

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

DANIEL ABRAN
B. SC. (BIOPHYSIQUE)

DISSIPATION D'ENERGIE DANS LA RHODOPSINE :
UNE ETUDE PAR PHOTOLYSE

AVRIL 1987

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

RESUME

L'acte primaire du processus visuel consiste en l'absorption de l'énergie d'un photon par le chromophore de la rhodopsine, le 11-cis rétinol. Lors de ce processus, il y a isomérisation du rétinol en sa forme tout-trans ($\Phi = 0,67$). Cette réaction constitue la base moléculaire du stockage d'énergie par le pigment visuel. Le mécanisme par lequel ce phénomène se produit n'est cependant pas clairement établi. Ainsi, on pourrait aussi bien imaginer que la séparation de charges entre l'azote positif du chromophore et son contre-ion négatif, ou que la génération de contraintes mécaniques, lors de l'isomérisation, soit responsable du stockage d'énergie, l'hypothèse la plus raisonnable étant que les deux mécanismes contribuent au stockage.

Afin de préciser cette question, nous avons tenté de mesurer expérimentalement la relaxation de contraintes mécaniques consécutives à l'excitation de la rhodopsine. La mise en évidence d'un tel phénomène permettrait non seulement d'appuyer une partie de l'hypothèse relative au mécanisme de stockage, mais aussi éventuellement de préciser l'importance de ce mode de stockage et de dissipation de l'énergie.

A cette fin, nous avons mesuré la vitesse des transitions lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II pour des échantillons de rhodopsine dispersés dans des micelles de rigidités variables. Les résultats montrent un effet de la rigidité sur les deux transitions. Toutefois, si on interprète cet effet en termes de changements conformationnels associés à la relaxation de contraintes mécaniques, on conclut qu'une fraction significative de l'énergie est dissipée dès la transition lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I et que cette dernière demeure un candidat plausible au titre d'état transitoire susceptible de déclencher l'excitation visuelle.

De plus, afin de savoir si les changements conformationnels de la rhodopsine pouvaient être mesurés directement, nous avons tenté de les coupler à un transducteur piézoélectrique. Les résultats, quoique préliminaires, indiquent que cette méthode pourrait s'avérer très utile dans l'étude de la dissipation de l'énergie par les pigments visuels.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME	i
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
1- INTRODUCTION	1
1.1 Localisation des SEB	1
1.2 La rhodopsine	3
1.3 L'excitation visuelle	5
1.4 Le rétinai	8
1.5 La séquence photolytique de la rhodopsine	10
1.6 Effet de l'environnement sur la séquence photolytique et objet du travail	12
2- METHODES	16
2.1 Préparation des segments externes des bâtonnets	16

2.1.1 Isolation des segments externes des bâtonnets	16
2.1.2 Purification des segments externes des bâtonnets	18
2.2 Purification de la rhodopsine	19
2.2.1 Préparation de la colonne à chromatographie	19
2.2.2 Solubilisation des segments externes des bâtonnets	20
2.2.3 Chromatographie d'affinité	21
2.2.4 Dialyse	24
2.2.5 Lavage de la colonne	26
2.2.6 Caractéristiques des détergents utilisés	26
 3- PHOTOLYSE	 32
3.1 Principe de la technique	32
3.2 Le faisceau actinique	32
3.3 Le faisceau d'analyse	33
3.4 La cuvette	35
3.5 Le contrôle de la température	37
3.6 L'amplification du signal	37
3.7 Obtention des résultats	39
3.8 Traitement des résultats	39

4- RESULTATS	41
4.1 Préparation des échantillons	41
4.1.1 Spectre d'absorption de la rhodopsine	41
4.1.2 Critère de pureté	41
4.1.3 Efficacité de solubilisation	43
4.1.4 Extraction du O-méthyl- α -D-glucopyranoside des préparation de rhodopsine	44
4.1.5 Incubation avant cinétique	44
4.2 Mesure de l'absorption transitoire des intermédiaires	45
4.2.1 Dépendance thermique de la réaction métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II	45
4.2.2 Effet de la longueur des chaînes	48
4.2.3 Effet de la digitonine	50
4.2.4 ΔS^\ddagger et ΔH^\ddagger de ces cinétiques	52
4.2.5 Effet de la longueur des chaînes sur l'étape lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I	52
5- DISCUSSION	57
5.1 Vitesse de transition et équilibre entre les métarhodopsines	57
5.2 Transitions conformationnelles	57

