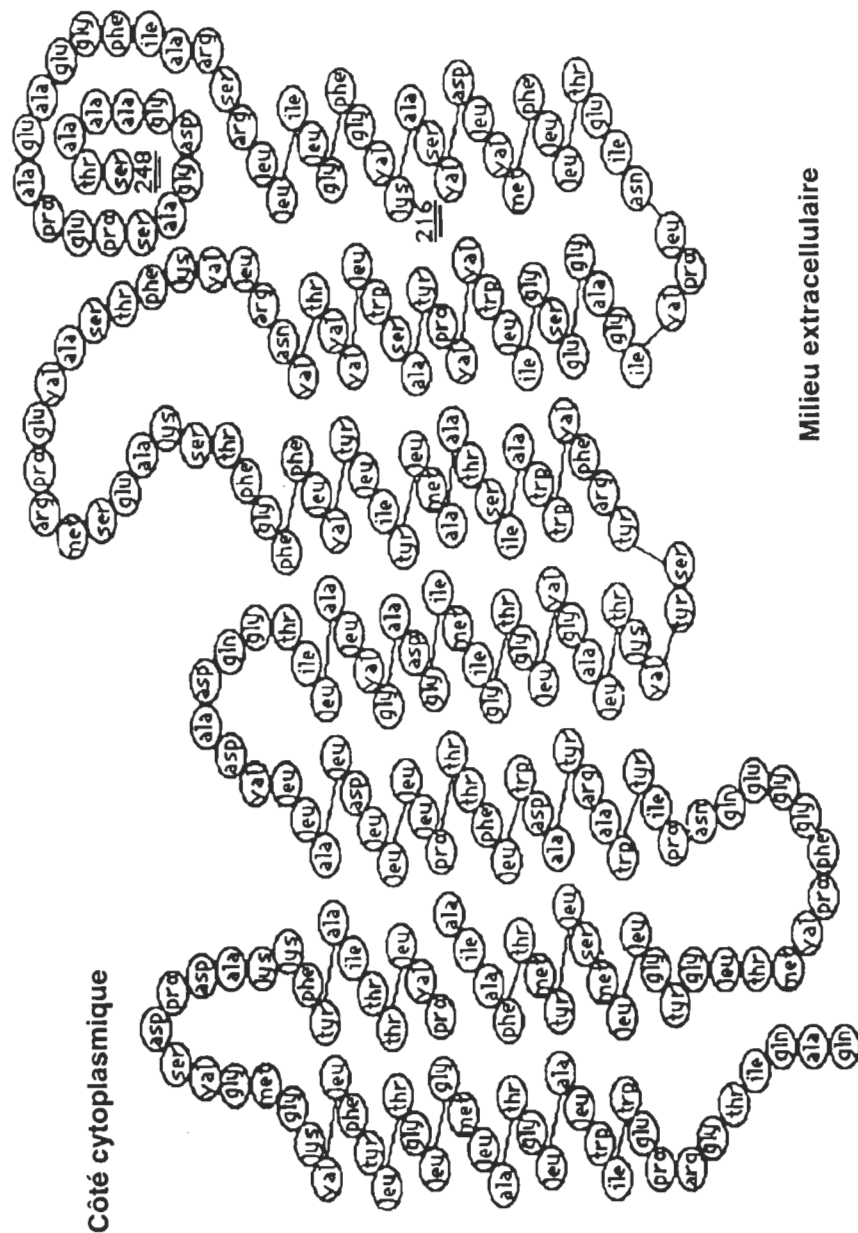
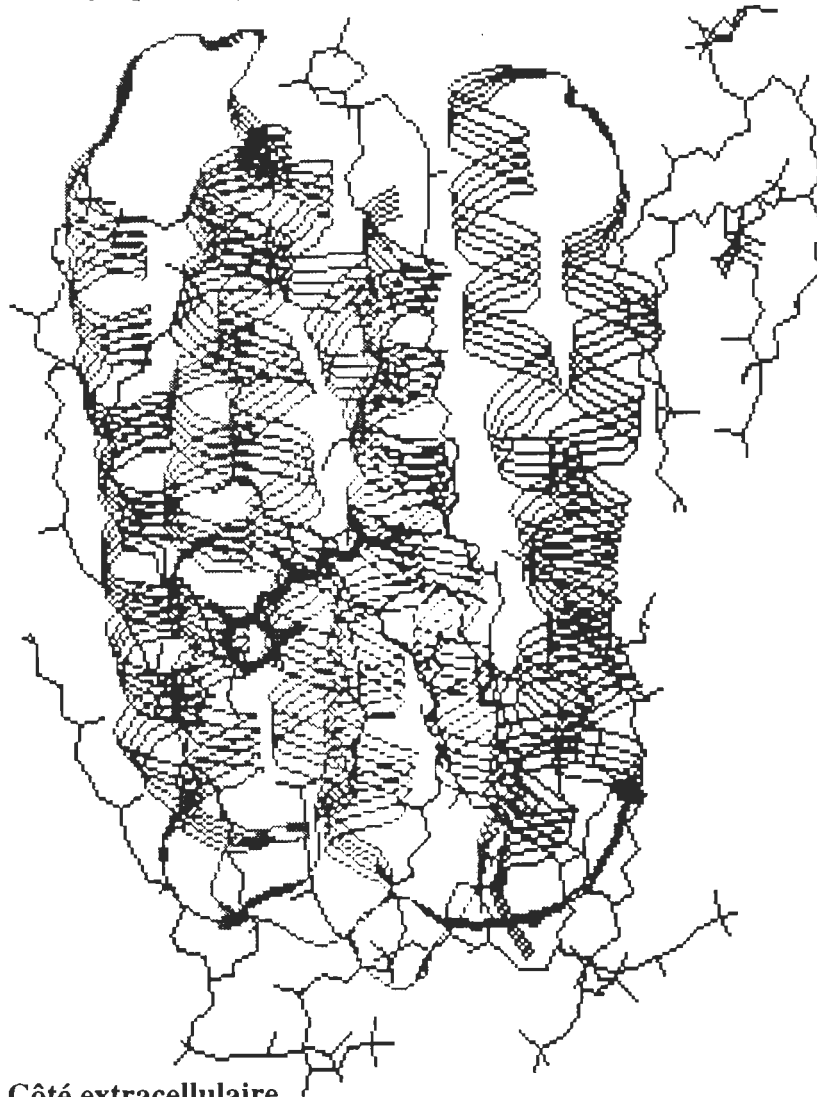


Figure 1.6

Structure tridimensionnelle de la bactériorhodopsine où l'on voit l'arrangement spatial des sept segments hélicoïdaux de la molécule. L'espace libre transmembranaire, ou cavité centrale, est occupé par le chromophore (rétinal). (Structure déposée par R. Henderson à Protein Data Bank, Brookhaven, 1997. La structure est comparable à celle publiée par: Edholm et al., 1995)

Côté cytoplasmique



Côté extracellulaire

Figure 1.7

Schéma de la liaison entre le rétinale et la lysine-216 de la bactériorhodopsine. Le groupement aldéhyde du rétinale et l'amine de la lysine 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.

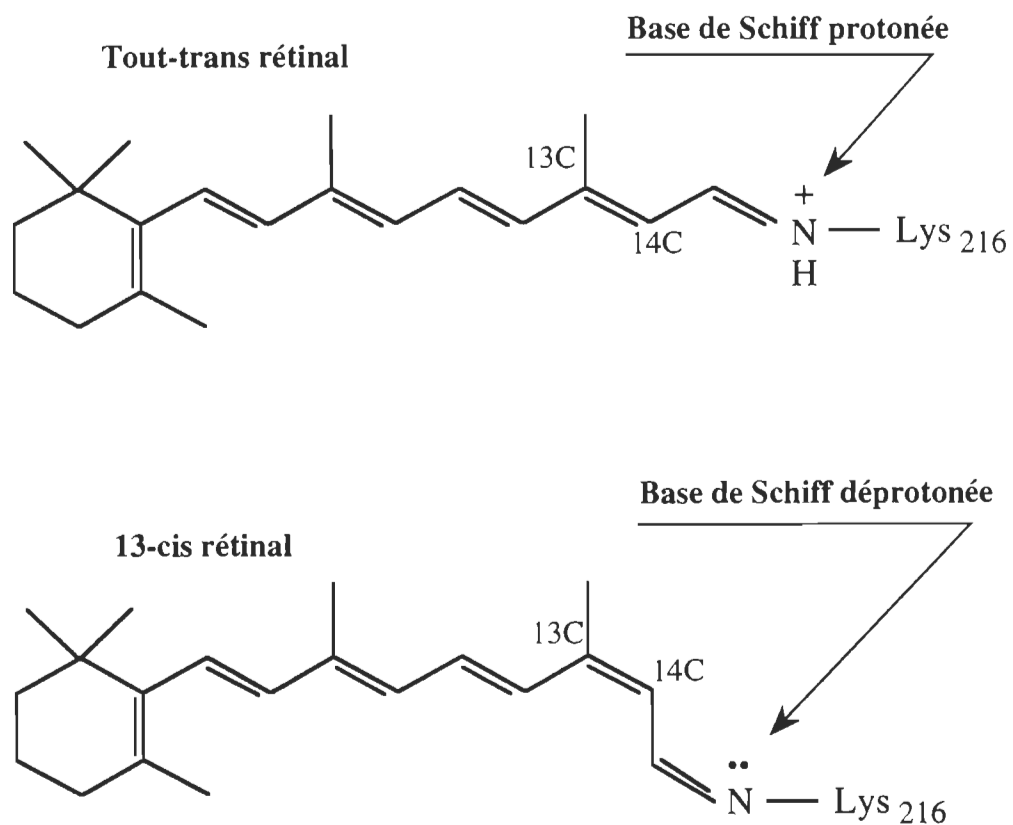
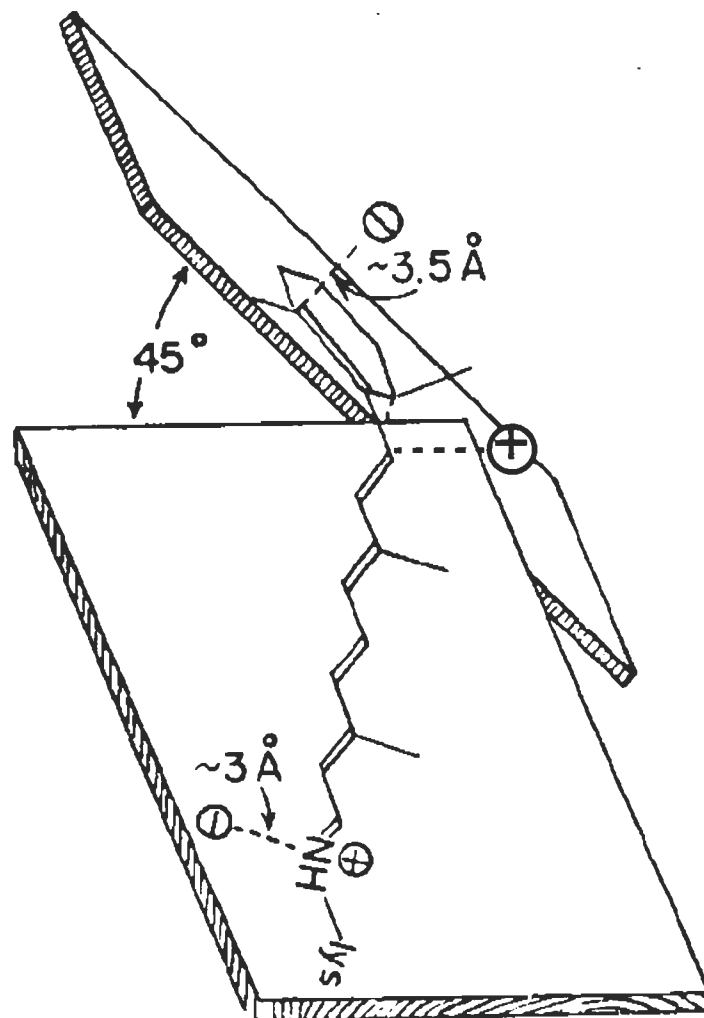


Figure 1.8

Modèle des interactions bactériorhodopsine-rétinal. Ce modèle de charge ponctuelle externe a été proposé par Nakanishi en 1980 pour les interactions rétinale-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 \AA de l'azote protoné de la base de Schiff et à 3.5 \AA du carbone-5 de l'anneau. Ce modèle a été révisé par Lugtenburg et al en 1986. Ils proposent l'ajout d'un dipôle près du carbone-7.



1.5.2 Activité photochimique de la bactériorhodopsine.

Dans la membrane pourpre, la bactériorhodopsine peut exister en deux formes différentes: la bR_{570} (bR pour bactériorhodopsine) et la bR_{560} . Ces deux formes sont stables et existent selon le cas, lorsque la bactériorhodopsine est adaptée à la lumière (bR_{570}) ou adaptée à l'obscurité (bR_{560}). La bactériorhodopsine adaptée à la lumière possède, comme son nom l'indique, un pic d'absorption maximum centré à 570 nm et ne contient que des chromophores tout-trans rétinol. Quant à la forme adaptée à l'obscurité, son maximum d'absorption se situe à 560 nm et elle contient un mélange équimolaire de deux formes: la bR_{570} et la bR_{540} . Comme nous venons de le mentionner, la bR_{570} contient la forme tout-trans rétinol, tandis que la bR_{540} contient le 13-cis rétinol. Les deux formes de la bactériorhodopsine (adaptée à la lumière et adaptée à l'obscurité), sont interconvertibles. Le passage de la bR_{560} à la bR_{570} nécessite une courte exposition à la lumière visible (entre 500 et 600 nm). Quant à elle, la conversion de la bR_{570} à la bR_{560} est une réaction thermique lente ayant une demi-vie d'environ 30 minutes à température ambiante et pH neutre. Cette réaction implique l'isomérisation du 13-cis rétinol à la forme tout-trans rétinol de la moitié des chromophores (Oesterhelt et Hess, 1973; Hofrichter et al., 1989).

Le rôle physiologique de la bactériorhodopsine est de générer un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane plasmique. Pour produire ce gradient, la molécule transfère un proton du côté cytoplasmique au côté extracellulaire de la membrane. L'énergie nécessaire à ce transport de proton est fournie à la bactériorhodopsine par la lumière captée par son chromophore (rétinol), ce dernier servant littéralement d'antenne réceptrice pour capter le rayonnement électromagnétique de la lumière visible. Lorsque le tout-trans rétinol de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière capte un photon, la bactériorhodopsine initie un cycle réactionnel passant par plusieurs intermédiaires distincts. Ce cycle photochimique amène le pompage d'un proton et se termine par la réapparition de la bR_{570} (Callender, 1982).

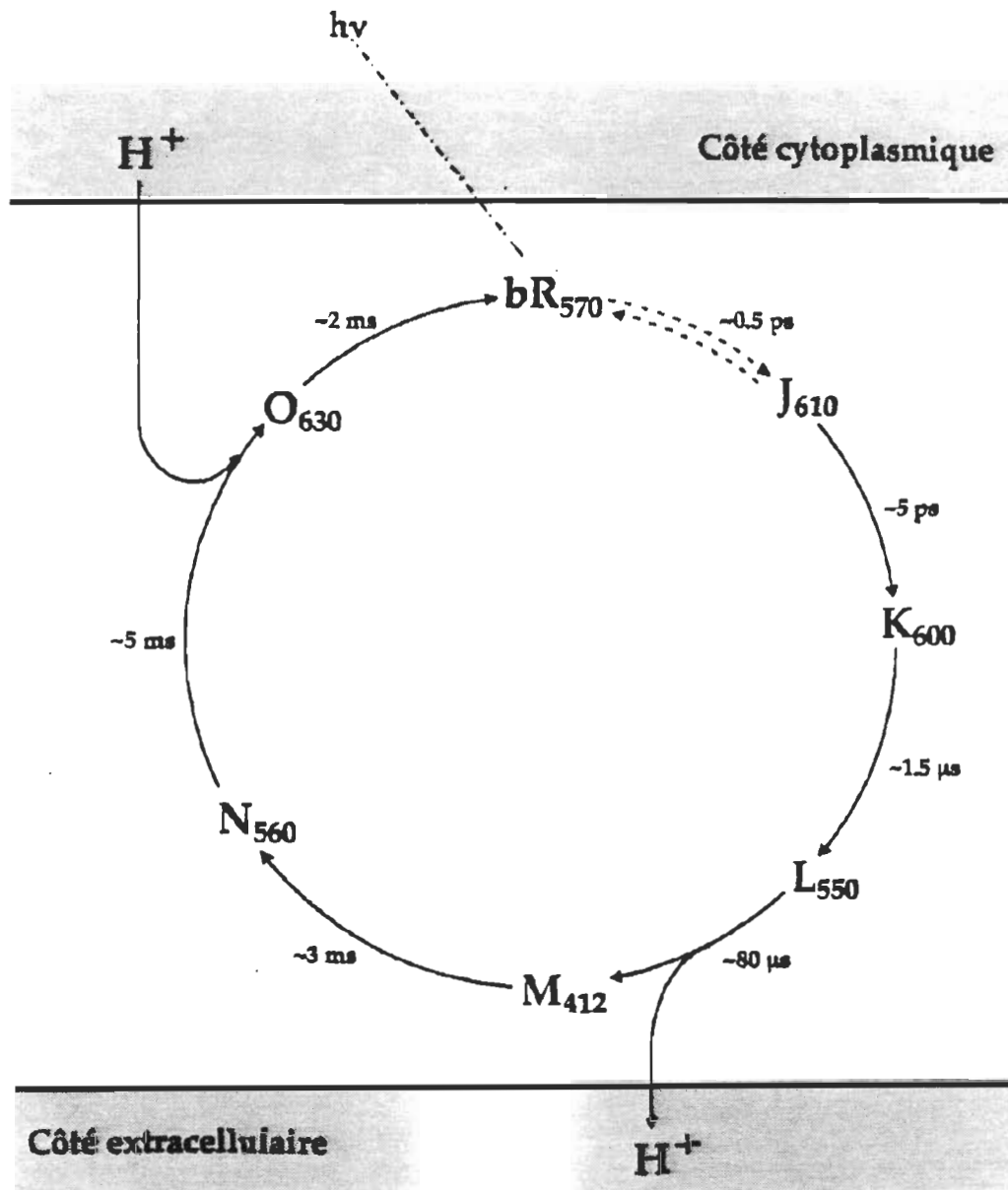
Voyons maintenant une à une toutes les étapes du photocycle de la bactériorhodopsine et pour ce faire nous ferons référence à la figure 1.9 qui décrit le cycle

complet. Au départ, la bactériorhodopsine adaptée à la lumière (bR_{570}) comporte un rétinol dans l'état tout-trans et ce dernier a une base de Schiff protonée. Au moment où le tout-trans rétinol absorbe un photon, il s'isomérisé en se transformant en 13-cis rétinol en moins de 10 picosecondes. Pour en arriver à cette isomérisation du rétinol, deux intermédiaires sont nécessaires: les intermédiaires J_{610} et K_{600} . Chacun de ces intermédiaires a un maximum d'absorption respectif de 610 nm et 600 nm comme leur nom l'indique. Lors du passage à l'intermédiaire J, il y a isomérisation partielle du rétinol caractérisée par une constante de temps de formation d'environ 0.5 picoseconde. Par la suite, le processus d'isomérisation se poursuit et se termine avec l'apparition de l'intermédiaire K avec une constante de temps d'environ 5 picosecondes (Keszthelyi et al., 1982; Dobler et al., 1988; Groma et al., 1988). L'intermédiaire K est le seul intermédiaire dont la formation est réversible par l'absorption d'un photon pour revenir à la bR_{570} (dans des conditions physiologiques normales: pH neutre, température ambiante et force ionique modérée).

Les intermédiaires J et K produits par isomérisation du rétinol, permettent à la bactériorhodopsine d'accumuler sous forme électrostatique l'énergie du photon capté par le tout-trans rétinol. En effet, l'isomérisation 13-cis du rétinol produit un mouvement rotationnel autour de la double liaison $13C=14C$. Cette distorsion conformationnelle du rétinol conduit bien sûr à la formation des intermédiaires J et K dont nous venons de discuter, mais induit surtout une séparation de charges entre le proton de la base de Schiff protonée et le contre-ion négatif situé à proximité (contre-ion que nous avons décrit à la section **1.5.1** voir figure **1.8**). Ainsi la photoisomérisation du rétinol lors des deux premiers intermédiaires du photocycle de la bactériorhodopsine s'avère être le processus indispensable à la protéine pour capter et stocker l'énergie lumineuse nécessaire à la poursuite du photocycle et la production d'un gradient électrique transmembranaire. L'énergie emmagasiné est de 11.6 KCal / mol ce qui en fait un procédé très efficace de transformation d'énergie lumineuse sous forme électrostatique (Liu et al., 1987; Lanyi, 1993; Balashov et Ebrey, 1994).

Figure 1.9

Photocycle de la bactériorhodopsine.



L'étape suivante du cycle de la bactériorhodopsine est le passage à l'intermédiaire L_{550} qui se produit avec une constante de temps d'environ 1.5 microsecondes. Le maximum d'absorption de cet intermédiaire est situé à 550 nm. L'intermédiaire L contient un rétinol de conformation 13-cis et sa base de Schiff est toujours protonée. La littérature ne contient pas beaucoup d'information sur cet intermédiaire, mais certains auteurs rapportent que le résidu D96¹ ainsi qu'une tyrosine voisine subissent des ionisations réversibles partielles ou totales à ce stade du photocycle (Keszthelyi, 1988; Lanyi, 1993).

Passons maintenant à la transition de l'intermédiaire L_{550} à l'intermédiaire M_{412} . Cette transition très importante s'effectue avec une constante de temps de 80 microsecondes et a un maximum d'absorption à 412 nm. Durant cette phase, la base de Schiff se déprotonne (l'azote de la base de Schiff perd sa charge positive) et l'ion hydrogène ainsi libéré sera directement transféré vers le résidu chargé négativement D85⁻. Par conséquent, le résidu D85 devient le premier accepteur de proton dans la chaîne réactionnelle qui permettra le pompage d'un proton par la bactériorhodopsine (Lanyi, 1993; Mathies et al., 1991; Balashov et Ebrey, 1994). Suite à ce transfert du proton de la base de Schiff vers le résidu de l'acide aspartique D85, le proton poursuit sa route pour être expulsé à l'extérieur de la bactériorhodopsine du côté extracellulaire en transitant par un groupe XH mal connu. Ce groupe XH, localisé dans le domaine extracellulaire du canal à proton, fut identifié par des études comparatives sur des protéines mutantes dans lesquelles il fut démontré que le proton éjecté à l'extérieur de la bactériorhodopsine provenait directement de la dissociation d'un groupement protoné (Gutman et Nachliel, 1990). Des travaux récents tendent à démontrer que le groupement XH consiste en un réseau de liens hydrogènes formés de plusieurs résidus et de deux molécules d'eau (voir partie inférieure de la figure 1.10) (Le Coutre et al., 1995; Le Coutre et Gerwert, 1996; Rammelsberg et al., 1997). L'intermédiaire M est aussi caractérisé par d'importants changements conformationnels de la protéine. Cette distorsion structurale permet la réorientation de la base de Schiff pour en faciliter son accessibilité au domaine cytoplasmique de la molécule

1. Le "D" symbolise l'acide aminé aspartique et le chiffre "95" représente la position dans la séquence d'acides aminés qui composent la structure primaire de la bactériorhodopsine.

préparant ainsi la reprotonation de la base de Schiff (Lanyi, 1993).

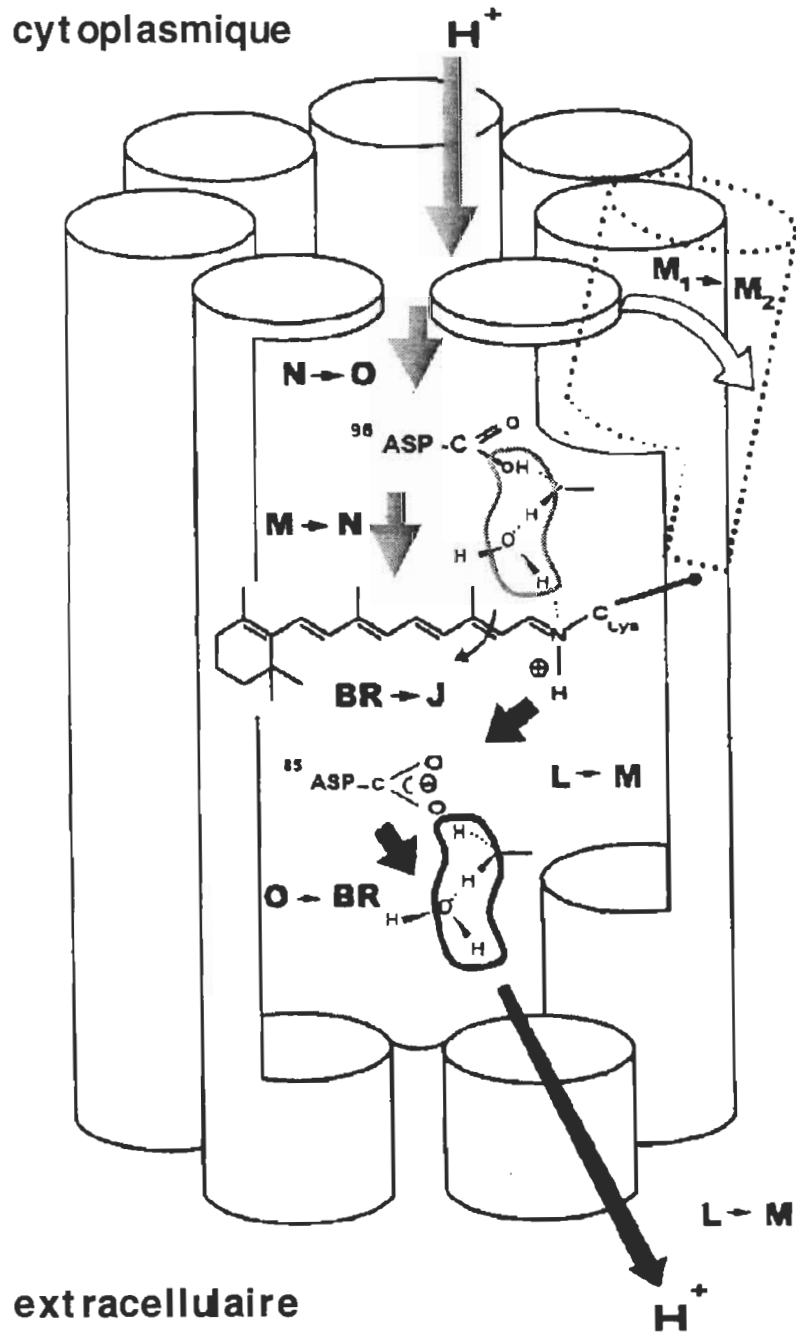
La transition suivante est la disparition de l'intermédiaire **M** vers l'apparition de l'intermédiaire **N**₅₆₀. La constante de temps de passage entre ces deux intermédiaires est de 3 millisecondes et le pic d'absorption maximum de **N** est centré à 560 nm. Durant cette transition il y a transfert d'un proton entre l'acide aspartique D96, localisé dans le domaine cytoplasmique de la protéine et la base de Schiff. Il y a donc reprotonation de la base de Schiff et le résidu D96 est par conséquent le premier donneur de proton au cours du processus de recouvrement de l'état initial de la base de Schiff. Le proton passe de son donneur à son accepteur à travers une chaîne de molécules d'eau reliées par des ponts hydrogènes (voir partie supérieure de la figure **1.10**) (Lanyi, 1993).

L'avant dernier intermédiaire **O**₆₃₀ a un maximum d'absorption à 630 nm et une constante de temps de passage de 5 millisecondes. Cet intermédiaire est associé à la capture d'un proton du côté cytoplasmique de la membrane pourpre, à la reprotonation du résidu D96⁻ et à la réisomérisation thermique du rétinol de 13-cis à tout-trans. Chronologiquement, il y a capture d'un proton côté cytoplasmique, puis transfert de ce dernier vers le résidu D96⁻ à travers un regroupement de molécules d'eau et de quelques résidus polaires. Finalement il y a réisomérisation du rétinol (Lanyi, 1993; Mathies et al., 1991; Balashov et Ebrey, 1994)

La dernière transition du photocycle est le recouvrement de l'état initial de la bactériorhodopsine à partir de l'intermédiaire **O**. Durant cette transition, il y a déprotonation de l'acide aspartique D85 et des relaxations au niveau du rétinol et de l'apoprotéine.

Figure 1.10

Canal à proton de la bactériorhodopsine selon Le Coutre et Gerwert, 1996.



1.6 De la bactériorhodopsine 570 à sa forme 480.

Comme nous l'avons vu précédemment, la forme native de la bactériorhodopsine a un maximum d'absorption situé à 570 nm. Mais une autre forme spectrale peut être obtenue à partir de la bR_{570} , c'est la forme bR_{480} dont le maximum d'absorption est centré à 480 nm.

Il est maintenant admis que le maintien de la coloration pourpre de la bactériorhodopsine de pH 2 à pH 12 n'est pas une propriété intrinsèque de la protéine. Cette coloration est plutôt le résultat d'interactions spécifiques entre la bactériorhodopsine et les lipides qui la solvant. En effet, lorsque cette protéine est complètement délipidée et suspendue en milieu aqueux en l'absence de détergents, elle n'est plus pourpre mais plutôt rouge (maximum d'absorption à 480 nm) (Baribeau et Boucher, 1985). Suspendue en présence de détergents, la bactériorhodopsine délipidée existe sous forme d'un équilibre acido-basique entre ces deux formes spectrales, bR_{570} et bR_{480} , et le pKa apparent de cet équilibre dépend du détergent utilisé (Baribeau et Boucher, 1987).

Par ailleurs, le passage de la forme 570 à la forme 480 de la bactériorhodopsine est aussi observable lorsque les lipides à chaînes ramifiées qui solvant la molécule à l'intérieur de la membrane pourpre sont substitués par des lipides à chaînes linéaires. Les monomères de bactériorhodopsine contenus dans des vésicules de phosphatidyl choline à chaîne linéaire peuvent être réversiblement transformés (variation du pH par l'ajout d'un acide ou d'une base) de la forme bR_{570} à la forme bR_{480} avec un pKa apparent de 7.3 et cette titrabilité disparaît lorsque les vésicules sont contaminées par des alcanes ramifiés (Pomerleau et al., 1995).

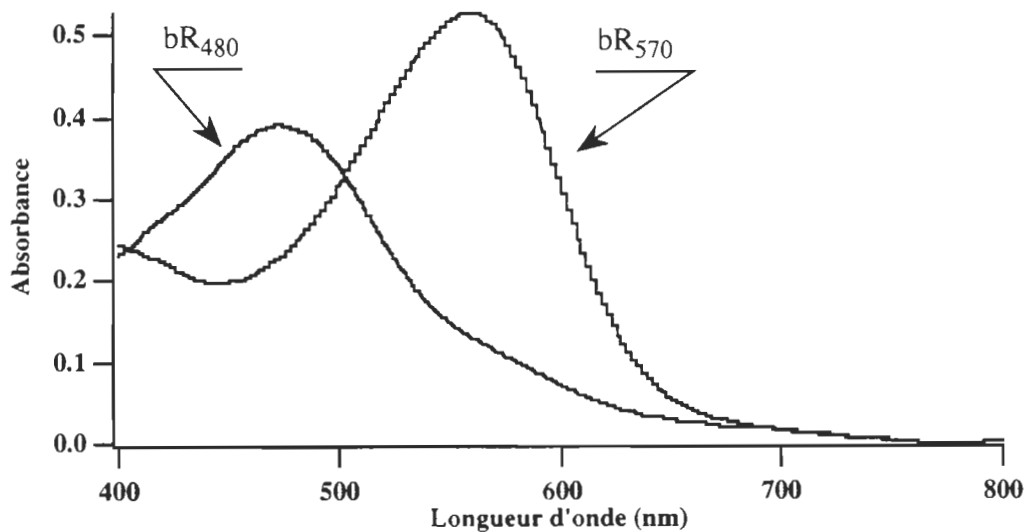
On voit donc des observations précédentes, qu'en absence des interactions fortes qui existent entre la protéine et les lipides qui la solvant dans son milieu natif, la bactériorhodopsine peut exister sous deux formes stables (bR_{570} et bR_{480}).

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

membranes pourpres par les anesthésiques généraux est la plus connue. En 1985, Nishimura et al. ont montré que l'ajout d'anesthésiques généraux comme l'Enflurane ou l'halothane aux membranes pourpres provoquait l'apparition de la forme rouge du pigment. Plus tard, Messaoudi et al. (1992) ont montré que ce phénomène consistait en l'établissement d'un équilibre acido-basique entre les formes pourpres (bR₅₇₀) et rouges (bR₄₈₀) dont le pKa apparent était de 7.5 et qu'il pouvait être reproduit autant avec des solvants comme l'hexane, les alcools ou l'acétone qu'avec des anesthésiques généraux. La figure qui suit montre les spectres d'absorption de ces deux formes de bactériorhodopsine.

Figure 1.11

Spectre d'absorption UV-visible des formes natives (bR₅₇₀) et modifiées (bR₄₈₀) de la bactériorhodopsine.



Comme dans le cas de la délipidation de la bactériorhodopsine ou sa reconstitution dans des membranes artificielles, la contamination aux anesthésiques semble provoquer une perte des interactions fortes lipides-protéine. Cette constatation est appuyée par une étude de diffraction aux rayons X ayant permis de localiser la fixation des anesthésiques généraux à la membrane pourpre dans le domaine hydrophobe de l'interface lipide-protéine (Nakagawa et al., 1994).

1.7 Structure et photochimie de la bR₄₈₀.

La structure de la forme bR₄₈₀ de la bactériorhodopsine est très peu différente de la forme native. Les deux formes ont un chromophore de configuration tout-trans relié à l'apoprotéine par l'intermédiaire d'une base de Schiff protonée (Baribeau, 1987; Baribeau et Boucher, 1985; Henry et al., 1988). Leur structure secondaire, quant à elles, sont identiques. Par contre, la structure tertiaire comporte une légère différence au niveau des sept hélices alpha qui sont relaxées les unes par rapport aux autres dans le pigment de forme bR₄₈₀ comparativement à la forme bR₅₇₀ (Messaoudi et al., 1993; Messaoudi et al., 1992; Pande et al., 1989).

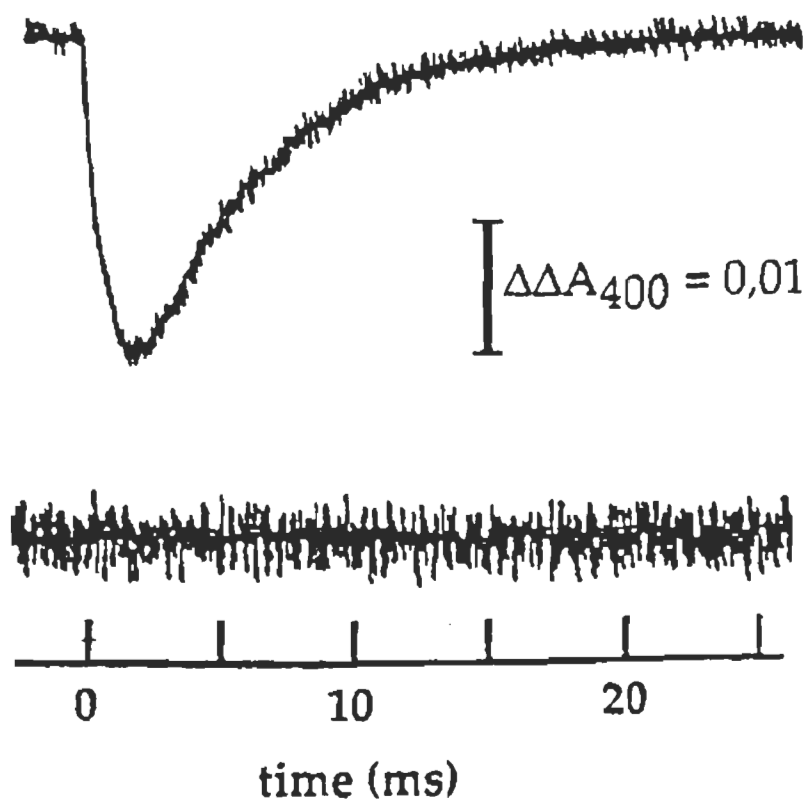
Du point de vue de leur activité photochimique, les deux pigments sont très comparables. Des principales similitudes en rapport avec le photocycle de la bR₄₈₀, notons l'apparition de deux intermédiaires dont les maximum d'absorption sont centrés à 535 nm et 380 nm. Par analogie avec le pigment natif, ces deux intermédiaires sont nommés: K₅₃₅ et M₃₈₀. Les cinétiques d'apparition et de disparition de l'intermédiaire M₃₈₀ sont différentes de celles de M₄₁₂. En effet, l'apparition de l'intermédiaire M₃₈₀ est légèrement plus rapide que pour la bactériorhodopsine native et inversement, la disparition de l'intermédiaire M₃₈₀ est plus lente (Boucher et al., 1996). Par contre, tout comme l'intermédiaire M₄₁₂, M₃₈₀ est une forme spectrale dont le rétinal est déprotoné (Baribeau et Boucher, 1985; Nishimura et al., 1985; Henry et al., 1988).

En ce qui concerne l'activité de pompage de protons de la forme bR₄₈₀, une étude dans nos laboratoires sur les variations transitoires du pH a pu démontrer une absence d'apparition transitoire de protons en phase aqueuse (voir figure 1.12) (Harvey-Girard, 1990). Ainsi, contrairement à la bactériorhodopsine native, la forme 480 ne relâche pas de protons dans sa phase aqueuse pendant son photocycle, ce qui laisse croire à une absence de pompage de protons ou à une grande perte d'efficacité. Ces résultats ont été confirmés par des mesures de photocourant et de photoconductivité électrique transitoire faites dans nos laboratoires (Elouatik, 1996). Ainsi la conversion spectrale bR₅₇₀→bR₄₈₀ s'accompagne au niveau moléculaire par un découplage entre l'activité photochimique du pigment et sa fonction de pomper efficacement des protons.

Figure 1.12

Activité de pompage de protons, après une excitation laser, par mesure de la variation transitoire d'absorbance du paranitrophénol.

Les mesures sont faites à 400 nm dans une solution aqueuse non tamponnée de membranes pourpres ($7.5 \mu\text{M}$ bR) ajustée à pH 7, contenant 50 mM NaCl et $25 \mu\text{M}$ de paranitrophénol sans anesthésique pour la courbe du haut et avec 0.4% (v/v) d'Enflurane pour la courbe du bas. Les transitions d'absorption dues à l'apparition et à la disparition de l'intermédiaire M ont été soustraites. La trace du bas est amplifiée d'un facteur 3 verticalement. (Boucher et al., 1996).



1.8 Objectif de la recherche.

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, la bactériorhodopsine est en fait une pompe à protons qui puise son énergie de fonctionnement de la lumière. Il fut donc vite intéressant pour la communauté scientifique de domestiquer cette protéine pour en faire un convertisseur efficace d'énergie lumineuse en énergie électrique. Bien sûr l'idée n'a jamais été de remplacer les énergies traditionnelles par des générateurs solaires "bactériorhodopsinien". Mais le but recherché était plutôt de développer des dispositifs optoélectroniques ultra rapides et performants avec une haute densité d'intégration de surface.

Pour recueillir l'énergie électrique produite par le transfert de protons de la bactériorhodopsine, il fallait tout d'abord trouver un moyen d'orienter toutes les molécules dans un même sens, afin que le courant produit par chacune soit additionné à celui de ses voisines. Pour en arriver à l'orientation de la bactériorhodopsine, les chercheurs se sont tournés vers l'électrodéposition. En effet, puisque les bactériorhodopsines insérées à l'intérieur de leur membrane sont toutes orientées, il devient donc possible d'orienter ces dernières en mettant à profit l'asymétrie de charges négatives de la membrane pourpre c'est-à-dire son dipôle électrique permanent. Ainsi, en appliquant un champ électrique à travers une solution de membranes pourpres, ces dernières migreront par électrophorèse vers l'électrode positive et s'y déposeront sous forme d'un empilement orienté.

Plus récemment, certaines équipes ont pu observer des photocourants de bactériorhodopsine sans procéder à l'orientation des membranes pourpres par électrodéposition mais seulement en déposant ces dernières par monocouche de Langmuir-Blodgett ou en solution sur une électrode et en les laissant sécher (Miyasaka et Koyama, 1991; Robertson et Lukashev, 1995). L'avènement de ces nouvelles observations a bouleversé l'idée selon laquelle il fallait orienter dans un même sens les bactériorhodopsines pour obtenir un photocourant. En effet, puisque les molécules pompent des protons autant dans un sens que dans l'autre, dû à leur orientation aléatoire, il ne devrait pas y avoir d'observation de photocourants. Les courants ainsi observés ne résulteraient plus d'un déplacement de charges du au pompage des protons dans un même

sens dans toutes les molécules. Pour expliquer ces courants, les équipes de Myasaka et Robertson ont émis les hypothèses de courant rectifié et de variation de pH local. Nous discuterons plus à fond de ces hypothèses plus loin.

Par ailleurs, nous savons que des membranes, simplement déposées sur une électrode par séchage à l'air libre, sont capables de générer des photocourants (Boyer et al., 1995). Cette observation repose toute la question de l'importance à accorder à l'orientation (électrodéposé, film Langmuir-Blodget...) dans l'interprétation des signaux.

Afin de préciser ces questions, nous proposons de comparer des techniques d'orientation autres que l'électrodéposition et de voir dans quelle mesure ces échantillons peuvent se prêter à l'analyse cinétique. Nous croyons qu'il s'agit ici d'un élément important puisqu'à ce jour, les seules informations cinétiques disponibles sur le déplacement de charges dans la bactériorhodopsine nous viennent de mesures de déplacement de charges sur des échantillons de membranes pourpres dont l'orientation est maintenue grâce à du polyacrylamide.

Nous utiliserons donc une technique d'orientation ionique qui est semblable au simple séchage, à la différence que l'électrode est cette fois prétraitée avec de la polylysine pour la rendre positive. Ainsi, plutôt que d'appliquer un champ électrique externe en faisant passer un courant électrique entre deux électrodes, nous créons un champ électrique à l'interface de l'électrode chargée positivement et la solution de membranes pourpres à déposer par séchage. Cette méthode met donc aussi à profit le dipôle électrique permanent de la membrane poupre pour orienter cette dernière dans un champ électrique à l'interface de l'électrode. Cette méthode fut utilisée par Fisher en 1975 pour orienter des érythrocytes sur une lamelle de verre. Puis, en 1978, son équipe orienta de la même façon des membranes pourpres à la surface d'une lamelle de verre. Nous avons donc pensé faire de même mais en utilisant des plaques de platine plutôt que celles de verre. À notre connaissance, cette technique n'avait pas été utilisée avec des métaux mais ceci ne devrait pas créer d'inconvénients. En effet, le platine étant difficilement oxydable, il ne devrait pas altérer la charge positive de la couche de polylysine étalée à sa surface.

En plus d'orienter des membranes pourpres à la surface d'une lamelle recouverte de polylysine, l'équipe de Fisher (1978) et celle de Hayward (1978) ont observé aussi qu'on pouvait donner différentes orientations aux membranes en variant le pH de ces dernières. Puisque que le dipôle permanent de la membrane pourpre en solution est fonction du pH, il est donc possible d'obtenir des orientations inverses en utilisant des solutions adéquates permettant d'inverser le dipôle électrique permanent de la membrane pourpre. Ainsi, avec une solution de membranes pourpres à pH 7.4, ils obtenaient une orientation du côté cytoplasmique de la membrane vers la polylysine. Inversement, une solution de membranes pourpres à pH 3, amenait une adsorption du côté extracellulaire de la membrane vers la polylysine. Ces résultats montrèrent des orientations supérieures à 90% autant à pH 7 qu'à pH 3.

Alors, si cette méthode d'orientation fonctionnait avec le platine, nous aurions une méthode que nous pourrions qualifier de douce pour l'orientation des membranes pourpres, contrairement à l'électrodéposition qui est une méthode beaucoup plus lourde pour les membranes. Mais, l'atout principal de l'orientation ionique, c'est de nous offrir la possibilité de comparer avec une méthode similaire de déposition, les photocourants obtenus par simple séchage. Dans l'ordre, nous procéderons donc comme suit:

- 1- Nous déposerons par orientation ionique des membranes pourpres à pH 7 et pH 3 sur des électrodes de platine. Les deux pH utilisés devraient nous donner des orientations inverses.
- 2- Nous vérifierons que le procédé fonctionne en comparant les photocourants pour les deux types d'orientations, soit pH 7 (côté cytoplasmique) et pH 3 (côté extracellulaire). Le cas échéant, nous devrions obtenir des courants inversés dus aux orientations inverses.
- 3- Nous déposerons par simple séchage des membranes pourpres à pH 7 et pH 3 sur des électrodes de platine. Nous utiliserons les variations de pH par analogie avec la déposition ionique pour avoir des conditions expérimentales similaires afin de pouvoir comparer les signaux et vérifier s'il y a orientation.
- 4- Nous comparerons les photocourants pour les deux types de dépositions et leur

orientation respective, c'est-à-dire leur pH de déposition.

- 5- Nous procéderons aussi par électrodéposition pour déposer les membranes pourpres. Les résultats des photocourants observés par cette méthode sont notre référence car, l'orientation des membranes est certaine et les résultats bien appuyés par la littérature.

Les photocourants seront obtenus selon deux procédés différents, soit en régime continu, soit en régime transitoire. Nous expliquerons en détails les deux procédés dans la section suivante de matériel et méthodes. Mais, brièvement nous pouvons dire que la différence entre les deux méthodes d'observation tient dans la façon de procéder à l'excitation de la bactériorhodopsine. Dans le cas du régime continu, nous excitions la bactériorhodopsine sur une longue période de temps avec une lumière continue et nous observons l'évolution du photocourant produit par la bactériorhodopsine pendant cette même période. Pour sa part, la méthode en régime transitoire nécessite une excitation très brève (par laser) de la bactériorhodopsine suivie de l'observation du photocourant produit par la bactériorhodopsine suite à cette excitation à travers les phases transitoires de son photocycle.

Dans un deuxième temps nous observerons les effets du pH et des anesthésiques sur les photocourants de la bactériorhodopsine. En effet, la solution électrolytique que nous utilisons à l'intérieur de notre cellule pour recueillir les photocourants, est un support idéal pour varier certaines conditions expérimentales comme le pH. Nous utiliserons aussi un anesthésique, l'Enflurane, que nous rajouterons en saturation à un électrolyte à pH 7. Ces variations des conditions expérimentales de l'électrolyte corrélées avec nos différentes méthodes de déposition, nous amèneront à identifier quels sont les effets de ces différentes conditions sur les photocourants de la bactériorhodopsine. Nous espérons, entre autres, approfondir nos connaissances des effets sur le pompage de protons de la bactériorhodopsine en fonction du pH et des anesthésiques et tenterons de relier certaines phases des photocourants avec ces conditions expérimentales et le photocycle de la bactériorhodopsine.

En résumé, nous tenterons dans ce travail de mettre au point une technique d'orientation ionique sur platine. Puis, de la comparaison des photocourants des diverses dépositions, nous espérons conclure sur l'orientation spontanée possible des membranes pourpres par simple séchage et le cas échéant, expliquer ces photocourants et les différences de photocourants entre la déposition par électrodéposition et les techniques de séchage. Finalement, nous étudierons les variations environnementales de la membrane pourpre (différents pH, anesthésique) sur le pompage de protons par la bactériorhodopsine.

Chapitre 2

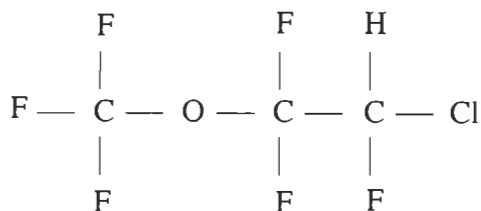
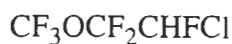
Matériel et méthodes

2 Matériel et méthodes.

2.1 Produits utilisés:

Enflurane: Compagnie Anaquest

Solubilité 0.28 mM



Poly-L-Lysine: Fournisseur Sigma

Platine: Fournisseur Aesar

0.127 mm d'épaisseur

25 mm X 25 mm de surface

2.2 Culture et récolte des halobactéries et obtention de la membrane pourpre.

La section 2.1 décrit les méthodes utilisées pour la culture de la bactériorhodopsine afin d'en obtenir des quantités suffisantes pour notre travail. On y décrit aussi la façon dont est séparée la membrane pourpre des autres impuretés.

La bactériorhodopsine cultivée dans nos laboratoires, est une souche mutante S9 d'*Halobacterium halobium*, provenant du Dr. Walther Stoeckenius de l'Université de Californie à San Francisco.

Les méthodes qui suivent sont décrites dans la thèse de doctorat de Johanne Baribeau (1987) et font référence aux techniques utilisées par Kushwaha et al., (1975a) et à la méthode d'Oesterhelt et Stoeckenius, (1971) pour la séparation des membranes pourpres.