CONCLUSION	63
BIBLIOGRAPHIE	64
ANNEXE A	70
ANNEXE B	71

LISTE DES FIGURES

	Page
1 Ultrastructure d'un bâtonnet.	3
2 Position de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine dans la membrane d'un disque.	4
3 Hypothèse impliquant le calcium dans le phénomène de la transduction visuelle.	7
4 Structure du chromophore de la rhodopsine.	9
5 Séquence photolytique de la rhodopsine bovine.	13
6 Schéma du montage de chromatographie.	22
7 Profil d'élution typique de la rhodopsine solubilisée.	23
8 Schéma du spectrophotomètre.	25
9 Spectres ESR d'une sonde dispersée dans les esters de sucrose de différentes longueurs de chaîne (C8 - C18).	30

10	Caractéristiques des détergents.	31
11	Schéma du montage expérimental de photolyse éclair.	33
12	Description du faisceau d'analyse.	36
13	Description du porte-cuvette thermostaté.	38
14	Spectre d'absorption de la rhodopsine.	42
15	Cinétique de formation de la métarhodopsine II à 30°C.	46
16	Variation du temps de demi-vie pour chaque longueur de chaîne à toute les températures étudiées pour la réaction métarhodopsine I → métarhodopsine II.	49
17	Cinétique montrant l'effet de ralentissement de la digitonine.	51
18	Cinétique de formation de la métarhodopsine I à 23°C.	54
19	Structure proposée du complexe rhodopsine détergent	60
20	Modèle des transitions conformationelles	62

LISTE DES TABLEAUX

	Page
1 Demi-vie de la réaction métarhodopsine I → métarhodopsine II à différentes températures pour la rhodopsine purifiée dans les esters de sucrose de différentes longueurs de chaînes.	47
2 Paramètres d'activations associées à la réaction métarhodopsine I → métarhodopsine II.	53
3 Demi-vie de la réaction lumirhodopsine → métarhodopsine I à 23°C pour la rhodopsine purifiée dans les esters de sucrose de différentes longueurs de chaînes.	56

INTRODUCTION

Chez les vertébrés, le site de l'absorption et de la transduction de l'énergie lumineuse au niveau du système visuel se retrouve au sein de la membrane discale des segments externes des bâtonnets (SEB). La rhodopsine, la composante protéique majeure des SEB, et son chromophore, le 11-cis rétinol, servent de capteur de lumière lors de ce processus.

L'absorption d'un photon par ce pigment provoque une séquence de changements structuraux qui ont été principalement caractérisés par des spectres d'absorption. Plusieurs chercheurs portent une attention toute particulière aux conditions modifiantes les caractéristiques de ces spectres. Plusieurs renseignements intéressants sur le système visuel furent obtenus par une étude du comportement spectral de la rhodopsine sous différentes conditions expérimentales. Voyons donc en quoi consiste le phénomène d'excitation du système visuel.

1.1 Localisation des SEB

A l'intérieur de la rétine de l'oeil se retrouve près d'un milliard de bâtonnets. Ces bâtonnets sont des tiges minces et allongées spécialisées dans la transduction de l'énergie lumineuse en influx nerveux (Hagins et al., 1970). Le bâtonnet se divise en deux sections (figure 1). Le segment interne, qui est riche en mitochondries et en ribosomes, génère de l'ATP à un rythme très rapide et synthétise activement des protéines. La section externe, le SEB, sert de support à des centaines de petits sacs appelés disques qui portent la rhodopsine au sein de leur membrane (Dratz et Hargrave, 1983).

1.2 La rhodopsine

Les disques sont des coussins plats servant de support à la rhodopsine, une protéine transmembranaire. Environ 85% des protéines se trouvant à l'intérieur du SEB sont la rhodopsine (Heitzmann, 1972; Krebs et Kühn, 1977). Il s'agit d'une chaîne polypeptidique constituée de 7 segments d'hélices alpha situés dans la partie hydrophobe de la membrane (figure 2) (Ovchinnikov, 1982). Quelques segments de chaîne de longueurs variables se retrouvent à l'extérieur, des deux côtés de la membrane, permettant des interactions avec des protéines environnantes. La rhodopsine est une glycoprotéine, c'est-à-dire