2.2.1 Milieu de culture.

Le milieu de culture nécessaire à la bactériorhodopsine se compose des éléments suivants dans un litre d'eau distillée:

- | | |
|--|-------|
| 1- Na Cl | 250 g |
| 2- KCl | 2 g |
| 3- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Na citrate) | 3 g |
| 4- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 20 g |
| 5- 1 ml d'une solution contenant 0.5g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, dans 10 ml d'eau distillée qu'on acidifie avec 3 gouttes de HCl 1N. | |
| 6- Le pH du mélange 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. | |
| 8- Oxoid peptone (bacteriological peptone) | 10 g |
- Les peptones sont ajoutées après la stérilisation, de préférence, juste avant l'inoculation.

2.2.2 Pré-inoculation.

La première étape de croissance bactérienne s'effectue de la manière suivante:

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

2- La croissance est d'environ trois à quatre jours et s'effectue dans un incubateur muni d'un plateau d'agitation rotatoire (New Brunswick Scientific Co. Inc., modèle Psychrotemp) à une vitesse d'agitation de 180 r.p.m. et à température contrôlée, soit de 37°C. Cette étape dure de 3 à 4 jours, jusqu'à l'obtention d'une densité optique d'environ 1 lue à 660 nm. A ce moment, la fin de la phase exponentielle de croissance est atteinte pour ce volume de culture.

2.2.3 Inoculation.

Afin d'augmenter la population de bactéries, nous procédons maintenant à la phase d'inoculation qui consiste à accroître peu à peu le volume du milieu de culture pour permettre aux bactéries d'avoir un environnement frais, toujours rempli des nutriments nécessaires à leur croissance. Cette étape s'effectue comme suit:

- 1- Deux erlenmeyers de 4000 ml, contenant 1200 ml de milieu de culture, sontensemencés, chacun avec l'inoculation de 100 ml obtenu à la section **2.2.2**.
- 2- La croissance dure environ trois jours, jusqu'à ce que la densité optique à 660 nm soit environ égale à 1 dans les mêmes conditions qu'à la section **2.2.2**.
- 3- Par la suite, on inocule six erlenmeyers de 4000 ml, contenant chacun 1600 ml de milieu de culture, avec 400 ml de l'inoculation obtenu précédemment.
- 4- La croissance des bactéries se poursuit pendant trois jours dans les mêmes conditions qu'à la section **2.2.2**.

2.2.4 Induction de la membrane pourpre.

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

En premier lieu, on diminue l'agitation des fioles à culture de 180 à 90 r.p.m. afin de minimiser l'aération desensemencements et par la suite, le milieu de culture est exposée à un groupe de 8 tubes fluorescents (256 watts au total) pendant trois jours. Le milieu est agité légèrement pour garder les bactéries en suspension.

Trois jours plus tard, les membranes pourpres sont présentes en quantité suffisante et on récolte les bactéries.

2.2.5 Récolte des bactéries.

Cette étape consiste à séparer les bactéries de leur milieu de culture. La suspension bactérienne est donc centrifugée dans un appareil Sorvall RC-5B à 10000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le milieu de culture formant le surnageant est jeté. Par la suite, les bactéries sont lavées deux fois dans une solution basale de sels pour enlever le milieu de culture restant. La solution basale de sels ou Kushner est composée des produits suivants dans un litre d'eau distillée:

1- NaCl	250 g
2- KCl	2 g
3- MgSO ₄ .7 H ₂ O	20 g
4- Le pH est ajusté à 7.0 avec du NaOH.	

Le poids des bactéries fraîches est mesuré et ces dernières sont alors déposées dans un bécher de 600 ml où elles sont mises en présence de trois fois leur poids de solution basale de sels. On remet en suspension par une agitation mécanique et 10 mg d'ADNase (Sigma Chemicals Co, St-Louis) y sont rajoutés. L'agitation s'effectue pendant une heure à l'obscurité et on obtient un mélange pâteux. Cette suspension est alors dialysée pendant 16 heures à 4°C contre de l'eau distillée avec un changement d'eau après 90 minutes. C'est à ce moment qu'a lieu la lyse des cellules résultant en des fragments de membranes de grandeurs variables.

2.2.6 Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires.

La membrane pourpre est préparée selon la méthode d'Oesterhelt et Stoeckenius, (1971). Afin d'obtenir seulement la membrane pourpre libérée des constituants cellulaires, le dialysat obtenu à la section 2.2.5 est centrifugé à 10000g pendant 20 à 25 minutes. Le culot contient des débris cellulaires tandis que le surnageant est constitué de la fraction membranaire des cellules. Ce surnageant est alors centrifugé à 50000g pendant 90 minutes. A ce moment, le culot contient la membrane pourpre en majorité tandis que le surnageant

est constitué de membranes rouges. Le culot (membrane pourpre) est resuspendu dans l'eau distillée et recentrifugé pendant 90 minutes à 50000g. Cette étape est répétée deux à trois fois jusqu'à ce que le surnageant soit presque incolore.

2.2.7 Purification de la membrane pourpre.

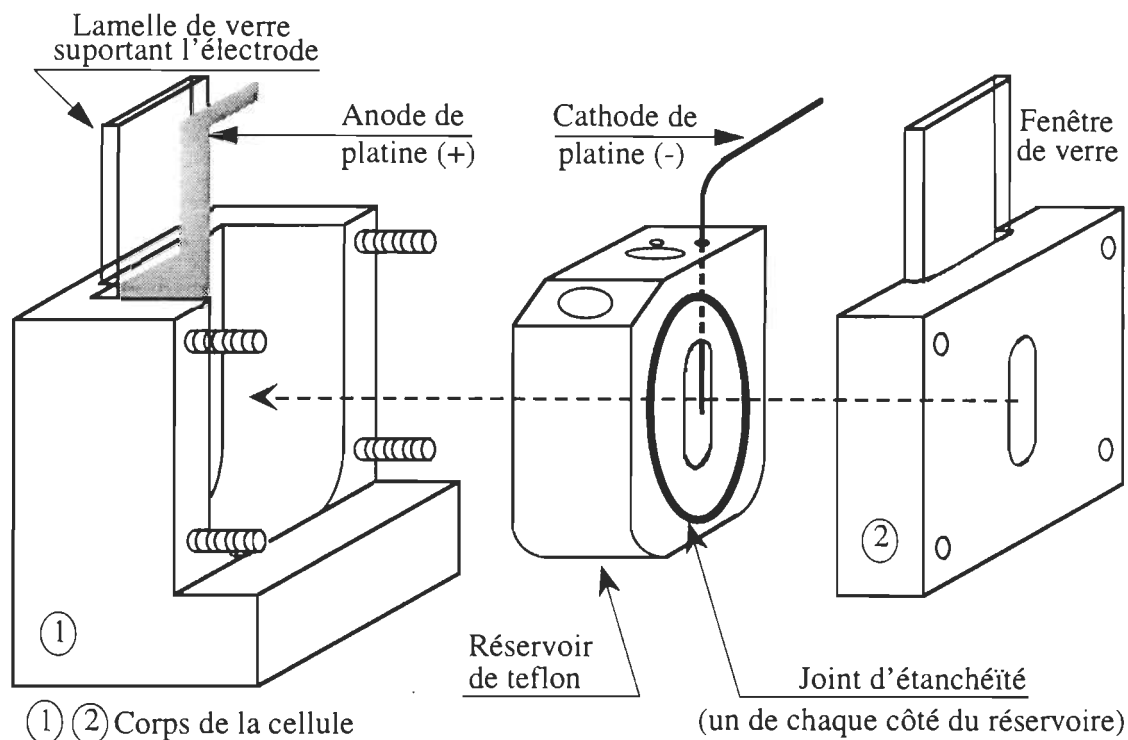
A la membrane pourpre obtenue à la section **2.2.6** est accolée une partie de membranes rouges contaminantes. Cette étape permettra une séparation de ces deux types de membrane. Le culot (membrane pourpre) est déposé sur un gradient discontinu de sucrose: 7 ml (1.5 M) - 21 ml (1.3 M). On procède ensuite à une ultracentrifugation de 48 heures à 260000g dans le rotor SB-110 de l'appareil IEC (modèle B-60). La membrane pourpre sera à l'interface 1.3 et 1.5 M tandis que la membrane rouge se retrouvera au-dessus de la portion contenant 1.3 M de sucrose. La bande pourpre est recueillie et dialysée contre de l'eau distillée pendant 16 heures avec un changement d'eau après 2 heures afin d'éliminer le sucrose. Le dialysat est centrifugé à 50000g dans l'appareil Sorval RC-5B pendant 90 minutes. La membrane pourpre obtenue est alors resuspendue dans la solution basale de sels pour la conservation (0 à 2 ans). Le rendement en membrane pourpre est évalué d'après le spectre d'absorption en utilisant un coefficient d'extinction de $54000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 560 nm, tel que suggéré par Oesterhelt et Stoeckenius, (1971).

2.3 Cellule électrolytique.

La cellule électrolytique est au coeur de nos expérimentations car elle est le lien, l'interface, entre les appareils de mesures et la bactériorhodopsine. Cette cellule nous sert autant pour l'observation que pour l'électrodéposition de la bactériorhodopsine. La figure **2.1** qui suit nous montre le schéma de cette cellule. Le corps de la cellule est constitué de deux parties fabriquées en aluminium anodisé. Au centre de ce corps, se trouve le réservoir central qui est amovible et taillé dans un bloc de téflon d'une seule pièce. Des joints de caoutchoucs de chaque cotés du bloc, faisant face à des lamelles de verres, assurent l'étanchéité de la cellule.

Figure 2.1

Schéma de la cellule électrolytique.



De ces deux lamelles de verre, qui servent à la fermeture de la cavité centrale, l'une sert de support et d'appui à l'électrode positive (plaque de platine de 2.5 * 2.5 cm) et l'autre fait objet de fenêtre pour l'illumination et l'observation des dépôts sur l'électrode d'en face. Comme nous venons de le mentionner, l'électrode positive (anode) est placée sur une des lamelles de verre. C'est sur cette plaque de platine que nous effectuons l'électrodéposition et puisque la membrane pourpre est chargée négativement, ce n'est donc pas un hasard que cette borne soit positive. La contre électrode négative (cathode) dont le rôle est joué par un fil de platine de 0.5 mm de diamètre, est introduit par l'orifice supérieur de la cavité en téflon le plus éloigné de l'anode (8 mm). Le remplissage ainsi que la vidange de la cellule se font par le plus gros des orifices centraux sur la cavité de téflon. Mais cet orifice a aussi une seconde utilité très importante qui consiste à laisser pénétrer la lumière laser lors des observations des photocourants en régime transitoire.

2.4 Dépôt de la membrane pourpre sur électrode.

La dépôt de la membrane pourpre peut se faire sur différents types d'électrodes comme le platine ou le SnO_2 . Dans notre cas, nous utilisons des électrodes de platine qui ont moins d'effets photoélectriques que le SnO_2 et dont le Pt est moins sensible à la lumière intense de notre laser YAG. Ces électrodes, recouvertes de membranes pourpres, serviront par la suite à différents types d'expériences pour recueillir les divers photocourants générés par la bactériorhodopsine. Nous procédons de deux façons différentes pour la dépôt de la membrane pourpre. La première technique est par séchage de la membrane pourpre en solution sur l'électrode et la deuxième est par électrodépôt. Nous allons voir ces deux techniques en détail dans les deux sous-sections qui suivent. Mais avant, notons que contrairement à la méthode de dépôt par film Langmuir-Blodgett, aucune des méthodes utilisées ici ne nous assure d'une dépôt homogène. Notons aussi que la stabilité des dépôts est comparable à la membrane pourpre en solution, c'est-à-dire de quelques mois.

2.4.1 Dépôt par séchage.

Comme son nom le laisse présager, cette technique est des plus simples. Tout d'abord, il faut bien nettoyer l'électrode de platine avec un papier abrasif doux (rugosité entre 220 et 320 environ) et ensuite laisser tremper la plaque dans une solution de HCl 1N pendant 10 à 15 minutes afin de se débarrasser de tout résidu de matériel organique. Après avoir bien rincé la plaque de platine à l'eau distillée, nous déposons l'électrode à plat sur une table et nous étalons environ 600 μl d'une solution d'absorbance 0.5 de bactériorhodopsine à la surface de la plaque. Finalement, il suffit d'attendre environ une heure à température de la pièce pour que la goutte de membrane pourpre sèche totalement. Bien sûr la solution de membrane pourpre peut varier selon le protocole expérimental. Pour notre part, la membrane pourpre peut être dans de l'eau distillée ou dans une solution tamponnée. Nous verrons plus loin que l'on peut aussi utiliser cette méthode comme technique d'orientation en la combinant à un procédé d'adsorption ionique.

2.4.2 Electrodeposition.

L'électrodeposition consiste à mettre à profit, lorsqu'il y a lieu, le dipôle électrique des molécules en les plaçant dans un champ électrique afin de les forcer à migrer et à se déposer sur une électrode. Dans notre cas, nous appliquons un courant entre les deux électrodes de notre cellule électrolytique (figure 2.1) pour faire migrer la membrane pourpre vers la borne positive. Le dipôle électrique permanent de la membrane pourpre origine, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, d'une différence de charges négatives entre ses deux surfaces. Cette différence de charges est ainsi exploitée pour donner une orientation unique à la bactériorhodopsine lors de la migration des membranes dans un champ électrique appliqué. Nous verrons un peu plus loin que nous pouvons tirer profit de cette anisotropie électrique de la membrane pourpre pour varier son orientation en fonction du pH.

Maintenant, passons à l'aspect technique de l'électrodeposition et de ses paramètres. Nous avons consulté l'article d'Alexander A. Kononenko (1986) et nous en sommes servi comme guide de départ afin de mettre au point notre méthode. Pour débiter, il faut bien nettoyer les électrodes de platine comme nous l'avons mentionné à la section 2.4.1 et nous assemblons la cellule avec ses électrodes bien en place. Ensuite nous introduisons une suspension de membranes pourpres dans l'eau distillée, dont la concentration est au moins de 5mg/ml (ou absorbance de 10). Il est très important de travailler avec des membranes dans de l'eau distillée, car la présence d'ions ferait écran au dipôle électrique des membranes. De plus, il faut que la concentration de membranes pourpres soit très élevée, afin que les membranes deviennent porteuses de charges majoritaires par rapport à l'eau distillée. Dans le cas contraire, il y aurait bien sûr électrophorèse des membranes, mais elles n'adhéreraient pas à la plaque de platine puisqu'elles ne recouvreraient pas assez rapidement et en assez grand nombre la surface de l'électrode avant qu'il n'y ait dégagement gazeux par électrolyse à la surface de cette dernière.

Une fois la solution et les électrodes en place, nous raccordons le tout au circuit électrique. La plaque de platine où sera électrodéposée la membrane est mise à la borne

positive et la contre électrode à la borne négative. Nous appliquons ensuite une différence de potentiel de 6 volts pendant 30 secondes. Puis, à l'aide d'une pipette, la solution de membrane pourpre en trop est retirée tout en maintenant la différence de potentiel appliquée sur la cellule. Le maintien de la tension sur les électrodes pendant la vidange permet de garder une bonne adhésion des membranes malgré les remous causés par l'extraction du liquide. Lorsque la cellule est vide et que la tension est enlevée, celle-ci est démontée pour retirer l'électrode de platine recouverte de membranes pourpres tout en prenant grand soin de ne pas abîmer la couche. Finalement nous déposons la plaque à plat sur une table et nous la laissons sécher environ une heure à la température de la pièce.

2.5 Procédés d'orientation des membranes pourpres

Nous avons utilisé deux procédés d'orientation, l'un étant l'orientation par champ électrique (électrodéposition) (Keszthelyi, 1982) et l'autre, l'orientation par adsorption de la membrane pourpre sur une surface cationique (Fisher et al., 1975, 1978, Hayward et al., 1978). Dans le cas de l'orientation par champ électrique, la section **2.4.2** sur l'électrodéposition décrit bien le procédé.

La méthode d'orientation par adsorption sur surface cationique est utilisée avec la technique de déposition par séchage et se veut un procédé qui rend la surface de notre électrode de déposition positive par l'étalement d'une couche de poly-L-lysine. Il faut au préalable nettoyer notre plaque de platine comme nous l'avons décrit à la section **2.4.1**. Puis, 10 μ l à 5mM de poly-L-lysine (Sigma Chemical Company, masse moléculaire de 2000) sont étalées sur la surface de l'électrode. Après 30 secondes, la plaque est lavée délicatement avec de l'eau distillée et nous laissons sécher pendant quelques minutes.

Immédiatement après cette étape de séchage, nous déposons la membrane pourpre en solution comme décrit à la section **2.4.1** (déposition par séchage). L'électrode de déposition étant chargée positivement, le dipôle électrique permanent de la membrane pourpre tendra à s'aligner dans le champ électrique créé entre l'électrode et la solution. Ainsi, suite à l'évaporation progressive de la solution, des couches successives de membranes pourpres se déposeront à la surface de l'électrode tout en alignant leur dipôle

dans un sens commun. Selon que nous voulons une orientation cytoplasmique ou extracellulaire face à l'électrode, nous utilisons une solution de membranes pourpres à pH 7 ou à pH 3, respectivement. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, le dipôle électrique permanent de la membrane pourpre est fonction du pH de cette dernière. Le dipôle électrique permanent de cette membrane étant inversé à pH 3 par rapport à pH 7, ceci nous permet de procéder à des dépôts ayant des orientations inverses. 600 μ l de solution sont étalés sur la surface de platine et nous laissons sécher le tout pendant environ une heure à température de la pièce.

2.6 Photocourant en régime continu.

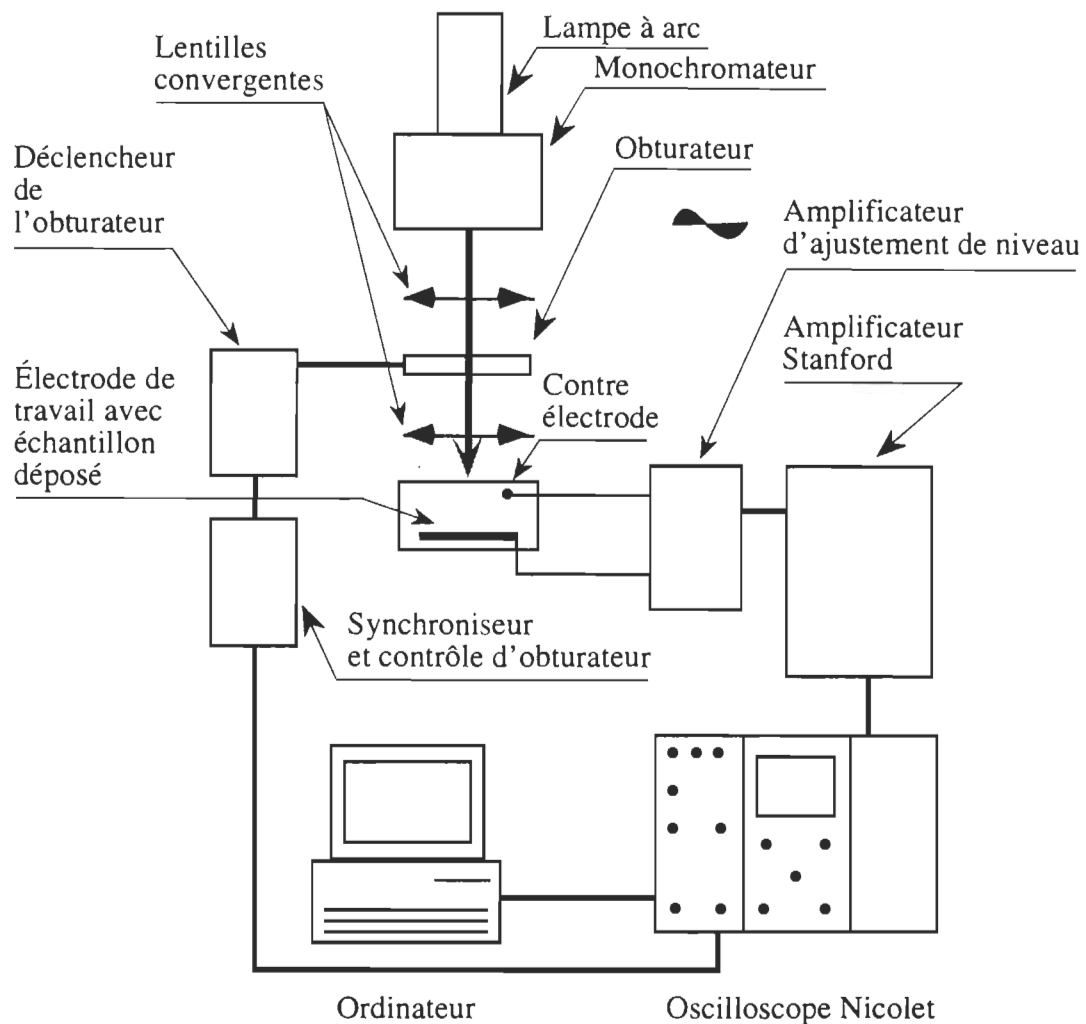
L'observation de photocourants en régime continu consiste à enregistrer l'activité électrique de la bactériorhodopsine en l'éclairant de façon continue avec une longueur d'onde précise. Ainsi, à l'aide d'une lampe à arc et d'un monochromateur, nous sélectionnons une longueur d'onde. Par la suite le faisceau est dirigé par une optique simple de deux lentilles vers notre cellule, en passant par un obturateur électromécanique (Uniblitz modèle 225L), (voir figure 2.2). Rappelons que cette cellule comporte deux électrodes de platine, dont l'une est une plaque sur laquelle est déposée une couche de membranes pourpres. Une fenêtre fait face à l'électrode d'analyse pour laisser pénétrer la lumière venant du monochromateur jusqu'à la couche de bactériorhodopsine (voir détails de la cellule figure 2.1). Les électrodes de la cellule sont à leur tour branchées à un premier amplificateur d'ajustement de niveau (voir plan à la figure 2.3). Un second amplificateur (Stanford Research Systems inc. Model SR560) récupère le signal et le filtre au-delà de 100Hz. Finalement, la réponse électrique est enregistrée sur un oscilloscope (Nicolet 4094) et acheminée pour traitement sur un ordinateur (Apple Macintosh IIci). Notons aussi qu'un dispositif de contrôle d'obturateur et de synchronisation (voir plan à la figure 2.4) permet de contrôler l'ouverture et la fermeture de l'obturateur et le début de l'enregistrement de l'oscilloscope. Cet appareil est ainsi relié au déclencheur de l'obturateur (Uniblitz modèle 100-2B/B) qui lui, à son tour, est relié à la synchronisation de l'oscilloscope. Cette dernière mesure permet de régler le temps d'ouverture de l'obturateur et la séquence d'ouverture

fermeture pour moyenner plusieurs signaux.

Figure 2.2

Schéma de montage pour photocourant en régime continu.

(Optique et cellule électrolytique vuent de haut)



Dans une expérience type, nous déposons de la membrane pourpre sur une électrode de platine (voir section 2.4) puis nous assemblons la cellule et la mettons en place dans le montage. La lampe à arc ayant été préalablement allumée, nous sélectionnons la longueur

d'onde désirée avec le monochromateur. L'amplificateur Stanford Research est réglé pour filtrer au-delà de 100Hz et avoir un gain de 1000. Ce qui nous donne une amplification totale de 1000000 avec l'amplificateur d'ajustement de niveau qui a aussi un gain de 1000. Finalement nous enregistrons le signal électrique de la bactériorhodopsine durant un cycle d'ouverture et de fermeture de l'obturateur. Plusieurs cycles peuvent être moyennés au niveau de l'oscilloscope et ainsi augmenter le rapport signal sur bruit. Le cycle d'ouverture et fermeture de l'obturateur peut varier entre 0.1 à 5 secondes et nous avons choisi par expérience et commodité environ 1.5 secondes.

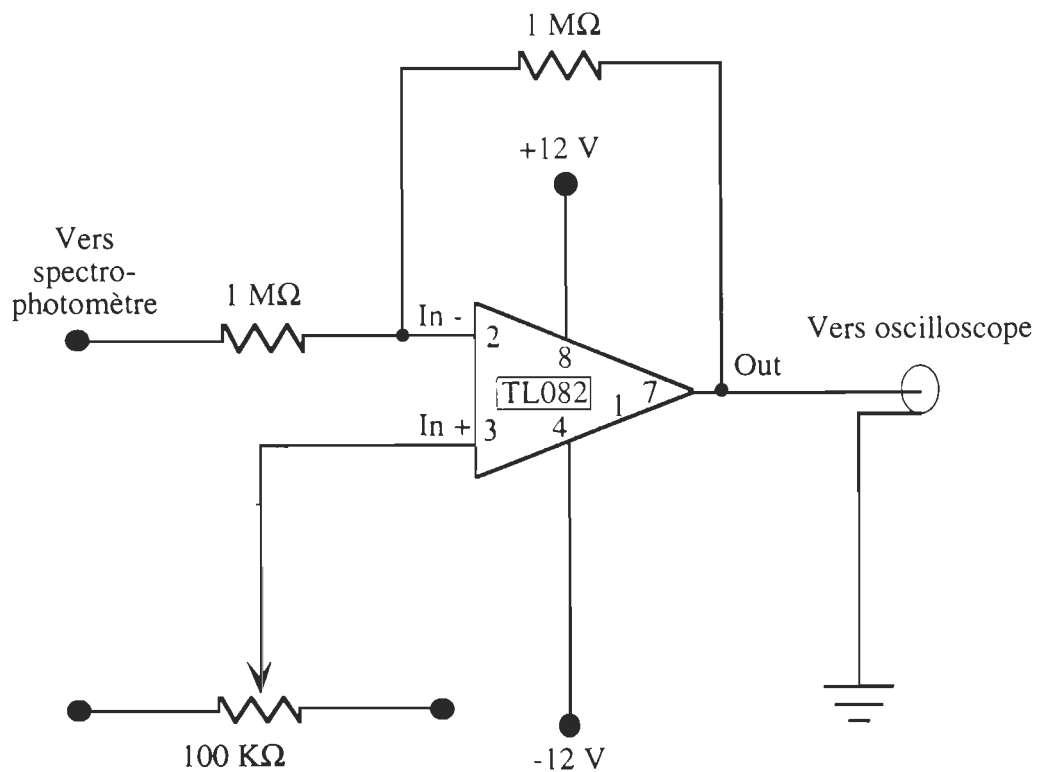
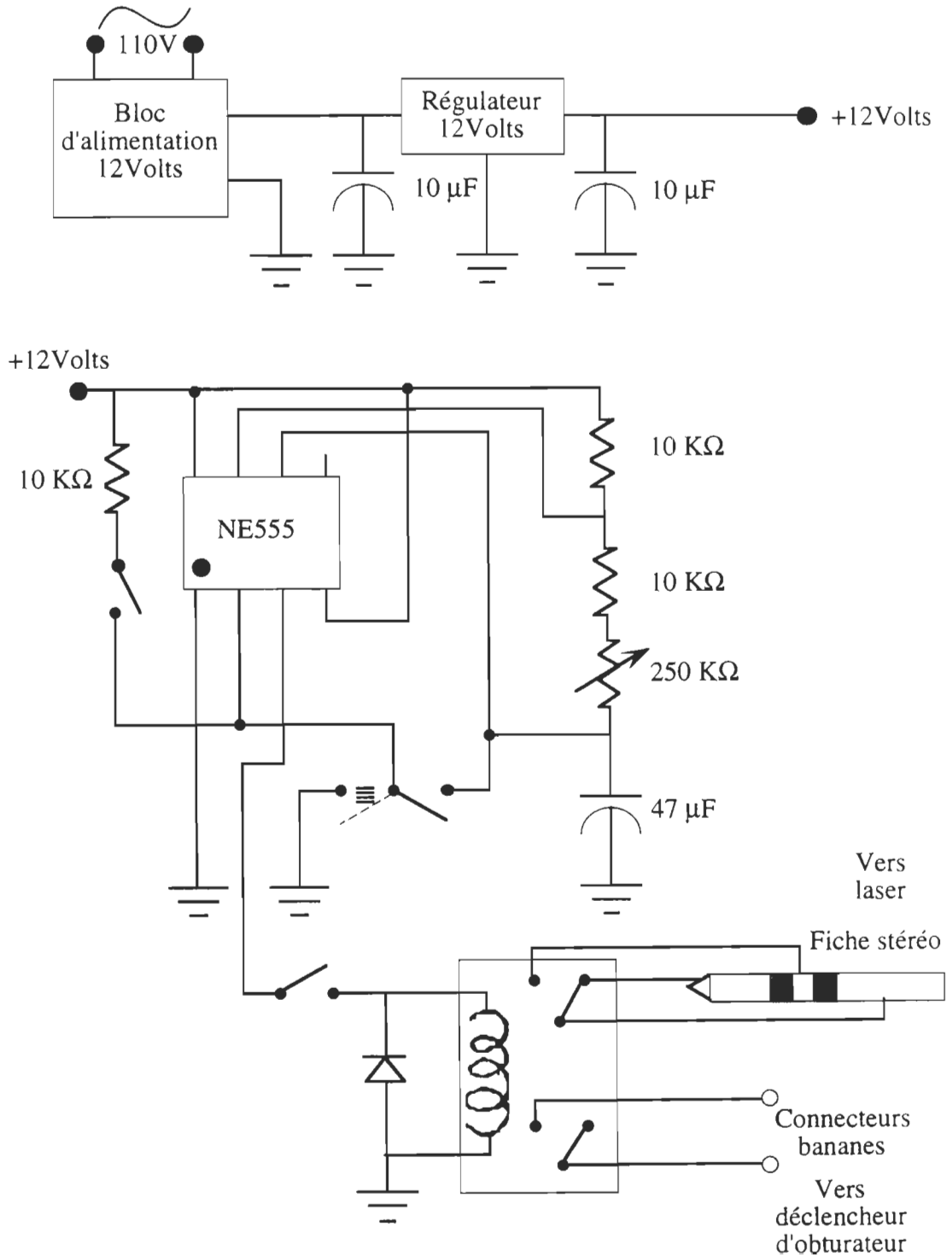
Figure 2.3**Amplificateur d'ajustement de niveau.**

Figure 2.4

Déclencheur et synchroniseur de l'obturateur.



2.7 Spectre d'action.

Le spectre d'action consiste à enregistrer l'activité photoélectrique des dépôts des membranes pourpres déposées en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Nous utilisons la méthode des photocourants en régime continu (section 2.6) pour enregistrer l'activité photoélectrique et nous effectuons les mesures entre 430 nm et 650 nm, par sauts de 20 nm. Le signal est normalisé pour l'intensité incidente de la lampe à arc.

Après que l'enregistrement des photocourants en régime continu pour chaque longueur d'onde soit fait, nous recueillons la valeur du courant maximum pour chacune de ces longueurs d'onde. Pour obtenir le spectre d'action il suffit maintenant de porter en graphique les valeurs maximales des courants en fonction de leur longueur d'onde d'excitation. La courbe ainsi obtenue nous donne donc l'activité photoélectrique de la bactériorhodopsine en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

2.7.1 Procédure de normalisation pour l'intensité incidente de la lampe à arc.

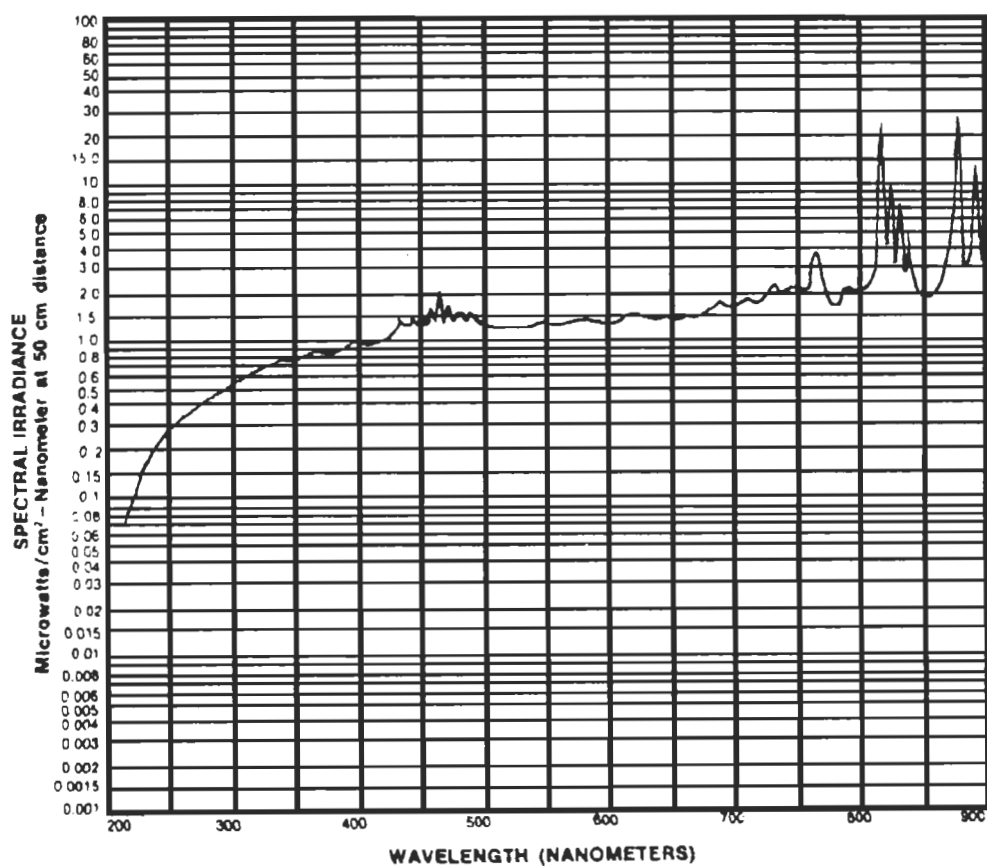
La lampe à arc n'ayant pas une intensité constante en fonction de la longueur d'onde, il est nécessaire de procéder à une correction lorsque nous voulons comparer les spectres entre eux. La figure 2.5 montre cette variation de l'intensité de la lampe à arc en fonction de la longueur d'onde (spectre expérimental fourni par le fabricant). Pour faire les corrections d'intensité il suffit de normaliser l'intensité du photocourant pour l'intensité incidente en fonction de la longueur d'onde. La correction ainsi faite nous autorise à faire des comparaisons entre les différents résultats.

Figure 2.5

Intensité de la lampe à arc en fonction de la longueur d'onde.

Lampe au Xénon 150 Watts.

(Spectre expérimental fournit par le fabricant.)



2.8 Photocourant transitoire.

L'étude des photocourants transitoires consiste à observer la réponse photoélectrique de la bactériorhodopsine après une brève excitation laser qui, dans notre cas, est de 10 ns. Ainsi, après l'éclair laser, la bactériorhodopsine entame son photocycle et nous enregistrons les différentes cinétiques de photocourant relié à ce photocycle.

Pour ce faire, la membrane pourpre est déposée sur une électrode de platine selon les différentes techniques élaborées plus haut (voir section 2.4). Ensuite, l'électrode est montée dans la cellule décrite par la figure 2.1 et placée à l'intérieur d'une double boîte de blindage en guise de cage de Faraday (voir figure 2.9). Le schéma global du montage est représenté par la figure 2.6 et se décrit comme suit.

L'impulsion laser est produite par un laser de type néodyme YAG pulsé (Q-switched) de la compagnie JK Laser System 2000. Nous utilisons la seconde harmonique à 532 nm comme source d'excitation dont l'énergie est approximativement de 70 mJ avec une impulsion de 10 ns à mi-hauteur. Le diamètre du faisceau est de 4 mm. Le faisceau du laser est dévié à 90 degré par un prisme et pénètre par le haut de la boîte de blindage où est situé l'échantillon. Le faisceau arrive par la partie supérieure de la cellule où un orifice lui est destiné. Ainsi, pour éviter de trop forts courants dus à l'effet photoélectrique, la lumière laser ne frappe donc pas de plein fouet l'électrode de platine sur laquelle est déposée la bactériorhodopsine. La lumière arrive par diffusion et réflexion sur les parois de la cellule.

Le signal électrique produit par la bactériorhodopsine est recueilli par un amplificateur de courant-voltage de 100 ou 300 MHz (Analog Modules Inc., modèle 342A) à l'intérieur de la boîte de blindage, et redirigé pour acquisition vers deux oscilloscopes Nicolet 4094 et 4094C. Ces deux derniers appareils ont des vitesses respectives d'échantillonnage maximum de 500 et 5 nanoseconde par point. Le tout est finalement transféré par un port série RS232 sur un ordinateur Macintosh IIci où sont traités tous les résultats à l'aide du logiciel IGOR PRO 3 qui sert aussi d'interface d'acquisition. La méthode numérique utilisée pour l'ajustement des modèles mathématiques (somme d'exponentielles) aux signaux expérimentaux, est un moindre carré non linéaire intégré au

logiciel IGOR.

Un déclencheur optique, monté à l'intérieur du laser, synchronise le début de l'enregistrement des oscilloscopes avec le tir laser (voir figure 2.7). De plus, un dispositif permettant d'effectuer plusieurs tirs laser à des intervalles de temps réguliers nous permet de moyenner plusieurs enregistrements pour augmenter le rapport signal sur bruit (voir figure 2.8).

Figure 2.6

Schéma de montage pour photocourant transitoire.

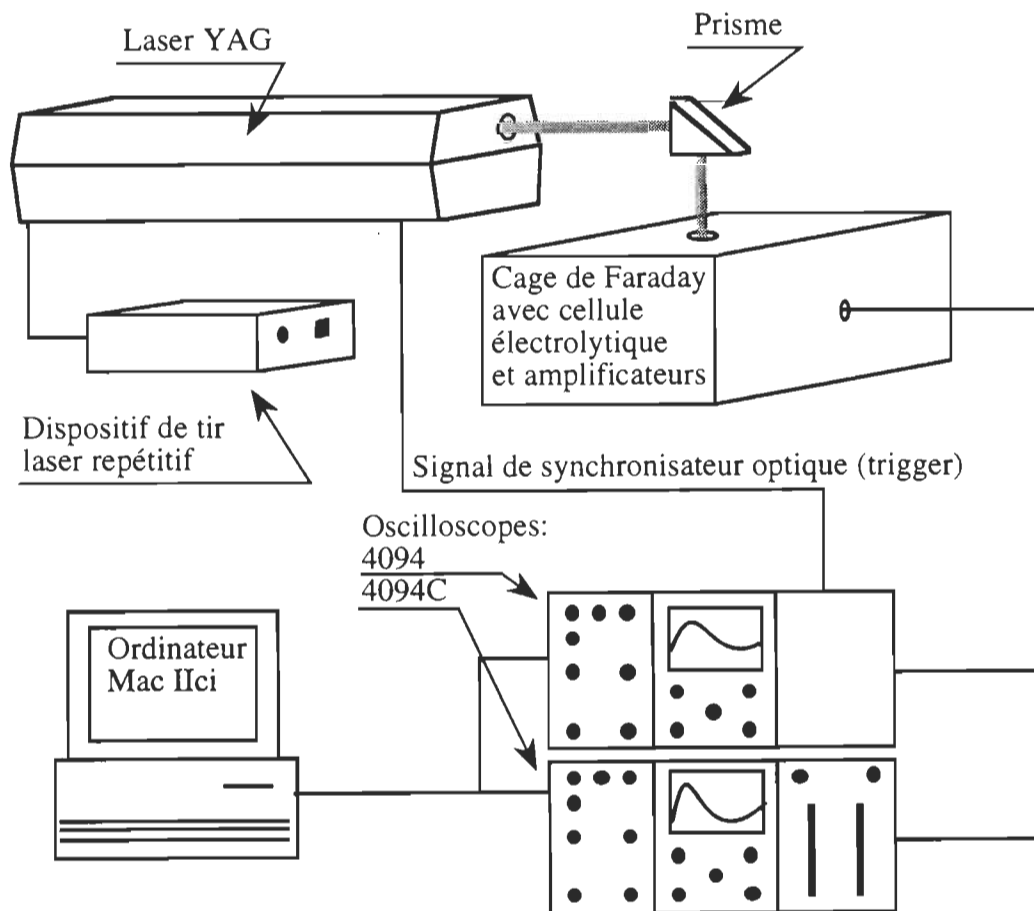


Figure 2.7
Synchroniseur optique.

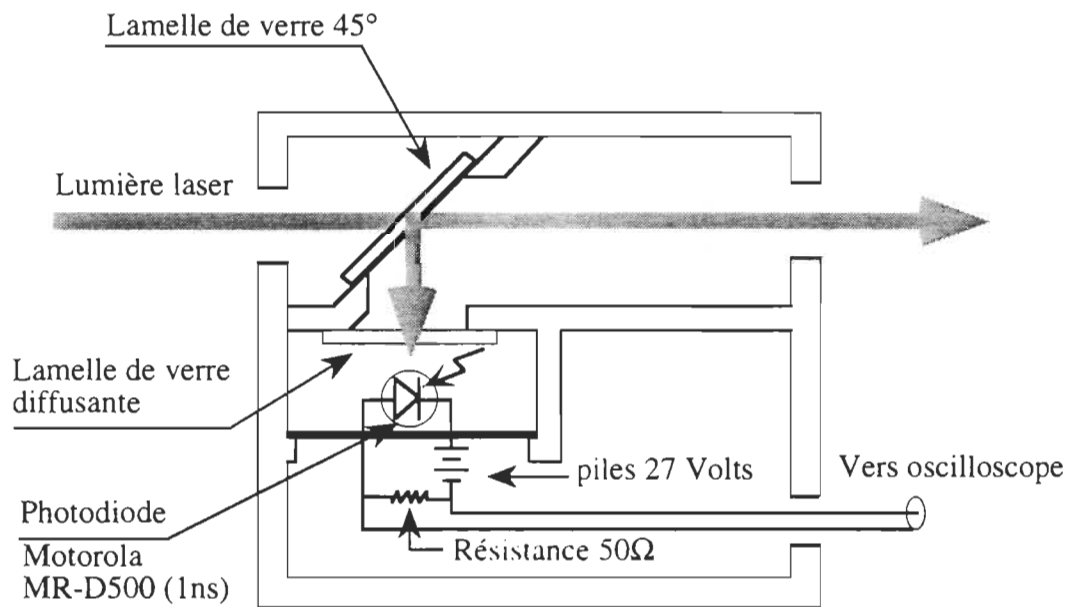
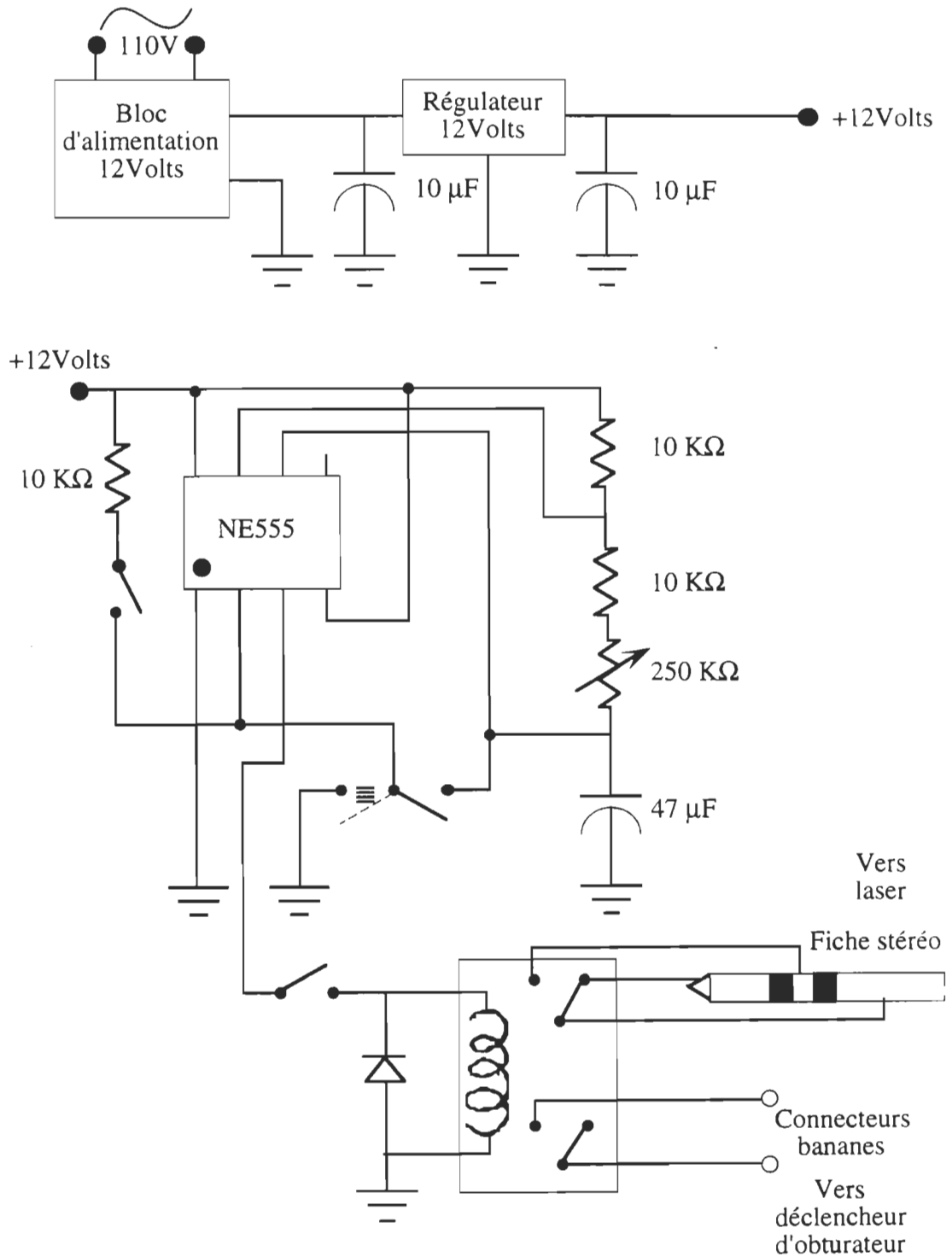


Figure 2.8

Dispositif de tir répétitif du laser.



Maintenant, regardons en détails à partir de la figure 2.9 le contenu des boîtes de blindage servant de cages de Faraday. Ces boîtes sont le coeur du montage car elles contiennent l'échantillon et sa cellule électrolytique, ainsi que les amplificateurs rapides (convertisseurs courant-voltage). De plus, la double cage de Faraday que constituent ces deux boîtes est indispensable pour diminuer le bruit électromagnétique parasite sur les signaux.

Le schéma de la figure 2.9 est une vue en coupe du dessus des boîtes de blindage. Pour se situer, le faisceau laser arrive par le dessus des boîtes comme s'il pénétrait dans la feuille de la figure pour s'introduire dans la cellule par le haut. Nous avons dû faire une double cage de Faraday (double blindage) pour isoler l'entrée de l'amplificateur de sa sortie contre les bruits électromagnétiques. Ainsi, l'entrée de l'amplificateur est à l'intérieur de la boîte interne où se trouvent la cellule et son échantillon. De l'autre côté, à l'intérieur de la grande boîte, se trouve le reste de l'amplificateur et le système d'alimentation par pile. La grande boîte externe isole donc l'amplificateur et son alimentation contre les bruits externes. Mentionnons qu'il n'y a qu'un seul point de mise à la terre de tout le système qui se fait au point d'acquisition avec l'oscilloscope.

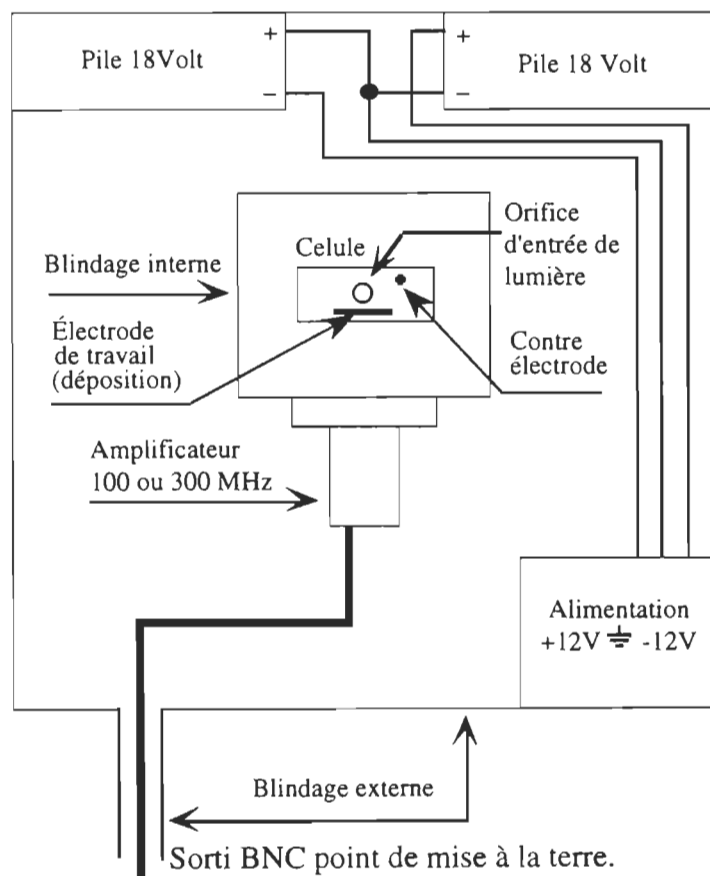
Dans une expérience type nous débutons par l'enregistrement du comportement à vide de la cellule électrolytique. Nous entendons par ceci, l'enregistrement du signal photoélectrique généré par les électrodes de platine nues, (sans déposition de membranes pourpres), baignant dans la solution électrolytique de KCl 100 mM. Ce signal sera la référence à vide de la cellule qui devra être soustraite des signaux obtenus avec les différentes dépositions de membranes pourpres. Dans un deuxième temps, la cellule est retirée du système et une déposition de membranes pourpres est effectuée sur l'électrode de platine de travail. Par la suite, la cellule est remontée et remise en place avec ses électrodes et son contenu en électrolyte.