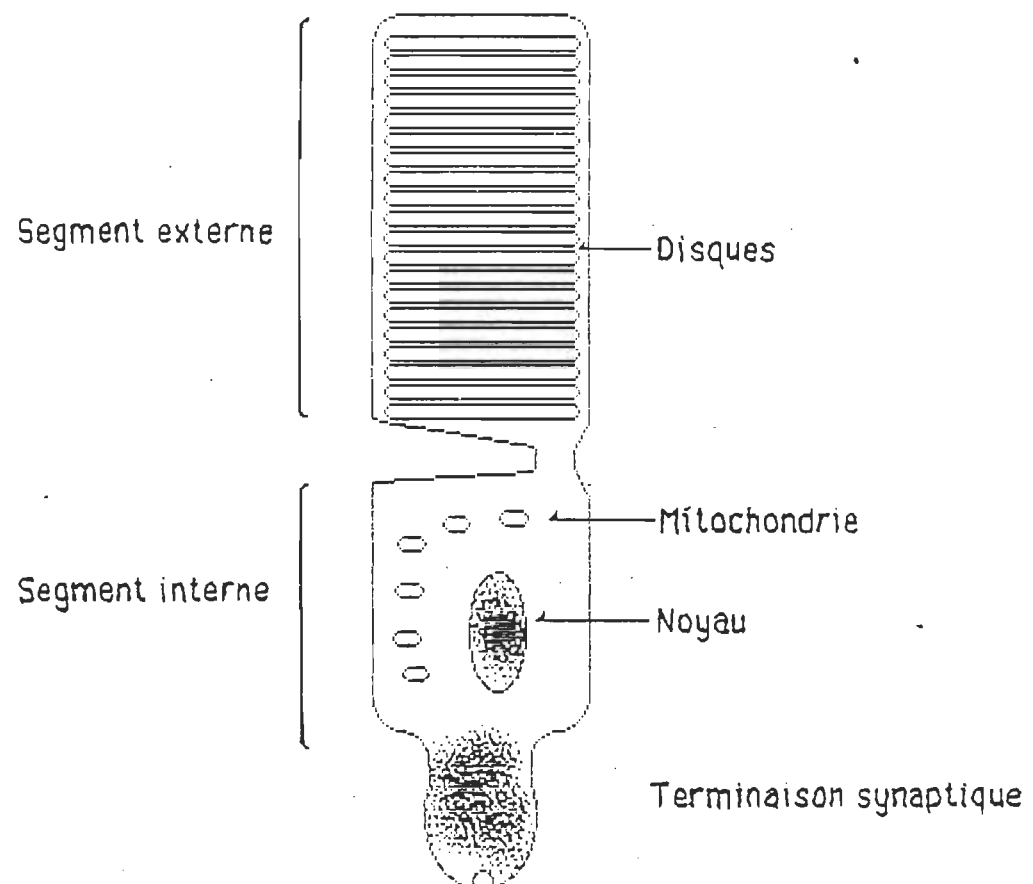


Figure 1 : Ultrastructure d'un bâtonnet.

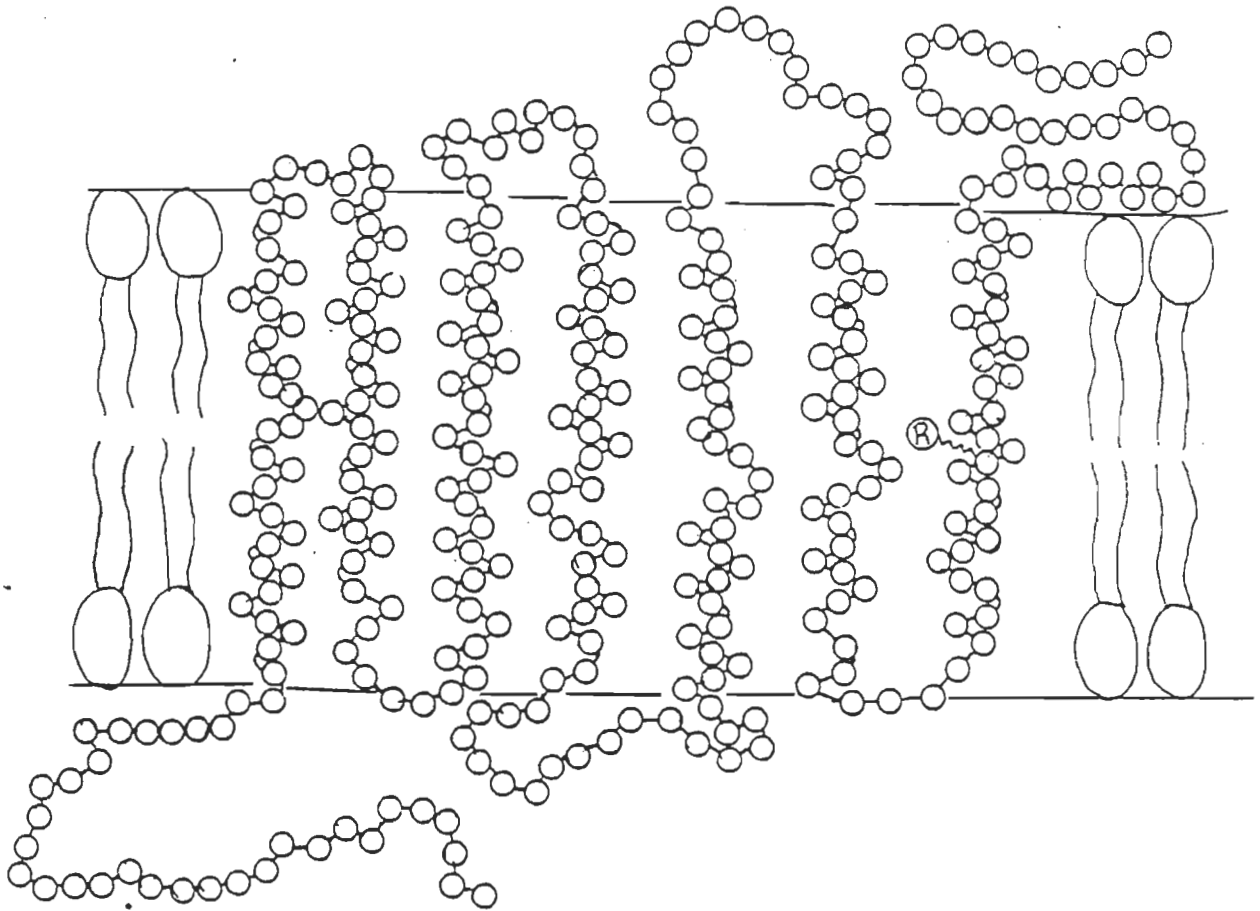


Figure 2 : Position de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine dans la membrane d'un disque (Ovchinnikov, 1982).

qu'elle a, attachée de façon covalente à sa chaîne polypeptidique, une chaîne d'oligo-saccharides (Heller, 1968; Plantner et Kean, 1976).

1.3 L'excitation visuelle

Un bâtonnet adapté à l'obscurité peut être excité par un seul photon (Hetch et al., 1942; Baylor et al., 1979). Phénomène extraordinaire, cette sensibilité à la lumière a conduit les chercheurs à imaginer toutes sortes d'hypothèses et à rechercher un système d'amplification de signal à proximité ou à l'intérieur des bâtonnets. Les études pour trouver ce mécanisme d'amplification avaient comme directive générale l'observation de toute modification chimique ou physique importante induite par la lumière. De ces recherches résultent deux hypothèses principales, l'une à base ionique, l'autre à base enzymatique. Ces deux possibilités font l'objet de recherches extensives (voir Yau et al., 1987). Voyons rapidement les grandes lignes de ces deux mécanismes.

L'hypothèse ionique tire ses principaux arguments du courant d'obscurité (Hagins et al., 1970). En effet, il existe à travers la membrane plasmique des disques un potentiel membranaire différent du potentiel de repos de la plupart des cellules. Cette différence provient du courant qui circule à l'obscurité entre le segment interne et le segment externe du

bâtonnet (figure 3). Ce courant origine du segment interne sous forme d'ions sodium et pénètre dans le segment externe. Une ATPase située dans le segment interne pompe le sodium vers l'extérieur et le potassium vers l'intérieur, permettant un gradient ionique qui maintient le courant. La perméabilité du SEB est grande aux ions sodium et faible aux ions potassium, tandis que la perméabilité du segment interne est grande aux ions potassium et faible aux ions sodium (Korenbrod et Cone, 1972). Le fait que le potentiel membranaire de la cellule photoréceptrice soit grandement influencé par le courant d'obscurité a suggéré que l'hyperpolarisation de la cellule après illumination soit causée par une baisse de ce courant, produisant ainsi l'excitation visuelle. En effet, l'absorption de la lumière par la rhodopsine provoque l'apparition de calcium dans le milieu extra-discal, conduisant au blocage des canaux sodiques, et donc à l'hyperpolarisation de la membrane du SEB.

La seconde hypothèse provient de l'observation d'activité enzymatique induite par la lumière. La réaction enzymatique la plus rapide observée jusqu'à maintenant dans les SEB est l'activation de la phosphodiesterase spécifique à la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). A l'obscurité, les SEB ont une concentration élevée en GMPc (70 μ M). Suite à l'illumination, cette concentration tombe de 50 à 70% et demeure à ce niveau jusqu'à ce que l'illumination cesse. De plus, on a pu montrer que le blanchiment d'une seule rhodopsine peut conduire à