Pour chaque manipulation, qu'elles soient à vide ou avec une déposition, les cages de Faraday sont fermées et l'enregistrement des signaux se fait consécutivement par l'intermédiaire de deux combinaisons d'acquisition. En effet, nous utilisons en alternance deux combinaisons "amplificateur et oscilloscope". La premier ensemble, le plus rapide,

est composé de l'amplificateur 300 MHz et de l'oscilloscope 4094C dont la vitesse est de 5 ns par points. Le deuxième ensemble est par conséquent moins rapide et constitué de l'amplificateur 100 MHz et de l'oscilloscope 4094 à 0.5 μ s par point. Finalement tous les signaux sont acheminés par une interface série vers un ordinateur où ils sont soustraits des tirs de références et traités numériquement.

Figure 2.9

Schéma interne des cages de Faraday (blindage électromagnétique).



2.8.1 Réponse du système (amplificateur-cellule).

Les convertisseurs courant-voltage que nous utilisons sont des amplificateurs très rapides ayant des bandes passantes de 0 à 100 MHz et de 0 à 300 MHz. Dans des conditions optimales, en accord avec les spécifications du fabricant, ces amplificateurs sont largement suffisants pour faire l'acquisition et suivre parfaitement l'évolution en temps réel de nos signaux. En effet, puisque nous utilisons un laser dont la durée de l'impulsion est de 10 ns, notre système sera aveuglé pendant ce temps. Ainsi, dans le meilleur des cas, nous pouvons observer les événements au-delà de 10 ns, ce qui représente des phénomènes de moins de 100 MHz.

Mais nous ne sommes pas dans des conditions idéales de couplage entre les amplificateurs et la cellule électrolytique. Dans ces conditions, les amplificateurs ne peuvent répondre aux caractéristiques du fabricant et ils entrent en oscillation pendant un certain laps de temps, ce qui a pour effet de diminuer leurs bandes passantes effectives. Or, pour évaluer la réponse des amplificateurs couplés à la cellule électrolytique, nous avons procédé à une excitation du système à partir d'une photodiode comme le montre la figure 2.10. Dans ce schéma, l'amplificateur est connecté à la cellule comme dans une expérience type. Mais, contrairement aux manipulations normales, la génération de courant n'est pas produite par une déposition de membrane pourpre dans la cellule électrolytique, mais plutôt par une photodiode très rapide (Motorola MR-D500) dont le temps de montée est de 1 ns. La rapidité de cette photodiode nous permet de générer un signal électrique aussi rapide que l'impulsion laser, tout en gardant les caractéristiques électriques de notre cellule couplée à l'amplificateur. Pour éviter toute génération de courant produite par la cellule, un masque totalement opaque à la lumière est disposé de telle sorte qu'aucune lumière (laser ou autre) ne puisse atteindre la cellule électrolytique.

Les signaux obtenus de ce montage avec les deux amplificateurs sont montrés à la figure 2.11. Ces résultats nous montrent bien que les amplificateurs sont en oscillation pendant un certain temps durant lequel toute mesure est non significative. À partir de 100 ns pour l'amplificateur à 300 MHz et de 200 ns pour l'amplificateur à 100 MHz, les oscillations sont terminées et le signal peut être considéré comme valable.

Figure 2.10

Schéma de montage pour réponse des amplificateurs.

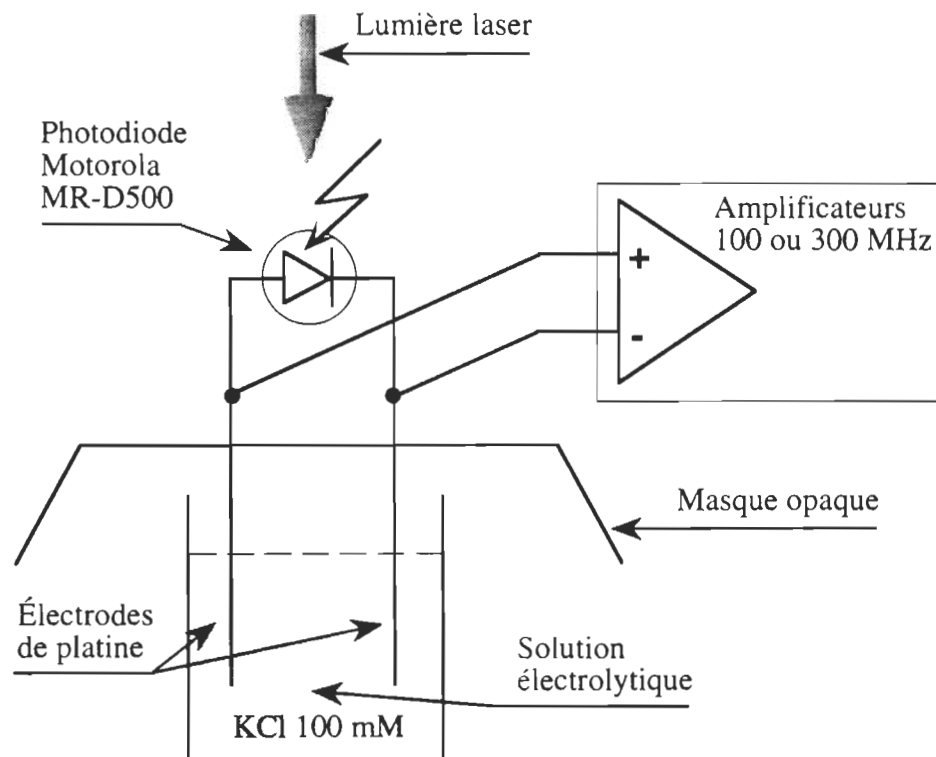
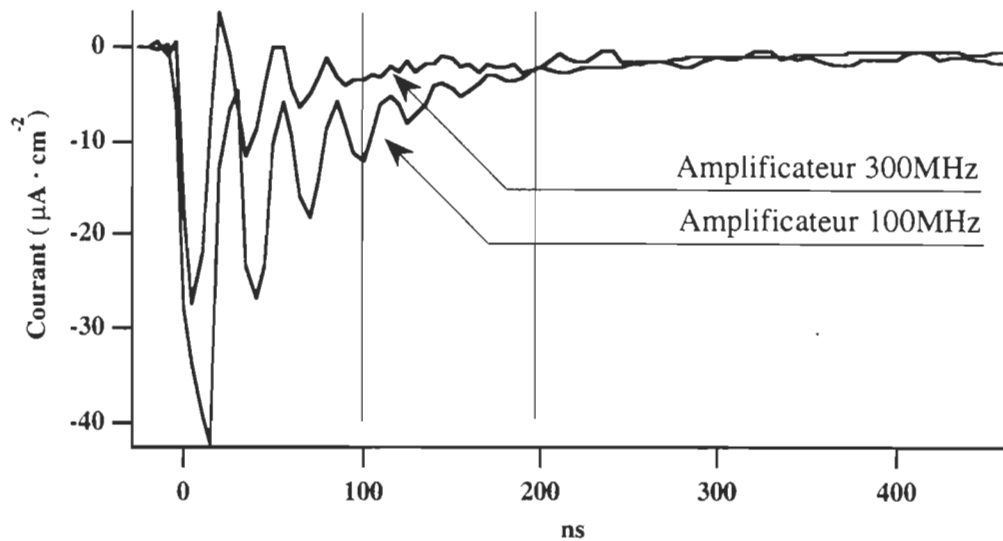


Figure 2.11

Réponse du système amplificateur-cellule.



Ces résultats sont très importants pour nos analyses cinétiques futures. Ainsi nous ne considérerons pas les échantillonnages de signaux en deçà des limites d'oscillation de chaque amplificateur. Pour ce qui est de nos ajustements de courbes, les constantes de temps inférieures à 100 ns ou 200 ns, selon le choix de l'amplificateur, ne seront pas étudiées.

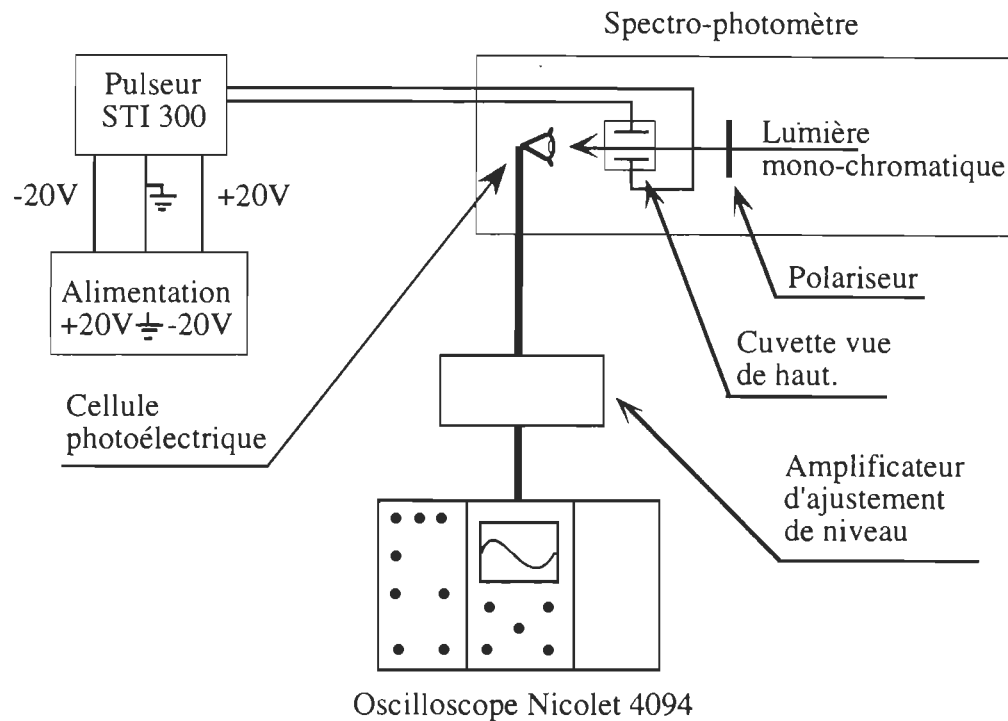
2.9 Dichroïsme électrique.

La méthode de dichroïsme électrique nous permet d'observer les variations d'absorption de la bactériorhodopsine en lumière polarisée, en fonction de son orientation. En lumière non polarisée, les probabilités d'absorption d'un photon par le chromophore d'une bactériorhodopsine sont toutes égales. Par contre, en lumière polarisée, les probabilités d'absorption d'un photon par un chromophore augmentent avec le degré de parallélisme de ce dernier avec la lumière. Ainsi, une solution de bactériorhodopsine non orientée, verra son absorption de lumière augmentée, au fur et à mesure que l'on orientera

ces dernières de telle sorte que leur chromophore devienne parallèle au plan de la lumière. Inversement, il y aura diminution de l'absorption si nous orientons les bactériorhodopsines de telle sorte que leur chromophore soit perpendiculaire au plan de la lumière.

Figure 2.12

Schéma pour dichroïsme électrique.



La méthode consiste donc à utiliser un spectrophotomètre (Pye Unicam) dont nous polarisons la lumière pour mesurer l'absorbance d'un échantillon de bactériorhodopsine. L'échantillon de bactériorhodopsine est dans une cuvette de quartz de 1 cm par 1 cm de côté dans laquelle se trouvent deux électrodes de platine disposés parallèlement à la propagation du faisceau d'analyse (voir figure 2.13). Ces deux électrodes nous serviront à appliquer un champ électrique servant à l'orientation de la bactériorhodopsine en mettant à profit le dipôle électrique permanent de la membrane pourpre. Le champ électrique sera appliqué

pendant 200 milisecondes avec une différence de potentiel de 15 volts et ce, à l'aide d'un générateur d'impulsion (STI 300, ScienTech International Inc.). Le signal d'absorption du spectrophotomètre sera recueilli à travers un amplificateur d'ajustement de niveau (voir figure 2.14) puis redirigé vers un oscilloscope Nicolet 4094. Notons que le générateur d'impulsions produit aussi un signal de synchronisation servant au déclenchement de l'enregistrement de l'oscilloscope.

Figure 2.13
Cellule de dichroïsme.

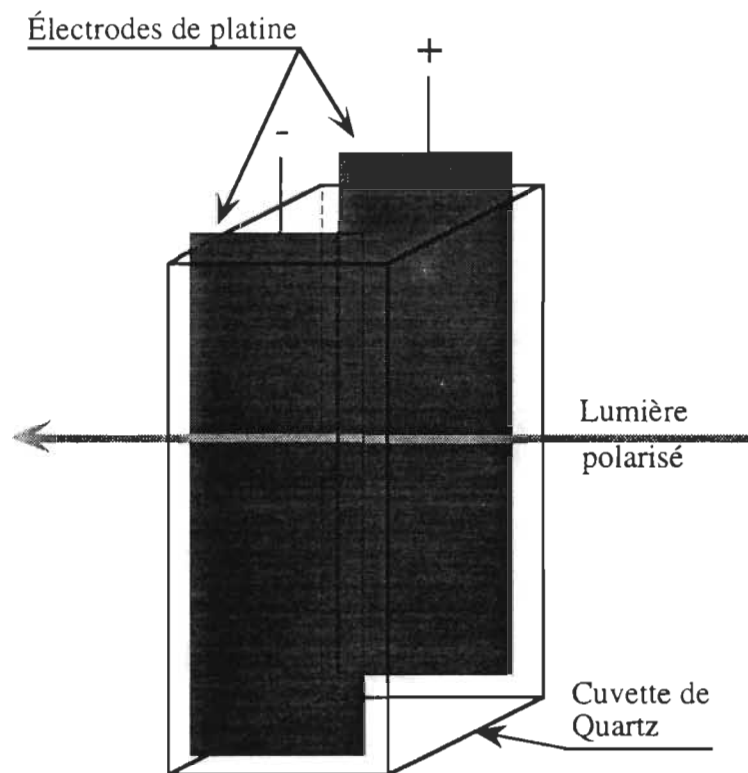
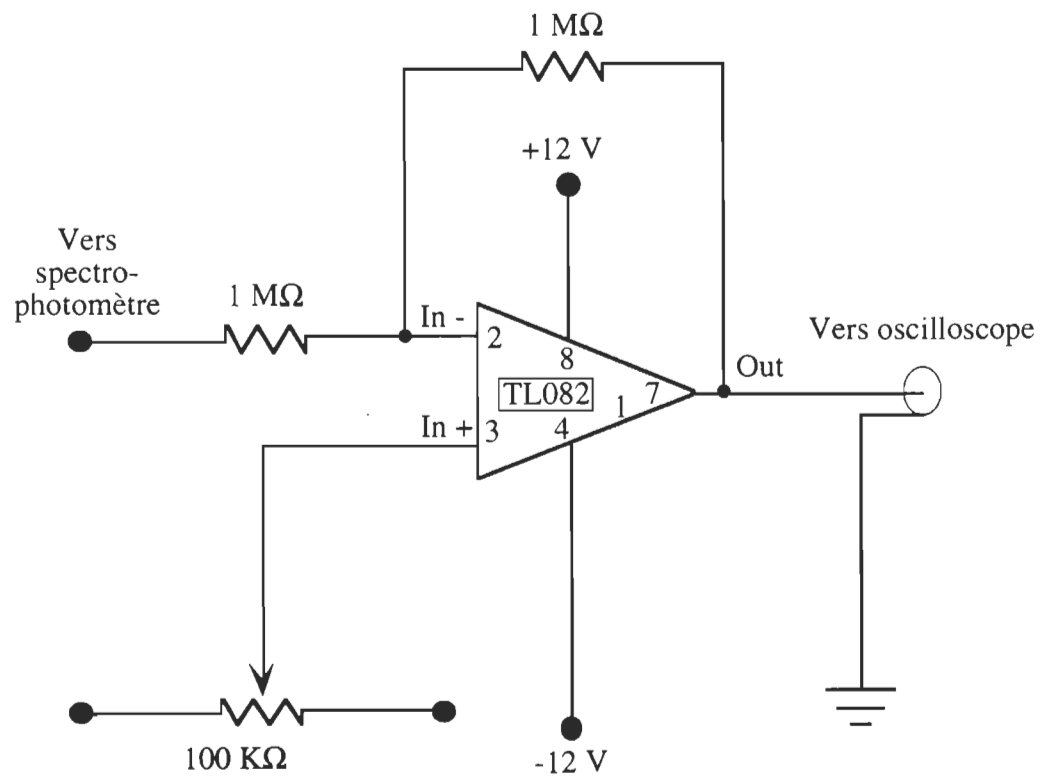


Figure 2.14

Amplificateur d'ajustement de niveau.



2.10 Photolyse éclair

La photolyse éclair permet d'observer les variations d'absorption d'un échantillon photochimiquement sensible après une brève excitation lumineuse. La technique consiste à placer un échantillon à la croisée de deux faisceaux lumineux (voir figure **2.15**). Dans notre cas, l'échantillon est constitué de membranes pourpres en solution à l'intérieur d'une cuvette de quartz qui est placée dans un porte échantillon approprié. L'un des deux faisceaux lumineux est le faisceau actinique servant à exciter de façon très brève l'échantillon et initier des changements photochimiques. Le deuxième rayonnement lumineux est le faisceau d'analyse. Ce dernier est monochromatique et passe en continu à travers l'échantillon pour être récupéré par une photodiode. La lecture des courants produits par la photodiode nous renseigne sur les variations d'intensité lumineuse transmise à travers l'échantillon tout au long de son processus photochimique.

Voyons plus en détails le schéma de montage en se référant à la figure **2.16**. Nous utilisons un laser de type YAG pulsé comme faisceau actinique (JK Laser System 2000). Le faisceau de 4 mm de diamètre a une longueur d'onde de 532 nm et la durée de l'impulsion est de 10 ns avec une énergie de 70 mJ. Le faisceau d'analyse est produit par une lampe à arc au Xénon de 150 Watts (Photon Technology Inc.) reliée à un monochromateur (Photon Technology Inc., N° 01-002). Une lentille convergente permet de diriger le faisceau d'analyse à travers l'échantillon et de le faire converger vers la photodiode. Entre la sortie du monochromateur et le porte échantillon se trouve un obturateur électromécanique (Uniblitz modèle 225L). Avant le déclenchement du faisceau actinique, l'obturateur s'ouvre pour laisser passer le faisceau d'analyse à travers l'échantillon puis vers la photodiode. Après le déclenchement du faisceau actinique, l'intensité détectée par la photodiode variera dans le temps selon la nature et la vitesse des variations d'absorbance engendrées dans l'échantillon. Afin que la photodiode ne soit pas aveuglée par la lumière du laser (faisceau actinique) diffusée par l'échantillon, un filtre holographique 532 nm est placé devant la photodiode. La photodiode est couplée à un amplificateur courant-voltage dont nous pouvons voir le plan à la figure **2.17** ainsi que le schéma de blindage à la figure **2.18**. Finalement les signaux sont acheminés vers des

oscilloscopes Nicolet 4094 et 4094C et le tout est synchronisé à partir du pulse laser par un synchronisateur (trigger) optique (voir figure 2.7, section 2.8).

Figure 2.15

Principe de la photolyse éclair.

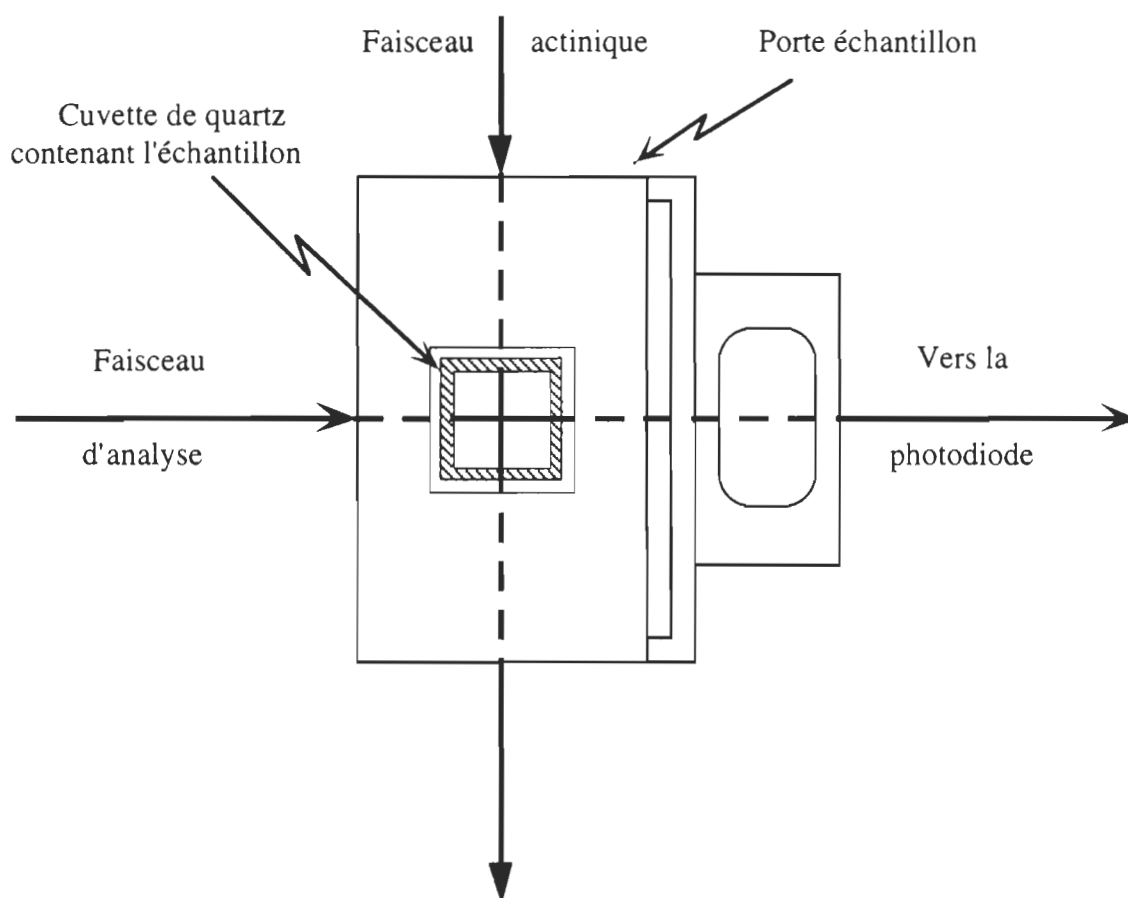


Figure 2.16

Schéma de montage de la photolyse éclair.

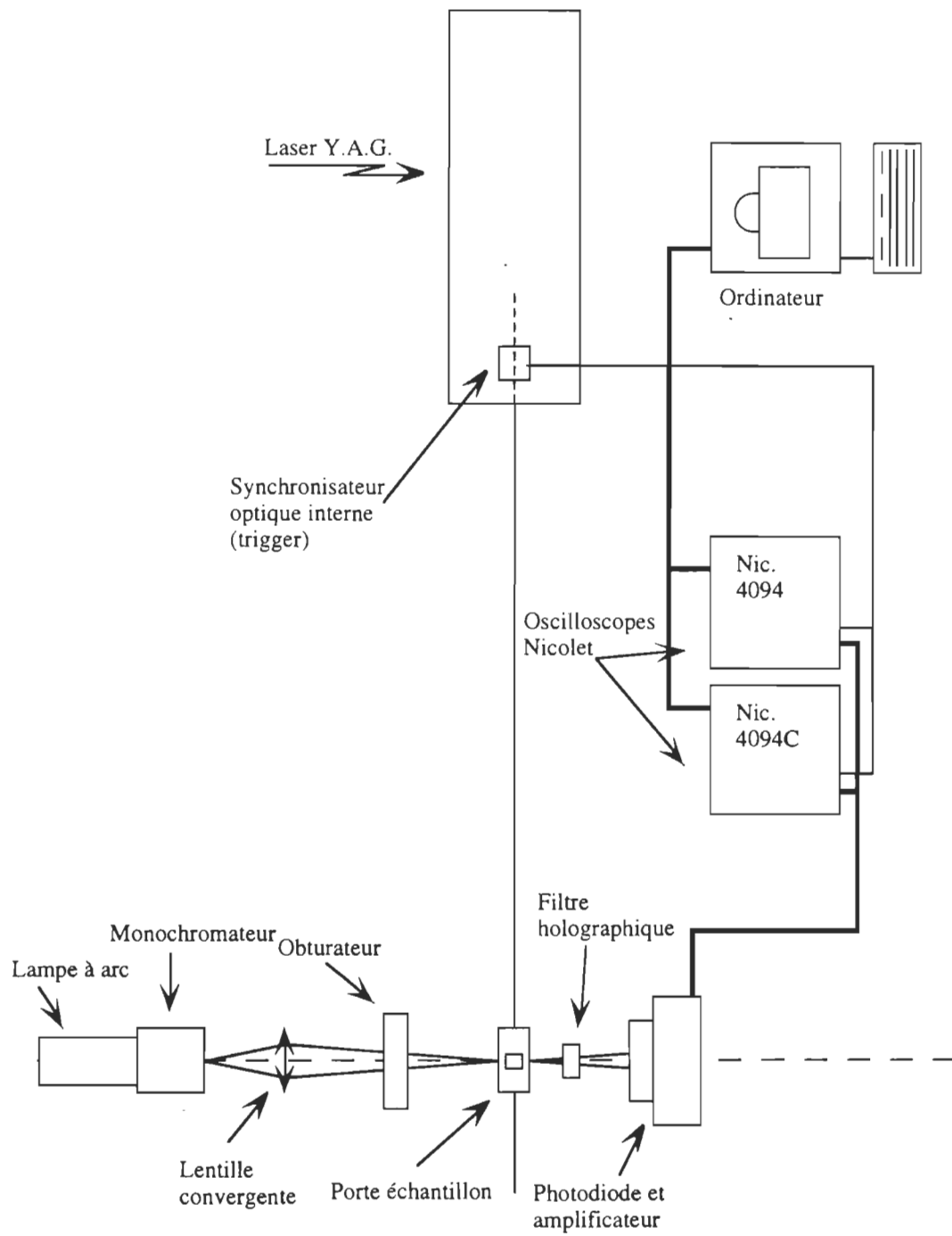


Figure 2.17

Amplificateur courant-voltage de la photolyse éclair.

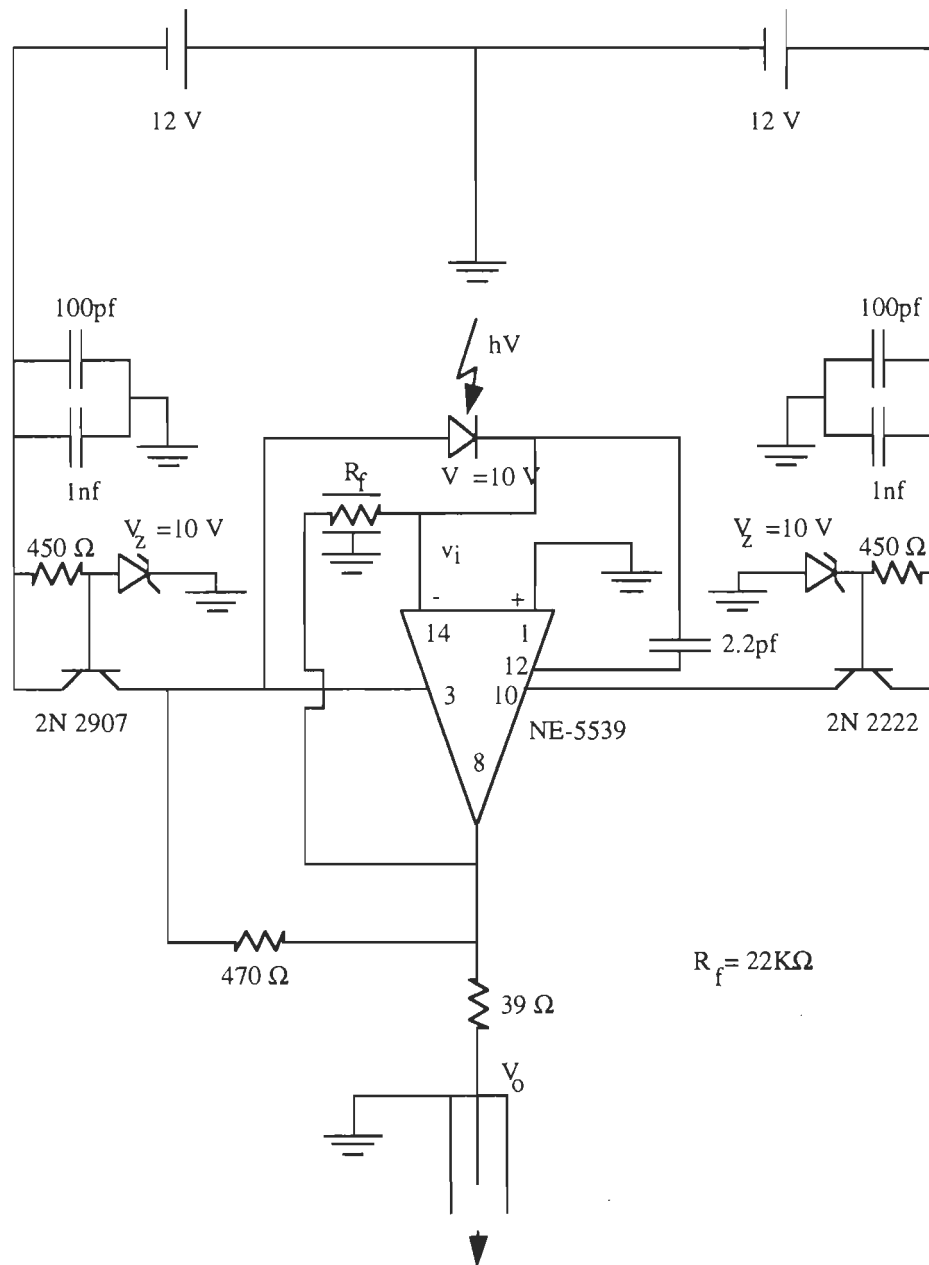
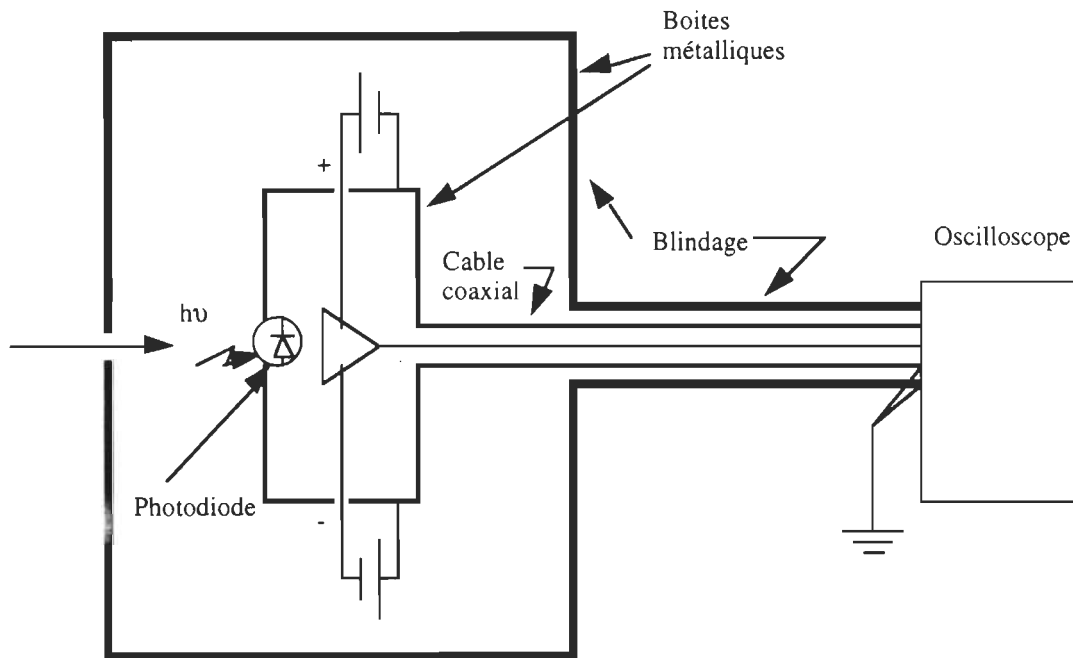


Figure 2.18

Schéma de blindage de la photolyse éclair.



Chapitre 3

Précisions sur les photocourants de la bactériorhodopsine

3 Précisions sur les photocourants de la bactériorhodopsine.

3.1 Définition des photocourants en régime continu et transitoire.

Avant d'aborder ce chapitre, il est nécessaire de définir ce que nous entendons par photocourant en régime continu et photocourant transitoire. Nous avons déjà discuté dans le chapitre matériel et méthodes (sections 2.6 et 2.8) des schémas de montage et des protocoles utilisés pour obtenir ces deux types de photocourants. Nous allons maintenant expliquer la différence fondamentale qui existe entre ces deux manières de recueillir les photocourants produits par la bactériorhodopsine.

Tout d'abord, nous parlons de photocourants produits par l'illumination de la bactériorhodopsine. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce travail, la bactériorhodopsine capte l'énergie lumineuse et utilise cette énergie pour transporter un proton de son côté cytoplasmique à son côté extracellulaire. Le courant produit par ce transport de protons est recueilli avec une cellule électrolytique que nous avons décrite à la section 2.3 du chapitre précédent. Pour produire ces courants, nous éclairons la membrane pourpre (contenant la bactériorhodopsine) de deux façons différentes.

1- La première façon consiste à irradier la bactériorhodopsine avec une source lumineuse monochromatique de façon continue, d'où le nom de photocourant en régime continu. Dès le début de l'illumination, les bactériorhodopsines que contient la membrane pourpre absorbent des photons et amorcent leur cycle photolytique et leur pompage de protons. Après un cycle complet, les bactériorhodopsines sont de nouveau prêtes à recommencer. Étant donné que l'éclairage persiste sur une période de temps beaucoup plus longue que le cycle de la bactériorhodopsine, ces dernières ne cesseront d'entamer de nouvelles séquences de pompage tant qu'il y aura irradiation. Le photocourant que nous observons dans ce cas est donc l'intégration de tous les photocourants produits par les bactériorhodopsines pendant toute la durée de l'illumination.

2- La deuxième façon de faire pour obtenir des photocourants, c'est de procéder à une irradiation très brève de la bactériorhodopsine afin que ces dernières ne puissent effectuer qu'un seul cycle photolytique de pompage et de manière synchronisée. De cette

façon nous pouvons observer le déplacement des protons et leur courant associé et ce, à travers les différents états transitoires du cycle de la bactériorhodopsine, d'où le nom de photocourant transitoire. Les étapes discrètes du pompage des protons dans la bactériorhodopsine peuvent ainsi être discriminées et leurs cinétiques analysées.

Dans le chapitre suivant, nous séparerons donc nos résultats sous deux grands thèmes correspondant à ces deux façons d'observer les photocourants générés par la bactériorhodopsine. Ces thèmes seront donc: photocourants en régime continu et photocourants en régime transitoire.

3.2 Revue des photocourants de bactériorhodopsine obtenus par divers procédés de déposition.

Dans cette section, nous proposons de faire une revue de la littérature récente traitant spécifiquement des photocourants de bactériorhodopsine obtenus par déposition de membrane pourpre sur électrode de travail à l'intérieur d'une cellule électrolytique. Les différentes méthodes de déposition utilisées sont: Langmuir-Blodgett, séchage et électrodéposition. À la suite des interprétations des différentes équipes que nous présenterons, nous ferons état des travaux déjà effectués dans notre laboratoire sur ce sujet.

3.2.1 État de la question.

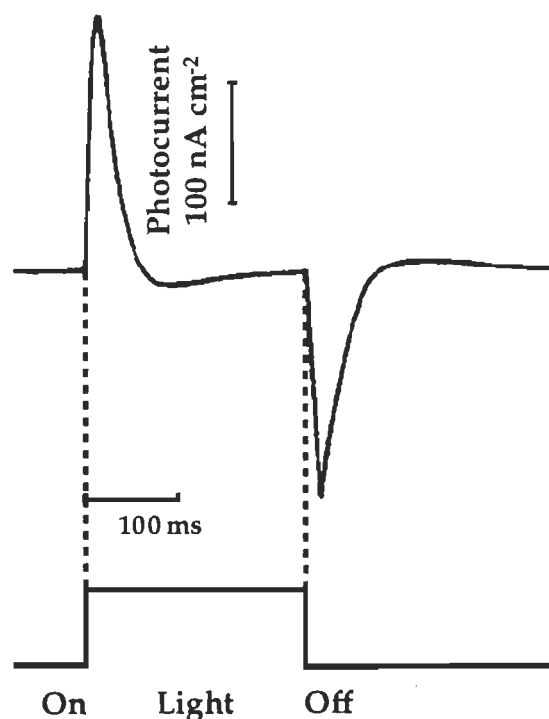
Des travaux récents sur les photocourants en régime continu ont été effectués principalement par deux laboratoires, l'un japonais, l'autre américain (Miyasaka et Koyama, 1991, 1992, Miyasaka et al., 1992, Koyama et al., 1994 et Robertson et al., 1995). Notons que nous n'avons pas répertorié de travaux sur les photocourants transitoires de membrane pourpre déposé. Les seuls résultats fiables à ce jour sont obtenus par immobilisation dans des gels de polyacrilamide, nous y reviendrons au chapitre 4. Débutons cette discussion par les travaux de Miyasaka et Koyama.

3.2.1.1 Travaux de l'équipe de Miyasaka et Koyama.

Miyasaka et Koyama ont observé des photocourants de membrane pourpre en utilisant une cellule électrochimique tout à fait comparable à celle que nous décrivons pour ce travail à la section 2.3 de matériel et méthode. Ils déposaient la membrane pourpre sur des électrodes de SnO_2 à partir de monocouches de Langmuir-Blodgett. Les membranes pourpres ainsi déposées étaient orientées de façon aléatoire puisque, selon les auteurs, les monocouches ne privilégient aucune orientation spécifique¹. L'électrode recouverte de membranes pourpres était ensuite placée à l'intérieur de leur cellule avec un électrolyte de gel aqueux. À l'illumination de la membrane pourpre, ils obtinrent le signal type suivant.

Figure 3.1

Signal type des photocourants en régime continu, obtenu par Miyasaka et al., 1991. Six monocouches déposés sur SnO_2 , électrolyte de gel aqueux: carboxyméthylchitine 6%, KCl 1 M.



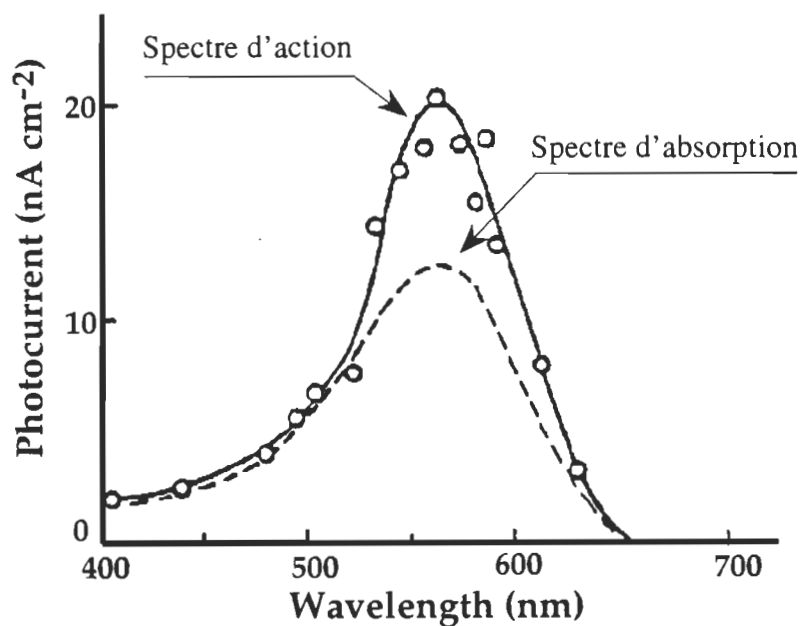
1. Contrairement aux prétentions de Lemmetyinen (Ikonen et Lemmetyinen, 1995) qui a montré qu'il était possible d'orienter les membranes pourpres sur une électrode en les transférant à partir d'un film monomoléculaire préparé à l'interface air-eau. A cet égard, des travaux menés dans notre groupe n'ont pas réussi à confirmer une telle orientation (Méthot et al., 1996).

Les auteurs expliquent leurs résultats en associant les photocourants positifs et négatifs au pompage de protons de la bactériorhodopsine. L'évaluation des taux de relaxation des signaux permet de relier ce phénomène au temps de passage de l'intermédiaire K à l'intermédiaire M du cycle de la bactériorhodopsine soit 300 μ s. De plus, le spectre d'action du photocourant (voir figure 3.2) est directement relié au spectre d'absorption de la bactériorhodopsine.

Figure 3.2

Spectre d'action obtenu par Miyasaka et al., 1991.

Deux monocouches déposées sur SnO_2 , électrolyte de gel aqueux: carboxyméthylchitin 6%, KCl 1 M.



Ces deux dernières observations permettent bien de conclure à l'activité de pompage de la bactériorhodopsine comme étant responsable des signaux obtenus. Par contre, l'orientation aléatoire des membranes pourpres suppose un courant de pompage nul, car d'un point de vue statistique il y a autant de protons pompés dans un sens que dans l'autre. Les auteurs expliquent donc les photocourants observés par un courant rectifié à

l'interface de l'électrode de SnO₂ et de la membrane pourpre. Ainsi à l'interface SnO₂ membrane pourpre, un champ électrique se crée à l'intérieur de la jonction entraînant les protons libérés par les bactériorhodopsines à proximité de la jonction pour créer les courants observés.

Les auteurs vont plus loin dans leur recherche avec l'article de Koyama et al. en 1994, en orientant leurs dépôts Langmuir-Blodgett avec des anticorps. Jusqu'alors, les photocourants observés par les auteurs étaient obtenus avec des dépôts non orientés de membranes pourpres. La présence d'anticorps appropriés permet d'orienter les monocouches de membranes pourpres face à l'électrode du côté cytoplasmique ou extracellulaire lors de la déposition. De cette façon les auteurs ont pu observer les photocourants produits par des dépôts orientés. Leurs résultats sont présentés dans la figure 3.3 à la page suivante.

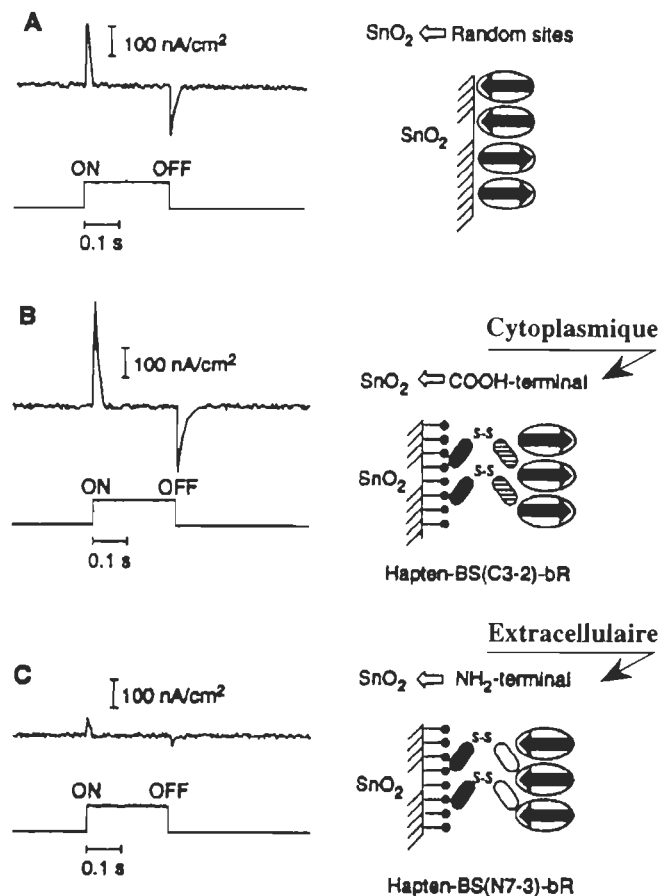
De ces résultats, les auteurs montrent qu'une orientation cytoplasmique des membranes pourpres augmente le photocourant observé par rapport à une orientation aléatoire. D'autre part, une orientation côté extracellulaire amène une quasi absence de photocourant. L'explication donnée de ces résultats est toujours basée sur un courant rectifié à la jonction SnO₂ membrane pourpre. Dans le cas d'une orientation côté cytoplasmique de la membrane pourpre, le pompage des protons se fait entièrement dans le même sens et amène un plus grand apport de proton vers la jonction. Ainsi un plus grand nombre de protons sont captés par le champ électrique de la jonction, produisant un courant plus important que dans le cas d'une orientation aléatoire. Au contraire, dans le cas d'une orientation extracellulaire, les protons sont pompés dans un même sens mais en s'éloignant de la jonction ayant pour effet de diminuer le nombre de protons disponibles à la production d'un courant rectifié à l'interface.

Malgré l'évidence de ces résultats, les explications tiennent peu compte du sens de pompage de la bactériorhodopsine. Ainsi pour le cas de l'orientation cytoplasmique, le sens du pompage se fait de l'électrode vers la solution. Contrairement à l'explication donnée, il y aurait moins de protons disponibles à la jonction SnO₂ membrane pourpre, diminuant ainsi le courant rectifié.

Figure 3.3

Photocourant avec et sans orientation, Koyama et al., 1994.

Une monocouche déposée sur SnO₂, électrolyte gel aqueux: carboxyméthylchitine 6%, KCl 1 M.



Pour palier à ce problème, l'auteur invoque l'existence d'un courant inverse au pompage de protons, relié à la séparation de charges due à l'isomérisation de rétinol au début du photocycle de la bactériorhodopsine. Mais ce courant inverse où la molécule emmagasine l'énergie lumineuse d'excitation, déplace des charges électriques internes à la molécule et ne met aucune charge libre en circulation à l'extérieur de la bactériorhodopsine. Or ces déplacements de charge ne peuvent apporter de protons afin de créer un courant rectifié.

Le même raisonnement s'applique pour l'orientation extracellulaire. Dans ce cas, le pompage de protons serait dans le sens adéquat pour produire un maximum de courant rectifié. Ce qui n'est pas le cas selon les résultats. Nous pouvons donc difficilement expliquer ces résultats seulement par la présence de courants rectifiés dus à la jonction SnO₂ membrane pourpre. Nous ne pouvons supposer non plus que la cellule soit sensible aux déplacements électrostatiques internes de la bactériorhodopsine car dans ce cas, le sens de l'orientation ne devrait pas affecter l'amplitude du signal mais seulement le moduler dans un sens ou dans l'autre. Finalement nous ne pouvons être assuré que la jonction rectifiante ne soit pas altérée par la présence d'anticorps sur l'électrode lors des orientations effectuées par les auteurs.

3.2.1.2 Travaux de Robertson et Lukashev.

Suite à ces critiques, nous aborderons maintenant le travail de l'équipe de Robertson et Lukashev qui publia en 1995 les résultats de travaux similaires à ceux de Miyasaka et Koyama. Ils amenèrent une autre façon d'expliquer les photocourants de la bactériorhodopsine qui tient compte des sens de pompage et des différentes conditions expérimentales. Ils travaillaient avec des électrodes de SnO₂ et des électrolytes de KCl à 100 mM tamponnés avec différents tampons 10 mM selon le pH désiré. La membrane pourpre était déposée sur leurs électrodes par électrodéposition (orientation cytoplasmique) ou tout simplement par séchage (absence d'orientation). Les photocourants observés, comme nous pouvons le voir sur la figure 3.4, sont tout à fait comparables à ceux de l'équipe de Miyasaka pour des conditions similaires.

L'originalité de leur travail vient surtout de leur interprétation des photocourants qui selon eux sont le résultat de changements de pH à la surface de l'électrode de travail. Ainsi les photocourants observés ne seraient pas une lecture directe du courant de protons dû au pompage de la bactériorhodopsine, mais plutôt une lecture des variations du nombre de protons (variation de pH) à la surface de l'électrode de travail dues au largage et à la capture de protons par la bactériorhodopsine. Les signaux seraient donc dus à un effet de surface et non de volume.

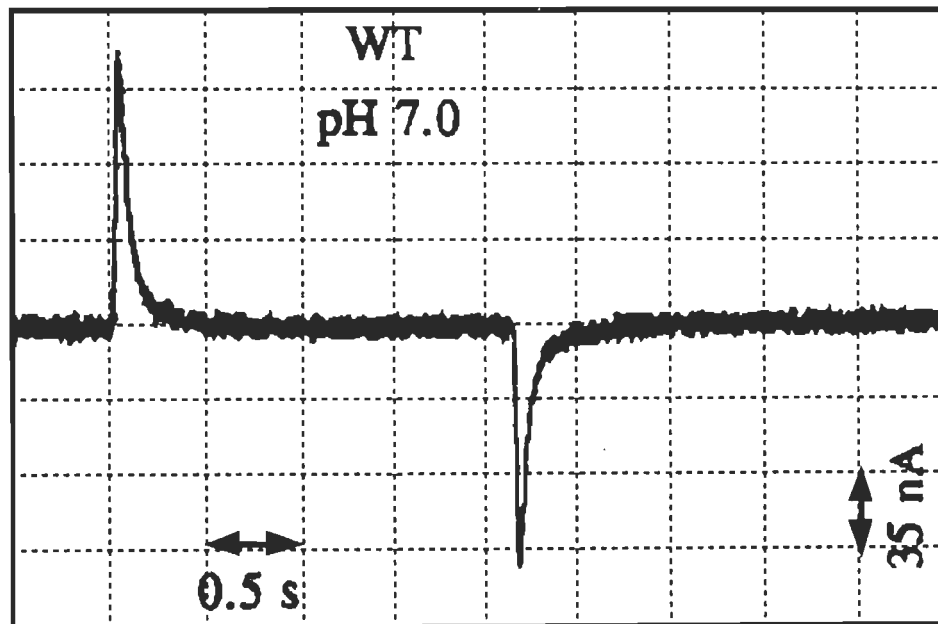
Selon leur interprétation, le photocourant de la figure 3.4 s'explique comme suit. À pH 7, la bactériorhodopsine effectue un cycle de pompage complet en larguant un proton de son côté extracellulaire avant d'en reprendre un autre de son côté cytoplasmique. Or dans le cas qui nous intéresse, les bactériorhodopsines sont orientées aléatoirement par séchage et vont donc dans un premier temps larguer leurs protons autant vers l'électrode de déposition qu'en s'éloignant de cette dernière. Puisque nous sommes dans le cas d'une orientation aléatoire, la moitié des protons éjectés par les bactériorhodopsines à la surface de l'électrode se retrouveront dans la solution du côté de l'électrode, entre celle-ci et les membranes pourpres déposées.

Figure 3.4

Signal type des photocourants en régime continu, obtenu par

Robertson et Lukashev, 1995.

**Membrane pourpre séchée, orientation aléatoire, électrolyte: KCl 100 mM, tampon sodium phosphate
10 mM pH7.**

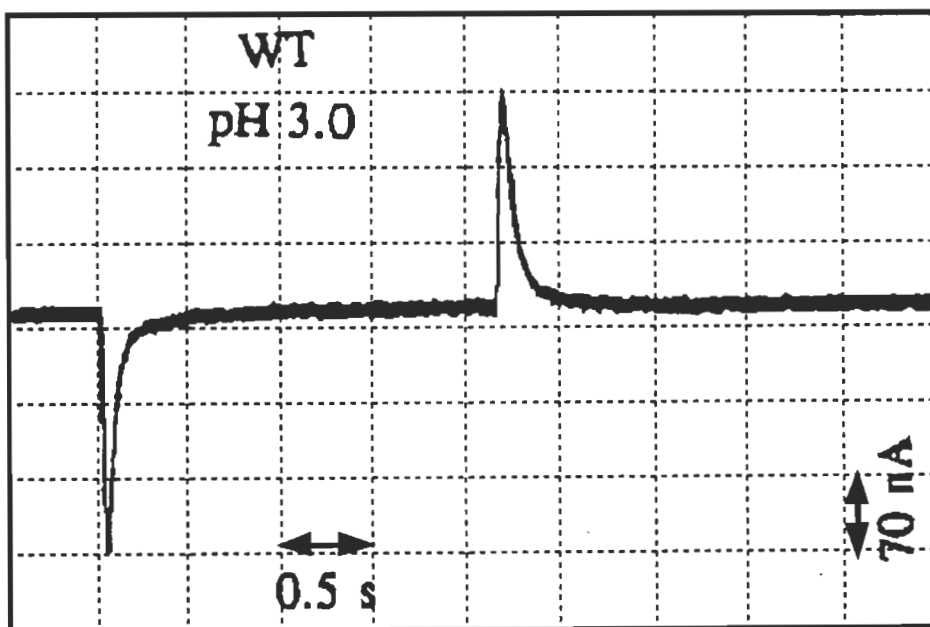


Ceci aura pour effet d'abaisser la valeur du pH à la surface de l'électrode de travail et d'ainsi créer l'apparition d'un courant positif. Puis les bactériorhodopsines poursuivant leur cycle, capteront des protons jusqu'à l'atteinte d'un équilibre entre les protons éjectés et ceux captés. De cette façon le pH reviendra à sa valeur de départ et il y aura retour du courant à zéro.

Robertson et Lukashev montrent aussi qu'il y a inversion du signal photoélectrique de la bactériorhodopsine en utilisant des électrolytes acides en deçà de pH 4.5. Nous pouvons voir un de ces photocourants à la figure qui suit.

Figure 3.5

Signal type des photocourants en régime continu à pH3, Robertson et Lukashev, 1995.
Membrane pourpre séchée, orientation aléatoire, électrolyte: KCl 100 mM, tampon sodium citrate 10 mM pH3.



L'explication de cette inversion de courant due au pH acide de l'électrolyte se base sur le fait que la bactériorhodopsine inverse son ordre d'éjection et de capture de protons à pH acide. À ces pH, la bactériorhodopsine capture un proton avant d'en éjecter un autre, ce qui lui permettra de terminer son cycle de pompage. Ainsi le raisonnement est le même que dans le cas des photocourants à pH 7, mais puisque les protons sont capturés avant d'être éjectés, le pH à la surface de l'électrode de travail augmentera, ce qui occasionnera un courant négatif. Par la suite l'éjection des protons par la bactériorhodopsine amènera un équilibre qui ramènera le courant à zéro.

3.2.2 Travaux récents de notre laboratoire.

Notre laboratoire a effectué des travaux sur les photocourants en régime continu et sur l'influence des anesthésiques sur ces derniers. Nous avons utilisé une cellule électrolytique que nous avons décrite à la section 2.3. L'électrolyte utilisé était une solution de KCl à 100 mM. Notre méthode de déposition était tout simplement le séchage de la membrane pourpre en solution dans de l'eau distillée sur une électrode de platine.

Nous avons donc procédé à l'enregistrement des photocourants de ces dépositions avec un électrolyte de KCl seulement et dans un deuxième temps avec l'ajout d'un anesthésique général (Enflurane) en saturation dans l'électrolyte. La figure 3.6 montre les résultats que nous avons obtenus dans de telles conditions.

Les résultats avec un électrolyte sans anesthésique sont comparables à ceux obtenus par les équipes que nous avons citées précédemment. Par contre l'ajout d'Enflurane modifie grandement le signal obtenu en l'inversant. De plus, ces changements sont réversibles après évaporation de l'Enflurane. Cette dernière observation est parfaitement cohérente avec ce qu'on trouve dans la littérature qui démontre la réversibilité du passage de la bactériorhodopsine rouge (λ_{max} 480 nm sous anesthésique) à la forme native (λ_{max} 570 nm) (Messaoudi et al., 1992; Boyer et al., 1995).

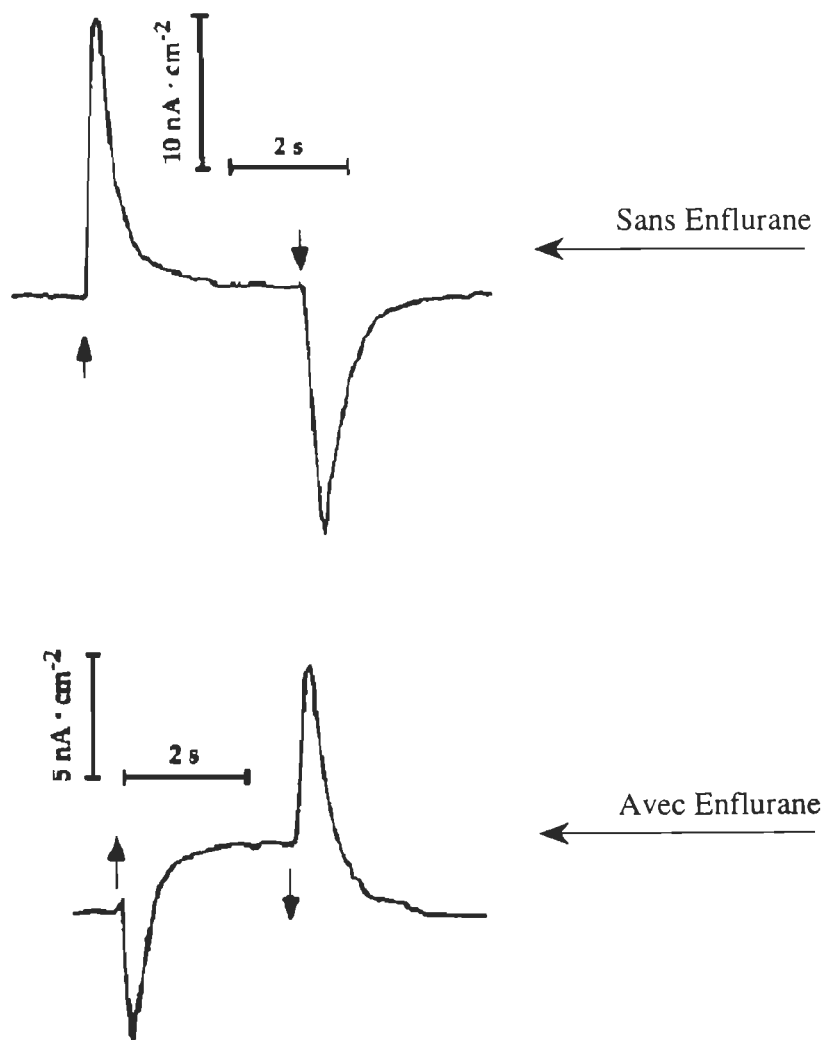
L'inversion du photocourant en présence d'Enflurane démontre bien que malgré un photocycle complet (Henry et al., 1988) la bactériorhodopsine rouge a des changements majeurs dans son processus de pompage de protons. D'ailleurs nous savons de la littérature

que la disparition de l'intermédiaire M de la membrane rouge est très ralenti et que le pompage de protons est nul par rapport à la membrane native (Boucher et al., 1996).

Figure 3.6

Photocourants en régime continu.

Membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100 mM, Enflurane en saturation selon le cas. Longueur d'onde d'excitation 570 nm et 480 nm.



3.3 Possibilité d'interprétation:

Comme nous l'avons vu dans la section 3.2 les photocourants obtenus sont associés à l'activité de pompage de la bactériorhodopsine. Des deux interprétations du mécanisme de production de ces courants, celle faisant appel à la variation du pH à l'interface électrode membrane pourpre semble la plus solide. Mais aucune des hypothèses n'avance l'idée d'une orientation spontanée des membranes pourpres par simple séchage sans électrodéposition. Nous savons qu'au delà de pH 5, la bactériorhodopsine a un fort dipôle électrique permanent (4×10^{24} Cm, Taneva et Petkanchin, 1991), ce qui pourrait entraîner une orientation spontanée des membranes lors de leur déposition par séchage ou par monocouche de Langmuir-Blodgett. La vérification de cette hypothèse d'orientation que nous formulons pourra s'avérer importante dans la poursuite des interprétations des photocourants de la bactériorhodopsine et de leurs applications.

L'inversion du photocourant en présence d'Enflurane suggère des changements majeurs dans les composantes de déplacements de charges qui constituent le photocourant de la bactériorhodopsine. L'identification des composantes du photocourant en cause dans l'action des anesthésiques sera sûrement un atout dans la compréhension de ces derniers. D'autre part la possibilité de moduler le photocourant de la bactériorhodopsine ouvre la possibilité de discriminer et d'identifier les étapes du pompage du proton dans la molécule.

Dans la section qui suit, nous allons voir de quelle façon nous comptons arriver à nos fins.

3.4 Démarche expérimentale.

Nous débuterons par l'établissement d'une courbe de l'orientation des membranes pourpres en fonctions du pH en utilisant le dichroïsme électrique comme moyen d'observation. De ces résultats, nous pourrions travailler à des pH qui inverseront le dipôle permanent de la membrane et qui nous permettront de passer à l'étape d'orientation.

Pour vérifier l'orientation spontanée des membranes pourpres lors de déposition par séchage, nous tenterons de sécher la membrane pourpre dans deux conditions de pH

différentes, inversant ainsi le dipôle permanent de la membrane et induisant donc une orientation inverse pour les deux conditions. Les photocourants en régime continu et transitoire de ces dépôts seront comparés aux photocourants de dépôts orientés par des procédés connus de la littérature; orientation par adsorption cationique et électrodéposition. Ces deux dernières méthodes d'orientation nous permettent d'obtenir des orientations inverses de la membrane pourpre en fonction du pH. Ainsi la corrélation des photocourants de ces dépôts avec celle faite par simple séchage nous confirmera ou nous infirmera l'hypothèse de l'orientation spontanée.

Nous porterons aussi une attention particulière aux analyses cinétiques des photocourants en régime transitoire afin de déterminer les composantes du courant qui sont influencées par les variations des conditions expérimentales, en particulier la présence de l'Enflurane. Nous tenterons de mettre en lien les différences connues des cinétiques optiques de la membrane native et de la membrane rouge et les variations des transitions de courant de ces mêmes membranes.

Chapitre 4

Résultats et discussion

4 Résultats et discussion.

4.1 Dichroïsme électrique de la membrane pourpre en fonction du pH.

La structure linéaire du chromophore de la bactériorhodopsine amène une absorption préférentielle de la lumière, dont la composante du champ électrique est dans le sens de l'axe du chromophore. Cette caractéristique nous permet de déterminer l'orientation de la molécule en utilisant de la lumière polarisée et en comparant les absorptions pour des faisceaux polarisés dans des plans perpendiculaires.

D'autre part, la membrane pourpre dans laquelle se trouve la bactériorhodopsine comporte une asymétrie de charges négatives de part et d'autre de la membrane. Le côté cytoplasmique étant chargé plus négativement que le côté extracellulaire. Asymétrie dont l'origine réside principalement dans la répartition inégale des charges des lipides associés à la bactériorhodopsine (Fisher et al., 1978), procure à la membrane pourpre un dipôle électrique permanent qui permet son orientation dans un champ électrique. Des études ont établi cette asymétrie de charges en observant des orientations inverses de la membrane pourpre entre des conditions de pH élevé et faible avec des méthodes d'adsorption cationique et d'électrodéposition. On a ainsi pu observer qu'aux environs de pH 5, la membrane pourpre n'avait plus d'asymétrie de charges mais une charge répartie également de chaque côté de la membrane (Fisher et al., 1978; Váró, 1981).

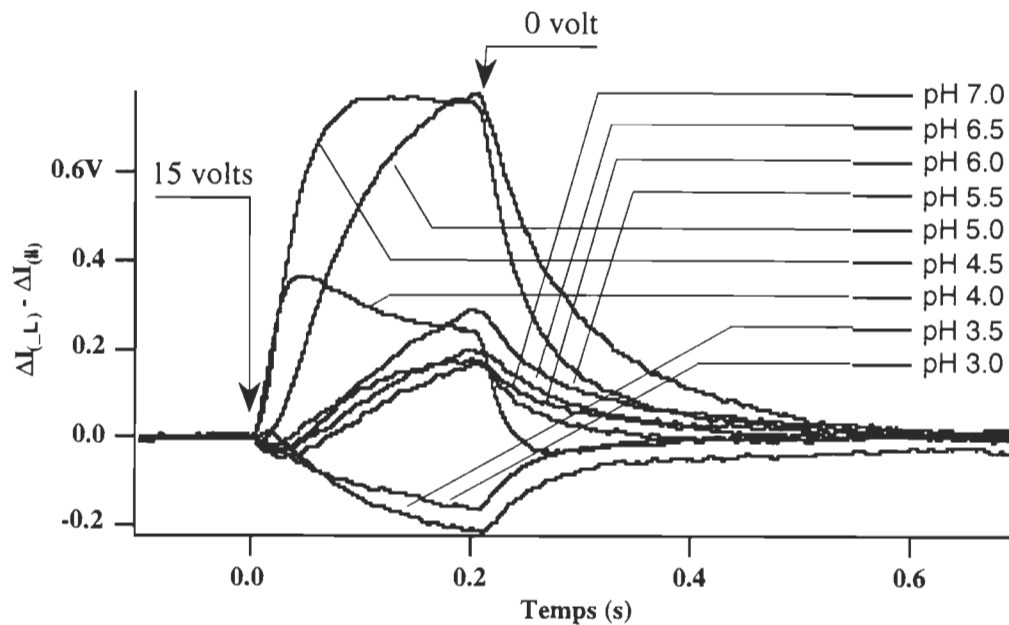
Nous proposons, comme nous l'avons vu dans la section 2.9 de matériel et méthodes, de mettre à profit cette asymétrie de charges pour moduler son orientation en fonction du pH. Les mesures de l'orientation nous sont données par l'observation du dichroïsme de la bactériorhodopsine. La figure 4.1 montre la différence d'intensité lumineuse transmise par la bactériorhodopsine entre la lumière polarisée horizontalement et celle polarisée verticalement.

Un signal positif signifie que la membrane pourpre est orientée perpendiculairement au champ électrique appliqué et un signal négatif représente une orientation parallèle. Plus le signal est grand en valeur absolue meilleure est la qualité de l'orientation.

Figure 4.1

**Différence d'intensité lumineuse transmise entre la lumière polarisée
horizontalement et verticalement pour différents pH.**

**Membrane pourpre en solution. Absorption de 0.2, tampon citrate 5 mM. Champ électrique de 15 volts
par cm appliqué pendant 200 ms.**



Pour bien comprendre la signification des courbes précédentes, rappelons nous que le degré d'orientation dans un champ électrique de la membrane pourpre est directement proportionnel à l'intensité de son dipôle électrique permanent et induit. Le dipôle permanent est perpendiculaire à la membrane puisqu'il est le résultat de l'asymétrie de charge de part et d'autre de cette dernière. Le dipôle induit quant à lui se forme par déplacement de charges dans le plan de la membrane lors de l'application du champ électrique. Par conséquent, une orientation perpendiculaire au champ électrique signifie une prédominance du dipôle électrique permanent sur le dipôle induit et vice versa pour une orientation parallèle au champ électrique.

Revenons maintenant à notre figure 4.1, nous avons une augmentation du dichroïsme de pH 7.0 à pH 5.0 puis un maximum entre pH 5.0 et pH 4.0. Cette

augmentation de l'orientation perpendiculaire des membranes pourpres par rapport au champ électrique démontre qu'avec la diminution du pH, il y a augmentation de l'asymétrie de charges (augmentation du dipôle électrique permanent) de chaque côté de la membrane. Par la suite il y a diminution du dichroïsme jusqu'à l'apparition d'un dichroïsme négatif correspondant à un alignement parallèle des membranes par rapport au champ électrique. Ainsi, de pH 4.0 à pH 3.5 il y a diminution du dipôle électrique permanent de la membrane, mettant progressivement en évidence le dipôle induit, pour finalement obtenir une orientation parallèle au champ. Il y a donc dans cette plage de pH l'établissement d'un équilibre entre les charges de chaque côté de la membrane pourpre annulant la différence de charges électriques.

Regardons d'une façon complémentaire nos résultats en portant en graphique la pente de la première partie des courbes de la figures 4.1 immédiatement après l'application du champ électrique. Cette pente indique la vitesse d'orientation et est par conséquent proportionnelle au dipôle électrique des membranes. La figure 4.2 affiche ces pentes en fonction du pH et résume bien ce que nous avons discuté. Il y a une augmentation de la pente c'est-à-dire du dipôle électrique de pH 7.0 à pH 4.0. De pH 4.0 à pH 3.0 nous avons inversion du signe de la pente indiquant qu'il existe un pH où il y a équilibre des charges de chaque côté de la membrane. Finalement, de pH 3.5 à pH 3.0 il y a une légère augmentation de la pente correspondant à une diminution de l'alignement parallèle au champ électrique des membranes pourpres. Cette dernière observation indique qu'il y a réapparition de l'asymétrie de charges de chaque côté de la membrane amenant ainsi une réapparition du dipôle électrique permanent au pH très acide (en deçà de pH 3.5).

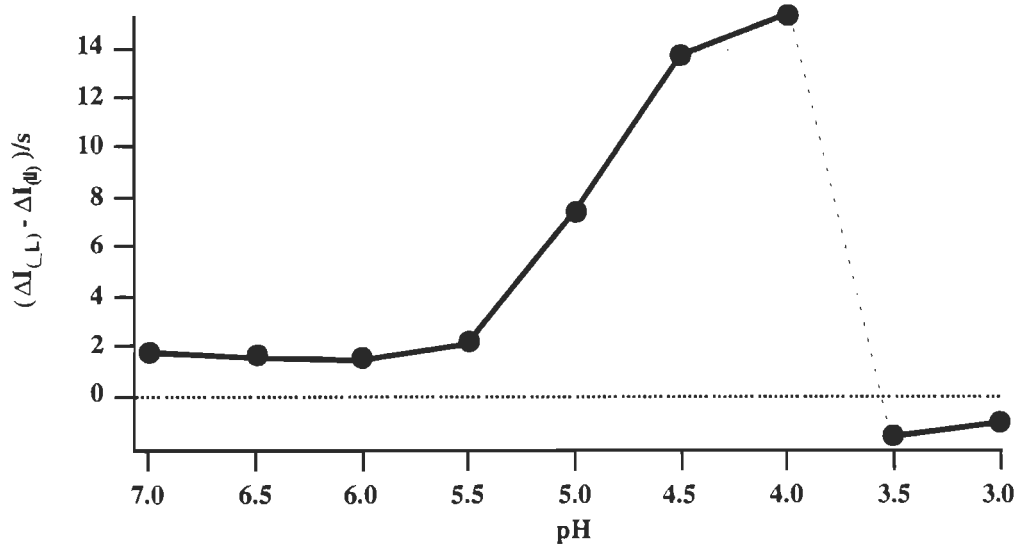
Ces résultats nous démontrent donc qu'il y a effectivement modulation du dipôle permanent de la membrane pourpre en fonction du pH. Nous voyons clairement qu'il y a un certain pH où la membrane pourpre n'a plus de dipôle électrique permanent et de part et d'autre de ce point, il existe un dipôle de plus ou moins grande intensité. Par contre nous ne pouvons savoir si le dipôle à pH 7.0 est de sens contraire à celui qui existe à pH 3.0, car la présence d'un dipôle permanent dans un sens ou dans l'autre de la membrane pourpre amène toujours une orientation perpendiculaire (dichroïsme positif). Mais comme nous

l'avons mentionné au début de cette section, la littérature nous renseigne sur l'existence de dipôles permanents inverses entre pH 7.0 et pH 3.0, responsables d'orientations inverses de la membrane pourpre. Il est donc raisonnable de penser que nos mesures de dichroïsme peuvent être interprétées comme une inversion de dipôle.

Figure 4.2

Pente d'orientation en fonction du pH.

Résultats extraits de la figure 4.1.



4.2 Spectres d'action

Maintenant que nous avons vérifié que le dipôle électrique permanent de la membrane pourpre varie en fonction du pH, notre prochaine étape est le séchage de la membrane pourpre à différents pH sur des électrodes de platine. De ces dépositions nous observerons des photocourants en examinant l'effet des différents pH de séchage sur ces mêmes photocourants en tentant d'y trouver les indices d'une orientation inverse. Mais, avant d'aller plus loin, il nous faut vérifier l'activité de la bactériorhodopsine avec nos différents types de dépositions, comme étant responsable des photocourants observés. Pour ce faire, nous avons mesuré les spectres d'action.

Comme nous l'avons décrit dans la section 2.7 de matériel et méthodes, la mesure d'un spectre d'action consiste à enregistrer les photocourants générés par l'excitation à différentes longueurs d'onde, d'une ou de plusieurs substances. Ces courants sont produits par l'absorption de lumière d'un système qui dans notre cas est composé d'électrodes de platine, d'un électrolyte et de membranes pourpres déposées sur une des électrodes. La corrélation du spectre d'action avec le spectre d'absorption des divers éléments du système nous permettra d'identifier celui qui est responsable de l'activité photo-électrique. Dans notre cas la bactériorhodopsine est évidemment la substance active, puisque le platine et l'électrolyte sont insensibles aux intensités de lumière que nous utilisons. En effet, sans la présence de bactériorhodopsine, le système électrode-électrolyte ne produit aucun photocourant.

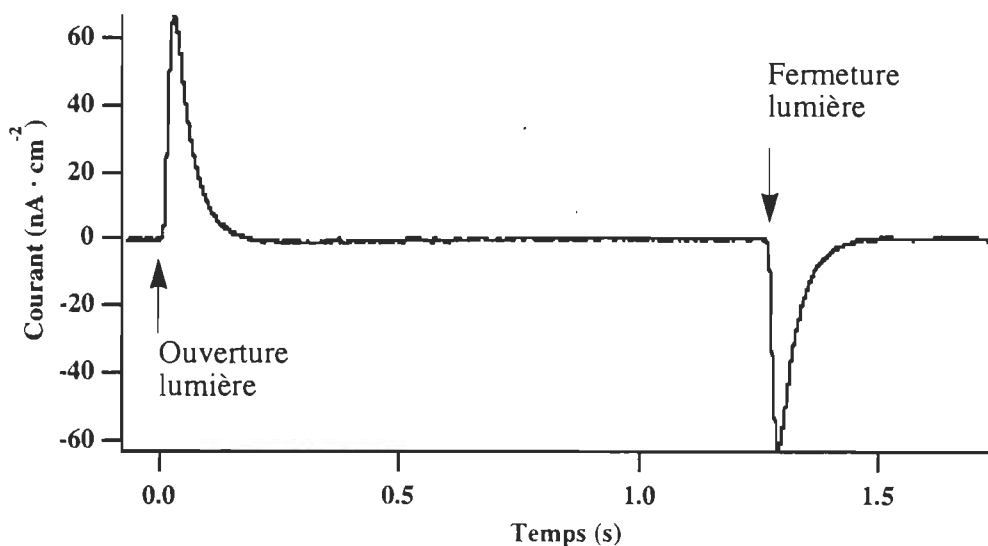
L'enregistrement d'un spectre d'action ne se fait pas en une seule étape, mais plutôt par un cumul d'informations à diverses longueurs d'onde d'excitation. Ainsi nous enregistrons le photocourant de la bactériorhodopsine déposé sur platine pour une seule des longueurs d'onde d'intérêt à la fois. Un exemple de photocourant observé pour une seule longueur d'onde nous est donné à la figure 4.3¹.

1. Notons que ce signal de photocourant en régime continu correspond bien aux signaux de la littérature dont nous avons discuté dans la section 3.2.1.

Figure 4.3

Photocourant en fonction du temps.

Membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0. Longueur d'onde d'excitation 570 nm.



Ensuite nous relevons la valeur maximale des courants obtenus pour chacune des longueurs d'onde d'excitation pour lesquelles nous avons enregistré des photocourants. La figure 4.4 montre les premières parties positives des spectres pour différentes longueurs d'onde. Les maximums ainsi trouvés sont reportés sur le graphique des courants en fonction de la longueur d'onde que l'on nomme spectre d'action (voir figure 4.5).

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les spectres d'action nous sont nécessaires pour identifier la substance active qui produit les photocourants que nous observons. Nous comparons donc le spectre d'action de la membrane pourpre déposée sur platine avec le spectre d'absorption de la bactériorhodopsine. Si les deux spectres se superposent, cela signifie que le photocourant produit par le système est proportionnel à l'absorption de la lumière par la bactériorhodopsine, ce qui impute la responsabilité de génération des photocourants à la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre.

Figure 4.4

Photocourant en fonction du temps.

Membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100mM, tampon citrate 10 mM
pH 7.0. Longueur d'onde d'excitation de 430 nm à 650 nm.

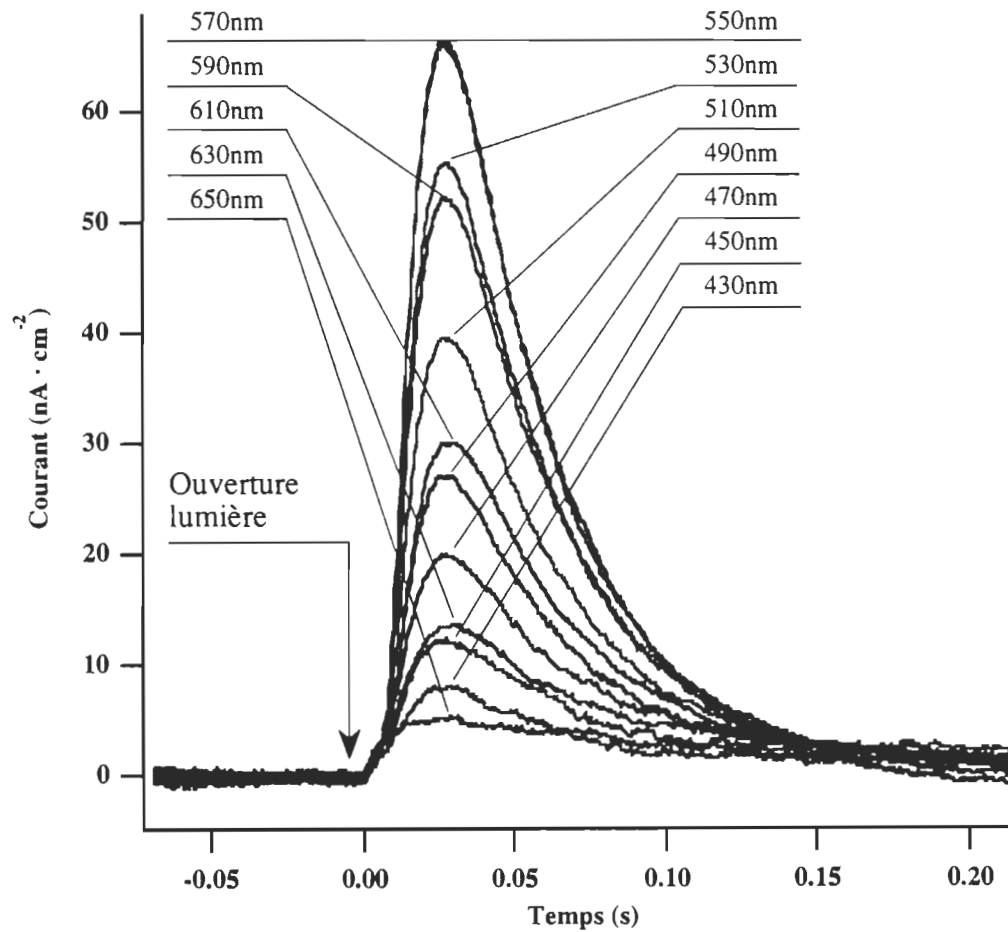
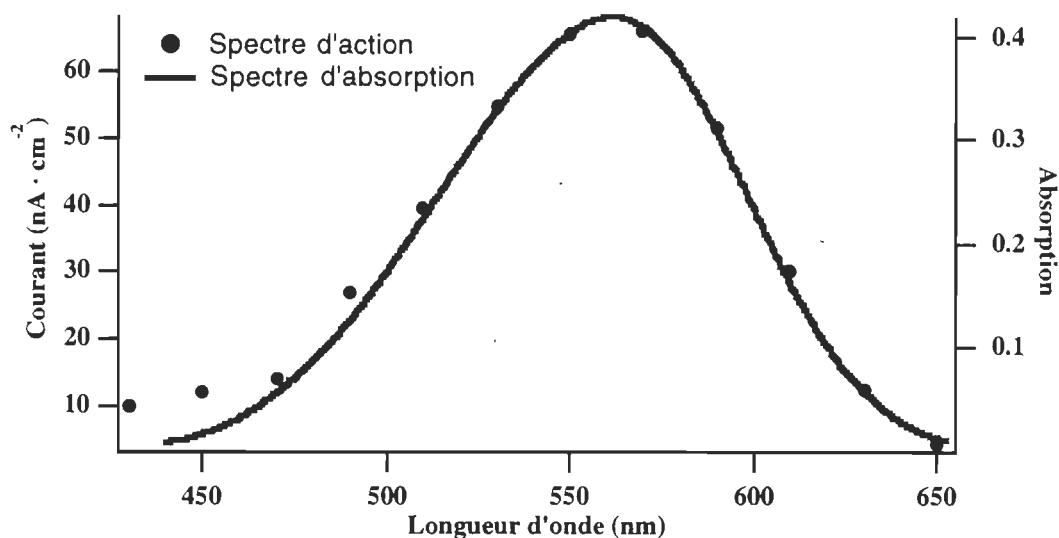


Figure 4.5

Spectre d'action pH 7.0.

Maximums d'intensité de courant en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.



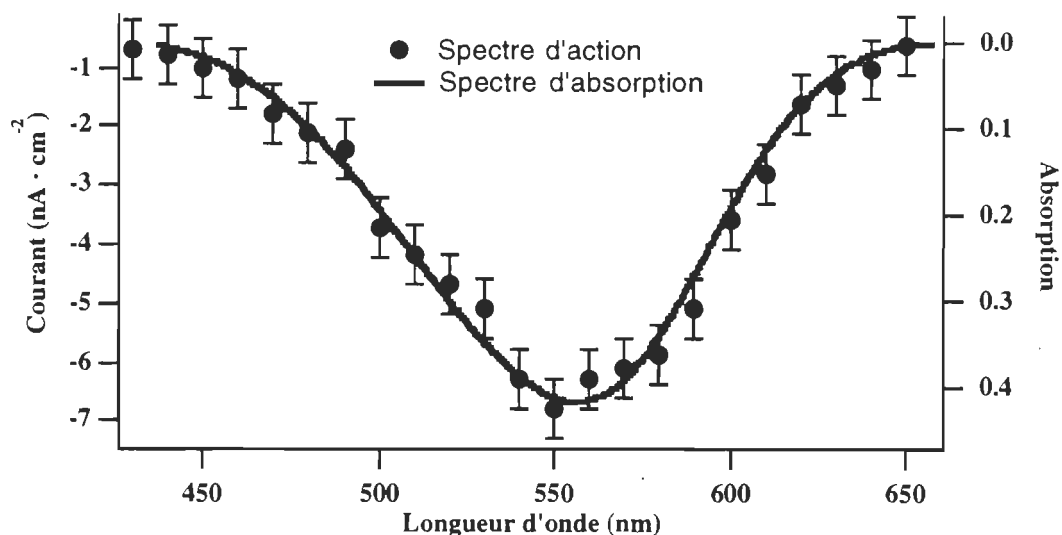
La figure 4.5 montre le spectre d'action de la membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur électrode de platine. L'électrolyte utilisé contient 100 mM de KCl et est tamponné à pH 7.0 avec 10 mM de tampon citrate. Nous voyons que le spectre d'action se superpose très bien au spectre d'absorption de la bactériorhodopsine (● spectre d'action, — spectre d'absorption). Il est à noter que tous les spectres d'action sont corrigés en fonction des variations d'intensité de la lampe-à-arc versus la longueur d'onde (voir section 2.7.1). À partir de ce résultat, nous pouvons être assuré que les photocourants observés tout au long de nos manipulations avec un électrolyte à pH 7.0 sont bien dus à l'action de la bactériorhodopsine avec un maximum de réponse à 570 nm.

Le spectre d'action que nous venons de voir identifie bien l'activité de la bactériorhodopsine pour un électrolyte tamponné à pH 7.0. Mais nous utilisons aussi des électrolytes tamponnés à pH 3.0, à pH 2.0 et à pH 7.0 avec Enflurane dissout en saturation.

Figure 4.6

Spectre d'action pH 3.0.

Maximums d'intensité de courant en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100mM, tampon citrate 10 mM pH 3.0.



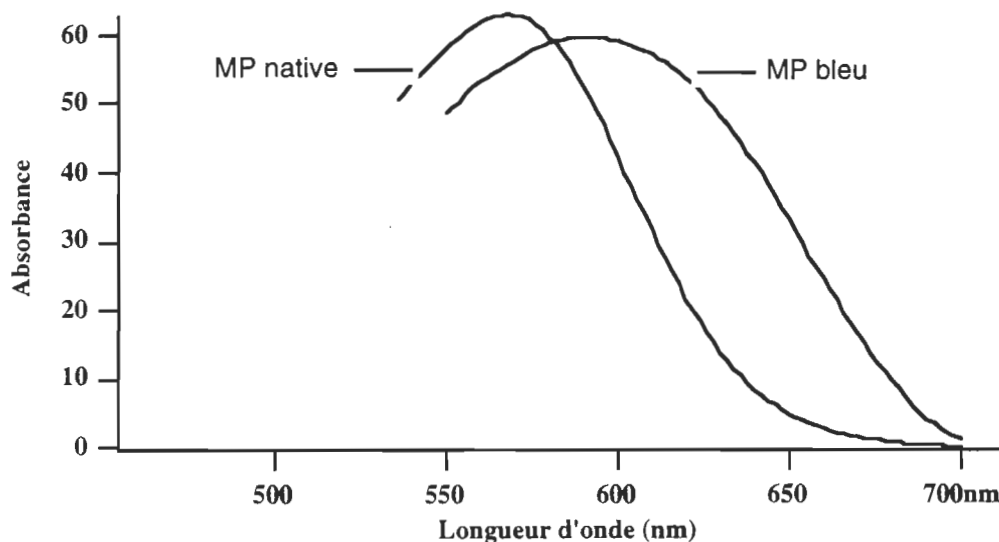
Nous avons donc vérifié les spectres d'action de la bactériorhodopsine pour ces trois autres conditions expérimentales. Dans la figure précédente, nous avons le spectre d'action de la bactériorhodopsine avec un électrolyte à pH 3.0. Nous constatons à nouveau que le maximum d'activité photoélectrique correspond au maximum d'absorption de lumière par la bactériorhodopsine à pH 3.0. Ainsi, à pH 3.0 nos dépôts conservent leur activité photoélectrique due à la bactériorhodopsine avec un maximum à 555 nm correspondant à celui de l'absorption de la bactériorhodopsine à ce pH. Le spectre d'action est inversé par rapport à pH 7.0 car comme nous l'avons vu dans la section 3.2.1 sur la revue de la littérature, le photocourant en régime continu est inversé à pH 3.0.

Maintenant passons à une solution électrolytique tamponnée à pH 2.0. À ce pH la membrane pourpre devient de la membrane bleue, c'est-à-dire que le maximum d'absorption passe de 570 nm à 605 nm (voir figure 4.7) (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971). Nous savons que dans cet état, la bactériorhodopsine ne pompe pas de protons (Drachev et

al., 1978; Mowery et al., 1979; Kobayashi et al., 1983). Ainsi sans transport de protons à travers la membrane, l'observation d'un courant avec notre temps d'échantillonnage relativement lent devrait être nul. Effectivement, nous n'observons aucun photocourant produit par la bactériorhodopsine à ce pH et bien sûr nous n'avons aucun spectre d'action. Ce dernier résultat vient appuyer les références citées ci-haut sur l'absence de transport de protons par cette forme de bactériorhodopsine.

Figure 4.7

Spectre d'absorption pour la membrane pourpre dans sa forme native et bleu.



Par contre, nous ne pouvons pas conclure qu'il n'y a aucun déplacement de charges à l'intérieur de la molécule et ainsi aucune activité photoélectrique. Le fait de ne pas observer de courant avec cette méthode, où nous recueillons les courants sur une longue période d'éclairage et une vitesse d'acquisition lente, ne nous permet pas de voir les déplacements rapides de charges internes à la molécule. Nous reviendrons sur ce point dans une section ultérieure .

Finalement nous avons fait le spectre d'action de la bactériorhodopsine pour une solution électrolytique à pH 7.0 avec l'Enflurane dissout en saturation. En présence d'Enflurane, la membrane pourpre passe d'une absorption maximum de 570 nm à 480 nm et devient ainsi de la membrane rouge (Nishinura et al., 1985; Henry et al., 1988; Lee et al., 1991). La superposition du spectre d'action au spectre d'absorption de la bactériorhodopsine en présence d'Enflurane (maximum d'intensité à 480 nm) est une fois de plus très convaincante de l'activité de la bactériorhodopsine dans ces conditions. Ce spectre est illustré à la figure 4.8. Cette dernière figure montre en fait deux spectres d'actions qui ont été pris simultanément avec le même échantillon. L'observation des photocourants en régime continu en fonction de la longueur d'onde nous montre qu'il y a deux maximums d'intensité à deux longueurs d'onde différentes; soit 570 nm et 480 nm. Pour illustrer ceci regardons la figure 4.9 où nous voyons en régime continu que pour notre déposition nous avons un signal positif avec une excitation à 570 nm correspondant à de la bR₅₇₀ et un signal avec une partie négative avec une excitation à 470 nm correspondant à de la bR₄₈₀. Comme le montre les spectres d'absorption de la figure 4.10 où l'on voit le passage de bactériorhodopsine de la forme 570 à 480, les deux maximum de courant que nous obtenons par spectre d'action sont dus à un mélange des deux formes de bactériorhodopsine dans notre déposition.

En effet, lorsque la membrane pourpre est séchée, l'Enflurane ne peut atteindre que les premières couches de la déposition dû probablement à l'entassement compact des membranes pourpres. Ainsi la figure 4.8 montre deux courbes; l'une négative pour la composante sous Enflurane ($\lambda_{\max} = 480\text{nm}$) et l'autre positive correspondant à une partie de la bactériorhodopsine n'ayant pas été atteinte par l'Enflurane ($\lambda_{\max} = 570\text{nm}$).

Nous remarquons aussi que nous avons des courants négatifs avec l'Enflurane comme ce qui a été discuté dans la section 3.2.2

Figure 4.8

Spectre d'action en présence d'Enflurane.

Maximums d'intensité de courant en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0, Enflurane dissout en saturation.

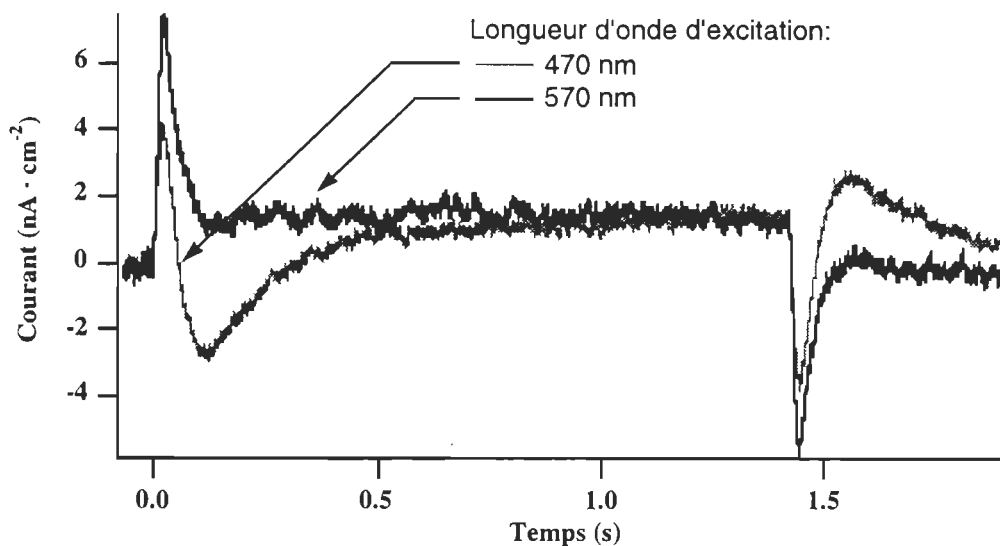


Figure 4.9

Photocourants en régime continu des excitations à 570 nm et 470 nm.

Membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0, Enflurane dissout en saturation.

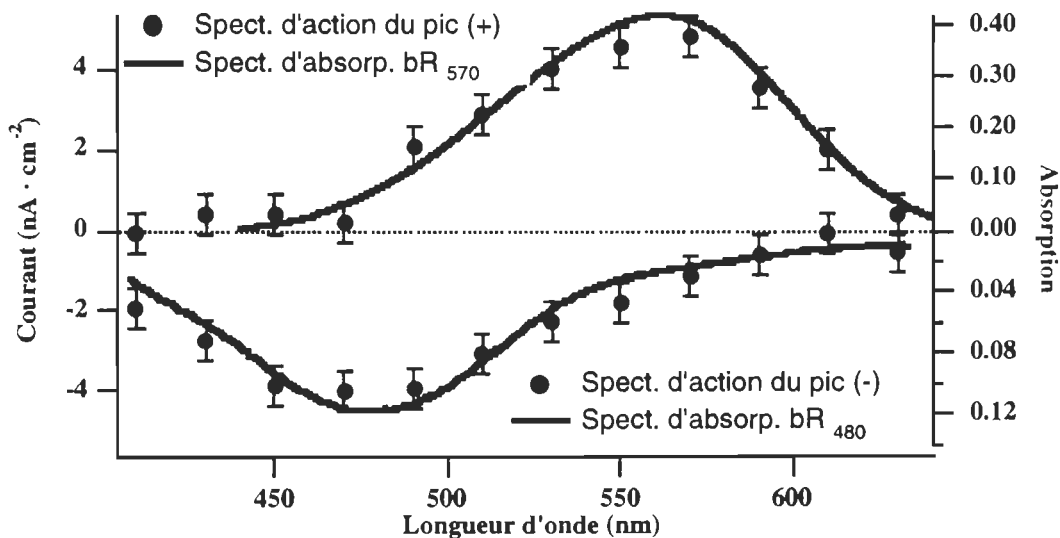
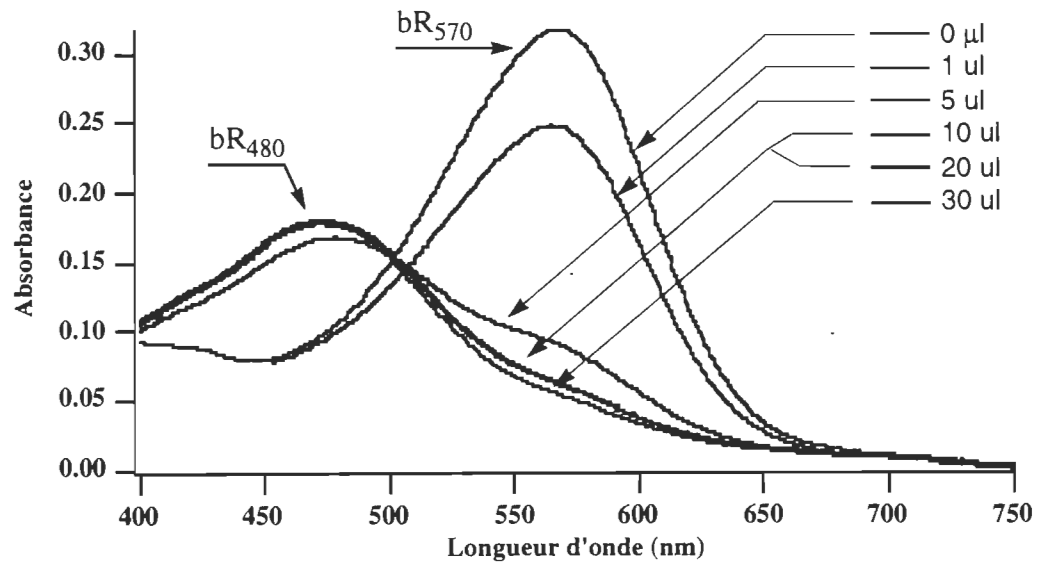


Figure 4.10

Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine pour différentes concentrations d'Enflurane.

Tampon phosphate pH 8.22 dans KCl 100 mM.



4.3 Résultats des photocourants en régime continu.

Dans les sous-sections qui vont suivre, nous allons faire état de tous les résultats de photocourants obtenus en régime continu.

4.3.1 Modulation de la réponse photoélectrique de la bactériorhodopsine en fonction du pH de séchage à la déposition.

Si nous récapitulons, nous avons vérifié par dichroïsme électrique qu'il y a variation du dipôle électrique de la membrane pourpre en fonction du pH. Nous avons aussi fait les spectres d'actions nécessaires nous permettant de conclure à l'activité photoélectrique de la bactériorhodopsine. Nous sommes maintenant prêts à observer les photocourants pour des dépositions de membranes pourpres séchées à différents pH. Ces mesures nous permettront de voir si ces variations de dipôle électrique à la déposition de la membrane ont un effet sur les photocourants produits par la bactériorhodopsine.

Nous avons donc enregistré les photocourants de différentes plaques de platine sur lesquelles il y avait de la membrane pourpre séchée à pH 7.0, pH 5.0, pH 4.0, et pH 3.0. Les courants ont été recueillis dans les mêmes conditions expérimentales, c'est-à-dire avec un éclairage à 570 nm et un électrolyte à 100 mM de KCl tamponné à pH 7.0.

La figure **4.11** montre les résultats obtenus en ne gardant que les premières parties des courbes où la lumière est ouverte. Les deuxièmes parties étant de symétries inverses après la fermeture de la lumière, elles ne sont donc pas nécessaires pour notre discussion. Le graphique en médaillon représente les maximums d'intensité en fonction du pH. On constate que les photocourants produits par la bactériorhodopsine sont supérieurs entre pH 5.0 et pH 4.0 et par surcroît le courant est négatif à pH 3.0. Le courant est donc dépendant du pH de séchage et une façon d'expliquer ces variations serait l'orientation de la membrane pourpre au séchage en fonction du pH.