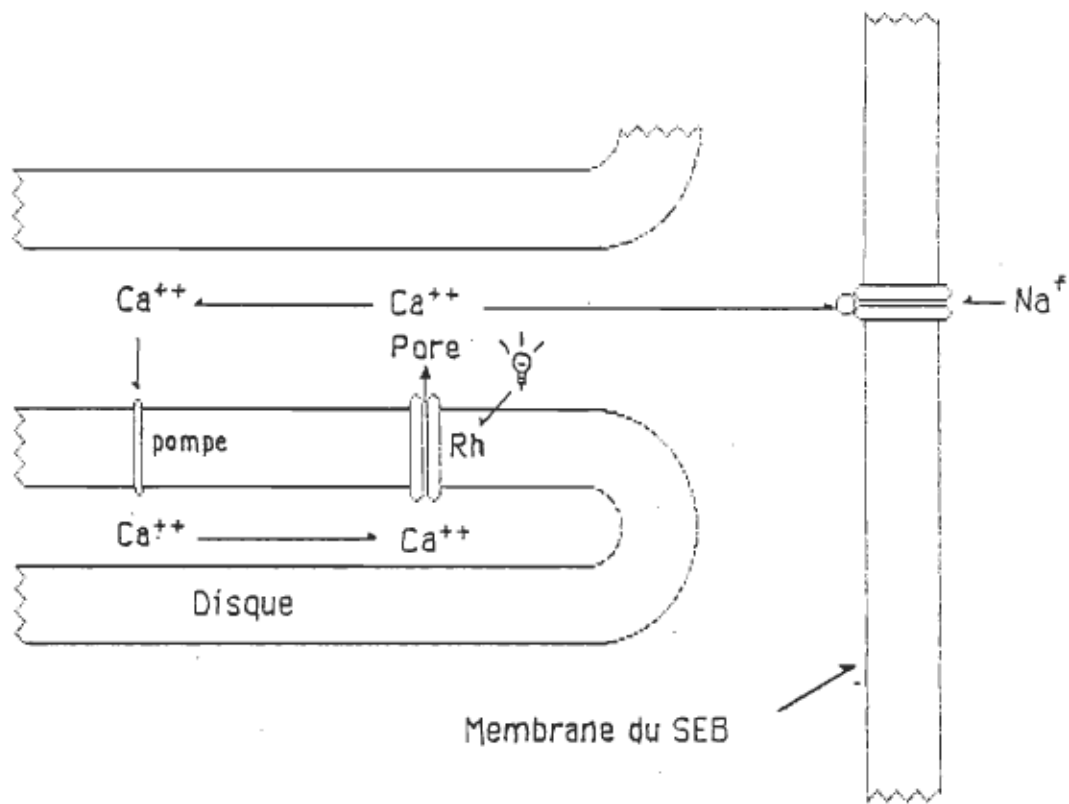


Figure 3 : Hypothèse impliquant le calcium dans le phénomène de la transduction visuelle.

l'hydrolyse de 50 000 molécules de GMPc (Woodruff et Bownds, 1979; Yee et Liebman, 1978). Ceci et le court temps de latence de la réponse enzymatique à la lumière (< 50 ms) serait consistant avec l'implication de l'hydrolyse du GMPc dans le mécanisme de la transduction visuelle.

1.4 Le rétinale

Le mécanisme de la transduction visuelle est directement relié à la rhodopsine. Que ce soit par la création de canaux dans l'hypothèse ionique, ou par l'activation de la phosphodiesterase, la rhodopsine est certainement impliquée. L'implication de la rhodopsine à ces différents processus ne peut être possible que par l'activation de la protéine en présence de lumière. L'excitation est réalisée grâce à la présence d'un groupe photosensible, le 11-cis rétinale. Ce chromophore est lié par une base de Schiff (Hubbard et Wald, 1952) à un groupe ϵ -amino d'un résidu lysine. Ce résidu est situé du côté C-terminal de la chaîne polypeptidique formant la rhodopsine. La présence de ce chromophore est responsable de l'absorption observée à 500 nm dans la rhodopsine.

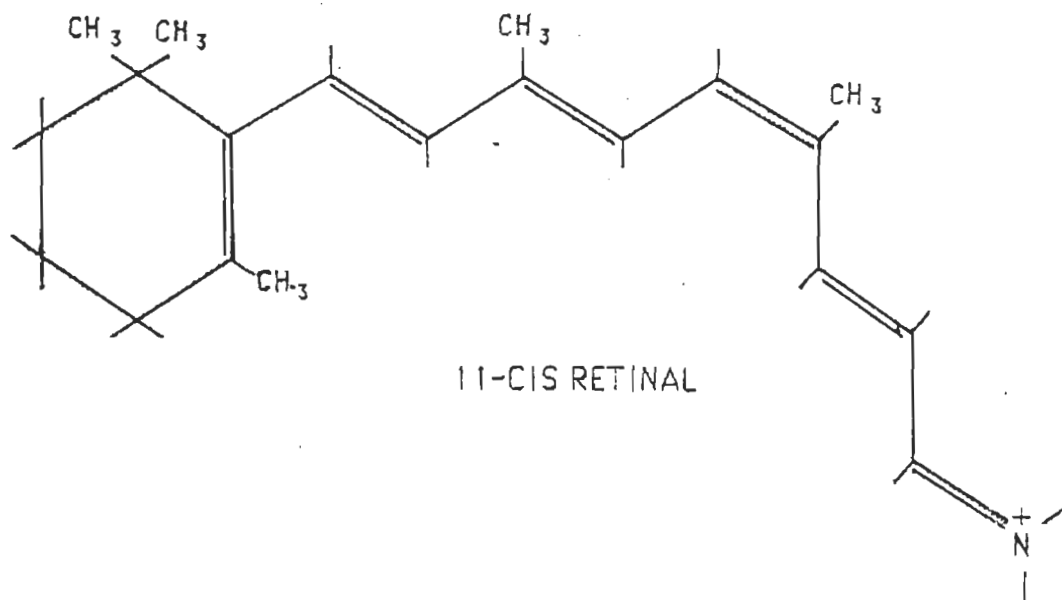
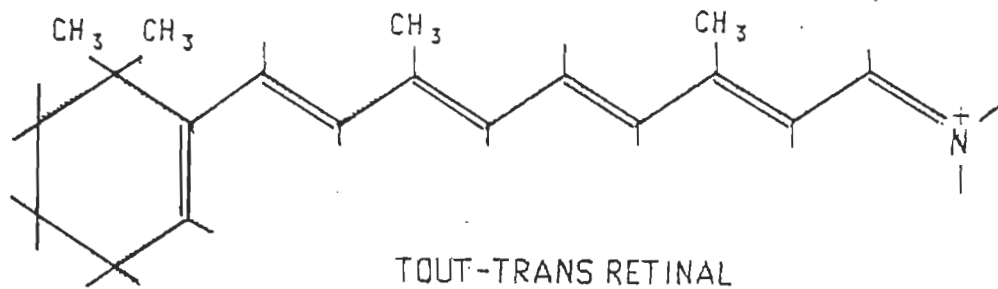