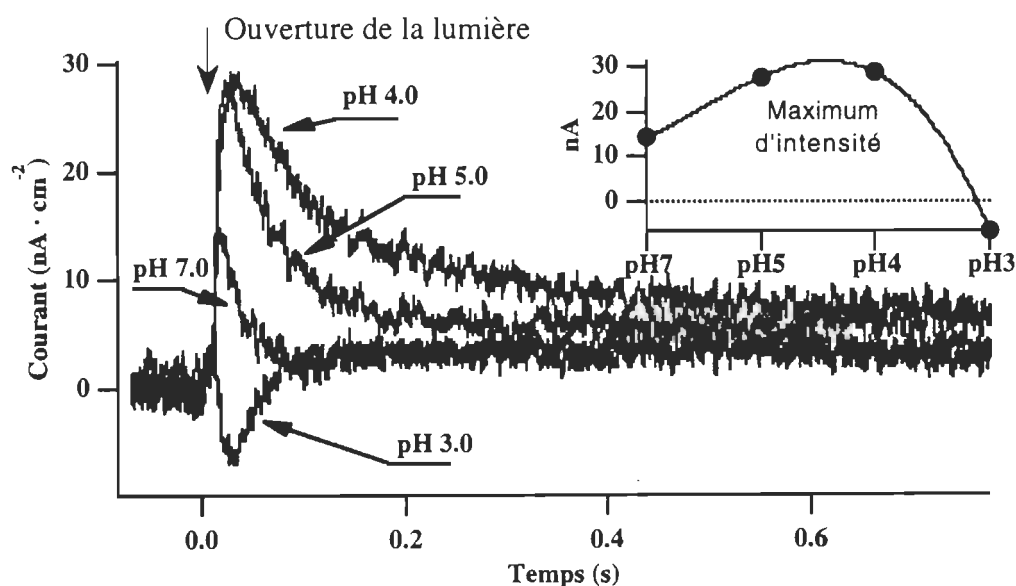
Ainsi, entre pH 7.0 et pH 4.0, les photocourants positifs que nous observons nous indiquent que le dipôle électrique de la membrane pourpre serait dans un sens commun aux trois pH que nous avons utilisés, tout comme nos résultats de dichroïsme électrique le

prédisaient. Donc, entre pH 7.0 et pH 4.0, nous aurions une même orientation de nos membranes pourpres. Les différences d'intensités des signaux seraient attribuables à la qualité de l'orientation. En effet, comme nous l'avons vu des mesures de dichroïsme électrique, le dipôle électrique de la membrane pourpre est constant en direction mais varie en grandeur avec un maximum entre pH 5.0 et pH 4.0. Par conséquent, nos dépôts seraient mieux orientés à pH 5.0 et pH 4.0 qu'à pH 7.0 produisant ainsi un meilleur photocourant. Par contre à pH 3.0 l'asymétrie de charges serait inversée engendrant un dipôle électrique inversé par rapport aux autres pH et conséquemment une inversion de l'orientation lors du séchage. Cette orientation inverse se traduisant par un photocourant négatif.

Figure 4.11

Photocourants en fonction du pH de séchage de membrane pourpre.

Membrane pourpre séchée à pH 7.0, pH 5.0, pH 4.0 et pH 3.0 sur platine. Électrolyte: KCl 100mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.



Ces observations sont vraiment étonnantes, car nous avons séché la membrane pourpre sans procédé d'orientation électrique ou cationique. En effet, le séchage de la membrane pourpre sur une électrode sans procédé spécifique d'orientation est considéré, comme nous l'avons vu dans notre revue de la littérature à la section 3.2.1, comme une méthode d'orientation aléatoire de la bactériorhodopsine (absence d'orientation) (Miyasaka et Koyama, 1991, 1992; Miyasaka et al., 1992; Koyama et al., 1994; Robertson et al., 1995)

4.3.2 Possible orientation spontanée de la membrane pourpre.

Suite aux sections précédentes, nous voilà en présence de faits très intéressants. Premièrement nous avons vu que le dipôle électrique des membranes pourpres est modulable en fonction du pH et deuxièmement il y a variation et inversion du photocourant de la bactériorhodopsine en fonction du pH de séchage. Ainsi l'inversion du photocourant entre pH 7.0 et 3.0 serait directement en lien avec l'inversion du dipôle électrique de la membrane pourpre à ces pH de séchage. Il y aurait donc orientation spontanée de la membrane pourpre lors de la déposition par séchage et cette orientation serait due au dipôle électrique de la membrane pourpre qui interagit avec le potentiel de surface de l'électrode.

Dans la prochaine section nous allons tenter de confirmer cette hypothèse d'orientation spontanée de la membrane pourpre en comparant les photocourants de la bactériorhodopsine avec d'autres types d'orientations connus. Comme nous l'avons discuté dans la section matériel et méthodes, nous savons de la littérature comment mettre à profit l'asymétrie de charges négatives de la membrane pourpre pour l'orienter. Nous pouvons procéder par électrodéposition pour avoir une orientation cytoplasmique¹ en appliquant un potentiel positif à l'électrode de déposition. Nous savons aussi utiliser l'adsorption cationique à l'aide de la poly-L-lysine pour charger l'électrode de déposition positivement et obtenir une orientation cytoplasmique à pH 7 ou extracellulaire² à pH 3.

1.Orientation cytoplasmique:côte cytoplasmique de la membrane pourpre face à l'électrode.

2.Orientation extracellulaire:côté extracellulaire de la membrane pourpre face à l'électrode.

4.3.3 Photocourants avec électrolyte à pH 7.0; Comparaison des différentes orientations.

Avant de regarder les résultats, rappelons nous le but et les méthodes de déposition que nous avons décrites aux sections 2.4 et 2.5 du chapitre matériel et méthodes. Nous procédons par électrodéposition et adsorption cationique pour orienter la membrane pourpre sur des électrodes de platine. A partir de ces techniques, nous sommes en mesure d'orienter la membrane pourpre dans ses deux sens possibles en inversant le dipôle permanent de la membrane en variant le pH lors de la déposition. Ainsi nous obtenons le côté cytoplasmique de la membrane pourpre vers l'électrode pour le cas de l'électrodéposition et adsorption cationique à pH 7.0 et le côté extracellulaire pour l'adsorption cationique à pH 3.0.

Dans la mesure où nous avons des orientations inverses, nous devrions avoir des photocourants de sens opposés entre l'orientation cytoplasmique et l'orientation extracellulaire. Mais comme la figure 4.12 le démontre, le sens des courants obtenus n'est pas en accord avec nos prédictions sur les orientations. De plus notre hypothèse d'orientation spontanée des membranes pourpres lors d'une déposition par simple séchage ne peut être confirmée de cette façon. Notons bien que cette figure montre les résultats des photocourants obtenus pour les cinq méthodes de déposition¹ que nous utilisons et que les mesures sont prises avec un même électrolyte de KCl à 100 mM et avec un tampon citrate 10 mM à pH 7.0.

Regardons de plus près ces résultats. L'électrodéposition et le séchage à pH 7.0 sur platine traité avec polylysine devraient donner des signaux dans le même sens puisqu'il s'agit d'orientations côté cytoplasmique vers l'électrode. Mais les signaux sont inversés. Par contre, les signaux devraient être inversés entre les séchage avec traitement à la polylysine à pH 7.0 et pH 3.0 puisqu'il s'agit d'orientations inverses. Mais nous voyons

1. Bactériorhodopsine électrodéposée.

Bactériorhodopsine à pH 7.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

Bactériorhodopsine à pH 7.0 séchée sur platine.

Bactériorhodopsine à pH 3.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

Bactériorhodopsine à pH 3.0 séchée sur platine.

qu'ils sont de mêmes signes.

Les signaux que nous avons obtenus semblent plutôt indiquer qu'il y a inversion d'orientation entre l'électrodéposition et le séchage avec polylysine à pH 7.0 et qu'il y a même orientation entre le séchage avec polylysine à pH 7.0 et pH 3.0. Mais cette conclusion ne paraît guère sérieuse car elle contredit la littérature qui nous indique les orientations que nous devons obtenir. De plus si le séchage avec polylysine à pH 7.0 et pH 3.0 ont la même orientation, comment expliquer l'inversion de signal entre le séchage sans polylysine à pH 7.0 et pH 3.0?

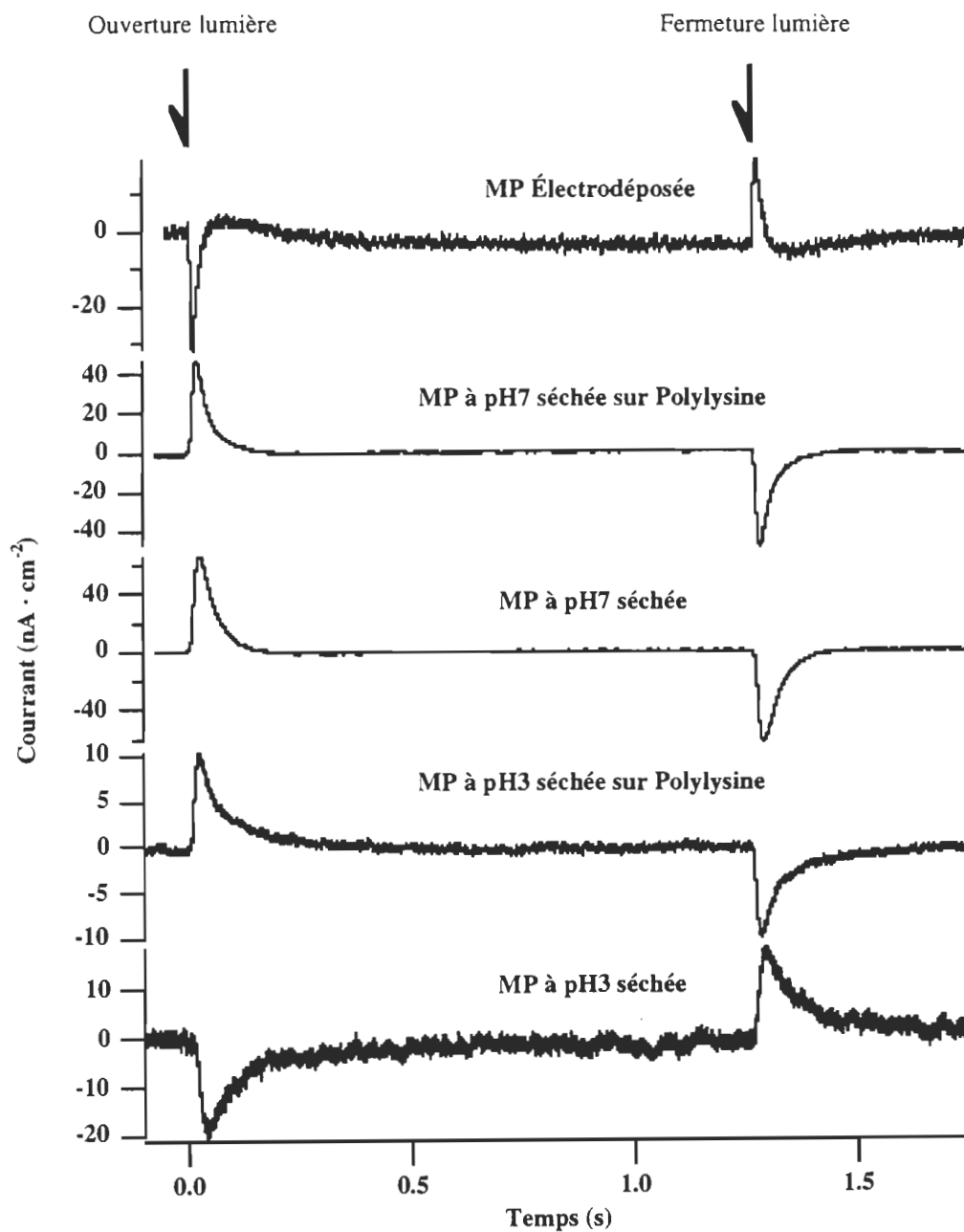
Par conséquent, cette méthode d'obtention des photocourants en régime continu ne peut nous renseigner sur l'orientation des membranes pourpres et de plus, elle sème la confusion dans notre hypothèse de travail.

Figure 4.12

Photocourants à pH7 pour diverses méthodes de déposition.

Membrane pourpre électrodéposée, séchée à pH 7.0 avec et sans polylysine et séchée à pH 3.0 avec et sans polylysine. Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.

L'ongueur d'onde d'excitation: 570 nm.



4.3.4 Photocourants avec électrolyte à pH 7.0 et présence d'Enflurane.

Comme nous venons de le mentionner dans la section précédente, les photocourants en régime continu ne nous renseignent en rien sur l'orientation de la membrane pourpre à la surface de l'électrode, mais ceci est d'autant plus évident avec un électrolyte contenant de l'Enflurane. En effet, comme le montre la figure 4.13, tous les signaux sont semblables sans égard à leur orientation présumée. À l'exception de la membrane pourpre électrodéposée, où nous voyons seulement un signal négatif, les quatre autres types de déposition ont un signal positif suivi d'une lente composante négative. Mais dans tous les cas les composantes négatives des signaux sont similaires et donc, toutes reliées à la présence d'Enflurane.

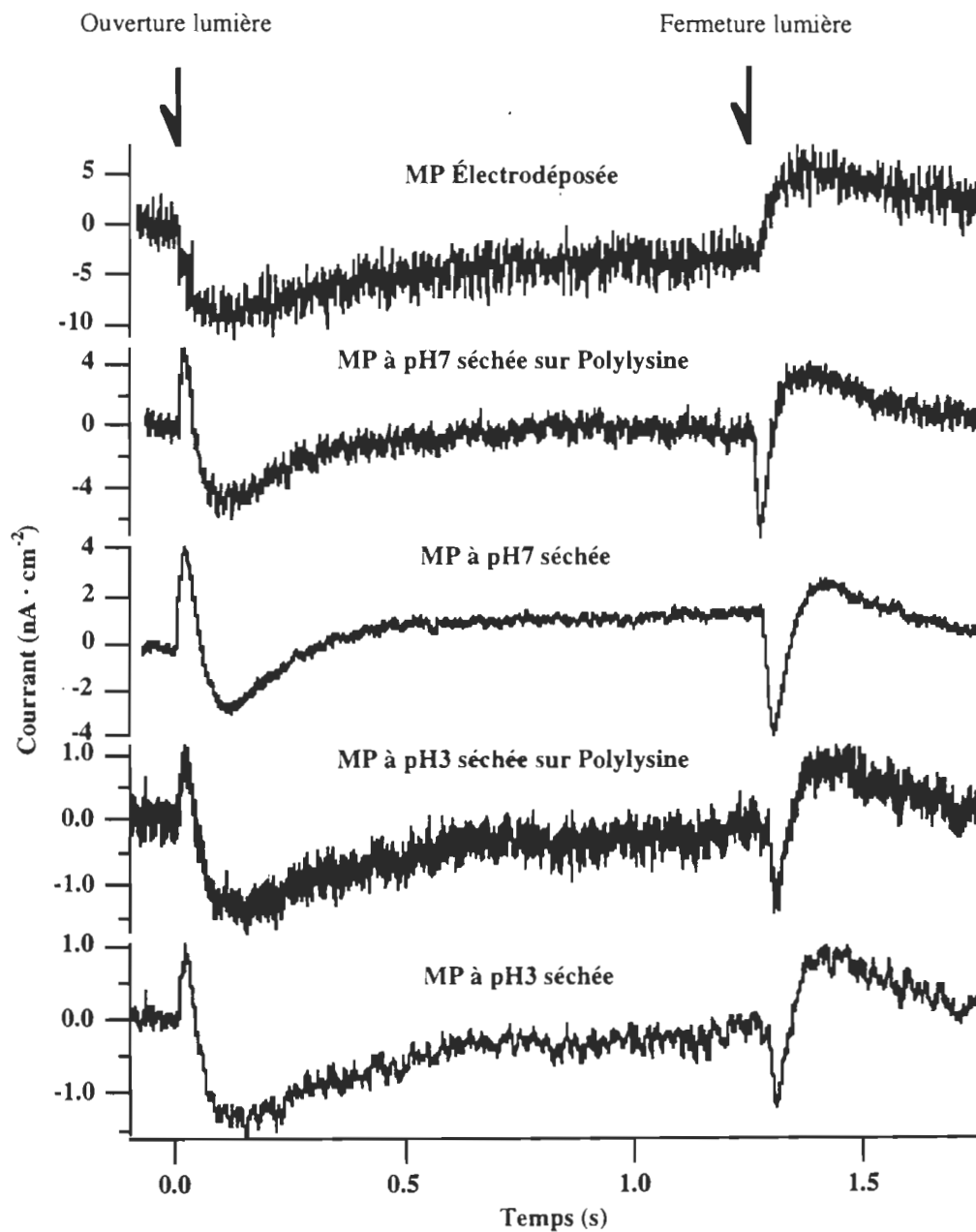
Mais malgré l'absence d'information sur l'orientation, la présence d'Enflurane nous renseigne sur l'importance de l'intermédiaire M et l'établissement de l'équilibre observé dans les photocourants. Ainsi après l'ouverture de la lumière, des courants apparaissent pour lentement s'atténuer et revenir à zéro jusqu'à la fermeture de la lumière où l'inverse des courants apparaît. Lorsque les courants reviennent vers zéro, c'est qu'il s'établit un équilibre entre l'éjection et la capture des protons dans le cycle de pompage de la bactériorhodopsine. Si nous comparons les figures 4.12 et 4.13, nous voyons que cet équilibre est plus lent à s'établir en présence d'Enflurane à pH 7.0 que sans Enflurane. De ceci nous pouvons établir un lien entre la vitesse de l'équilibre et l'accumulation de l'intermédiaire M de la façon suivante.

Nous savons de la littérature (Boucher et al., 1996) qu'en présence d'Enflurane la bactériorhodopsine a une cinétique de disparition de l'intermédiaire M plus lente. M étant un intermédiaire clé dans le largage et la reprise du proton, il est vraisemblable que la vitesse d'apparition et de disparition de cet intermédiaire influence les courants observés et leur équilibre. Ainsi, à l'apparition de M, il y a éjection d'un proton par la bactériorhodopsine et reprise du côté opposé de la molécule à la disparition de M. Or plus la disparition de M sera lente, plus il faudra du temps pour établir un équilibre entre l'éjection et la capture des protons pompés par la bactériorhodopsine. C'est seulement lorsque cet équilibre est atteint que le photocourant devient nul.

Figure 4.13

Photocourants à pH7 avec Enflurane pour diverses méthodes de déposition.

Membrane pourpre électrodéposée, séchée à pH 7.0 avec et sans polylysine et séchée à pH 3.0 avec et sans polylysine. Électrolyte: KCl 100mM, Enflurane dissoute en saturation, tampon citrate 10 mM pH 7.0. L'ongueur d'onde d'excitation: 480 nm.



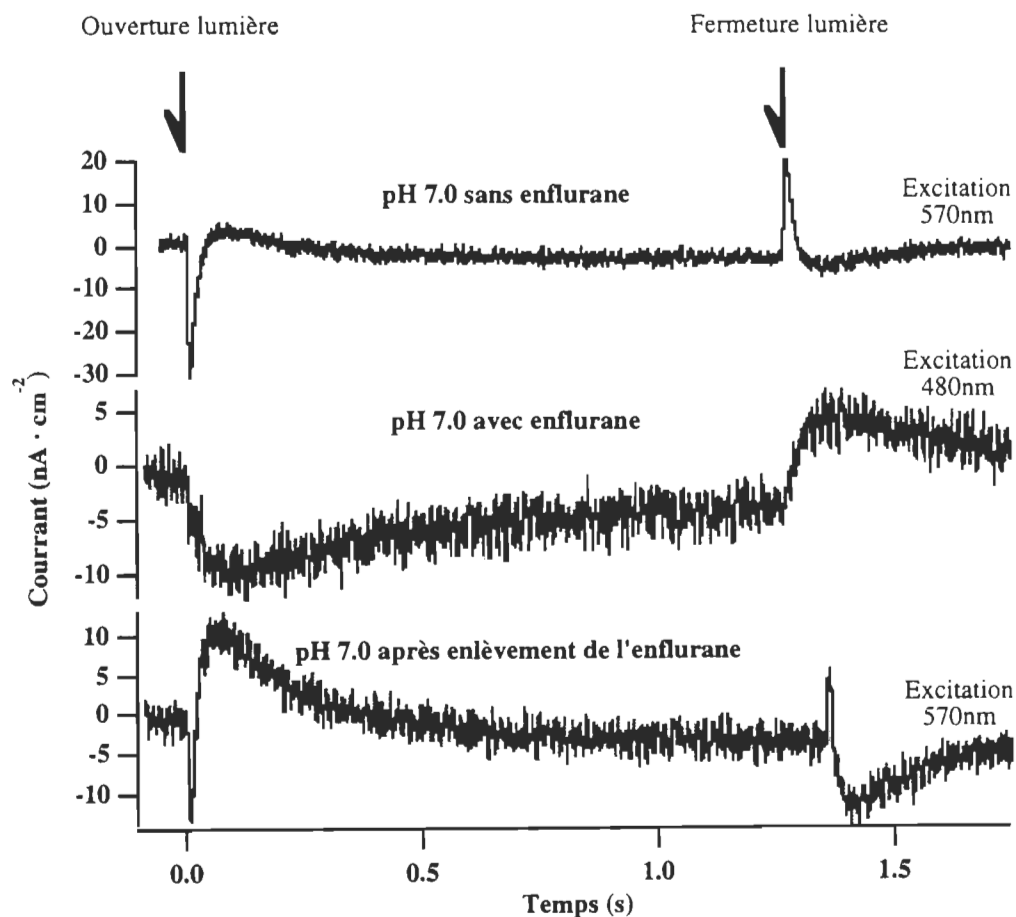
Pour ce qui est d'établir une interprétation expliquant le fait que tous les signaux ont une composante négative importante de leur photocourant et ce, peu importe leur orientation, nous ne nous prononcerons pas à cette étape-ci de notre travail car cela ne serait que pure spéculation dû à la faiblesse de cette méthode. Mais il est intéressant de remarquer un fait troublant qui ne se produit qu'avec les plaques électrodéposées.

La figure 4.14 montre les photocourants d'une même plaque de platine avec de la membrane pourpre électrodéposée.

Figure 4.14

Photocourant membrane pourpre électrodéposée.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH7.0 et Enflurane dissout en saturation selon le cas.



La première courbe du haut est enregistrée avec un électrolyte à pH 7.0 sans Enflurane. Le signal est négatif avec une partie positive plus lente. Puis la courbe du centre est prise à pH 7.0 et en présence d'Enflurane comme nous venons de le discuter un peu plus haut dans le texte. Finalement, nous voyons le photocourant de la même plaque après avoir enlevé l'Enflurane et utilisé un électrolyte à pH 7.0 seulement. Nous remarquons que nous avons toujours un signal rapide négatif mais un peu plus faible et une augmentation considérable du signal positif lent. Il y a donc un effet non réversible entre la membrane pourpre de départ qui n'a pas été exposée aux anesthésiques et celle après exposition. Pourtant le spectre d'absorption est quant à lui complètement réversible (Messaoudi et al., 1992; Boyer et al., 1995).

4.3.5 Photocourants avec électrolyte à pH 3.0.

Encore une fois nous obtenons des photocourants qui vont tous dans le même sens et qui ne tiennent pas compte de l'orientation des membranes pourpres par nos méthodes de déposition. Comme nous pouvons le voir à la figure 4.15, tous les signaux sont négatifs. Si nous nous rappelons de la section 3.2.1.2, nous avons vu que l'équipe de Robertson et Lukashev a remarqué qu'il y avait inversion des photocourants produits par la bactériorhodopsine entre des électrolytes à pH 7 et pH 3. Selon leurs conclusions, cela serait dû à l'inversion de l'éjection et de la capture du proton par la bactériorhodopsine dans son ordre de pompage à pH acide. Or nous nous serions attendu à voir l'image inverse de nos photocourants recueillis avec un électrolyte à pH 7.0 (voir figure 4.12).

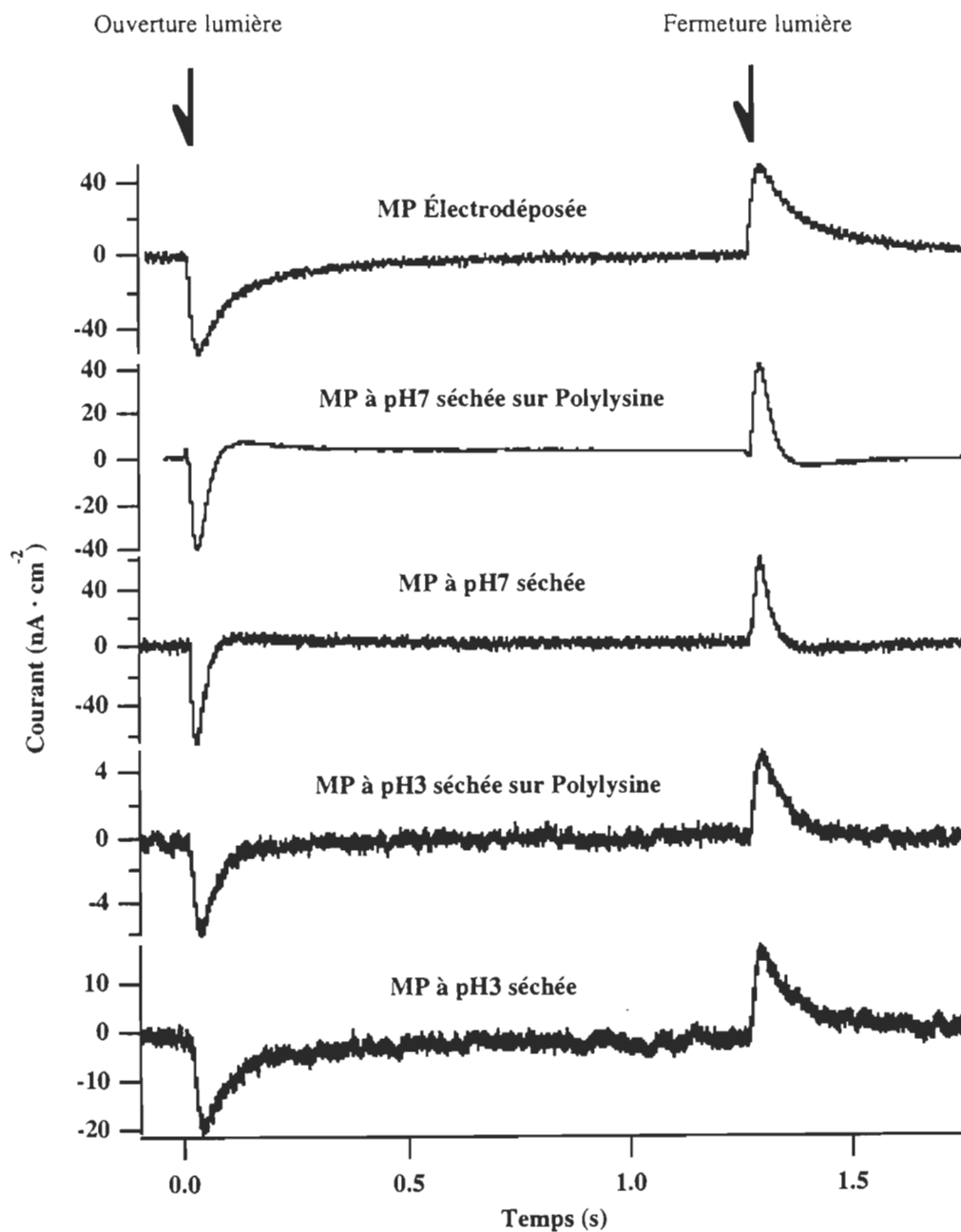
À la lumière de ces nouvelles données avec un électrolyte à pH 3.0, non seulement nous ne pouvons nous prononcer sur l'orientation de la membrane pourpre, mais nous ne pouvons non plus vérifier l'explication de Robertson et Lukashev.

Figure 4.15

Photocourants à pH3 pour diverses méthodes de dépôt.

Membrane pourpre électrodéposée, séchée à pH 7.0 avec et sans polylysine et séchée à pH 3.0 avec et sans polylysine. Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 3.0.

L'ongueur d'onde d'excitation: 560 nm.



4.3.6 Vue d'ensemble des résultats et discussion.

Dans un premier temps, l'étude par dichroïsme des changements de dipôles électriques permanents de la membrane pourpre en fonction du pH, l'élaboration des spectres d'action confirmant l'activité photoélectrique de la bactériorhodopsine, ainsi que l'observation des photocourants de la bactériorhodopsine en fonction du pH de séchage (section 4.3.1) furent des résultats prometteurs. Ces données nous ont permis d'appuyer notre hypothèse d'orientation spontanée des membranes pourpres par simple séchage sur une électrode de platine et que cette orientation était modulable en fonction du pH des membranes pourpres au séchage.

Mais voilà que la suite des résultats vient assombrir notre perspective de démontrer l'orientation spontanée des membranes pourpres. En effet, suite à l'inversion du photocourant entre les pH 7.0 et pH 3.0 de séchage qui suggère une inversion d'orientation, la comparaison de ces résultats avec d'autres méthodes d'orientation connues, dans des conditions d'électrolyte à pH 7.0, ne fut pas concluante. Nous ne pouvions tirer aucune conclusion sur l'orientation des membranes pourpres, mais un fait devenait incontournable; le sens des photocourants observés en régime continu ne semblait avoir aucun lien avec l'orientation des membranes pourpres. Ceci devient d'autant plus évident lorsque nous regardons les résultats avec des électrolytes à pH 3.0 et à pH 7.0 en présence d'Enflurane. Pour chacun de ces types d'électrolyte, les photocourants recueillis sont dans des sens communs indépendamment de l'orientation.

En plus de ne pas être reliés avec les sens d'orientation des membranes pourpres, les photocourants que nous observons ne peuvent être interprétés par l'hypothèse de Robertson et Lukashev que nous avons vue dans la littérature. Comme nous l'avons mentionné, l'hypothèse de Robertson et Lukashev suppose toujours une inversion du signal photoélectrique de la bactériorhodopsine entre des électrolytes à pH 7.0 et pH 3.0 et ce, pour un même type de déposition. Or si nous comparons les photocourants que nous avons obtenus pour ces deux pH d'électrolytes, nous avons deux cas où il n'y a pas d'inversion c'est-à-dire pour la membrane électrodéposée et celle séchée à pH 3.0.

Par contre l'effet de l'Enflurane sur les photocourants est vraiment remarquable et réversible. Le ralentissement de la disparition de l'intermédiaire M du photocycle de la bactériorhodopsine a un lien direct avec la modification des photocourants observés et ce pour toutes formes de dépositions. On remarque aussi que la membrane pourpre électrodéposée semble avoir un comportement particulier qui nous est révélé par la présence d'anesthésique. Ainsi nous avons vu que l'Enflurane influence le photocycle de la bactériorhodopsine électrodéposée de façon différente aux autres dépositions. Toutes les formes de dépositions ont un signal très semblable sous Enflurane avec comme caractéristique un bref pic positif à l'ouverture de la lumière suivi d'un signal négatif, suivi de la séquence inverse à la fermeture de la lumière. Mais la membrane électrodéposée n'a pas de pic positif à l'ouverture de la lumière, seulement un signal négatif. De plus l'effet de l'Enflurane n'est pas réversible comme pour les autres dépositions.

À la lumière de ces résultats qui semblent incohérents et qui ne collent à aucune explication déjà fournie par la littérature, nous n'avons pas misé sur l'élaboration et la spéculation d'une nouvelle théorie qui tenterait de généraliser tous nos résultats. Nous nous sommes plutôt penchés sur le pourquoi de cette incohérence. La réponse nous vient de la technique elle-même.

En effet la technique que nous utilisons et que les auteurs cités plus haut utilisent aussi est une méthode d'échantillonnage lente puisqu'elle s'étend sur quelques secondes comparativement aux vitesses extrêmement rapides des phénomènes en jeu dans la bactériorhodopsine. Nous savons que les différents intermédiaires de la bactériorhodopsine ont des constantes de temps s'étalant des picosecondes aux millisecondes. Chacun de ces intermédiaires est susceptible d'être accompagné de différents déplacements de charges et donc le même éventail de vitesses peut être présumé pour les courants. Pour un éclair de lumière très bref, chaque impulsion brève de courant générée par le photocycle de la bactériorhodopsine engendre une réaction de notre système de mesure. Donc chaque impulsion de courant est convoluée avec les réactions du système des autres impulsions, ce qui donne le signal final. Mais les résultats que nous observons sont plus que le résultat d'un éclair bref de lumière, il s'agit plutôt de la conséquence d'un équilibre atteint entre la

bactériorhodopsine et le système avec une lumière continue. Ceci ajoute à la convolution une superposition des signaux convolués dans le temps où l'équilibre s'installe entre l'éjection et la capture de protons par la bactériorhodopsine, ce qui rend le signal final encore plus complexe car il véhicule une quantité impressionnante d'informations convoluées et superposées.

À partir de ces considérations, il est difficile de penser expliquer les résultats des photocourants dans leurs sens et leurs amplitudes. Les moindres variations de conditions expérimentales changent les impulsions de courants initiales dans leurs amplitudes et leurs vitesses et les résultats de leurs convolutions est imprévisible. La vitesse d'échantillonnage de la méthode ne permet pas de discriminer les effets des impulsions de base du signal. Nous pouvons seulement voir les effets de la disparition de l'intermédiaire M sur l'équilibre des photocourants car cet intermédiaire est suffisamment lent pour être dans l'ordre de grandeur de nos mesures, c'est-à-dire entre 10 et 100 millisecondes.

Il faut plutôt nous tourner vers une méthode plus rapide d'observation des photocourants et surtout utiliser une brève excitation lumineuse pour étudier les photocourants transitoires du cycle de la bactériorhodopsine et non un équilibre en régime continu. Nous poursuivrons donc ce travail en effectuant des analyses cinétiques des photocourants transitoires de la bactériorhodopsine en excitant cette dernière avec un bref éclair laser.

4.4 Photocourant transitoire.

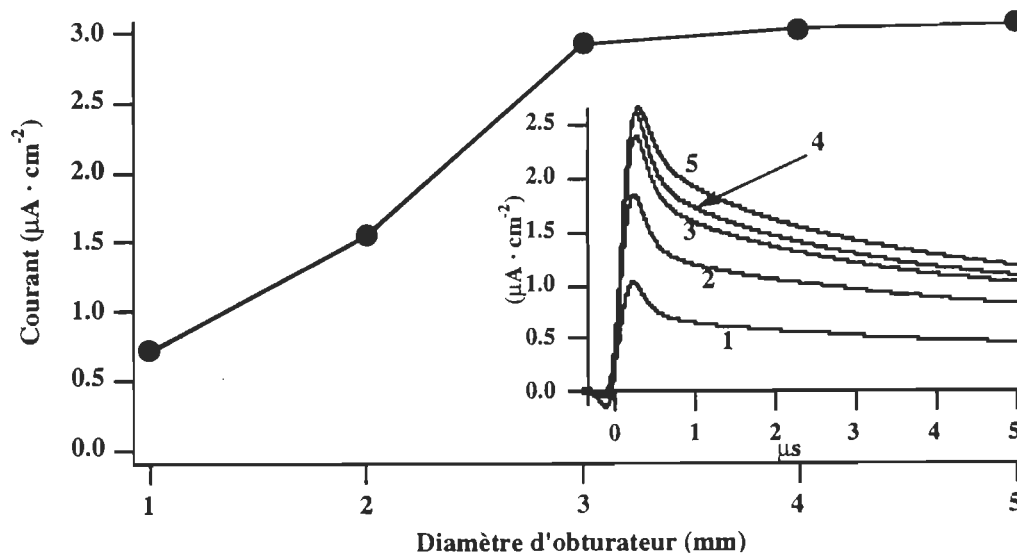
Comme nous venons de le voir dans la section précédente, il nous faut donc une autre méthode de mesure des photocourants que celle en régime continu. La technique d'acquisition des photocourants transitoires que nous avons décrite à la section 2.8 nous permet de suivre le photocourant produit par une population de bactériorhodopsines synchronisées. Ce que nous voulons signifier par synchronisation des bactériorhodopsines c'est qu'elles sont toutes excitées dans un laps de temps très court. Cette excitation se fait à l'aide d'un faisceau de lumière presque saturant (laser Yag 532 nm, 70 mJ) pendant 10 nanosecondes. Pendant cette période il y a assez de photons pour exciter près de 90% des bactériorhodopsines (tel que déterminé par la courbe d'intensité de la figure 4.16). C'est à ce moment que nous suivons l'évolution dans le temps des courants produits par les différentes étapes du pompage de protons de la bactériorhodopsine.

Figure 4.16

Courbe de courant maximum en fonction du diamètre d'obturateur.

Membrane pourpre déposée par séchage à pH 7.0. À 5mm de diamètre puissance maximal du laser.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0. L'insert montre les pics maximums de courant pour chaque diamètre d'obturateur.



Cette façon de faire nous permet d'éliminer la convolution et l'addition dans le temps des signaux observés en régime continu. Ainsi nous observons le photocourant durant un photocycle de la bactériorhodopsine à partir d'un temps zéro (10 ns d'excitation) sans qu'il y est ajout d'autres cycles pendant le temps d'analyse.

Avant d'aller plus loin dans ce chapitre, nous allons définir deux expressions que nous allons utiliser fréquemment pour qualifier nos photocourants transitoires: photocourant transitoire rapide ou cinétique rapide et photocourant transitoire lent ou cinétique lente. Ces deux expressions sont reliées à notre matériel de laboratoire et définies de façon arbitraire. Ainsi nous utilisons deux oscilloscopes d'acquisition ayant des vitesses d'échantillonnage maximales différentes. Par conséquent nous obtenons deux séries de résultats, l'une provenant de l'oscilloscope rapide que nous nommons cinétique rapide et l'autre provenant de l'oscilloscope lent nommée cinétique lente. Les résultats rapides sont enregistrés dans un intervalle de 0 à 70 microsecondes à raison d'un échantillonnage de 5 nanosecondes par point. Les parties lentes s'étalent entre 0 et 0.3 seconde en procédant à deux échantillonnages successifs de 0.5 et 20 microsecondes par point.

Tout au long de cette section sur les photocourants transitoires, nous allons nous référer aux résultats admis par la littérature. Rappelons que ces résultats ne sont pas faits avec des dépôts sur des électrodes mais plutôt avec des membranes pourpres dont l'orientation est maintenue par de l'acrylamide. Malgré les différences entre nos techniques d'orientation et celles de la littérature, nous allons tenter d'établir un parallèle entre ces photocourants et les nôtres afin de mieux comprendre les déplacements de charges à l'intérieur de la bactériorhodopsine.

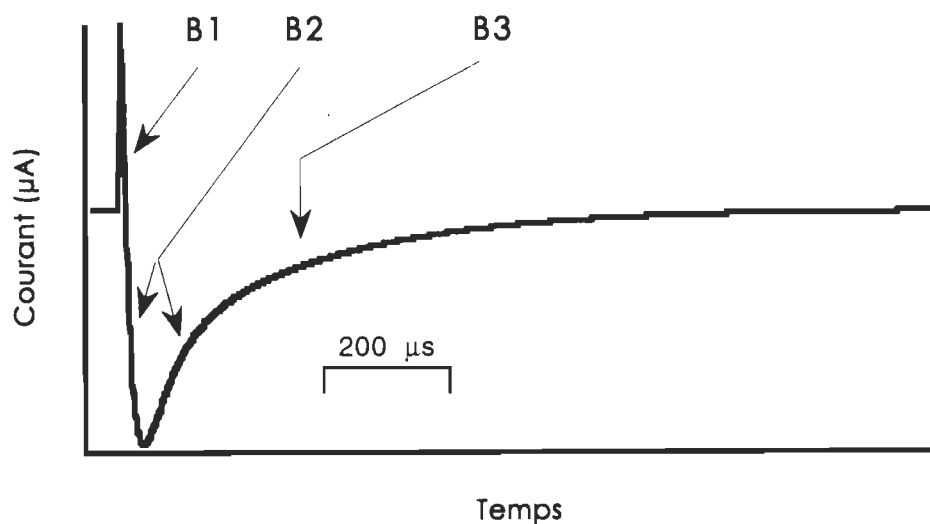
Ainsi pour arriver à ces comparaisons nous utiliserons la nomenclature admise dans la littérature décrivant les photocourants transitoires de la bactériorhodopsine en trois composantes (Drachev et al., 1978). Ces trois composantes se dénomment B1, B2 et B3 (voir figure 4.17). Les termes B1 et B2 ont été utilisés par Hong et Montal (1979) et la composante B3 a été utilisée par Liu (1990). Les cinétiques rapides que nous observons correspondent à la composante B1 de la séquence connue des photocourants de la bactériorhodopsine. Cette composante est caractérisée par un temps de montée très rapide

de moins de 100 picosecondes (Trissl, 1985; Groma et al., 1988) et de sens inverse à la direction normale de pompage de protons à travers la molécule (Keszthelyi et Ormos, 1983). B1 est aussi associée aux transitions optiques $bR \rightarrow K \rightarrow L$ du photocycle.

Les deux autres composantes B2 et B3 sont comprises dans nos cinétiques lentes. Elles sont reliées aux autres transitions optiques $L \rightarrow M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow bR$ du photocycle, à l'éjection du proton (B2) ainsi qu'à la capture du proton (B3) dans le processus de pompage de la bactériorhodopsine (Lanyi, 1993; Balashov et Ebrey, 1994).

Figure 4.17

Représentation schématique des composantes B1, B2 et B3



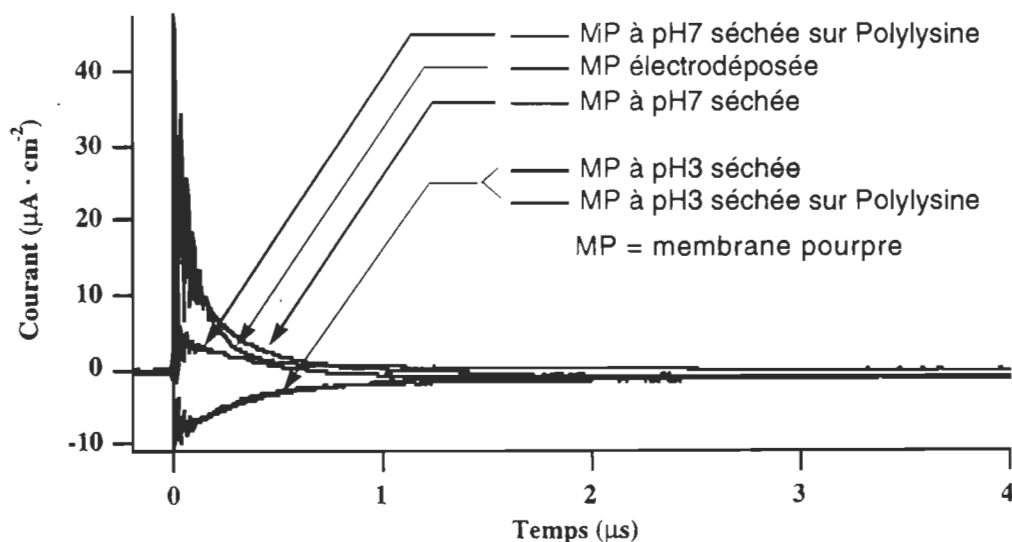
4.4.1 Photocourants transitoires rapides avec électrolyte à pH 7.0 (cinétiques rapides, B1).

Les résultats qui suivent ne comprennent que les observations rapides des cinétiques de la bactériorhodopsine. Suite à notre incapacité dans les sections précédentes à déterminer et prédire l'orientation de la membrane pourpre en fonction des méthodes d'orientation utilisées, nous allons de nouveau examiner les photocourants produits pour chacune des techniques d'orientation. La figure qui suit montre ces résultats. Les courbes ont été échantillonnées à une vitesse de 5 nanosecondes par point et les cinq types de dépositions que nous utilisons ont servi aux manipulations. Pour chaque type d'échantillon l'électrolyte utilisé était constitué de: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM à pH 7.0.

Figure 4.18

Photocourants rapides pour nos cinq types de déposition de membrane pourpre.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.



Nous remarquons immédiatement que nous avons trois signaux positifs et deux signaux négatifs. Parmi ces signaux, nous avons trois méthodes de déposition dont nous savons le sens d'orientation à partir de la littérature. L'électrodéposition et le séchage à pH 7.0 de la membrane pourpre sur polylysine nous donnent une orientation côté cytoplasmique et des signaux positifs. Par contre, la méthode de déposition par séchage à pH 3.0 sur polylysine nous donne une orientation extracellulaire et produit un courant négatif. Il devient donc évident que les signaux que nous observons avec cette technique confirment nos présomptions quant au sens d'orientation de nos échantillons.

Les deux autres méthodes de déposition, soit le séchage de membranes sur platine nu à pH 7.0 et pH 3.0, nous donnent des courants inversés l'un par rapport à l'autre. Le séchage à pH 7.0 produit un photocourant positif comme les orientations côté cytoplasmique et le séchage à pH 3.0 produit un photocourant négatif comme l'orientation extracellulaire. Ces résultats nous démontrent donc qu'il y a une orientation spontanée des membranes pourpres lors d'un simple séchage des membranes sur une électrode. Ainsi notre hypothèse de départ concernant la possible orientation spontanée des membranes pourpres se voit confirmée par cette méthode d'observation de la réponse photoélectrique de la bactériorhodopsine.

Nous constatons aussi que les signaux observés vont en sens inverse du pompage de protons par la bactériorhodopsine. En effet, le sens de pompage de protons à travers la membrane pourpre se fait du côté cytoplasmique vers le côté extracellulaire. Ainsi, de nos résultats précédents, si nous prenons exemple de l'orientation cytoplasmique, nous observons un photocourant positif qui représente un courant de protons vers l'électrode de travail. Il y a donc un transport de charges positives allant du côté extracellulaire vers le côté cytoplasmique. Le courant observé dans cet intervalle de temps est donc inverse au sens de pompage de protons.

Ceci est en accord avec la littérature (Keszthelyi, 1984) et la nomenclature B1 sur les photocourants qui associe ce courant au déplacement de charge qui accompagne l'isomérisation du chromophore dans les premiers instants du photocycle de la bactériorhodopsine.

4.4.2 Photocourants transitoires rapides avec différents électrolytes (cinétiques rapides, B1)

Dans la section précédente nous avons observé les photocourants de la bactériorhodopsine pour les cinq façons que nous avons de déposer la membrane pourpre sur nos électrodes de travail. L'électrolyte utilisé pour les mesures était toujours le même puisque nous voulions observer l'effet des méthodes de déposition sur le sens des photocourants observés.

Dans cette section nous allons plutôt observer l'effet de différents électrolytes sur l'activité photoélectrique de la bactériorhodopsine. Ainsi pour chaque type de déposition nous allons observer les photocourants de la bactériorhodopsine en fonction de quatre différents électrolytes:

1. KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.
2. KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 3.0.
3. KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 2.0.
4. KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0, Enflurane en saturation.

Les cinq figures qui suivent représentent la réponse photoélectrique d'un type de déposition soumis à quatre différents électrolytes. La figure **4.19** représente le photocourant de la membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur une plaque de platine nu. La figure **4.20** représente le photocourant de la membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur une plaque de platine ayant été préalablement traitée à la poly-L-lysine. La figure **4.21** nous montre les photocourants de la membrane pourpre ayant été électrodéposée sur une plaque de platine. La figure **4.22** montre les photocourants de la membrane pourpre séchée à pH 3.0 sur une plaque de platine nu. Et finalement, la figure **4.23** affiche les photocourants de la membrane pourpre séchée à pH 3.0 sur plaque de platine ayant été traitée avec poly-L-lysine.

Figure 4.19

Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 7.0 sur platine nu.

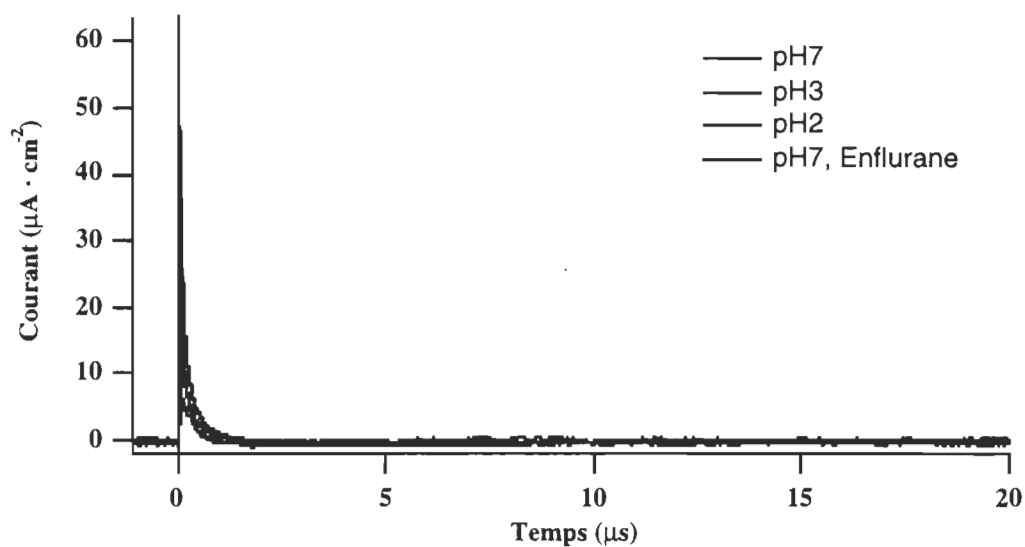


Figure 4.20

Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 7.0 avec platine traité à la poly-L-lysine.

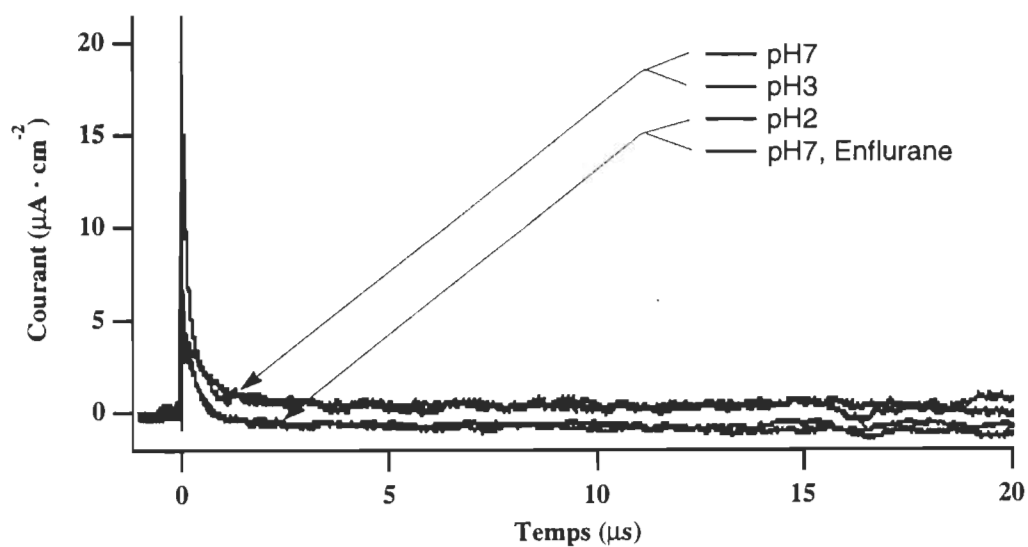


Figure 4.21

Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre électrodéposée sur platine.

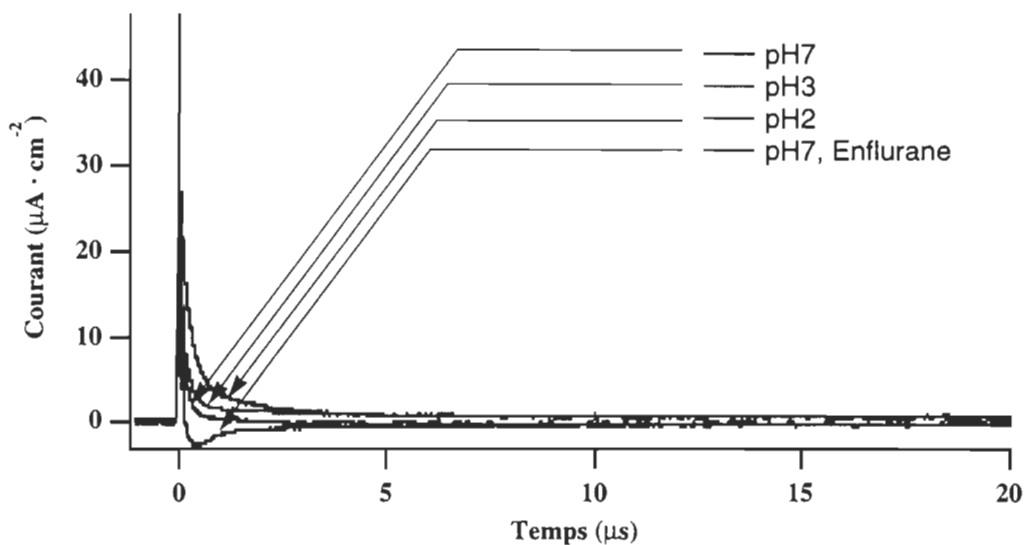


Figure 4.22

Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 3.0 sur platine nu.

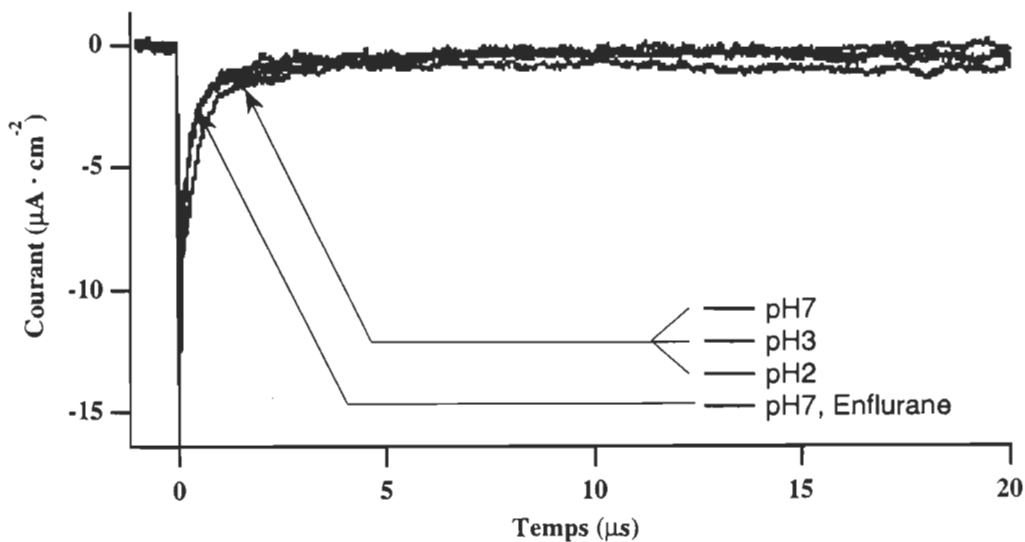
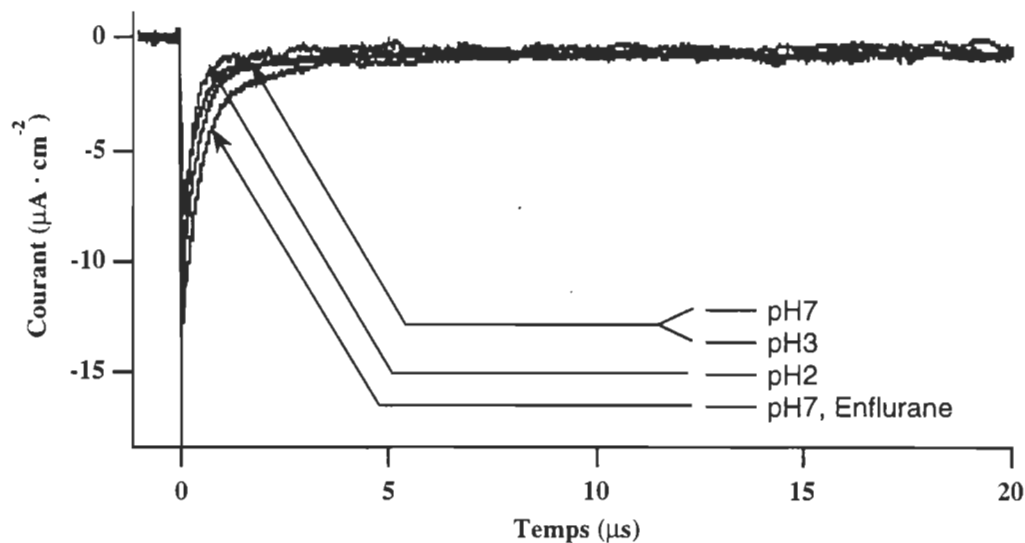


Figure 4.23

Photocourants rapides pour quatre différents électrolytes; membrane pourpre séchée à pH 3.0 avec platine traité à la poly-L-lysine.



On remarque immédiatement qu'il y a deux cas de figure, celui dont la réponse en photocourant est positive et celui dont la réponse est négative. Ainsi les trois premières figures (4.19, 4.20 et 4.21) montrent un signal positif pour des échantillons de membranes pourpres séchées à pH 7.0 sur platine traité ou non traité à la poly-L-lysine ou électrodéposé sur platine. Rappelons que ces trois types de dépôts ont une orientation côté cytoplasmique des membranes pourpres. Les deux autres figures (4.22 et 4.23) montrent des signaux négatifs qui sont dus à de la membrane pourpre séchée à pH 3.0 sur platine traité ou non traité avec de la poly-L-lysine, c'est-à-dire des orientations extracellulaires. Cette observation sur le sens des signaux en fonction de leur type de déposition vient bien confirmer nos résultats de la section précédente.

Mais en plus de confirmer l'orientation spontanée des membranes pourpres, nous constatons que le sens des signaux (positif \Rightarrow orientation cytoplasmique, négatif \Rightarrow orientation extracellulaire) n'est pas influencé par le pH de l'électrolyte utilisé lors des mesures ou la présence d'Enflurane. Contrairement à l'observation des photocourants en

régime continu, ou l'électrolyte influençait le sens des signaux recueillis, cette méthode de lecture rapide des photocourants transitoires nous montre que la partie rapide des courants de la bactériorhodopsine n'est pas influencée par le choix de l'électrolyte mais que ces courants sont le reflet de l'orientation de la membrane pourpre.

Voyons maintenant les constantes de temps associées à ces cinétiques de photocourant à partir du tableau 4.1 de la page suivante. Ces constantes de temps ont été déterminées par l'ajustement de sommes d'exponentielles aux signaux expérimentaux par moindres carrés non linéaires. Nous avons établi que les meilleurs ajustements avec un minimum d'exponentielles correspondent à des modèles à deux exponentielles, soit deux constantes de temps. (Notons que les signaux sont ajustés dans la phase de disparition des courants et non dans celle d'apparition qui est dans la partie bruyante et oscillante de l'amplificateur). Dans le tableau 4.1 nous avons les constantes de temps de ces deux exponentielles. La première exponentielle, qui est la plus rapide, a un taux de décroissance de l'ordre de quelques centaines de nanosecondes avec une incertitude de plus ou moins 35 nanosecondes (premier écart type).

Nous constatons pour cette première exponentielle que pour un même type de déposition, la différence de pH de l'électrolyte ou la présence d'Enflurane lors des mesures ne semble pas affecter de façon significative (à l'extérieur de nos marges d'incertitude) les vitesses des signaux obtenus. Il est à remarquer aussi que la vitesse des cinétiques, quelque soit l'orientation de la bactériorhodopsine ou son mode de déposition, ne varie pas non plus à l'intérieur des marges d'incertitude. Nous constatons aussi que le sens des courants est inverse au sens de pompage des protons, ce qui nous permet de relier cette première exponentielle à la nomenclature B1¹. Ce critère d'inversion est très important pour associer la deuxième exponentielle à B1 car nos constantes de temps ne correspondent pas aux temps de la littérature qui sont de l'ordre de 100 psec. Cette absence de correspondance entre constantes de temps vient probablement du fait que nous ne savons rien de la

1. Nous relierons les événements et les temps de passage de nos cinétiques à la nomenclature B1, B2 et B3 et non à la forme puisqu'elles sont différentes. Ceci est dans le but de mieux comprendre et établir un parallèle entre notre façon de faire et celle utilisée dans la littérature, nous y reviendrons à plusieurs occasions plus loin.

littérature sur le temps de disparition de B1 qui est sûrement dans l'ordre de plusieurs nsec, ce qui se rapprocherait de nos signaux.

Ces dernières observations nous amènent directement à relier les photocourants observés à un ou des déplacements de charges à l'intérieur de la molécule, déplacements indépendants du milieu environnant de la membrane pourpre. Ces mouvements de charges ne seraient donc pas influencés par les changements de dipôle de la membrane (variation de pH) ou les changements de maximums d'absorption de la bactériorhodopsine dus à la présence d'Enflurane ou de conditions acides.

La deuxième exponentielle fait aussi partie du signal B1 puisqu'elle est inverse au sens de pompage de protons par la bactériorhodopsine. Cette deuxième exponentielle fait suite à la première avec une constante de temps moyenne de 3 microsecondes. Comme la première, cette décroissance reflète aussi le sens d'orientation des membranes pourpres. Par contre la dispersion des constantes de temps sort des limites d'incertitude que nous avons estimées à $\pm 0.3 \mu\text{s}$. Cette plus grande dispersion nous amène à penser que les déplacements de charges reliées à cette deuxième exponentielle sont dépendants des conditions du milieu environnant de la membrane pourpre.

Revenons maintenant au tableau précédent et observons les valeurs et le sens des exponentielles recueillies pour le cas de la membrane pourpre électrodéposée avec un électrolyte contenant de l'Enflurane. La valeur de la deuxième exponentielle est encadrée en gris pour une raison bien particulière. Contrairement aux autres conditions expérimentales, la deuxième exponentielle ne va pas dans le même sens que la première. Par conséquent ce courant ne fait pas partie de la composante B1 du signal photoélectrique de la bactériorhodopsine mais fait plutôt partie de la composante B2. Nous reviendrons en détail sur ce point lors de notre discussion sur les effets de l'Enflurane.

Tableau 4.1
Constantes de temps pour les photocourants rapides avec différents électrolytes.

	Électrolite	Première exponentielle		Deuxième exponentielle	
		Amplitude Relative	Const. de temps ns (± 35)	Amplitude Relative	Const. de temps μ s (± 0.3)
bRe	pH7	0.96	108	0.04	1.1
	pH3	0.95	163	0.05	2.8
	pH2	0.86	203	0.14	1.4
	Enf	1	118	-0.25	0.5
bRL_7	pH7	0.94	346	0.06	5.3
	pH3	1	311	—	—
	pH2	0.88	159	0.12	1.2
	Enf	0.95	443	0.05	5.4
bRL_3	pH7	-0.87	327	-0.13	4.9
	pH3	-0.89	345	-0.11	1.4
	pH2	-0.92	180	-0.08	1.4
	Enf	-0.86	394	-0.14	3.0
bRs_7	pH7	0.77	163	0.23	0.6
	pH3	0.92	125	0.08	0.5
	pH2	0.88	158	0.12	0.8
	Enf	1	246	—	—
bRs_3	pH7	-0.84	232	-0.16	4.2
	pH3	-0.86	291	-0.14	2.1
	pH2	-0.89	250	-0.11	3.3
	Enf	-0.84	254	-0.16	1.5

Amplitude relative: normalisation à l'unité de la somme des amplitudes des cinétiques d'un même signal.

Amplitude négative:.... $\exp(-t/\tau)$

Amplitude positive: $-\exp(-t/\tau)$

bRe:.....MP électrodéposé.

bRL_7:.....MP à pH 7.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRL_3:.....MP à pH 3.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRs_7:.....MP à pH 7.0 séchée sur platine nu.

bRs_3:.....MP à pH 3.0 séchée sur platine nu.

MP:.....membrane pourpre.

4.4.3 Photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 7.0 (cinétiques lentes, B2, B3).

Dans cette section nous allons regarder les phases lentes de nos signaux en régime transitoire. Les deux figures qui suivent montrent les photocourants obtenus pour deux échelles de temps complémentaires couvrant entièrement l'étendue des signaux. La première figure montre les courbes sur une échelle de temps de 0 à 3 ms, tandis que la seconde montre les mêmes résultats sur une échelle de temps plus grande allant de 0 à 50 ms. Nous n'avons recueilli les photocourants que pour les quatre cas de déposition par séchage (séchage¹ à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement à la polylysine). Le cas de l'électrodéposition sera vu un peu plus tard dans ce travail car comme nous l'avons observé à plusieurs reprises dans les sections précédentes, l'électrodéposition semble un cas d'exception. L'électrolyte utilisé était donc le même pour toutes les dépositions et sa concentration était de 100 mM de KCl tamponné à pH 7.0 avec un tampon citrate 10 mM.

En regardant les figures, nous constatons que les signaux vont tous dans le même sens. Dans les deux sections précédentes nous avons démontré par l'observation du sens des signaux rapides qu'il y avait des orientations inverses des membranes pourpres selon le type de déposition. De même nous serions en droit de nous attendre au même phénomène d'inversion des signaux en fonction de l'orientation des membranes pourpres pour les signaux lents. Rappelons que les signaux lents sont la continuité des signaux rapides vus sur une échelle de temps plus lente.

1.Légende sur les abréviations utilisées dans les figures et tableaux pour cette section et les suivantes:

bRe: MP électrodéposé.
bRL_7: MP à pH 7.0 séchée sur platine traité avec polylysine.
bRL_3: MP à pH 3.0 séchée sur platine traité avec polylysine.
bRs_7: MP à pH 7.0 séchée sur platine nu.
bRs_3: MP à pH 3.0 séchée sur platine nu.
MP:..... membrane pourpre.

Figure 4.24 (première échelle de temps).

Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement par polylysine. Électrolyte: KCl
100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.

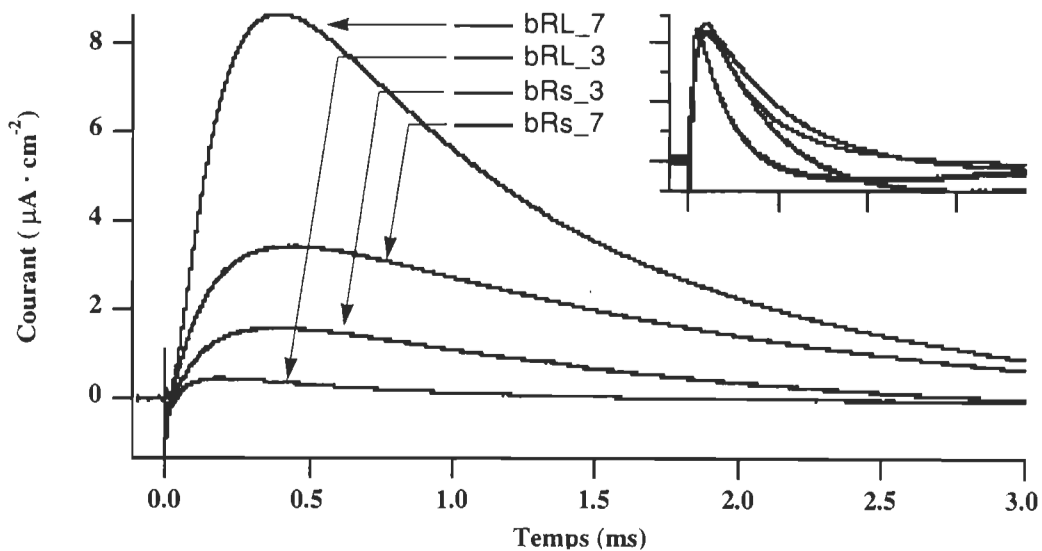
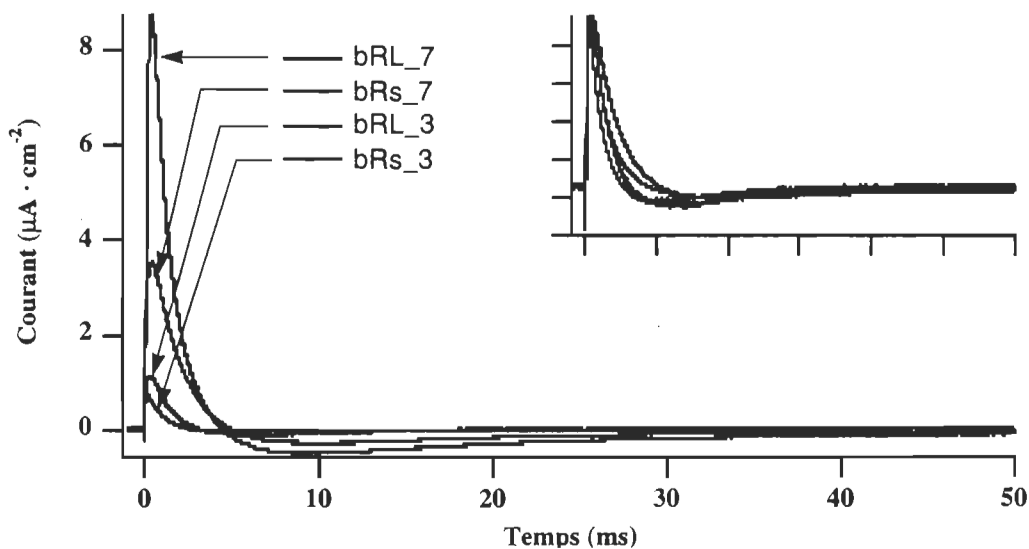


Figure 4.25 (deuxième échelle de temps).

Cinétiques lentes. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement par polylysine. Électrolyte: KCl
100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.



Cette absence de corrélation entre les sens des courants recueillis et l'orientation des membranes nous amène à éliminer tout lien direct entre le sens des courants observés et le sens vectoriel du pompage de protons par la bactériorhodopsine pour les composantes lentes des signaux. En d'autres termes, les courants lents ne sont pas une lecture des déplacements de protons à l'intérieur des bactériorhodopsines. En plus d'être tous dans le même sens, nous remarquons aussi que les signaux sont tous semblables peu importe l'orientation des membranes pourpres en fonction de la méthode de séchage. Les vignettes de chaque figure montrent les signaux après normalisation arbitraire afin de mettre en évidence la similitude des réponses photoélectriques (les échelles des vignettes sont les mêmes que celles des figures hôtes).

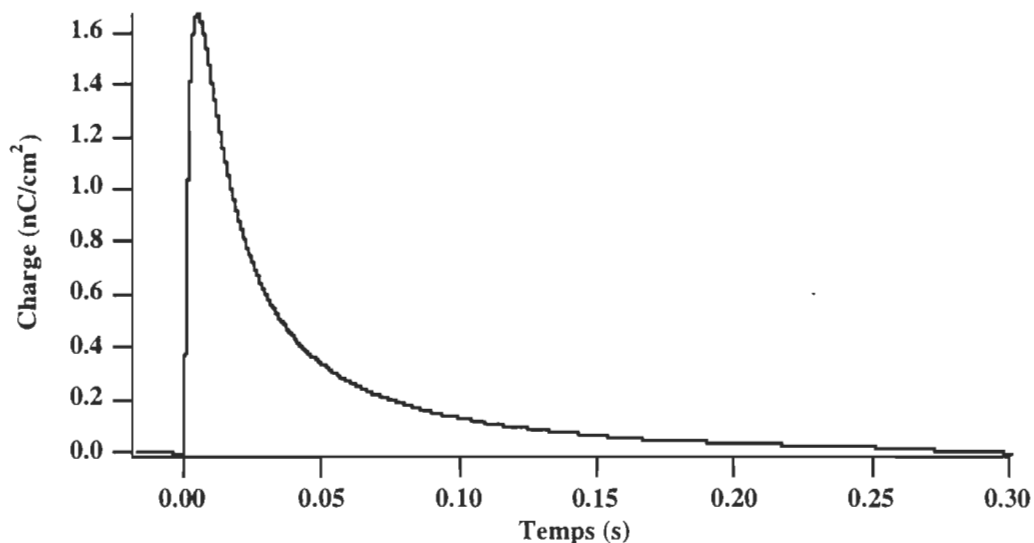
Nous observons un déplacement de charges positives (courant positif) vers l'électrode de travail (électrode de déposition). Ce courant est ensuite suivi du déplacement inverse de ces charges pour un retour à l'équilibre. Vérifions maintenant par intégration des courants, s'il y a symétrie entre les déplacements de charges de sens positifs et négatifs afin de mieux comprendre ce qui se passe dans notre cellule électrolytique.

L'intégration des courants dans le temps donne un résultat nul (voir figure 4.26). Ceci signifie que le déplacement de charges total est nul. Ainsi le nombre de charges déplacées pour produire le courant positif est égal à celui nécessaire pour produire le courant négatif et ce pour chaque photocourant observé.

Figure 4.26

Exemple d'intégration. Membrane pourpre séchée à pH 7.0.

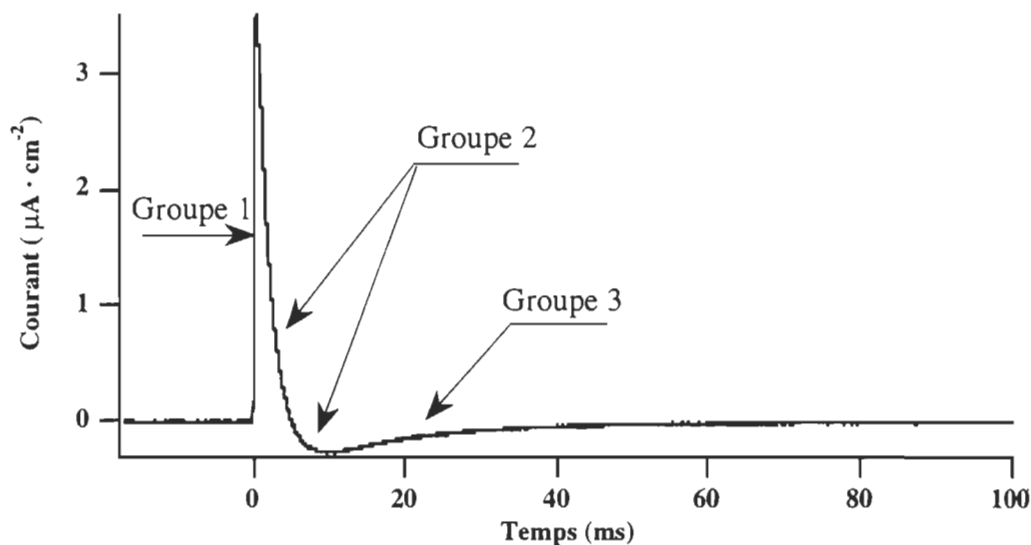
La courbe donne la somme des charges total s'ayant déplacé dans un sens moins celle dans le sens opposé



Regardons maintenant les constantes de temps associées aux photocourants. Le tableau 4.2 affiche les constantes de temps pour chaque cinétique observée. Les cinétiques ont été séparées en trois groupes selon leur sens. Le premier groupe représente la montée positive du photocourant. Le second groupe est composé d'une ou deux exponentielles associées à la diminution du courant positif et à l'apparition du courant négatif. Le dernier groupe est associé au retour à l'équilibre. La figure 4.27 qui suit nous permet de mieux visualiser ces groupes.

Figure 4.27

Identification des phases lentes avec électrolyte à pH 7.0.



Suite aux constantes de temps que nous avons recueillies par photolyse éclair sur l'apparition et la disparition de l'intermédiaire M (voir tableau 4.3) en accord avec les données admises dans la littérature (section 1.5.2; Birge, 1990), nous pouvons associer chacun des trois groupes de photocourant aux cinétiques optiques de la façon suivante.

Nous savons qu'à l'apparition de l'intermédiaire M il y a un mouvement de charges provenant de la déprotonation du rétinol et que inversement, à la disparition de ce même intermédiaire, il y a mouvement de charges vers la reprotonation du rétinol. Nous devons donc être en mesure d'identifier des courants correspondants à ces mouvements de charges spécifiques et ce, dans le même ordre de temps que les cinétiques optiques associées à ces mouvements. Mais nous ne nous attendons pas nécessairement à avoir une correspondance exacte entre le nombre de cinétiques optiques et de cinétiques photoélectriques.

Ainsi les constantes de temps du premier groupe correspondent aux constantes de temps de l'apparition de l'intermédiaire M_{412} , tandis que le groupe 2 correspond à la disparition de ce même intermédiaire jusqu'au passage à l'intermédiaire O_{630} . Pour ce qui est du groupe 3, les temps τ_m correspondraient au recouvrement de l'état initial de la bactériorhodopsine.

Tableau 4.2**Constantes de temps pour photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 7.0.**

	Groupe 1		Groupe 2		Groupe 3		Groupe 3	
	1 exp. (Amp) τ (μ s)	2 exp. (Amp) τ (μ s)	3 exp. (Amp) τ (ms)	4 exp. (Amp) τ (ms)	5 exp. (Amp) τ (ms)	6 exp. (Amp) τ (ms)	7 exp. (Amp) τ (ms)	
bRL_7	(-1) 163	(0.57) 632	(0.43) 2.01	(-0.79) 10.5	(-0.21) 38.4			
bRL_3	(-1) 56	(1) 760			(-1) 6.3			
bRs_7	(-1) 162		(1) 1.95	(-0.92) 12.9	(-0.08) 53.9			
bRs_3	(-1) 160		(1) 1.46	(-0.99) 6.1	(-0.01) 59.9			

Amplitude relative (Amp): ...normalisation à l'unité de la somme des amplitudes des cinétiques d'un même groupe.

Amplitude positive: $A \cdot \exp(-t/\tau)$

Amplitude négative: $-A \cdot \exp(-t/\tau)$

bRL_7:MP à pH 7.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRL_3:MP à pH 3.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRs_7:MP à pH 7.0 séchée sur platine nu.

bRs_3:MP à pH 3.0 séchée sur platine nu.

Tableau 4.3

Constantes de temps associées à l'apparition et à la disparition de l'intermédiaire M_{412} .

Cinétiques obtenues par photolyse éclair, faisceau d'analyse à 410 nm.

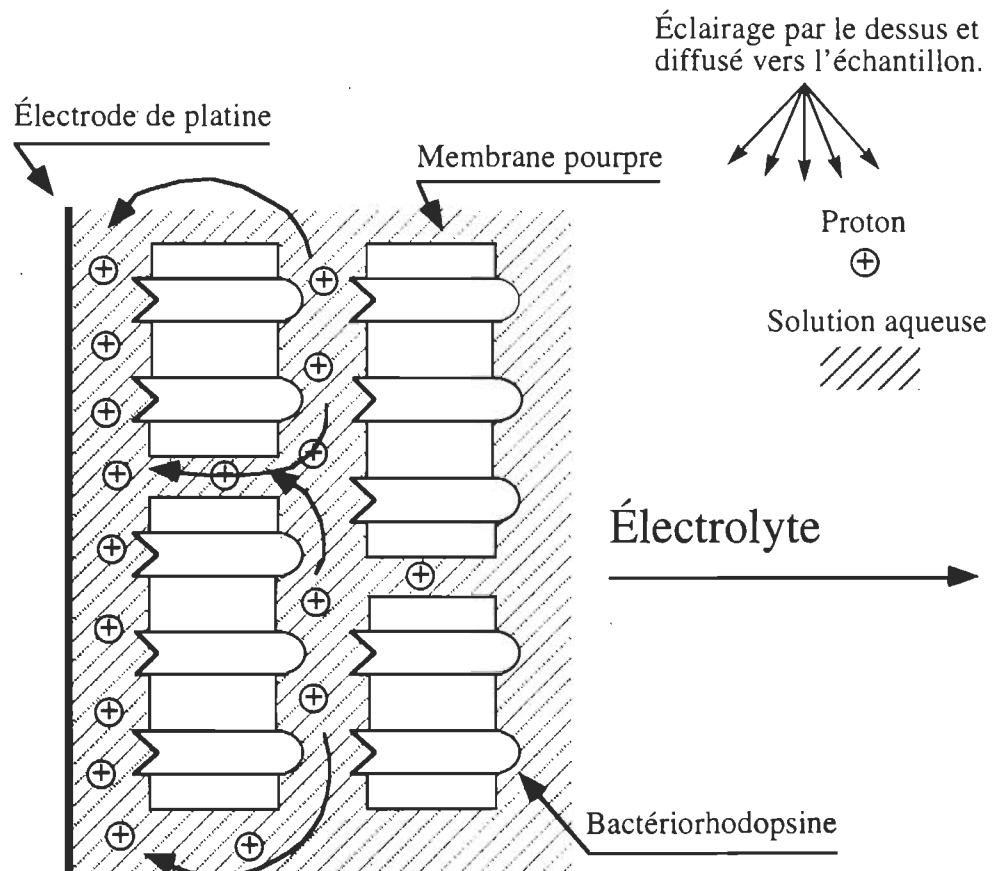
Apparition de M_{412}		Disparition de M_{412}	
1 exp. (Amp) τ (μ s)	2 exp. (Amp) τ (μ s)	3 exp. (Amp) τ (ms)	4 exp. (Amp) τ (ms)
(0.14) 16.2	(0.86) 66.5	(0.38) 1.82	(0.62) 4.65

Amplitude relative(Amp):normalisation à l'unité de la somme des amplitudes des cinétiques d'un même signal.

À partir des résultats précédents et de nos observations, nous sommes maintenant prêt à expliquer ces courants en faisant appel à l'hypothèse de Robertson et Lukashev dont nous avons discuté au chapitre 3. Pour la suite de nos explications nous ferons référence à la figure 4.28. Regardons ce qui se passe à l'interface de l'électrode de travail et des toutes premières couches de membranes déposées. Lors de la déposition par séchage, les membranes pourpres sont en solution aqueuse. Après séchage, l'eau n'est certainement pas retirée entièrement et il en demeure une certaine quantité absorbée et/ou piégée entre les membranes et aussi entre l'électrode et les membranes. Cette quantité d'eau résiduelle (solution aqueuse) n'est pas à confondre avec l'électrolyte qui lui, est ajouté après les dépositions pour servir de conducteur et boucler le circuit de la cellule électrolytique.

Figure 4.28

Modèle de déplacement de charges pour photocourant avec variation de pH.



Lors de l'éjection des protons par les bactériorhodopsines, la quantité de protons dans l'eau environnant l'électrode et les membranes augmente et ceci peu importe le sens d'orientation des membranes pourpres. Ainsi le pH diminue aux abords de l'électrode produisant alors un courant positif dû au grand nombre de protons disponibles et mobilisés par les électrons libres du métal de l'électrode. Comme le mentionnaient Robertson et Lukaxhev, le courant positif que nous observons n'est pas le courant de proton vectoriel de la bactériorhodopsine, mais plutôt une variation du pH aux abords de l'électrode, résultant du largage de protons par les bactériorhodopsines. Cette diminution de pH ou augmentation de protons coïncide bien selon nos constantes de temps avec l'apparition de l'intermédiaire M_{412} qui est associé à l'éjection d'un proton par la bactériorhodopsine dans son photocycle.

De la même manière, l'apparition du courant négatif serait le résultat de la capture des protons par les molécules de bactériorhodopsine. Ainsi le nombre de protons aux abords de l'électrode diminuerait, provoquant une hausse du pH et par conséquent l'apparition d'un courant négatif jusqu'au retour à l'équilibre. De plus, ce courant négatif correspond aux exponentielles décroissantes du groupe 2 que nous avons identifiées comme étant reliées à la disparition de l'intermédiaire M_{412} jusqu'au passage à l'intermédiaire O_{630} . Or nous savons de la littérature (voir section 1.5.2) que c'est lors du passage à l'intermédiaire O_{630} qu'il y a capture des protons par les bactériorhodopsines.

Pour ce qui est du courant vectoriel de pompage de protons de la bactériorhodopsine, il est sûrement présent puisque nous avons démontré que les membranes pourpres étaient orientées. Nous devons donc conclure que l'intensité de ce courant de pompage est largement inférieur aux courants provoqués par les variations de pH à l'électrode et donc masqué par ce dernier. Par conséquent, nous n'observons que les variations de pH à l'électrode dû à la diffusion des protons éjectés par les molécules et cela, peu importe leur orientation.

Les signaux que nous observons n'ont pas la même forme que ceux observés dans la littérature, comme le montre la figure 4.17 sur la nomenclature B2 et B3. Ceci vient du fait que les photocourants rapportés dans la littérature sont des courants de protons et non des variations de pH, les mesures étant (comme nous l'avons déjà dit) obtenues avec des

échantillons de membranes orientées et immobilisées dans du polyacrylamide. Mais on peut tout de même associer la composante B2, reliée à l'apparition de l'intermédiaire M_{412} et à l'éjection de protons, aux groupes 1 et 2. La composante B3, associée à la disparition de l'intermédiaire M_{412} et à la capture des protons, serait identifiable aux groupes 2 et 3 de nos résultats. Le groupe 2 fait partie des deux composantes puisqu'il est le lien entre la disparition du courant positif et l'apparition du courant négatif.

4.4.4 Photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 3.0 (cinétiques lentes, B2, B3)

Regardons maintenant les signaux photoélectriques de la bactériorhodopsine dans des conditions d'électrolyte à pH 3.0. Les deux figures qui suivent font état des signaux pour tous les types de déposition à l'exception de l'électrodéposition. Car comme nous l'avons déjà dit, voilà un cas d'exception.

Comme à la section précédente, les signaux sont tous semblables et ne tiennent donc pas compte de l'orientation des membranes pourpres lors de la déposition. Les vignettes de chaque figure montrent les signaux après normalisation arbitraire afin de mettre en évidence la similitude des réponses photoélectriques (les échelles des vignettes sont les mêmes que celles des figures hôtes). De plus, ces courants enregistrés en présence d'électrolyte à pH 3.0 sont de formes inverses à ceux enregistrés à pH 7.0 à la section précédente. Pour expliquer ces signaux inverses, tout en utilisant comme hypothèse la variation du pH aux abords de l'électrode de travail (hypothèse de Robertson et Lukashev section précédente) il nous faudrait invoquer une augmentation du pH dans un premier temps, suivi d'une baisse. Ceci signifie une chronologie inverse des étapes de pompage qui prévalent à pH 7.0. Ainsi plutôt que les protons soient éjectés par la bactériorhodopsine puis repris dans un deuxième temps, il faudrait que les protons soient capturés par la bactériorhodopsine avant d'être éjectés. Il y aurait donc inversion de l'ordre de pompage de la molécule lorsqu'elle est dans des conditions acides (dans notre cas pH 3.0).

Nous connaissons de la littérature (Garty et al., 1977; Takeuchi et al., 1981) qu'il y a effectivement inversion de l'ordre de pompage de la bactériorhodopsine à des pH inférieurs à 4.0. Le sens du pompage est toujours le même, c'est seulement qu'il y a capture du proton du côté cytoplasmique avant l'éjection du côté extracellulaire.

Nos résultats viennent donc appuyer l'hypothèse de Robertson et Lukashev ainsi que l'inversion de l'ordre de pompage de la bactériorhodopsine à pH 3.0.

Figure 4.29 (première échelle de temps).

Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement par polylysine. Électrolyte: KCl
100 mM, tampon citrate 10 mM pH 3.0.

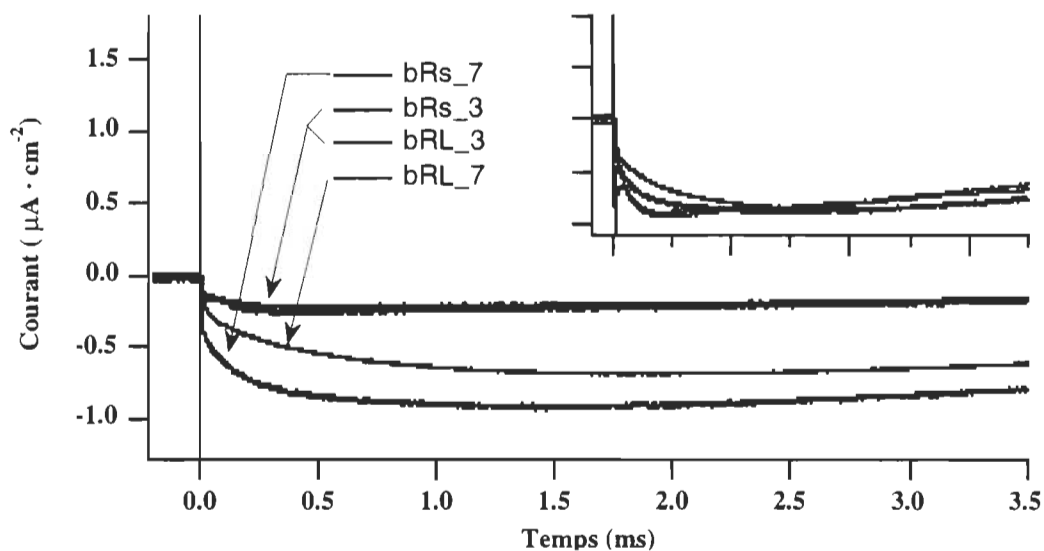
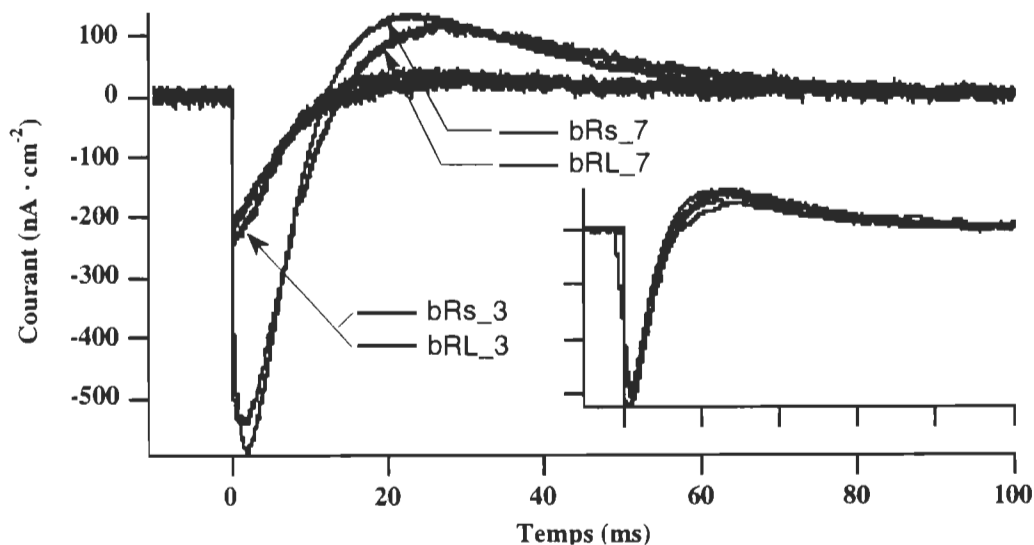


Figure 4.30 (deuxième échelle de temps).

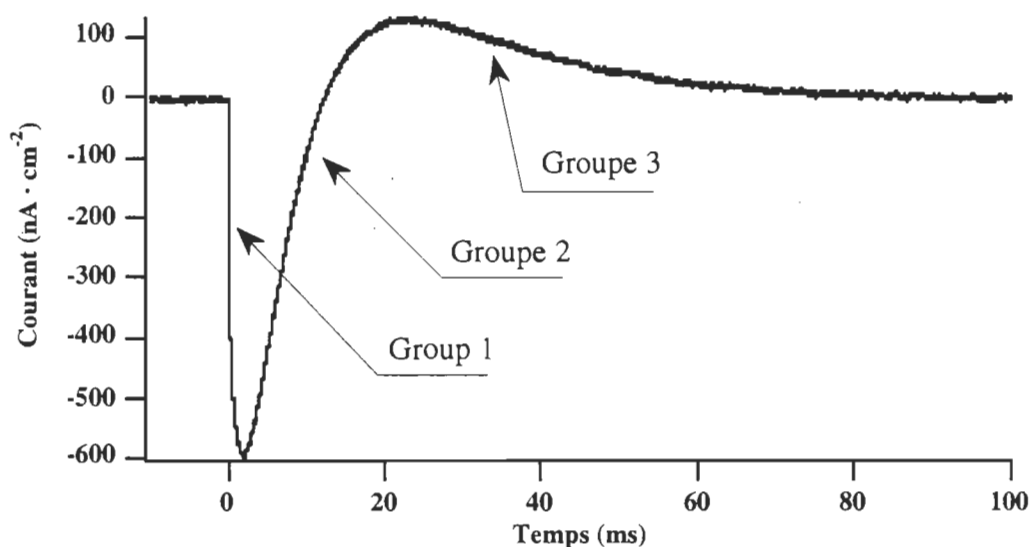
Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement par polylysine. Électrolyte:
KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 3.0.



Regardons maintenant les constantes de temps reliées aux cinétiques de ces photocourants. Comme à la section précédente, nous avons déterminé trois groupes de cinétiques (voir la figure 4.31). Ces trois groupes sont de sens opposé à ceux de la section précédente avec électrolyte à pH 7.0. Ainsi, le premier groupe correspond à la descente de courant négatif et on y observe de une à trois exponentielles. Le deuxième groupe, composé d'une exponentielle, est associé à la remontée de la première descente négative et à l'apparition du courant positif. Et le dernier groupe est associé au retour à l'équilibre.

Figure 4.31

Identification des phases lentes avec électrolyte à pH 3.0.



Le tableau de la page suivante présente les constantes de temps que nous avons trouvées pour chaque exponentielle formant les photocourants. Nous remarquons que dans le premier groupe nous avons des constantes de temps qui vont de l'apparition de l'intermédiaire M, pour la première exponentielle, jusqu'au passage à l'intermédiaire O pour la dernière exponentielle. Or selon notre hypothèse de travail et du fait que le groupe 1 soit associé à un courant négatif, nous constatons qu'à pH 3.0 il y a déjà capture des protons

par les bactériorhodopsines dès l'apparition de l'intermédiaire M. Ainsi, contrairement aux conditions de pH 7.0, il n'y a pas éjection de protons à l'apparition de l'intermédiaire M. En poursuivant l'analyse du groupe 1, nous voyons que la capture de protons se poursuit jusqu'à l'apparition de l'intermédiaire O qui, comme à pH 7.0, correspond à la capture normale des protons par les bactériorhodopsines.

Tableau 4.4

Constantes de temps pour photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 3.0.

	Groupe 1		Groupe 2		Groupe 3	
	1 exp. (Amp) τ (μ s)	2 exp. (Amp) τ (μ s)	3 exp. (Amp) τ (ms)	4 exp. (Amp) τ (ms)	5 exp. (Amp) τ (ms)	
bRL_7	(0.33) 117	(0.19) 572	(0.48) 2.05	(-1) 91	(1) 21.0	
bRL_3	(0.34) 106		(0.66) 2.40	(-1) 52	(1) 32.9	
bRs_7	(0.05) 183	(0.24) 580	(0.71) 2.35	(-1) 68	(1) 18.0	
bRs_3	(1.00) 111			(-1) 81	(1) 25.9	

Amplitude relative (Amp): ...normalisation à l'unité de la somme des amplitudes des cinétiques d'un même groupe.

Amplitude positive: $A \cdot \exp(-t/\tau)$

Amplitude négative:.....- $A \cdot \exp(-t/\tau)$

bRL_7:MP à pH 7.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRL_3:MP à pH 3.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRs_7:MP à pH 7.0 séchée sur platine nu.

bRs_3:MP à pH 3.0 séchée sur platine nu.

Passons maintenant au deuxième groupe qui est relié à la disparition de l'intermédiaire O et qui dans nos conditions acides, correspond à l'éjection des protons par les bactériorhodopsines avec l'apparition d'un courant positif. Quant au groupe 3, il correspond au retour à l'équilibre vers la bactériorhodopsine initiale.

En résumé nous constatons que nous avons la même séquence et les mêmes temps de cinétiques avec un électrolyte à pH 7.0 qu'avec un électrolyte à pH 3.0. La différence

réside dans l'inversion de l'ordre d'éjection et de capture du proton par la bactériorhodopsine. Des constantes de temps obtenues avec électrolyte à pH 7.0 et pH 3.0 (voir tableaux 4.2 et 4.4) nous voyons que la troisième exponentielle correspond dans les deux cas à la capture du proton par la bactériorhodopsine et que l'éjection est située soit avant soit après cette troisième exponentielle, selon que la mesure est faite à pH 7.0 ou pH 3.0.

4.4.5 Photocourants transitoires avec électrolyte à pH 2.0.

Voyons maintenant les cinétiques des courants des différentes méthodes de déposition avec une solution conductrice à pH 2.0. Les trois figures qui suivent affichent chacune les résultats des différentes méthodes de déposition pour des échelles de temps et d'amplification différentes couvrant tout le signal. Nous remarquons immédiatement une grande différence entre ces résultats et ceux avec des solutions conductrices autres que pH 2.0. Ces cinétiques ne possèdent qu'un seul pic de courant dans la partie très rapide du signal (signaux que nous avons d'ailleurs déjà observés à la section 4.4.2). En effet, mis à part le premier pic de départ que nous avons déjà identifié comme étant le résultat de déplacement de charges interne à la molécule dû à l'isomérisation du chromophore, les courants reviennent progressivement à zéro signifiant qu'il n'y a pas d'autre déplacement de charges.

Figure 4.32 (première échelle de temps)

Photocourant avec électrolyte à pH 2.0.

Électrodéposition et déposition par séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement par polylysine.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 2.0.