Figure 4 : Structure du chromophore de la rhodopsine.

1.5 La séquence photolytique de la rhodopsine et sa signification moléculaire

La première étape du processus visuel consiste en l'absorption de lumière par la rhodopsine qui provoque sa transformation rapide ($\sim 10^{-12}$ s) en un intermédiaire métastable dont le spectre est centré vers 540 nm, la bathorhodopsine. Les travaux à caractère tant théorique qu'expérimental montrent que cette réaction photochimique correspond à l'isomérisation du rétinol de sa forme 11-cis à tout-trans, suivie d'une translocation rapide d'un proton associé à l'azote du lien imine qui le relie à la protéine (Konig, 1982). Au cours de cette réaction, près de la moitié de l'énergie du photon est stockée par le pigment (Boucher and Leblanc, 1985), soit sous forme électrostatique, soit sous forme de contraintes mécaniques des segments polypeptidiques qui entourent le rétinol dans la rhodopsine (Warshel et Barbay, 1982).

La bathorhodopsine qui n'est stable que sous 100 K se transforme rapidement ($\sim 10^{-9}$ s) en un autre intermédiaire à la température de la pièce: la lumirhodopsine. Cette dernière, identifiée par Matthews et al. en 1963 possède son maximum d'absorption à 497 nm. A la température ambiante, cet intermédiaire ne persiste que pour quelques microsecondes et cède place à la métarhodopsine I qui, elle, a son maximum d'absorption à 480 nm. On connaît peu de choses sur les événements moléculaires qui prennent place au cours des transitions vers la

lumi- et la métarhodopsine I. Les modifications spectrales qui les accompagnent indiquent que les interactions rétinal-protéine sont modifiées au cours de ces étapes. Il est évident qu'elles consistent en des modifications progressives de la structure du pigment, consécutive à la migration de l'énergie du chromophore vers son apoprotéine car le but de cette activité photochimique est de transformer la rhodopsine, soit en canal à ions Ca^{++} , soit en initiateur de l'activité phosphodiésterasique.

Dans le domaine de temps des millisecondes, la métarhodopsine I se transforme progressivement en métarhodopsine II, une espèce absorbant à 380 nm. Ces deux métarhodopsines sont en équilibre chimique et cet équilibre dépend de la température, du pH (Parkes et Liebman, 1984) et de la pression (Lamola et al., 1974), l'élévation de la température, l'acidité du pH et les faibles pressions favorisant l'apparition de la métarhodopsine II. Plusieurs observations favorisent l'idée d'un changement conformationnel majeur au cours de la transition métarhodopsine I \rightarrow II. En effet, la réaction à des paramètres d'activation élevés, la susceptibilité du pigment à la protéolyse change (Pellicone et Virmaux, 1985), la liaison aldimine qui relie le rétinal à la protéine devient attaquable au borohydrure (Liebman et al., 1974), le pigment échange des protons avec son environnement (Ostroy, 1977), les membranes discales changent de volume (Atwood et Gutfreund, 1980), et finalement elles sont capables d'activer l'hydrolyse du cGMP (Fung et Stryer, 1980).

On voit donc que les variations transitoires de l'absorption de la rhodopsine suite à son excitation (figure 5) correspondent à ces changements structuraux importants. La forme métarhodopsine I \rightarrow II du pigment est stable pour plusieurs secondes, après quoi, le chromophore est lentement hydrolysé et libéré par la protéine qui dès lors redevient disponible pour lier une nouvelle molécule de 11-cis rétinol et répéter la séquence photolytique.