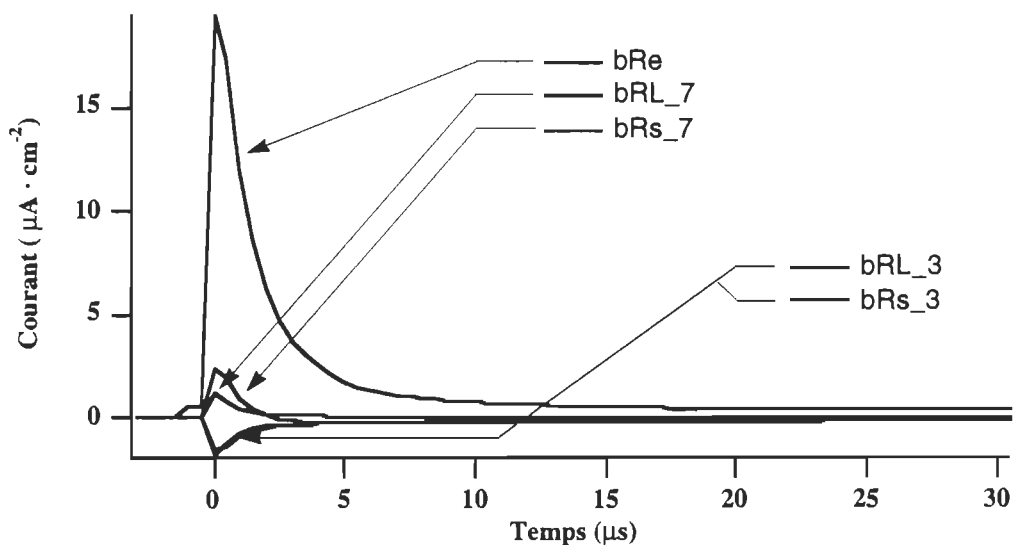
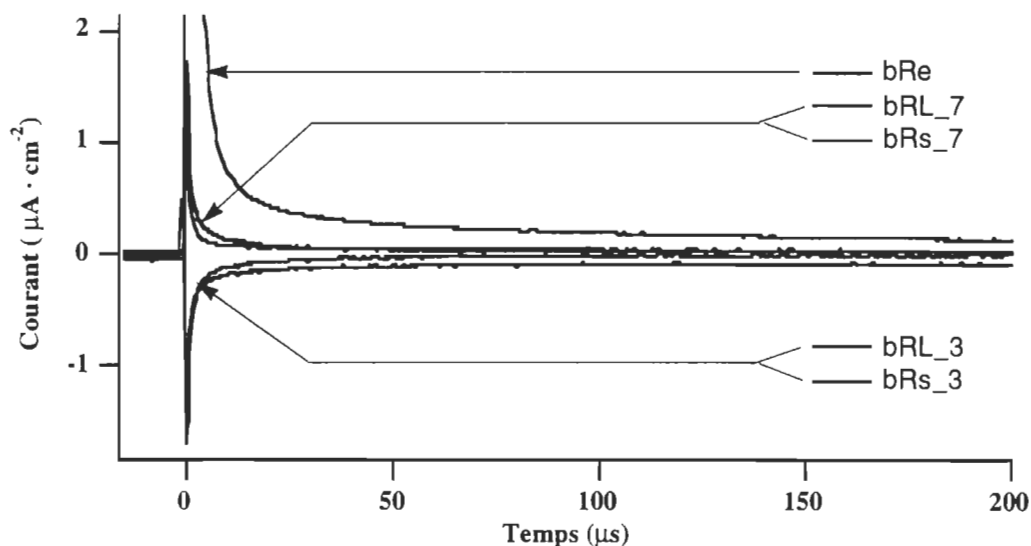
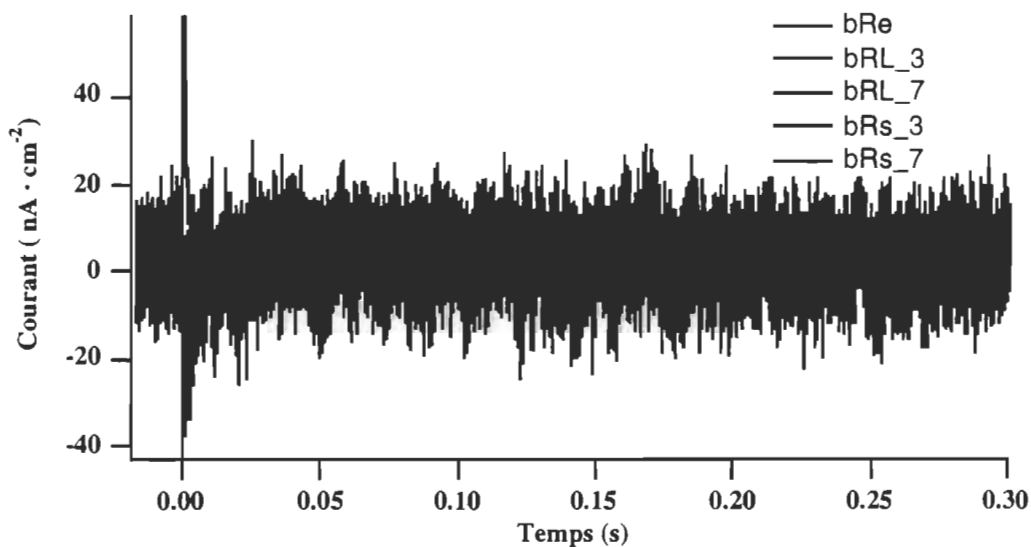


Figure 4.33 (deuxième échelle de temps)**Photocourant avec électrolyte à pH 2.0.**

Électrodéposition et déposition par séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement par polylysine.
Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 2.0.

**Figure 4.34 (troisième échelle de temps)****Photocourant avec électrolyte à pH 2.0.**

Électrodéposition et déposition par séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec et sans traitement par polylysine.
Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 2.0.



Comme nous le voyons dans le tableau 4.5, nous avons entre 6 et 7 exponentielles pour exprimer chaque réponse électrique. Les deux premières exponentielles constituent au delà de 95 pour cent du signal total (voir amplitudes relatives entre parenthèses au tableau 4.5). Par la suite, chaque courbe passe par une série de petits intermédiaires pour revenir à zéro. Comme nous l'avons déjà mentionné, les deux premières exponentielles forment un groupe clairement identifiable au processus d'isomérisation du rétinol (composante B1). Par contre, la suite des cinétiques observées ne semblent pas former de groupes précis et ne peuvent raisonnablement être associée à un ou plusieurs intermédiaires connus de la bactériorhodopsine.

En définitive, nous n'observons que la composante B1 du signal normal de la bactériorhodopsine et aucun autre courant attribuable au pompage de protons par les bactériorhodopsines. Par conséquent nous pouvons conclure à une absence de pompage de protons par les bactériorhodopsines lorsqu'elles se trouvent à pH 2.0. Cette conclusion vient appuyer d'autres résultats de la littérature démontrant l'absence de pompage de protons par la bactériorhodopsine à pH 2.0 (Drachev et al., 1978; Mowery et al., 1979; Kobayashi et al., 1983; Chang et al., 1985; Váró et Lanyi, 1989)

Autre remarque au sujet des courants à pH2. Nous n'avons qu'un seul pic de courant pour chaque courbe, ce qui signifie une intégrale du courant non nulle. Mais ceci est impossible car les charges déplacées lors de l'isomérisation du rétinol doivent revenir à leur place puisque nous avons un processus cyclique et que la cellule ne reste pas chargée. Il faut donc supposer que puisque le pompage est bloqué dans ces conditions, le chromophore reprend sa position initiale de tout-trans à 13-cis de façon très lente et ainsi génère un courant inverse à celui de départ mais d'amplitude imperceptible par notre appareillage.

Constantes de temps pour photocourants transitoires avec électrolyte à pH 2.0

	Pic de courant		Relaxation				
	ns	μs	μs	ms	ms	ms	ms
bRL_7	(0.86) 159	(0.12) 1.20	(0.0132) 3.36	(0.0037) 0.245	(0.0005) 0.870	(0.0024) 4.46	
bRL_3	(-0.91) 180	(-0.07) 1.30	(-0.0117) 14.0	(-0.0018) 0.500	(-0.0023) 1.317	(-0.0002) 14.18	
bRs_7	(0.86) 157	(0.12) 0.77	(0.0039) 19.0	(0.0035) 0.059	(0.0032) 0.423	(0.0034) 0.933	(0.0003) 24.0
bRs_3	(-0.85) 249	(-0.11) 3.29	(-0.0340) 3.30	(-0.0104) 0.026	(-0.0020) 0.043	(-0.0019) 2.30	
bRe	(0.79) 202	(0.13) 1.40	(0.0604) 5.50	(0.0074) 0.078	(0.0034) 0.226	(0.0016) 1.26	

Tableau 4.5

Amplitude relative: ... normalisation à l'unité de la somme des amplitudes des cinétiques d'un même signal.

Amplitude positive: ... $A \cdot \exp(-t/\tau)$

Amplitude négative: ... $-A \cdot \exp(-t/\tau)$

bRe: MP électrodéposé.

bRL_7: MP à pH 7.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRL_3: MP à pH 3.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRs_7: MP à pH 7.0 séchée sur platine nu.

bRs_3: MP à pH 3.0 séchée sur platine nu.

4.4.6 Photocourants transitoires avec membrane pourpre électrodéposée: électrolyte à pH7 et à pH3.

Nous voilà maintenant rendus à l'analyse des résultats pour les membranes pourpres électrodéposées. Nous avons délibérément omis de parler de ces résultats dans les deux sections précédentes car la réponse photoélectrique de la bactériorhodopsine dans ces conditions ne s'explique pas par les mêmes hypothèses que dans le cas des dépositions par séchage. Rappelons nous que dans le cas des dépositions par séchage, nous avons expliqué nos résultats en invoquant des variations de pH à l'interface de l'électrode de travail et de la couche de membranes pourpres. Par conséquent, les courants lents que nous observions n'étaient pas une lecture directe du courant vectoriel du pompage de protons par les bactériorhodopsines.

Dans le cas des membranes pourpres électrodéposées, il ressort des figures qui suivent (les quatre figures sont d'échelles et d'amplitudes différentes couvrant tout le signal), que nous obtenons des courants très différents des cas de dépositions par séchage. À la figure 4.35, nous avons sur cette échelle de temps le premier pic de départ relié à l'isomérisation du rétinol comme nous l'avons déjà observé à la section 4.4.1. Comme nous le savons, ce premier courant est inverse au sens du pompage de la bactériorhodopsine. Suite à ce pic de courant nous voyons immédiatement apparaître un courant négatif aussi bien pour l'électrolyte à pH 7.0 qu'à pH 3.0. Ce courant est dans le sens du pompage de protons de la bactériorhodopsine puisqu'avec l'électrodéposition nous avons une orientation cytoplasmique côté électrode et que la bactériorhodopsine déplace un proton du côté cytoplasmique au côté extracellulaire. C'est à partir de ce courant négatif que l'hypothèse de variation de pH de Robertson et Lukashev ne tient plus pour les membranes pourpres électrodéposées. Selon cette dernière hypothèse, nous aurions dû obtenir des courants de sens inverses entre l'électrolyte à pH 7.0 et celui à pH 3.0 (voir section 4.4.3 et 4.4.4). Or dans les deux cas nous avons des courants qui tiennent compte du sens vectoriel de pompage des protons par la bactériorhodopsine.

Figure 4.35 (première échelle de temps)

Photocourants lents. Électrodéposition des membranes pourpres.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0 ou pH 3.0

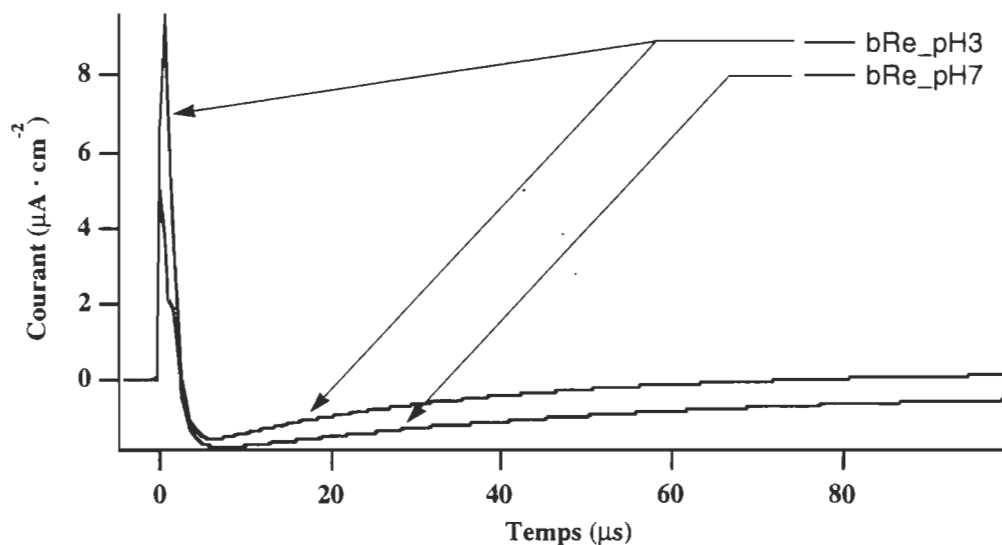


Figure 4.36 (deuxième échelle de temps)

Photocourants lents. Électrodéposition des membranes pourpres.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0 ou pH 3.0

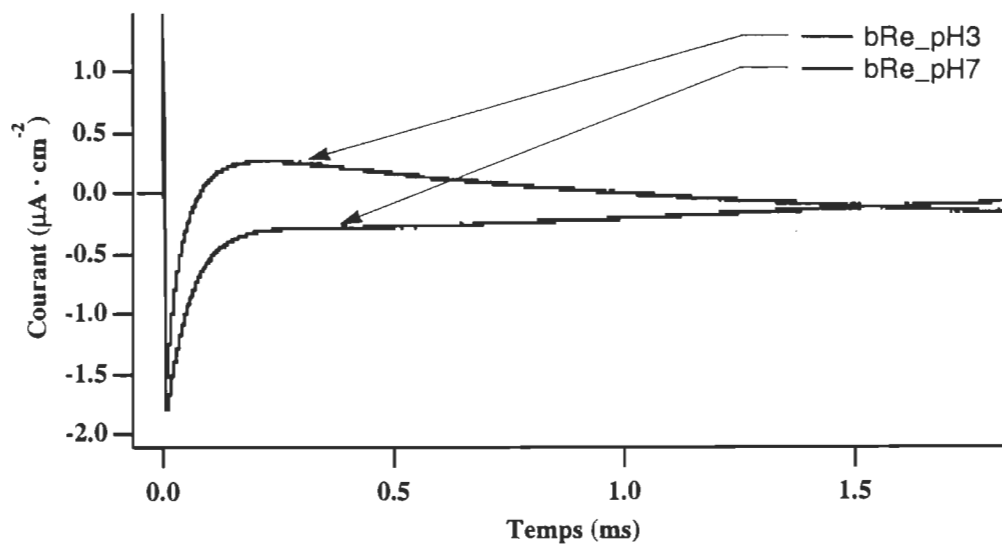


Figure 4.37 (troisième échelle de temps)

Photocourants lents. Électrodéposition des membranes pourpres.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0 ou pH 3.0

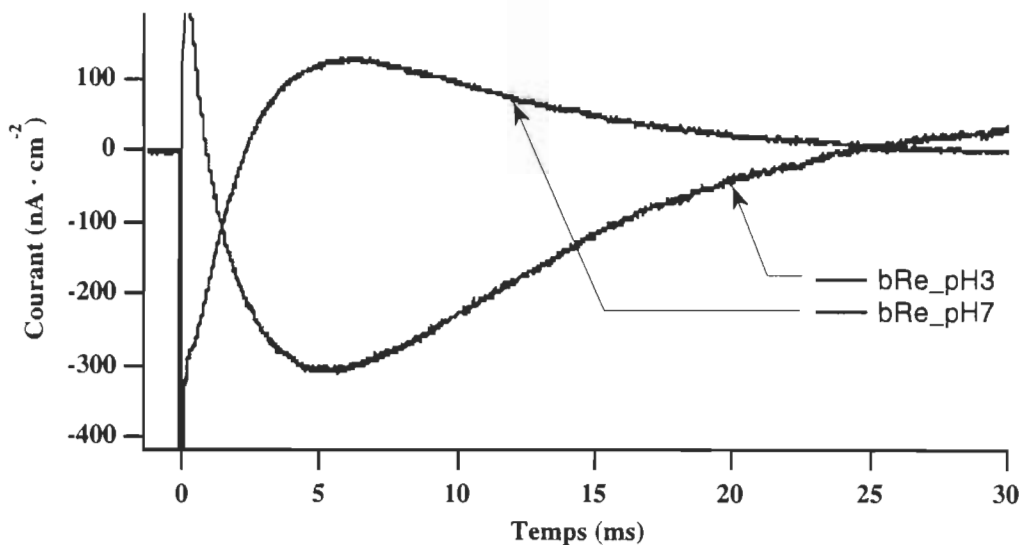
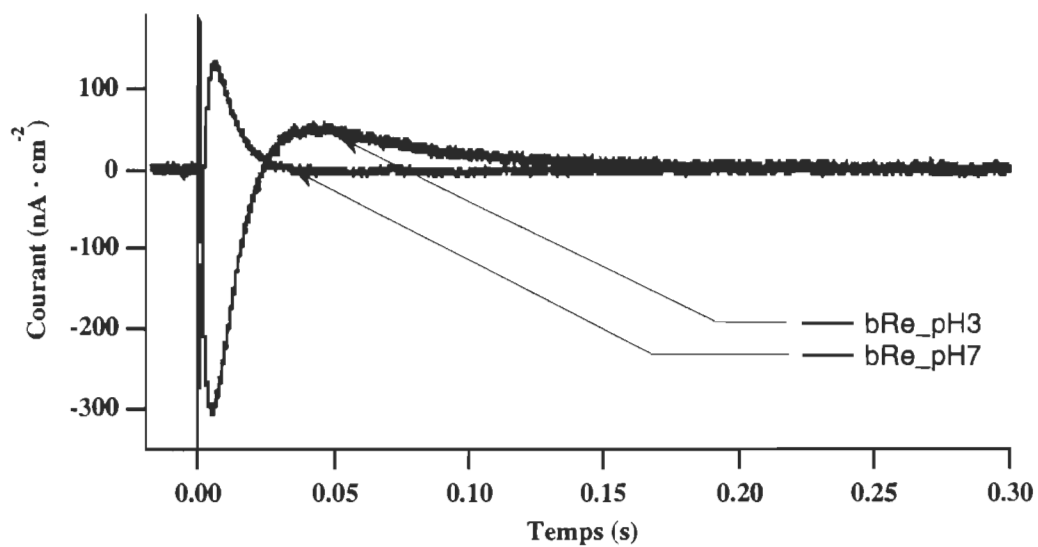


Figure 4.38 (quatrième échelle de temps)

Photocourants lents. Électrodéposition des membranes pourpres.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0 ou pH 3.0



À la deuxième figure (4.36) les deux signaux se séparent. Avec l'électrolyte à pH 7.0, le courant négatif revient progressivement vers zéro alors qu'à pH 3.0 nous avons un signal positif avant de revenir vers zéro.

Finalement, dans les deux dernières figures nous observons une inversion des courants entre pH 7.0 et pH 3.0 et une phase de courant positive supplémentaire pour l'électrolyte à pH 3.0.

Pour expliquer ces résultats, nous considérons que les courants enregistrés sont directement couplés au transport vectoriel de protons à travers la membrane pourpre. Contrairement aux dépositions par séchage, nous n'observons pas un effet indirect du transport de protons traduit par une variation de pH, mais bien le transport lui-même. Cette différence majeure d'observation des photocourants vient du fait que la membrane pourpre est électrodéposée plutôt que séchée. Nous pourrions qualifier la méthode de séchage comme un moyen passif de déposition par opposition à l'électrodéposition qui est une méthode active.

Dans le cas du séchage, la membrane pourpre en solution est laissée à elle-même et s'oriente lentement au fil de l'évaporation de la solution pendant plusieurs heures. Par contre, avec l'électrodéposition la membrane pourpre est forcée brutalement pendant quelques secondes à se coller à l'électrode dans un fort champ électrique. Cette façon de faire crée un lien intime entre l'électrode et la couche de membranes éliminant ainsi la phase aqueuse entre l'électrode et la couche de membranes que nous avons par séchage. Ce lien intime entre l'électrode de travail et la couche de membranes pourpres permet d'éliminer cette zone de diffusion des protons, qui persiste après séchage, entre l'électrode et la couche de membranes, éliminant ainsi les variations de pH aux abords de l'électrode. Il s'en suit une lecture directe des mouvements de protons à l'intérieur de la membrane pourpre.

A partir de ces dernières considérations, nous allons analyser chacune des phases de nos courbes de photocourants. Pour ce faire nous ferons référence au tableau 4.6 répertoriant les constantes de temps qui ont été ajustées à chacune des courbes. De ces constantes de temps nous ferons un lien avec les intermédiaires du photocycle de la

bactériorhodopsine et le modèle de transport de protons de Le Coutre et Gerwert, (1996).

Commençons par la réponse photoélectrique avec l'électrolyte à pH 7.0 que nous avons scindée en quatre phases distinctes à la figure 4.39.

La première phase correspond, comme nous l'avons déjà mentionné, au courant inverse au sens du pompage de protons causé par l'isomérisation du rétinol. Ce courant répertorié dans la littérature comme étant la composante B1 du signal photoélectrique de la bactériorhodopsine est associé aux transitions $bR \rightarrow K \rightarrow L$ du photocycle de la bactériorhodopsine.

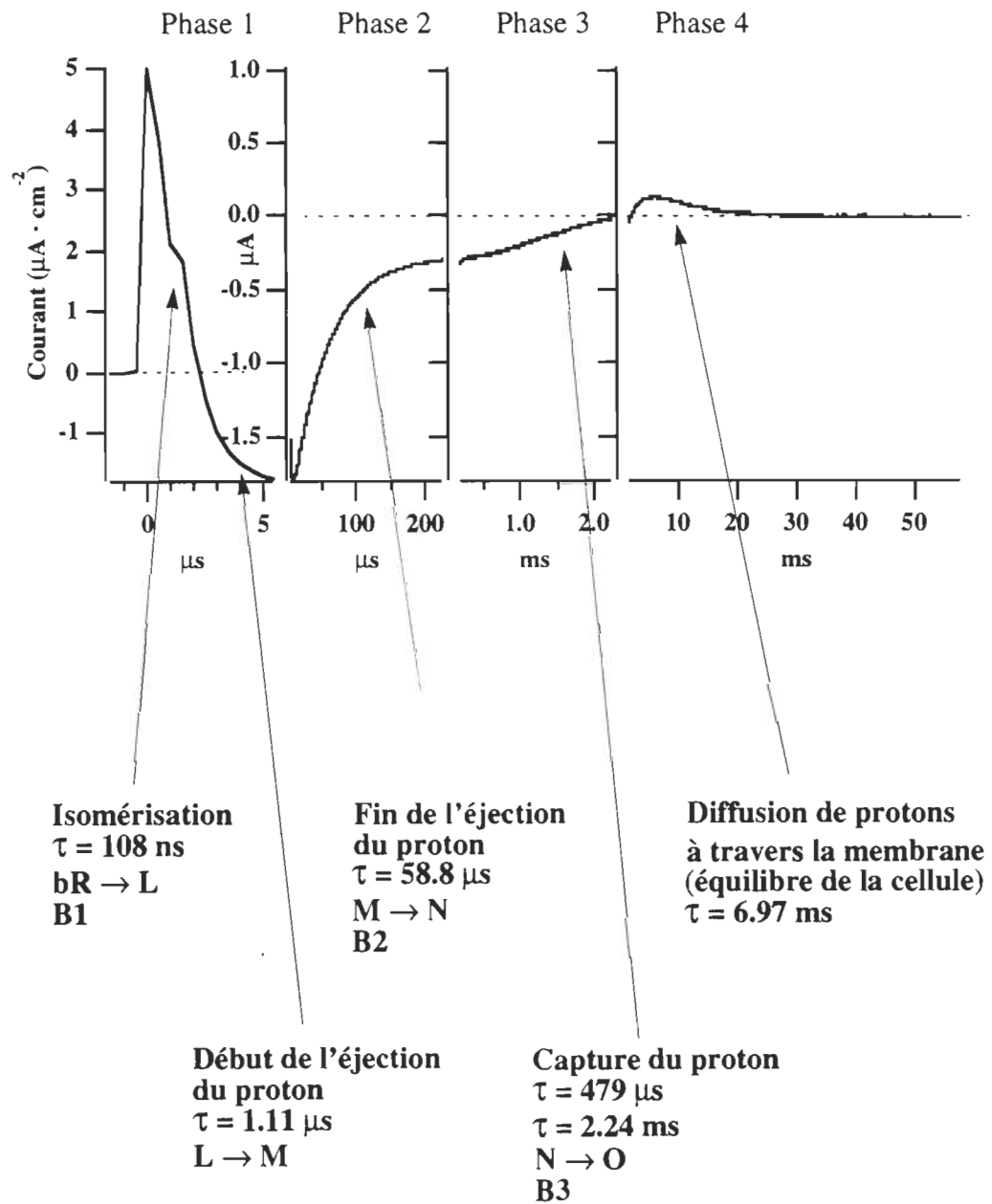
À la phase deux nous avons un courant négatif dans le sens du pompage par la molécule. Les constantes de temps que nous avons trouvées pour cette étape nous démontrent une correspondance entre ce courant et le passage des intermédiaires L, M et N du photocycle. Sachant que lors de cette transition il y a éjection par la bactériorhodopsine d'un proton, nous pouvons associer cette phase à cette éjection. Ceci est en accord avec la nomenclature B2 du photocourant de la bactériorhodopsine.

La phase trois est associée à la composante B3. Remarquons que ce courant est aussi dans le sens du pompage de protons. Les constantes de temps que nous lui avons trouvées nous permettent d'y voir le passage de l'intermédiaire N à l'intermédiaire O. Cette phase coïncide donc avec la capture du proton par la bactériorhodopsine.

La dernière phase n'est pas répertoriée dans la littérature comme faisant partie de la nomenclature des composantes B1, B2 et B3. Nous expliquons ce courant positif comme étant le résultat de la diffusion de protons à travers la couche de membranes pourpres déposées. En effet, le transfert de protons du côté cytoplasmique de la membrane au côté extracellulaire crée un potentiel électrique qui force un nombre égal de charges positives à revenir à travers la membrane pour équilibrer le champ électrique. Ce déplacement de charges se produisant donc du côté extracellulaire vers l'électrode de travail, il en résulte un courant positif. Puisque nous supposons que ce courant est une diffusion à travers la membrane et qu'il n'est pas un effet direct du mécanisme interne de pompage de la bactériorhodopsine, nous n'associons pas ce déplacement de charges à aucun intermédiaire du photocycle de la bactériorhodopsine.

Figure 4.39

**Photocourant. Membrane pourpre électrodéposée, électrolyte à pH7.
Échelle variable.**



Passons maintenant à la figure suivante et analysons les courants recueillis avec une solution conductrice à pH 3.0. Cette fois-ci nous avons divisé le photocourant en cinq phases distinctes.

Pour l'interprétation de ces courants à pH 3.0 nous considérerons, comme à la section 4.4.4, que la bactériorhodopsine a un ordre de pompage inversé par rapport à un milieu à pH 7.0. Pour se rafraîchir la mémoire, rappelons nous que la bactériorhodopsine à pH 3.0 capte un proton avant l'éjection d'un autre proton, alors qu'à pH 7.0 il y a éjection avant capture.

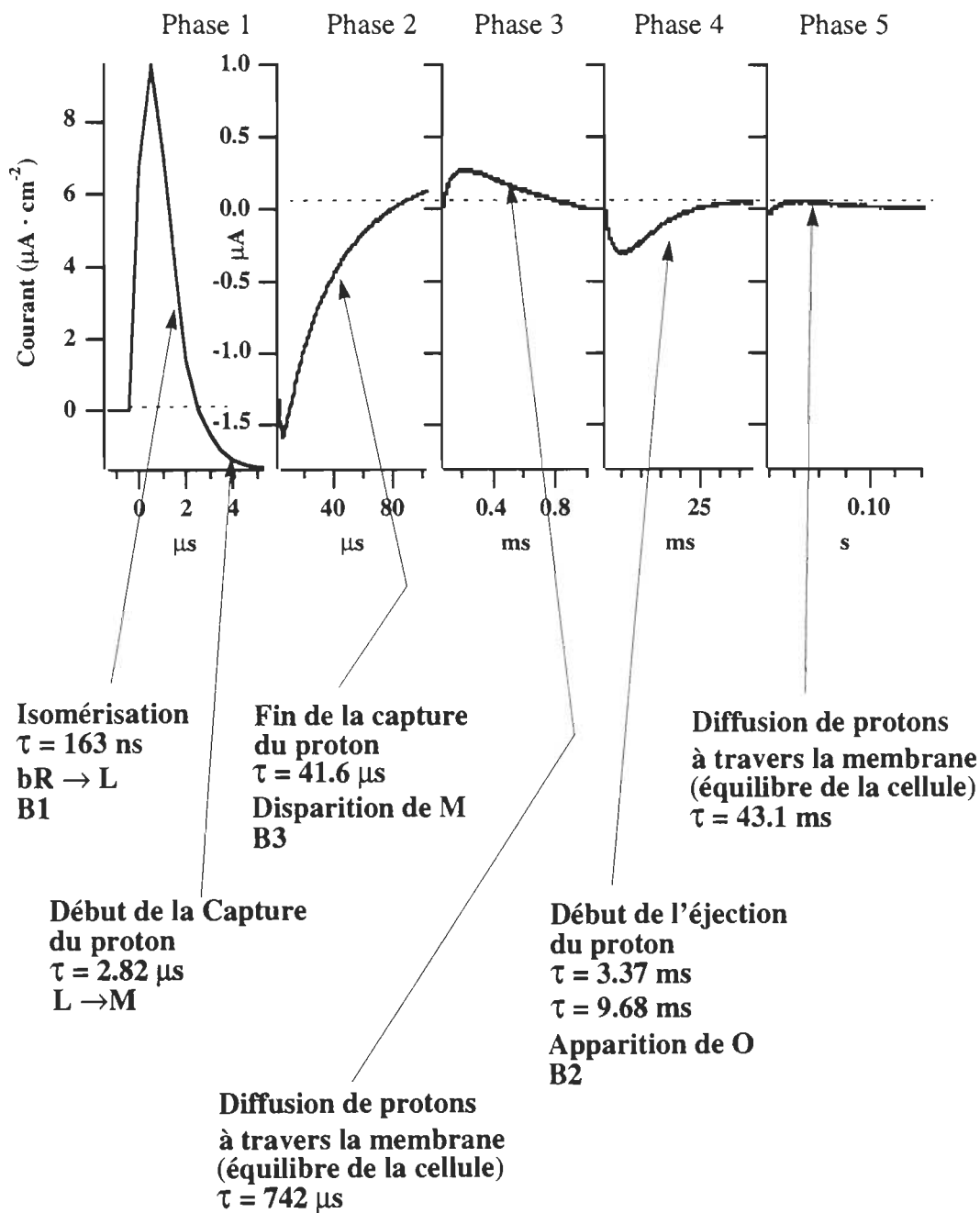
À la première phase nous voyons encore une fois le courant positif dû à l'isomérisation du rétinol et associé à la fois à la composante B1 du photocourant de la bactériorhodopsine et au passage de bR à l'intermédiaire L. À la phase deux il y a apparition d'un courant négatif dans le sens du pompage de protons et dont les constantes de temps sont associées aux intermédiaires L et M. En apparence cette phase est tout à fait semblable à son homologue à pH 7.0. Mais partant de l'hypothèse qu'à pH 3.0 l'ordre de pompage est inversé, nous interprétons donc ce premier courant négatif comme étant la capture des protons par les bactériorhodopsines. De ce fait nous associons donc cette phase à la composante B3 de la nomenclature du photocourant de la bactériorhodopsine puisque nous sommes dans une phase de capture.

À la troisième étape nous constatons des différences majeures entre un électrolyte à pH 3.0 par rapport à pH 7.0. À pH 7.0 nous avons la continuité du courant négatif de la phase deux représentant la fin du processus de pompage de la molécule. À pH 3.0 nous avons un courant positif inverse au sens de pompage. Il y a donc un temps d'arrêt dans le processus de pompage apparent de la bactériorhodopsine. Comme dans la dernière étape du photocourant à pH 7.0, nous expliquons ce courant positif comme un retour de charges positives à travers la membrane pour équilibrer le potentiel électrique créé par la capture de protons. Durant cette étape il y a soit absence ou soit présence de faibles courants internes à la bactériorhodopsine associés au pompage de protons et ainsi une dominance du courant d'équilibre.

Figure 4.40

Photocourant. Membrane pourpre électrodéposée, électrolyte à pH3.

Échelle variable.



Nous pouvons supposer que ce laps de temps est utilisé par la bactériorhodopsine pour effectuer un certain nombre de modifications internes lui permettant de procéder à l'éjection de son proton en trop. En effet, à pH 3.0 la bactériorhodopsine a une inversion de son ordre de pompage et ne suit donc pas un processus normal. À pH 7.0 la bactériorhodopsine éjecte un proton avant d'en reprendre un autre. Il y a donc défaut d'une charge positive pendant un certain temps. Par contre, à pH 3.0 il y a capture avant éjection ce qui amène le surplus d'une charge positive. D'autre part nous savons de la littérature (Váró et Lanyi, 1989) qu'il y a absence de l'intermédiaire N dans le photocycle de la bactériorhodopsine à pH 3.0. Cet intermédiaire, associé à pH neutre à la reprotonation du chromophore par le transfert d'un proton de l'aspartate 96 au rétinol, ne semble plus nécessaire dans les conditions présentes. La molécule n'ayant pas encore éjectée le proton provenant du rétinol, ce dernier n'a pas à être reprotonné, laissant en suspens la charge positive déjà admise à l'intérieur de la molécule et provoquant ainsi le temps d'arrêt que nous observons dans cette phase trois.

À la phase quatre nous revenons à un signal négatif dans le sens du pompage que nous relient à l'éjection du proton par la bactériorhodopsine. Puisqu'il s'agit d'une phase d'éjection nous l'associons à la composante B2 de la nomenclature du photocourant de la bactériorhodopsine. Les constantes de temps vont dans le sens de l'apparition de l'intermédiaire O.

Finalement la dernière phase du signal est positive et nous l'associons au courant de diffusion de charges à travers la membrane rétablissant ainsi l'équilibre électrique de part et d'autre de la membrane. Comme à pH 7.0, nous n'associons pas d'intermédiaire à ce courant puisque nous considérons qu'il ne s'agit pas d'un courant de pompage par la bactériorhodopsine.

Tableau 4.6
Constantes de temps pour photocourants avec membranes pourpres électrodéposées
avec électrolyte à pH 7.0 et pH 3.0.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0 ou pH 3.0

	Électrolyte pH7		Électrolyte pH3	
	Amplitudes	Constantes de temps	Amplitudes	Constantes de temps
1 exp.	3.1	108 ns	2.1	163 ns
2 exp.	0.14	1.11 μ s	0.12	2.82 μ s
3 exp.	-0.047	55.8 μ s	-0.056	41.6 μ s
4 exp.	0.0041	479 μ s	0.0072	742 μ s
5 exp.	-0.024	2.24 ms	0.027	3.37 ms
6 exp.	0.012	6.97 ms	-0.029	9.68 ms
7 exp.			0.0041	43.1 ms

Note: "exp." signifie exponentielle.

En résumé de cette section, la méthode de déposition par électrodéposition permet d'obtenir des photocourants représentant le sens du déplacement des protons lors du pompage de ces derniers par les bactériorhodopsines. Les cinétiques de courant enregistrées avec l'électrolyte à pH 7.0, comportent les mêmes composantes que dans la littérature (voir figure 4.17) soit B1, B2 et B3 ainsi que la même forme. Cet accord entre nos résultats et ceux de la littérature nous permet d'analyser avec confiance les cinétiques avec l'électrolyte à pH 3.0 puisque nous n'avons pas de comparaisons avec la littérature dans ce cas. Sachant que la bactériorhodopsine à pH 3.0 voit son ordre de pompage inversé, les phases deux et quatre ont été associées respectivement à la capture et à l'éjection du proton. Ceci nous permis d'identifier un temps d'arrêt apparent de pompage à la phase trois, coïncidant avec le surplus d'une charge positive à l'intérieur de la bactériorhodopsine et

possiblement associable à l'absence de l'intermédiaire N dans de telles conditions.

Les figures 4.41 et 4.42 résument de façon schématique les mouvements de protons à l'intérieur de la bactériorhodopsine et de sa membrane.

Figure 4.41

Schéma des déplacements de protons pour la membrane pourpre électrodéposée avec électrolyte à pH 7.0

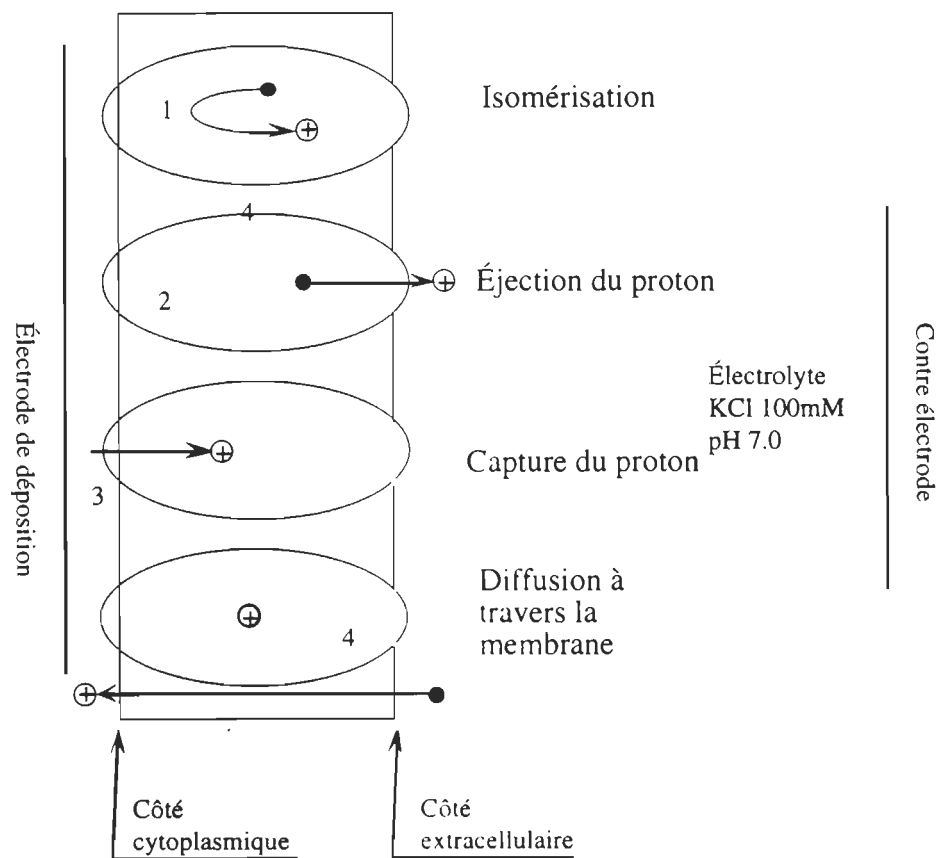
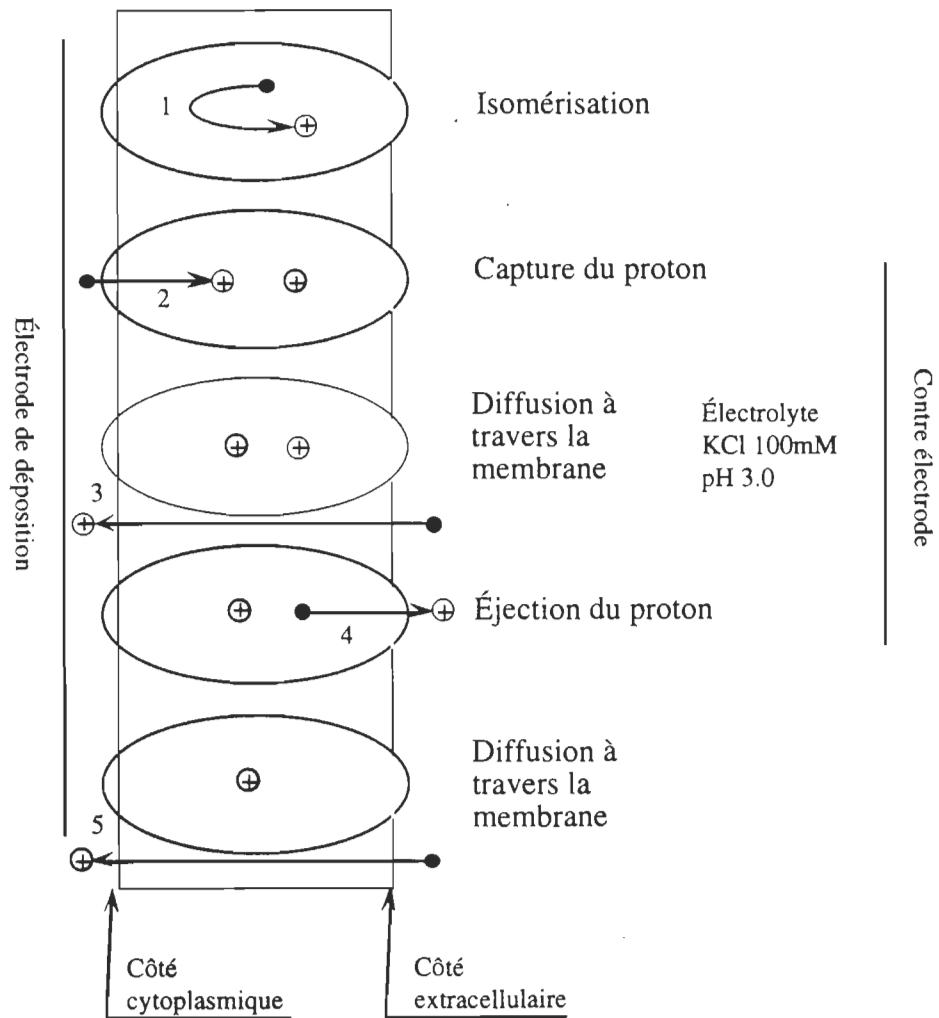


Figure 4.42

Schéma des déplacements de protons pour la membrane pourpre électrodéposée avec électrolyte à pH 3.0



4.4.7 Comparaison entre les photocourants avec et sans Enflurane pour les dépôts par séchage; solution électrolytique à pH7.

Nous savons (Boucher et al., 1996; Messaoudi et al., 1992) que la bactériorhodopsine en présence d'Enflurane offre des caractéristiques particulières tant au niveau du déplacement de son maximum d'absorption qui passe de 570 nm à 480 nm qu'au niveau de la vitesse de ses cinétiques optiques. Ainsi, la vitesse d'apparition de son intermédiaire M est accélérée et la vitesse de disparition de ce même intermédiaire est considérablement réduite. Nous pouvons par conséquent parler d'un blocage partiel de l'intermédiaire M ou plus précisément d'une accumulation de cet intermédiaire. D'où une grande diminution de l'efficacité de pompage de la molécule.

Nous avons comparé les photocourants pour les dépôts par séchage (séchage à pH 7.0 et pH 3.0 avec ou sans traitement par polylysine) avec un électrolyte tamponné à pH 7.0 et les photocourants obtenus avec un électrolyte tamponné à pH 7.0 et en présence d'Enflurane dissout à saturation. Les quatre figures qui suivent (4.43, 4.44, 4.45, 4.46) montrent ces comparaisons pour chaque type de dépôt. Les graphiques en médaillons montrent les mêmes signaux qu'en premier plan mais avec un facteur de normalisation qui ajuste leurs amplitudes. De ces normalisations il est nettement visible que les signaux sont tout à fait semblables entre les électrolytes avec ou sans Enflurane et ce, pour les quatre types de dépôts. Par contre les graphiques principaux nous montrent bien qu'il y a diminution de l'amplitude des signaux par rapport à ceux obtenus sans Enflurane. Ce résultat est cohérent avec la diminution de l'activité de pompage de la bactériorhodopsine traitée aux anesthésiques (bR₄₈₀).

Ce qui est surprenant, c'est la vitesse et la forme des cinétiques qui semblent invariantes entre les deux formes de la bactériorhodopsine (bR₅₇₀ et bR₄₈₀). Comme nous l'avons mentionné un peu plus haut, ceci nous est montré qualitativement par les graphiques en médaillons. Mais de façon quantitative, le tableau 4.7 affichant les constantes de temps associées à chacune des cinétiques, nous montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la bactériorhodopsine native et sa forme bR₄₈₀.

Figure 4.43

Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 7.0 avec traitement par polylysine. Électrolyte: KCl 100 mM ou KCl 100 mM plus Enflurane dissout en saturation, tampon citrate 10 mM pH 7.0.

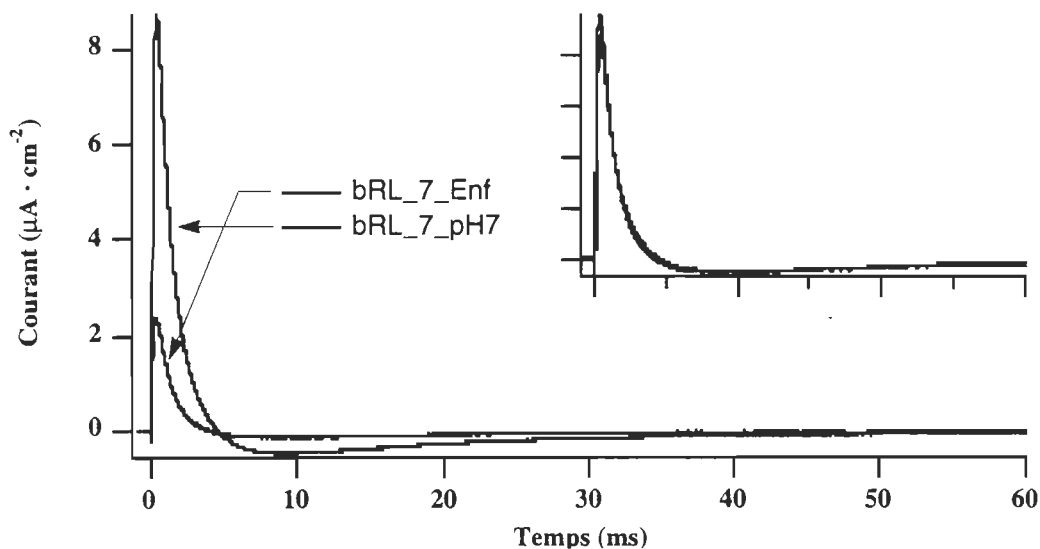


Figure 4.44

Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 7.0. Électrolyte: KCl 100 mM ou KCl 100 mM plus Enflurane dissout en saturation, tampon citrate 10 mM pH 7.0.

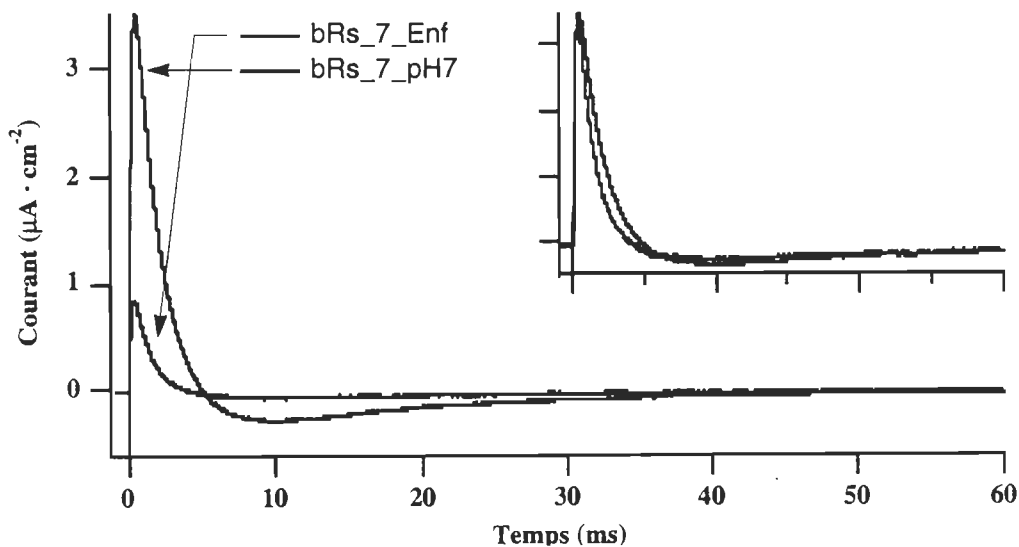


Figure 4.45

Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 3.0 avec traitement par polylysine. Électrolyte: KCl 100 mM ou KCl 100 mM plus Enflurane dissout en saturation, tampon citrate 10 mM pH 7.0.