1.6 Effet de l'environnement sur la séquence photolytique et objet du travail

Les étapes antérieures à la transition métarhodopsine I \rightarrow II sont, en principe, insensibles aux modifications chimiques de l'environnement moléculaire de la rhodopsine. En fait, aucune étude sur ce point n'a été rapportée. Par contre, la transition de la métarhodopsine I à la métarhodopsine II est, elle, très dépendante de cet environnement. Cette transition est complètement bloquée dans des membranes discales séchées ou soumises à l'action des phospholipases (Bonting et al., 1977). Par contre, elle est fortement accélérée quand les lipides membranaires sont progressivement substitués par des détergents. Ainsi, à 20°C et pH 6.5, la constante de vitesse pour l'apparition de la métarhodopsine II passe de 72 s⁻¹ dans les disques membranaires à, 86 s⁻¹, 9700 s⁻¹ et 11700 s⁻¹ quand la

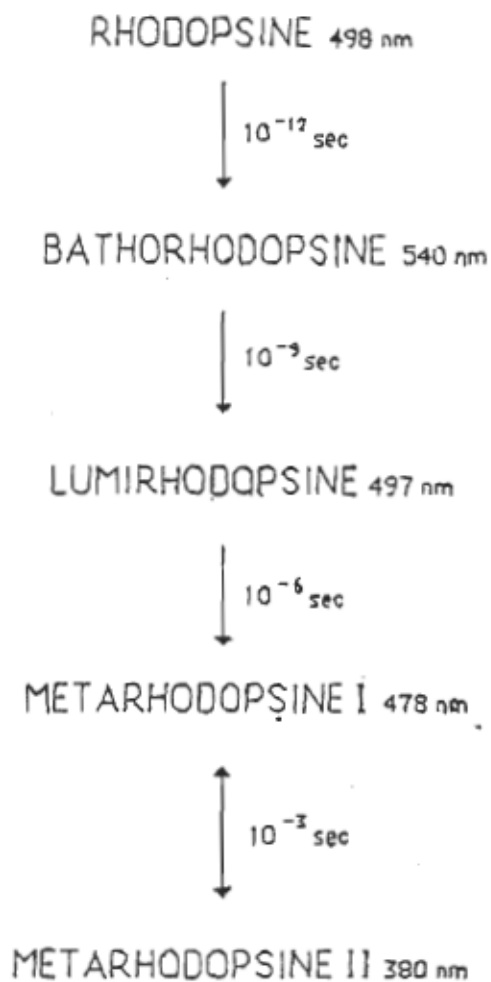


Figure 5 : Séquence photolytique de la rhodopsine bovine.

rhodopsine est solubilisée dans la digitonine, le CTAB, l'Amenyx-LO et l'Emcelphogène BC-720, respectivement (Baker et al., 1977). Par ailleurs, Makino et al. (1980) ont observé que dans la rhodopsine solubilisée dans la cholate, la même transition était fortement ralentie, en raison de la grande rigidité des micelles de cholate.

Récemment, Motoyama et al. (1985) ont montré que dans une série homologue d'esters de sucrose la position de l'équilibre entre les deux métarhodopsines se déplaçait parallèlement avec la taille et la rigidité des micelles formées par ces détergents. Selon ces auteurs, la vitesse du changement conformationnel associé à la transition serait directement relié à la fluidité du milieu qui solvate la rhodopsine.

Si cette hypothèse est fondée, il devrait être possible d'observer un ralentissement progressif de la vitesse d'apparition de la métarhodopsine II dans des échantillons de rhodopsine solubilisé dans des micelles de rigidité croissante. A cette fin, nous proposons ici une analyse de la vitesse de décoloration de la rhodopsine purifiée dans des esters de sucrose et d'acides gras dont la longueur de chaîne varie de 8 à 22 atomes de carbone. Cette décoloration sera provoquée par un bref éclair (20 ns) et notre attention sera principalement centrée sur les vitesses d'apparition des métarhodopsine I et II. Cette analyse devrait permettre d'établir si i) la vitesse du changement conformationnel est associable à la rigidité du milieu qui entoure la rhodopsine et

si ii) il existe un changement conformationnel sensible à l'environnement au cours de la transition lumi- → métarhodopsine I.

METHODES

2.1 Préparation des segments externes des bâtonnets

2.1.1 Isolation des segments externes des bâtonnets

L'étape préliminaire lors de la purification de la rhodopsine est la préparation des SEB à partir de rétines fraîches. La méthode la plus souvent utilisée pour une grande quantité de rétines est la flottation dans le sucrose. Pour ce faire, nous utilisons des yeux (une centaine) de boeufs abattus la journée même de la purification. La dissection se fait généralement dans les 3 heures qui suivent l'abattage des animaux. Toutes les manipulations impliquant la présence de pigments visuels s'effectuent sous une illumination rouge atténuée ($\lambda > 650$ nm). Nous récupérons la rétine en frottant doucement le fond de l'oeil, de l'extérieur vers le centre. La rétine reste alors accrochée par le nerf optique que l'on doit couper. Ces rétines sont agitées dans un tampon d'isolement (3/4 ml de tampon par rétine), ceci dans le but de séparer la couche de SEB du segment interne des bâtonnets et des cellules nerveuses du reste de la rétine.