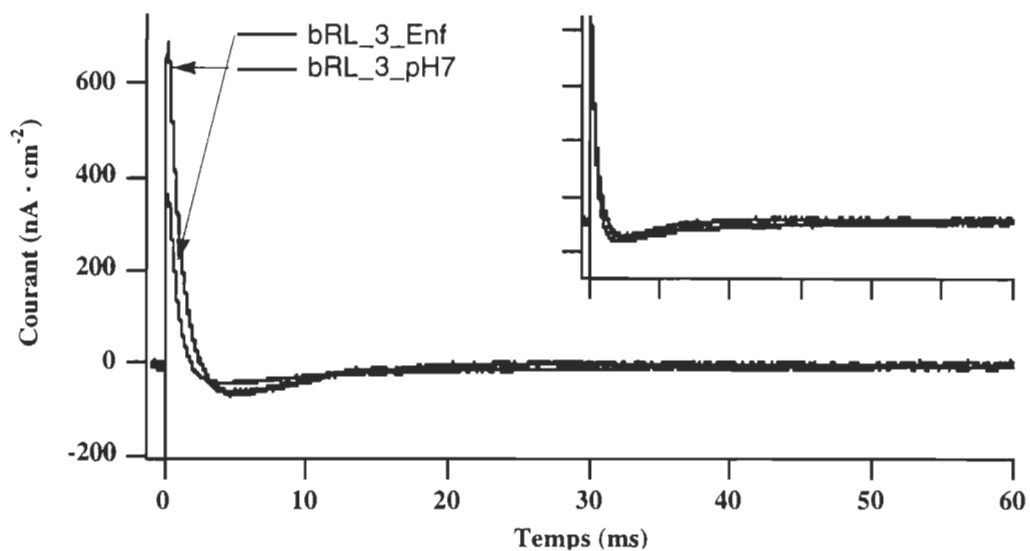
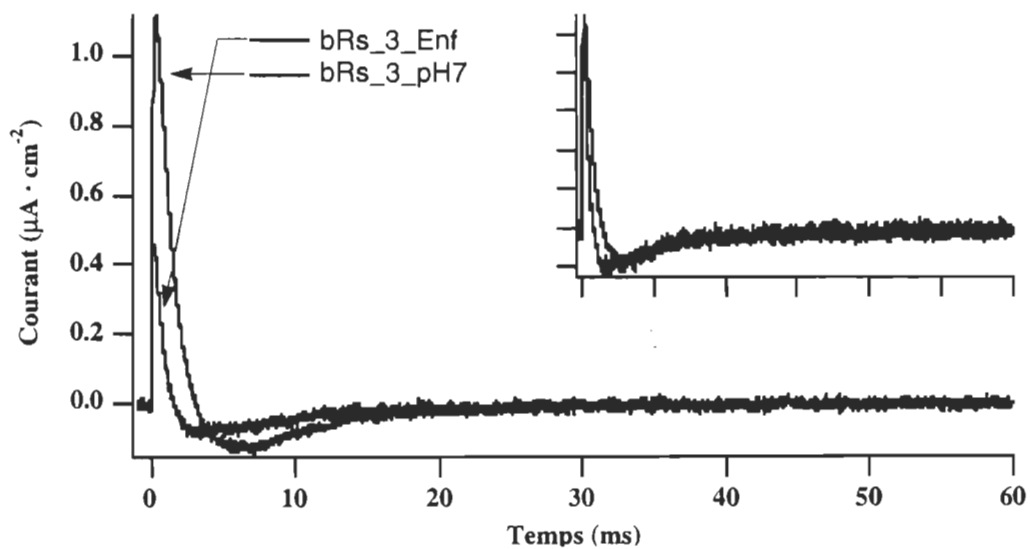


Figure 4.46

Photocourants lents. Déposition par séchage des membranes pourpres.
Déposition par séchage à pH 3.0. Électrolyte: KCl 100 mM ou KCl 100 mM plus Enflurane dissout en saturation, tampon citrate 10 mM pH 7.0.



Pour bien comprendre les résultats qui suivent, nous avons repris le tableau 4.3 affichant les constantes de temps des dépôts par séchage avec électrolyte à pH 7.0 de la section 4.4.3. À ces résultats nous avons rajouté sur fond gris les constantes de temps pour les dépôts correspondant avec électrolyte à pH 7.0 plus Enflurane. Nous avons gardé la même structure de tableau avec les trois groupes correspondant à la figure 4.27 puisque nous avons le même type de cinétiques.

Tableau 4.7

Constantes de temps pour photocourants transitoires lents avec électrolyte à pH 7.0 avec ou sans Enflurane.

	Groupe 1		Groupe 2		Groupe 3	
	1 exp. (Amp) τ (μ s)	2 exp. (Amp) τ (μ s)	3 exp. (Amp) τ (ms)	4 exp. (Amp) τ (ms)	5 exp. (Amp) τ (ms)	
bRL_7	N (-1) 163	(0.57) 632	(0.43) 2.01	(-0.79) 105	(-0.21) 38.4	
	E (-1) 162	(0.77) 833	(0.23) 2.55	(-0.87) 11.7	(-0.13) 59.2	
bRL_3	N (-1) 56	(1) 760		(-1) 63		
	E (-1) 88	(1) 700		(-1) 97		
bRs_7	N (-1) 162		(1) 1.95	(-0.92) 129	(-0.08) 53.9	
	E (-1) 155	(0.79) 936	(0.21) 2.92	(-0.60) 78	(-0.40) 29.6	
bRs_3	N (-1) 160		(1) 1.46	(-0.99) 61	(-0.01) 59.9	
	E (-1) 125	(1) 708		(-1) 91		

Amplitude relative (Amp): ...normalisation à l'unité de la somme des amplitudes des cinétiques d'un même groupe.

Amplitude positive: $A \cdot \exp(-t/\tau)$

Amplitude négative:.....- $A \cdot \exp(-t/\tau)$

bRL_7:MP à pH 7.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRL_3:MP à pH 3.0 séchée sur platine traité avec polylysine.

bRs_7:MP à pH 7.0 séchée sur platine nu.

bRs_3:MP à pH 3.0 séchée sur platine nu.

N:MP native.

E:MP plus Enflurane.

Ainsi, comme nous le disions un peu plus haut, il n'y a pas de différence significative entre les deux formes de bactériorhodopsine. Les groupes et les temps des cinétiques sont globalement les mêmes. Sachant que les cinétiques optiques de l'apparition et de la disparition de l'intermédiaire M sont influencées par la présence d'Enflurane, il nous semblait clair que les phases deux et trois des photocourants, associées à l'intermédiaire M à la section **4.4.3** auraient dû subir la même influence.

En effet, l'apparition de l'intermédiaire M étant accélérée en présence d'Enflurane, la phase deux du photocourant devrait l'être tout autant. De même, la phase trois du photocourant en présence d'Enflurane devrait être ralentie puisque la disparition de l'intermédiaire M se trouve elle-même ralentie.

Pour expliquer cette discordance spécifique à ces conditions entre les cinétiques optiques et électriques, il faut revenir à notre modèle d'interprétation des photocourants pour des dépôts par séchage. Comme nous l'avons déjà discuté, les courants observés avec les dépôts de membranes pourpres par séchage ne sont pas une lecture directe du déplacement vectoriel des protons interne à la bactériorhodopsine. Il s'agit plutôt d'une lecture indirecte du transport de protons par la mesure des variations de pH. Ainsi ces variations de pH ne sont sensibles qu'aux variations de la densité de protons à l'interface de l'électrode de travail et de la couche de membranes pourpres, et à la diffusion des protons vers cet interface. Par conséquent les variations des vitesses de déplacement des protons à l'intérieur de la bactériorhodopsine ne génèrent pas de courants assez importants pour être perçus dans les échantillons préparés selon ces types de dépôt.

4.4.8 Comparaison entre les photocourants avec Enflurane (bR₄₈₀) et sans Enflurane (bR₅₇₀) pour les films préparés par électrodéposition; solution électrolytique à pH7.

Cette dernière section compare les photocourants de la bactériorhodopsine avec et sans Enflurane pour le cas de la membrane pourpre électrodéposée. Comme nous le voyons dans les figures 4.47 et 4.48, nous avons des différences majeures entre les photocourants avec et sans la présence d'Enflurane. Dans un premier temps, notons que la première partie du signal de la bR₄₈₀ (Enflurane) est très accélérée par rapport à la bR₅₇₀ (sans Enflurane). La figure 4.47 ainsi que son graphique en médaillon illustre bien cette accélération. Nous voyons entre autres dans le graphique en médaillon que le premier courant négatif de la bR₄₈₀ revient vers zéro alors que le courant de la bR₅₇₀ n'a pas atteint son minimum. Pour sa part, la figure 4.48 nous montre les mêmes photocourants sur une échelle de temps plus grande. À cette plus grande échelle de temps nous remarquons l'inhibition des dernières phases de courant lent.

Figure 4.47 (première échelle de temps)

Photocourants lents. Membranes pourpres électrodéposées.

Électrolyte: KCl 100 mM avec ou sans Enflurane dissout en saturation, tampon citrate 10 mM pH 7.0.

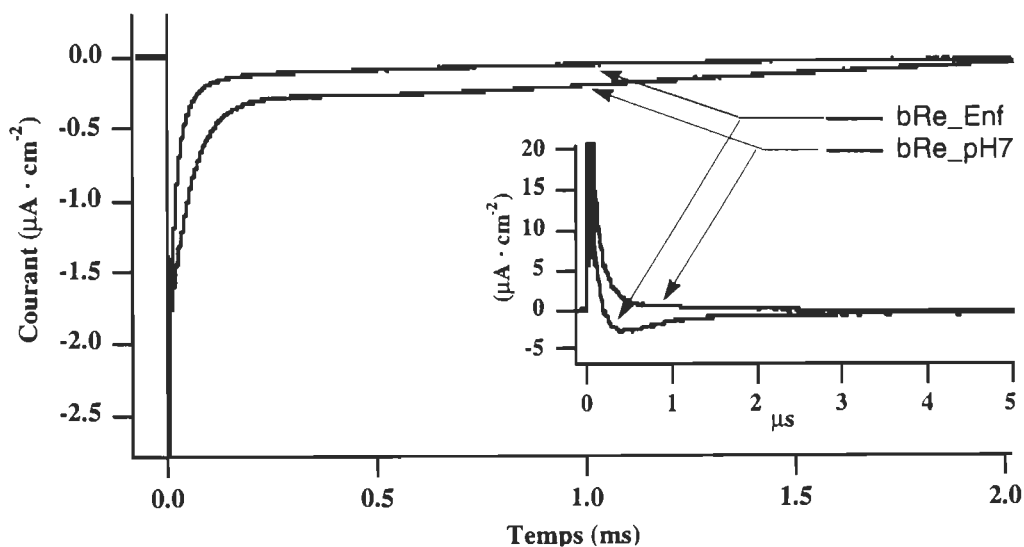
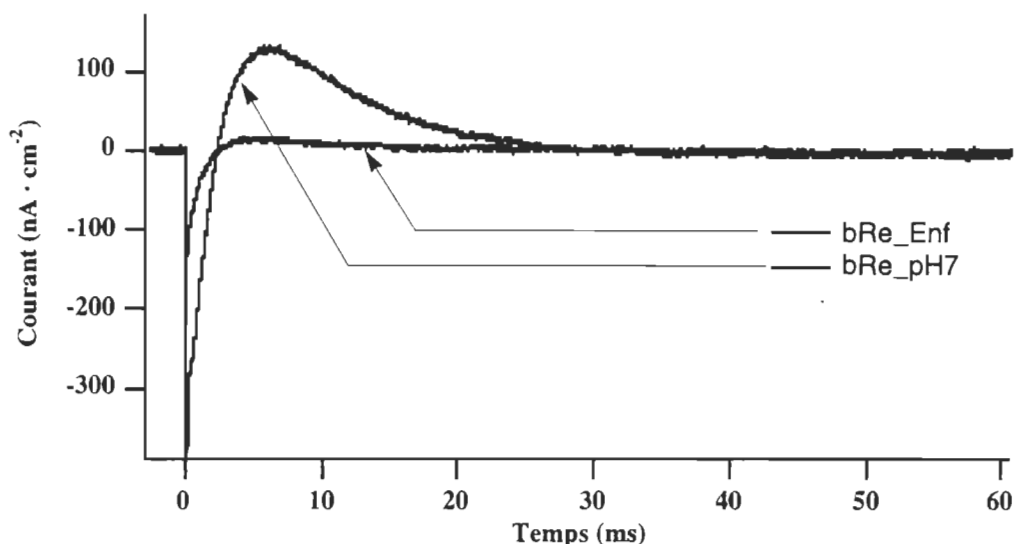


Figure 4.48 (deuxième échelle de temps)

Photocourants lents. Membranes pourpres électrodéposées.

Électrolyte: KCl 100 mM avec ou sans Enflurane dissout en saturation, tampon citrate 10 mM pH 7.0.



Regardons plus en détail chacune des phases des photocourants à partir de la figure 4.49 et du tableau 4.8 répertoriant les constantes de temps ajustées à chacune des courbes. La figure 4.49 est une reprise de la figure 4.39 de la section 4.4.6 de laquelle nous n'avons gardé que le photocourant de la membrane pourpre électrodéposée avec électrolyte à pH 7.0 et à laquelle nous avons superposé le photocourant en présence d'Enflurane. Cette figure nous est utile pour comparer les effets de l'Enflurane avec les quatre phases de courant que nous avons établies pour la membrane pourpre électrodéposée.

La première phase des signaux comporte toujours le pic d'isomérisation pour les deux conditions expérimentales et l'on voit que les constantes de temps sont similaires. Les changements surviennent immédiatement après ce pic de courant. Nous voyons qu'en présence d'Enflurane il y a une grande accélération des cinétiques suivant le pic de départ jusqu'au milieu de la deuxième phase. Dans le cas de l'électrolyte sans Enflurane le courant négatif de départ n'atteint pas son minimum avant le début de la deuxième phase et

l'apparition de ce courant, associé au passage de l'intermédiaire L à l'intermédiaire M, a sa propre constante de temps. Par contre, en présence d'Enflurane ce courant négatif est presque revenu à zéro pendant la première phase et son apparition se confond avec la disparition du pic de courant de départ éliminant ainsi une constante de temps. Par analogie avec les courants sans Enflurane, ce premier courant négatif est associé au passage de l'intermédiaire L à l'intermédiaire M mais avec une très grande accélération. Puis le retour vers zéro de ce courant se poursuit de la phase 1 au début de la phase 2 par l'intermédiaire de deux exponentielles rapides qui n'ont pas d'équivalent pour le cas sans Enflurane. Nous relierons ces deux dernières exponentielles à la fin de l'apparition de l'intermédiaire M car, comme le montre le tableau **4.9**, c'est l'apparition de l'intermédiaire M qui est accélérée avec la bR_{480} .

Poursuivons maintenant avec la fin de la phase 2 et de la phase 3. Dans le cas du photocourant sans Enflurane nous avons trois exponentielles qui correspondent à l'éjection et à la capture du proton dont celle du centre qui est positive et qui marque bien le début de la capture. Par contre pour la bR_{480} nous n'avons que deux exponentielles de faibles amplitudes qui ramènent progressivement le signal à zéro. Cette dernière observation qui ne montre aucune évidence de pompage de protons par la bR_{480} est en accord avec la littérature qui démontre qu'il y a une très faible activité de pompage observable entre autres par le grand ralentissement de la cinétique optique de la disparition de l'intermédiaire M. Nous pouvons prendre connaissance de l'importance de ce ralentissement avec le tableau **4.9**.

Par la suite, à la phase 4 nous avons un courant d'équilibre dans les deux conditions expérimentales, mais celui qu'on observe en présence d'Enflurane est très faible en raison de l'activité de pompage réduite dans de telles conditions.

Figure 4.49

Bactériorhodopsine électrodéposée, électrolyte à pH 7.0 avec ou sans Enflurane.

Échelle variable.

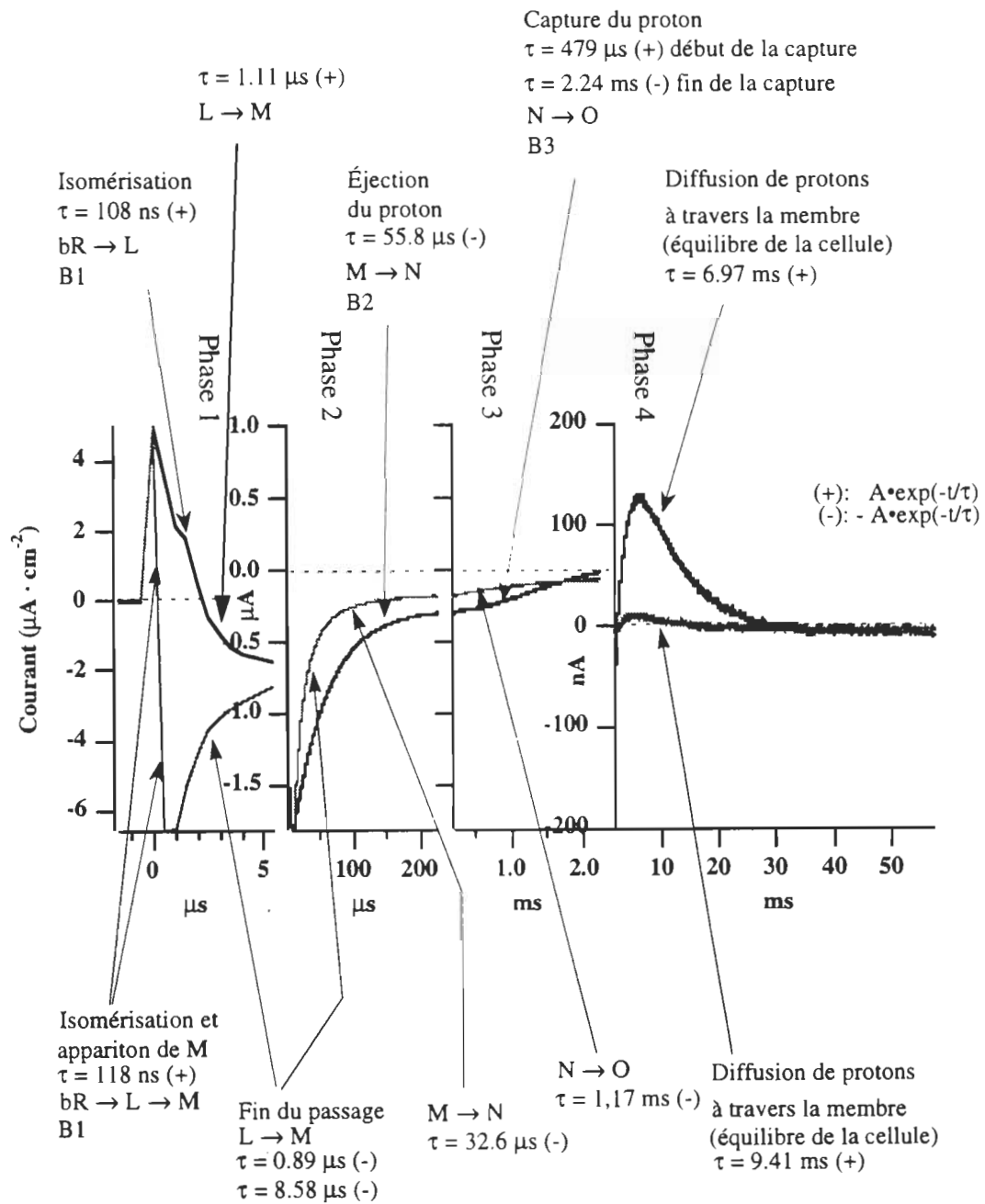


Tableau 4.8

Constantes de temps pour photocourants avec membranes pourpres électrodéposées et électrolyte à pH 7.0 avec et sans Enflurane.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0, Enflurane dissout en saturation selon le cas.

		Électrolyte pH7		Électrolyte pH7 + Enf		
		Amplitudes	Constantes de temps	Amplitudes	Constantes de temps	
Phase 1	1 exp.	0.78	108 ns	0.68	118 ns	Phase 1
	2 exp.	0.035	1.11 μ s	-0.068	0.889 μ s	
Phase 2	3 exp.	-0.047	55.8 μ s	-0.06	8.58 μ s	Phase 2
Phase 3	4 exp.	0.0041	479 μ s	-0.029	32.6 μ s	Phase 3
	5 exp.	-0.024	2.24 ms	-0.004	1.17 ms	
Phase 4	6 exp.	0.012	6.97 ms	0.0006	9.41 ms	Phase 4

Amplitude positive: $A \cdot \exp(-t/\tau)$

Amplitude négative:.....- $A \cdot \exp(-t/\tau)$

Tableau 4.9

Constantes de temps associées à l'apparition et à la disparition de l'intermédiaire M_{412} .

Cinétiques obtenues par photolyse éclair, faisceau d'analyse à 410 nm.

	Apparition de M_{412}		Disparition de M_{412}	
	1 exp. (Amp) τ (μ s)	2 exp. (Amp) τ (μ s)	3 exp. (Amp) τ (ms)	4 exp. (Amp) τ (ms)
bR ₅₇₀	(0.14) 16.2	(0.86) 66.5	(0.38) 1.82	(0.62) 4.65
bR ₄₈₀	(0.56) 8.5	(0.44) 32.3	(0.51) 14.7	(0.49) 154

En résumé, contrairement aux méthodes de séchage, l'électrodéposition des membranes pourpres nous offre la possibilité d'observer les différences entre les photocourants de la bR₅₇₀ et de la bR₄₈₀. Les courants recueillis en présence d'Enflurane reflètent bien ce que l'on connaît du comportement de la bR₄₈₀. Ainsi nous avons une accélération très marquée des courants associés à l'apparition de l'intermédiaire M, suivie d'une quasi absence de déplacement de charges montrant bien la faible capacité de la bR₄₈₀ à pomper des protons en lien avec le blocage de son intermédiaire M.

Nous terminerons cette section en revenant sur une observation que nous avons faite à la section 4.3.4 figure 4.14. À ce moment nous analysons les résultats des photocourants en régime continu en présence d'Enflurane et nous remarquons que dans le cas des membranes pourpres électrodéposées, le signal de la bactériorhodopsine n'était pas réversible après l'enlèvement de l'Enflurane. C'est-à-dire que le photocourant observé après avoir enlevé l'Enflurane était différent de celui mesuré avant l'ajout d'Enflurane, alors que nous savions que le spectre UV-Visible de la bactériorhodopsine était totalement réversible.

Nous avons donc recueilli à partir de la section présente les résultats nécessaires pour observer si le phénomène est toujours visible avec les photocourants transitoires. Nous avons enregistré le photocourant pour la membrane électrodéposée après avoir retiré l'Enflurane de l'électrolyte par deux vidanges successives. Ce résultat a été rajouté à ceux déjà montrés plus haut à pH 7.0 et avec Enflurane et affiché aux figures de la page suivante. Nous remarquons que comme dans le cas des signaux en régime continu, il n'y a pas complète réversibilité des signaux après élimination de l'Enflurane. Quoique les signaux avant et après l'Enflurane soient semblables, il y a un ralentissement général de l'ordre de 30% des cinétiques après traitement puis élimination de l'Enflurane. Ceci est aussi mis en évidence quantitativement au tableau 4.10 affichant les constantes de temps des exponentielles ajustées aux signaux.

Figure 4.50 (première échelle de temps)

Photocourants lents avant et après Enflurane. Membranes pourpres électrodéposées.
Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0, Enflurane dissout à saturation selon le cas.

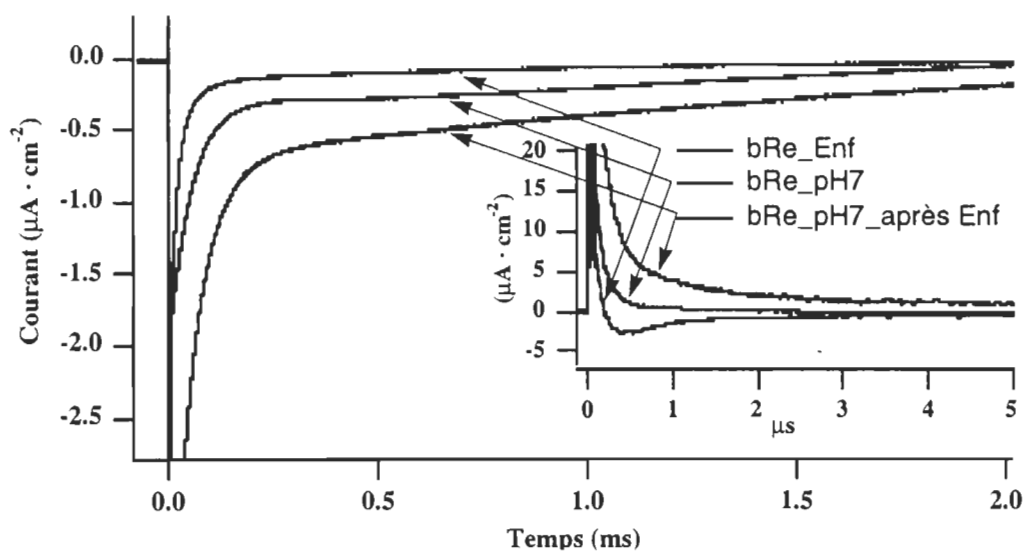


Figure 4.51 (deuxième échelle de temps)

Photocourants lents avant et après Enflurane. Membranes pourpres électrodéposées.
Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0, Enflurane dissout à saturation selon le cas.

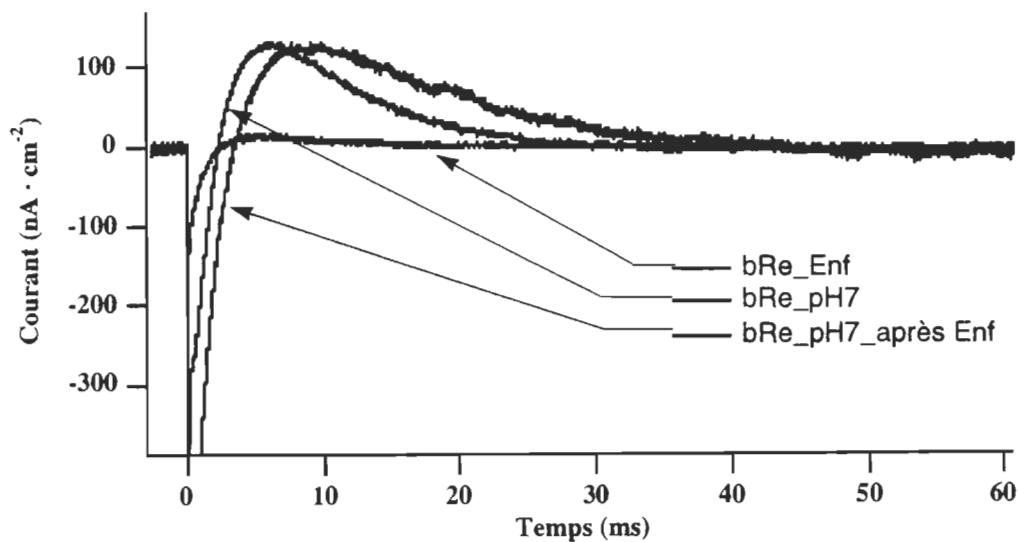


Tableau 4.10

Constantes de temps pour photocourants avec membranes pourpres électrodéposées et électrolyte à pH 7.0 avant et après avoir enlevé l'Enflurane.

Électrolyte: KCl 100 mM, tampon citrate 10 mM pH 7.0.

		Électrolyte pH7 avant Enf.		Électrolyte pH7 après Enf.	
		Amplitudes	Constantes de temps	Amplitudes	Constantes de temps
Phase 1	1 exp.	0.78	108 ns	1.47	146 ns
	2 exp.	0.035	1.11 μ s	0.65	1.49 μ s
Phase 2	3 exp.	-0.047	55.8 μ s	-0.078	64.2 μ s
Phase 3	4 exp.	0.0041	479 μ s	0.017	510 μ s
	5 exp.	-0.024	2.24 ms	-0.016	3.29 ms
Phase 4	6 exp.	0.012	6.97 ms	0.009	12.2 ms

Amplitude positive: $A \cdot \exp(-t/\tau)$

Amplitude négative:..... $- A \cdot \exp(-t/\tau)$

Chapitre 5

Conclusion Générale

5 Conclusion générale.

5.1 Dichroïsme et photocourant en régime continu.

Dans un premier temps, nous avons confirmé par dichroïsme linéaire qu'il y a modulation du dipôle électrique permanent de la membrane pourpre en fonction du pH. Ces variations de dipôle électrique conjuguées avec nos différents procédés de déposition nous permettent d'orienter la bactériorhodopsine dans ces deux configurations possibles; soit côté cytoplasmique ou côté extracellulaire face à l'électrode de déposition.

Dans un deuxième temps nous avons observé les photocourants en régime continu pour nos cinq procédés de déposition dans le but de démontrer un lien entre le sens des courants observés et l'orientation des membranes pourpres. Les résultats obtenus se sont avérés incohérents et ne se prêtèrent pas à une interprétation raisonnable. Par conséquent, nous avons conclu à la faiblesse de cette méthode d'observation par rapport aux objectifs de notre travail dû à la convolution et à la superposition des photocourants recueillis.

5.2 Photocourant transitoire.

Dû au manque d'informations obtenues par l'observation des photocourants en régime continu, nous avons effectué des mesures de photocourants transitoires. Ces derniers résultats furent riches en informations et nous permirent de vérifier nos hypothèses et d'établir une interprétation des courants.

5.2.1 Photocourant transitoire partie rapide.

De l'observation des parties rapides des photocourants transitoires nous vérifions que le sens des courants enregistrés est directement relié au sens d'orientation de la membrane pourpre obtenue avec nos méthodes de dépositions. De ceci nous démontrons qu'il y orientation spontanée des membranes pourpres avec les dépositions par simple séchage sans aucun traitement de la plaque de déposition et que cette orientation est déterminée par le dipôle électrique permanent de la membrane versus le pH de séchage.

Nous montrons aussi que le premier pic de courant associé à l'isomérisation du rétinol n'est pas influencé par les différentes solutions électrolytiques que nous utilisons lors des mesures. Ainsi les variations de pH de la solution électrolytique entre pH 7.0 et pH 2.0 et la présence d'Enflurane ne modifient pas les déplacements de charges internes à la molécule lors de l'isomérisation.

De plus à pH 2.0 il n'y a que le courant d'isomérisation qui est observable et aucun autre courant relié au transport de protons vers l'extérieur ou l'intérieur de la molécule, confirmant ainsi l'absence de pompage de la bactériorhodopsine à ce pH.

5.2.2 Photocourant transitoire partie lente.

À partir des résultats des parties lentes des photocourants transitoires, nous avons dû séparer nos résultats en deux groupes demandant des hypothèses différentes pour expliquer l'origine de leurs photocourants: les dépositions par séchage et les dépositions par électrodéposition.

5.2.2.1 Déposition pas séchage.

Dans le cas des dépositions par séchage le sens des photocourants lents ne correspond pas au sens d'orientation des membranes pourpres. De plus, les photocourants recueillis sont tous semblables pour un même électrolyte quelque soit le type de déposition par séchage. Finalement il y a inversion des signaux entre les électrolytes à pH 7.0 et à pH 3.0.

Pour expliquer l'origine et le comportement de ces courants nous faisons appel à l'hypothèse de Robertson et Lukashev et à l'inversion de la séquence de pompage de la bactériorhodopsine à pH 3.0 par rapport à pH 7.0. Ainsi nous expliquons la similitude des photocourants pour différents électrolytes avec une même déposition par l'hypothèse d'une lecture indirecte des courants de pompage de protons par des variations de pH à l'interface platine membrane pourpre. Pour ce qui est de l'inversion de signal entre les électrolytes à pH 7.0 et pH 3.0 nous mettons en cause l'inversion de la séquence de pompage. Nous avons

remarqué aussi qu'il n'y a pas de différences majeures entre les photocourants avec et sans présence d'Enflurane, mais seulement une diminution de l'intensité des courants reliée à la baisse de la capacité de pompage de la bactériorhodopsine rouge (bR_{480}). Cette absence de différence dans la forme des courbes de courants obtenus est le résultat de la lecture indirecte des courants de pompage par des variations de pH nous empêchant de voir les différences de courants de transport de protons à l'intérieur de la bactériorhodopsine.

5.2.2.2 Électrodéposition.

Dans le cas de l'électrodéposition l'hypothèse de Robertson et Lukashev ne peut être utilisée pour expliquer les photocourants par l'entremise de variation de pH à l'interface platine membrane pourpre. En effet, l'électrodéposition crée un lien intime à l'interface platine membrane pourpre éliminant la zone aqueuse de variation de pH et nous permet d'observer le véritable courant de pompage vectoriel de la bactériorhodopsine. Cette lecture directe des courants de pompages de protons nous permet d'observer des différences de réponse photoélectrique entre les différents électrolytes.

Des différences marquées sont observées entre les photocourants avec électrolyte à pH 7.0 et pH 3.0. Ces différences sont expliquées en tenant toujours compte de l'hypothèse d'inversion de la séquence de pompage entre pH 7 et pH 3. Nous identifions aussi un temps d'arrêt dans la séquence de pompage inversée à pH 3.0 associé au surplus d'une charge positive et à l'absence de l'intermédiaire N dans cette condition.

Des différences sont aussi observées entre les photocourants avec et sans la présence d'Enflurane dans l'électrolyte. De ces données nous avons pu identifier la partie des courants associée à l'accélération de l'apparition de l'intermédiaire M_{380} et l'absence de pompage relié au blocage de ce même intermédiaire pour la bactériorhodopsine en présence d'Enflurane. Nous observons aussi une réversibilité presque complète des photocourants vers leur forme initiale après l'enlèvement de l'Enflurane.

5.3 Avenues de recherche et potentiel technologique.

5.3.1 Avenues de recherche.

Pour procéder plus avant dans cette recherche, il nous faudrait normaliser nos procédés de déposition par séchage afin de pouvoir effectuer des comparaisons en amplitude entre les divers types de dépositions. Il faut aussi améliorer la combinaison amplificateur/cellule électrolytique afin d'augmenter le temps de réponse du système et d'améliorer le rapport signal sur bruit.

En plus des améliorations techniques, il faut poursuivre par la caractérisation des deux types de jonctions que nous avons identifié, soit les jonctions par séchage et les jonctions par électrodéposition. Ces caractéristiques devraient nous mener finalement à une connaissance des potentiels de jonction et à une modélisation des courants et des déplacements des porteurs de charge en cause.

5.3.2 Potentiel technologique.

Comme nous le savons, le monde industriel est avide de procédés simples et rapides pouvant s'appliquer à des productions à grande échelle et à coût minime. À ce niveau le procédé de déposition par simple séchage est tout à fait approprié. Ainsi, par exemple, la production de capteurs à base de bactériorhodopsine, demandant la déposition de membranes pourpre sur des électrodes, serait grandement avantagée par la technique de déposition par simple séchage par rapport aux techniques de déposition par monocouches de Langmuir-Blodgett ou d'électrodéposition. Les deux dernières méthodes que nous venons d'énoncer demandent des infrastructures plus imposantes et des conditions beaucoup plus rigoureuses.

De plus nous avons démontré qu'il y a orientation des membranes pourpres par simple séchage et que l'on peut choisir cette orientation (cytoplasmique ou extracellulaire) en fonction du pH de séchage. Cette possibilité d'orientations inverses et du même coup de photocourants inverses, sera sûrement générer des idées d'applications très prometteuses aux spécialistes des transferts technologiques.

Bibliographie.

Balashov S.P., Ebrey T.G. **Bacteriorhodopsin: molecular mechanisms of transmembrane proton transfer.** The Spectrum (1994) **vol. 7; no. 3**, pp. 1-9.

Baribeau Johanne. **Les interactions lipides-protéines dans la membrane pourpre: une approche analytique.** Thèse de doctorat de biophysique Université du Québec à Trois-Rivières (1987) **D 12**, p. 148.

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

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

Birge R. R. **Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin.** Biochim. Biophys. Acta (1990) **vol. 1016**, pp. 293-327.

Blaurock A.E., King G.I. **Asymmetric structure of the purple membrane.** Science (1977) **vol. 196**, pp. 1101-1104.

Boucher F., Taneva S. G., Elouatik S., Déry M., Messaoudi S., Harvey-Girard E., Beaudoin N. **Reversible inhibition of proton release activity and the anesthetic-induced acid-base equilibrium between the 480 and 570 nm forms of bacteriorhodopsin.** Biophys. J. (1996) **vol. 70**, pp. 948-961.

Boyer A., Déry M., Selles P., Arbour C., Boucher F. **Colour discrimination by forward and reverse photocurrents in bacteriorhodopsin-based photosensor.** Biosens. Bioelectron(1995) **vol. 10**, pp. 415-422.

Brown A.D. et Shorey C.D. **The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria.** J. cell biol (1963) **vol. 18**, pp. 681.

Callender R.H. **An introduction to visual pigments and purple membranes and their primary processes.** Biological Events Probed by Ultrafast Laser Spectroscopy (1982) pp. 239.

Chang C.-H., Chen J.-G., Govindjee R., Ebrey T. **Cation binding by bacteriorhodopsin.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) **vol. 82**, pp. 396-400.

Dobler B.J., Zinth W., Kaiser W., Oesterheld D. **Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy.** Chem. Phys. Lett. (1988) **vol. 144**, pp. 215-220.

Drachev L.A., Kaulen A.D., Skulachev V.P. **Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis.** FEBS Lett. (1978) **vol. 87**, pp. 161-167.

Ebrey T.G., Becher B., Mao B., Kilbride P. **Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane.** J. mol. biol. (1977) **vol. 112**, pp. 377.

Edholm O., Berger O., Jahnig F. **Structure and fluctuations of bacteriorhodopsin in the purple membrane.** J. Mol. Biol. (1995) **vol. 250**, pp. 94-111.

Elouatik S. **Modulation réversible de l'activité de la bactériorhodopsine: aspects optique et électrocinétique de la conversion énergétique par ses états couplé et découplé.** Thèse de doctorat (1996) Université du Québec à Trois-Rivières, p. 189.

Fisher A.K., Yanagimoto K., Stoeckenius W. **Oriented adsorption of purple membrane to cationic surfaces.** J. Cell Biol. (1978) vol. 77, pp. 611-621.

Fisher A.K. **"Half" Membrane enrichment: verification by electron microscopy.** Science (1975) vol. 190, pp. 983-985.

Garty H., Klemperer G., Eisenbach M., Caplan S. R. **The direction of light-induced pH changes in purple membrane suspensions.** FEBS Lett. (1977) vol. 81, pp. 238-242.

Gibbons N.E. **Family V. Halobacteriaceae Fam. nov.** In R.E. Buchanan et N.E. Gibbons (Ed.). *Bergey's Manual of determinative bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins (1974) p. 269.

Groma G.I., Ráksi F., Szabó G., Váró G. **Picosecond and nanosecond components in bacteriorhodopsin light-induced electric response signal.** Biophys. J. (1988) vol. 54, pp. 77-80.

Gutman M., Nachliel E. **The dynamic aspects of proton transfer processes.** Biochim. Biophys. Acta (1990) vol. 1015, pp. 391-414.

Hayward B.H., David A.G., Robert M.G., Fisher A.K. **Molecular orientation of bacteriorhodopsin within the purple membrane of Halobacterium halobium.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1978) vol. 75; no. 9, pp. 4320-4324.

Harvey-Girard E. **Détermination de l'activité de pompage de protons de la forme spectrale 480 de la bacteriorhodopsine des Halobacterium.** Mémoire de maîtrise (1990) Université du Québec à Trois-Rivières, p. 82.

Henderson R. **The structure of purple membrane from halobacterium halobium: Analysis of the X-ray diffraction pattern.** J. mol. biol. (1975) vol. **93**, pp. 123-138.

Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zenlin E., Beckmann E., Downing K.H. **Model for the structure of bacteriorhodopsin base on high-resolution electron cryo-microscopy.** J. mol. biol. (1990) vol. **213**, pp. 899-929.

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

Henry N., Beaudoin N., Baribeau J., Boucher F. **Further characterization of anesthetic-treated purple membranes.** Photochem. photobiol. (1988) vol. **47**; no.1, pp.85-90.

Hofrichter J., Henry E.R., Lozier R.A. **photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane by time-resolved absorption spectroscopy.** Biophys. J. (1989) vol. **56**, pp. 693-706.

Hong F.T., Montal M. **Bacteriorhodopsin in model membranes, a new component of the displacement photocurrent in the microsecond time scale.** Biophys. J. (1979) vol. **25**, pp. 462-472.

Ikonen M., Lemmetyinen H. **The photovoltage and optical signals of bacteriorhodopsin in LB films with different molecular orientations.** Thin Solid Films (1993) vol. **235**, pp. 234-237.

Kates M., Kushwaha S.C., Sprott G.D. **Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methadenic bacteria.** Methodes in enzymology (1982) vol. **88**, pp 98-111.

Keszthelyi L. **Intramolecular charge shifts during the photoreaction cycle of bacteriorhodopsin.** Progress in clinical and biological research. Alan R. Liss, Inc., New York. (1984) Vol **164**, pp. 51-71

Keszthelyi L. **Primary charge motions and light-energy transduction in bacteriorhodopsin.** Biophys. Chem. (1988) vol. **29**, pp. 127-136.

Keszthelyi L. **Orientation of membrane fragments by electric field.** Biochim. Biophys. Acta (1980) vol. **598**, pp. 429-436.

Keszthelyi L. **Orientation of purple membranes by electric field.** Methodes in Enzymology (1982) **88**: 287-297.

Keszthelyi L., Ormos P., Váró Gy. **Fast components of the electric response signal of bacteriorhodopsin protein.** Acta Phys. Acad. Sci. Hung. (1982) vol. **53**, pp .143-157.

Keszthelyi L., Ormos P. **Displacement current on purple membrane fragments oriented in a suspension.** Biophys. Chem. (1983) vol. **18**, pp. 397-405.

Khorana H.G., Gerber G.E., Herlihy W.C., Gray C.P., Anderegg R.J., Nihei K., Biemann K. **Amino acid sequence of bacteriorhodopsin.** Proc. natl. acad. sci. U.S.A. (1979) vol. **76**, pp. 5046.

Kimura Y., Fujiwara M., Ikegami A. **Anisotropic electric properties of purple membranes and their change during the photoreaction cycle.** *Biophys. J.* (1984) vol. **45**, pp. 615-625.

Kobayashi T., Ohtani H., Iwai J., Ikegami A., Uchiki H. **Effect of pH on the photoreaction cycles of bacteriorhodopsin.** *FEBS Lett.* (1983) vol. **162**, pp. 197-200.

Kononenko A.A., Lukashov E.P., Maximychev A.V., Chamorovsky S.K., Rubin A.B., Timashev S.F., Cherkulaeva L.N. **Oriented purple-membrane films as a probe for studies of the mechanism of bacteriorhodopsin functioning. I. The vectorial character of the external electric-field effect on the dark state and the photocycle of bacteriorhodopsin.** *Biochim. Biophys. Acta* (1986) vol. **850**, pp. 162-169.

Koyama K., Yamaguchi N., Miyasaka T. **Antibody-Mediated bacteriorhodopsin orientation for molecular device architectures.** *Science* (1994) vol. **265**, pp. 762-765.

Kushwaha S.C., Kates M., Martin W.G. **Characterization and composition of the purple and red membrane from halobacterium cutirubrum.** *Can. J. Biochem.* (1975a) vol. **53**, pp. 284.

Kushner D.J. **Halophilic bacteria.** *Advan. Appl. Microbiol.* (1968) vol. **10**, pp. 73-99.

Kushner D.J., Bayley S.T., Boring J., Kates M., Gibbons N.E. **Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile halobacterium cutirubrum.** *Can. j. biochem.* (1964) vol. **10**, pp. 483.

Kushner D.J., Onishi H. **Absence of normal cell wall constituents from the outer layers of halobacterium cutirubrum.** *Can. j. biochem.* (1968) vol. **46**, pp. 997.

Lanyi L.K. **Proton translocation mechanism and energetics in the light-driven pump bacteriorhodopsin.** *Biochim. Biophys. Acta* (1993) **vol. 1183**, pp. 241-261.

Lanyi L.K. **Proton translocation mechanism and energetics in the light-driven pump bacteriorhodopsin.** *Biochim. Biophys. Acta* (1993) **vol. 1183**, pp. 241-261.

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) p. 297.

Larsen H. **Biochemical aspects of extreme halophilism.** *Advan. Microbiol. Physiol.* (1967) **vol. 1**, pp. 97.

Le Coutre J., Tittor J., Oesterhelt D., Gerwert K. **Titre.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **vol. 92**, pp. 4962-4966.

Le Coutre J., Gerwert K. **Kinetic isotope effects reveal an ice-like and a liquid-phase-type intramolecular proton transfert in bacteriorhodopsin.** *FEBS Letters* (1996) **vol. 398**, pp. 333-336.

Lee K.-H., McIntosh A.R., Boucher F. **The interaction between halogenated anaesthetics and bacteriorhodopsin in purple membranes as examined by intrinsic ultraviolet fluorescence.** *Biochem. Cell Biol.* (1991) **vol. 69; no.2-3**, pp. 178-184.

Liu S.Y. **Light-induced currents from oriented purple membrane. I. Correlation of the microsecond component (B2) with the L-M photocycle transition.** *Biophys. J.* (1990) **vol. 57**, pp. 943-950.

Liu S.Y., Ebrey T., Zingoni J., Couch R., Fang J.-M., Nakanishi K. **Fast photoelectric responses from artificial pigments of bacteriorhodopsin.** *Biophys. J.* (1987) **vol. 51**, pp. 134a.

Lugtenburg J., Muradin-Szweykowska M., Heeremans C., Pardoën J.A., Hardison G.S., Herzfeld J., Griffin R.G., Smith S.O., Mathies R.A. **Mechanism for the opsin shift of retinal's absorption in bacteriorhodopsin.** *J. Am. Chem. Soc.* (1986) **vol. 108**, pp. 3104.

Mathies R.A., Lin S.W., Ames J.B., Pollard W.T. **From femtoseconds to biology - Mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump.** *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* (1991) **vol. 20**, pp. 491-518.

Messaoudi S., Lee K.-H., Beaulieu D., Baribeau J., Boucher F. **Equilibria between multiple spectral forms of bacteriorhodopsin effect of delipidation, anesthetics and solvents on their pH dependence.** *Biochim. Biophys. Acta* (1989) **vol. 1140**, pp.45-52.

Messaoudi S., Daigle I., Boucher F. **Structural features underlying the anesthetic-induced equilibrium between three spectral species of bacteriorhodopsin: bR₅₇₀, bR₄₈₀, bR₃₈₀.** *J. Mol. Struct.* (1993) **vol. 297**, pp. 19-27.

Méthot M., Boucher F., Salesse C., Subirade M., Pérolet M. **Determination of bacteriorhodopsin orientation in monolayers by infrared spectroscopy.** *Thin Solid Films* (1996) **vol. 284-285**, pp. 627-630.

Miyasaka T., Koyama K. **Rectified photocurrents from purple membrane Langmuir-Blodgett films at the electrode-electrolyte interface.** *Thin Solid Films* (1992) **vol. 210-211**, pp. 146-149.

Miyasaka T., Koyama K., Itoh I. **Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor.** Science (1992) vol. **255**, pp. 342-344.

Miyasaka T., Koyama K. **Photoelectrochemical behavior of purple membrane Langmuir-Blodgett films at the electrode-electrolyte.** Chem. Lett. (1991) pp.1645-1648.

Mowery P.C., Lozier R.H., Chae Q., Tseng Y.-W., Taylor M., Stoeckenius W. **Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin.** Biochemistry (1979) vol.**18**; no.**19**, pp. 4100-4107.

Nakagawa T., Hamanaka T., Nishimura S., Uruga T., Kito Y. **The specific binding site of the volatile anesthetic diiodomethane to purple membrane by X-ray diffraction.** J. Mol. Biol. (1994) vol. **238**, pp. 297-301.

Nishinura S., Mashimo T., Hiraki K., Hamanaka T., Kitô Y., Yoshiya I. **Volatile anesthetics cause conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membrane.** Biochim. Biophys. Acta (1985) vol. **818**, pp. 421-424.

Oesterhelt D., Stoeckenius W. **Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium.** Nature New biology (1971) vol. **233**, pp. 149-152.

Oesterhelt D. **The purple membrane of halobacterium halobium: A new system for light energy conversion.** In CIBA found symp. Energy transform. in biol. syst. (1975) vol. **31**, pp. 147-167.

Oesterhelt D., Stoeckenius W. **Functions of a new photoreceptor membrane.** Proc. natl. acad. sci. U.S.A. (1973) vol. **70**, pp. 2853-2857.

Oesterhelt D., 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) vol. 37, pp. 316.

Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Feigina M.Y., Kiselev A.V., Lobanov N.A. **The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview.** FEBS Letters (1979) vol. 100, pp. 219.

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

Pettei M.J., Yudd A.P., Nakanishi K., Henselman R., Stoeckenius W. **Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin.** Biochemistry (1977) vol. 16, pp. 1955.

Pomerleau V., Harvey-Girard É., Boucher F. **Lipid-protein interaction in the purple membrane: structural specificity within the hydrophobic domain.** Biochim. Biophys. Acta (1995) vol. 1234, pp. 221-224.

Rammelsberg R., Huhn G., Lübber M., Gerwert K. **The proton release mechanism of bacteriorhodopsin monitored by time-resolved step-scan FT-IR spectroscopy.** Eur. Biophys. J. (1997) vol. 26;No. 1, pp. 33.

Robertson B., Lukashev E. P. **Rapid pH change due to bacteriorhodopsin measured with a tin-oxide electrode.** Biophys. J. (1995) vol.68, pp.1507-1517.

Stoeckenius W., Rowen R. **A morphological study of halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration.** J. cell biol. (1967) vol. 34, pp. 365.

Stoeckenius W., 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) vol. **38**, pp. 337.

Takeuchi Y., Ohno K., Yoshida M., Nagano K. **Light-induced proton dissociation and association in bacteriorhodopsin.** Photochem. Photobiol (1981) vol. **33**, pp. 587-592.

Taneva S.G., Petkanchin I.B. **Electric parameters of purple membrane fragments.** Photobiology, ed. E. Riklis. Plenum Press, New York, pp. 277-286.

Trissl H.-W. **I. Primary electrogenic processes in bacteriorhodopsin probed by photoelectric measurements with capacitative metal electrodes.** Biochim. Biophys. Acta (1985) vol. **806**, pp. 124-135.

Unwin P.N.T., Henderson R. **Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystallin specimens.** J. mol. biol. (1975) vol. **94**, pp. 425-440.

Wallace B.A. **Comparison of bacteriorhodopsin and rhodopsin molecular structure.** Methods in Enzymology. Academic Press (1982) vol. **88**, pp. 447-470.

Váró Gy. **Dried oriented purple membrane samples.** Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae (1981) vol.**32**, pp.301-310.

Váró Gy., Lanyi J. K. **Photoreactions of bacteriorhodopsin at acid pH.** Biophys. J. (1989) vol. **56**, pp. 1143-1151.