Tampon d'isolement

Hepes	10 mM	(Sigma chemicals co.)
CaCl ₂	0,15 mM	(Fisher scientific co.)
EDTA	0,10 mM	(Fisher scientific co.)
NaCl	1% p/v	(Fisher scientific co.)
pH 7,5		

2.1.2 Purification des segments externes des bâtonnets

A partir de la suspension pâteuse de tampon d'isolement et de SEB, nous entreprenons la purification des SEB. D'abord, la suspension est additionnée de sucrose (40% p/v, concentration finale). Ceci se fait dans un tube à centrifuger. Un peu de tampon d'isolement (environ 2 ml) est déposé à la surface de la suspension qui est ensuite centrifugée à 10 000 rpm pour 40 minutes dans un rotor à godets inclinables (Sorval HB-4). Après centrifugation les SEB flottent à l'interface tampon/sucrose. Ils sont soigneusement récupérés à l'aide d'une pipette, dilués par un facteur de deux avec du tampon d'isolement et lavés par centrifugation à 17 000 rpm dans un rotor à angle fixé (Sorval SS-34) pendant 30 minutes. Le sédiment obtenu lors de cette centrifugation est resuspendu dans du tampon d'isolement. On répète la flottation et la sédimentation jusqu'à l'obtention de SEB purifiés. Généralement, elles sont répétées 3 fois. La pureté de la préparation est contrôlée par la mesure d'un spectre d'absorption permettant de connaître le rapport A_{280}/A_{500} . L'absorbance à 280 nm est caractéristique de la présence d'acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) dans la composition de la protéine (Honig et Ebrey, 1974; Shichi, 1983). L'absorbance à 500 nm est attribuée à la base de Schiff

du rétinale. Ce rapport d'absorbance doit être inférieur à 2.5 avant d'entreprendre les prochaines étapes. Finalement on centrifuge les SEB dans de l'eau distillée pour enlever les sels du tampon.

2.2 Purification de la rhodopsine

2.2.1 Préparation de la colonne à chromatographie

L'étape primordiale de la purification de la rhodopsine est la chromatographie. De cette étape dépend la qualité de la rhodopsine, son utilisation dans les expériences de photolyse ou son rejet. Pour effectuer cette chromatographie, nous utilisons une colonne (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) ayant une dimension de 10 mm X 15 cm. L'élément de rétention est la concanavalin A sépharose-4B (ConA) obtenue de Sigma Chemicals Co.. Après l'introduction de la ConA dans la colonne, celle-ci est lavée avec l'équivalent de 5 volumes de colonne de tampon de départ. Elle est ensuite conditionnée avec 5 volumes de colonne de détergent (L1695 0,2% dans un tampon tris 50 mM, pH 7.5). Les solutions de lavage et de conditionnement sont introduites dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique (Buchler Instruments Inc.) ayant un débit d'environ 10 ml/heure. Ceci permet d'obtenir une compression uniforme des particules de ConA.

Tampon de départ

Tris	100 mM	(Aldrich chemical co. inc.)
NaCl	1 M	(Fisher scientific co.)
CaCl ₂	1 mM	(Fisher scientific co.)
MgCl ₂	1 mM	(Fisher scientific co.)
MnCl ₂	1 mM	(Fisher scientific co.)
pH 7,5		

Pour éviter l'oxydation du tampon de départ, on ajuste d'abord le pH en présence de Tris, puis on ajoute un à un, dans l'ordre donné, les sels mentionnés en prenant soin de les solubiliser à chaque fois.

2.2.2 Solubilisation des segments externes des bâtonnets

Les SEB isolés et purifiés sont solubilisés dans du détergent dans le but de libérer la rhodopsine et de permettre la séparation de ce pigment des lipides et autres protéines de la membrane discale. On solubilise la rhodopsine dans une solution de Lauryl sucrose 5% (L1695, Ryoto co. Ltd, Tokyo) et de tampon Tris 50 mM à pH 7.5. Le mélange est bien homogénéisé et est ensuite centrifugé à 17 000 rpm pendant 15 minutes dans un rotor à angle fixe (Sorval SS-34). Le

surnageant est récupéré car il contient la rhodopsine et sera introduit par pompage dans la colonne à chromatographie (figure 6).

2.2.3 Chromatographie d'affinité

La rhodopsine possède à son extrémité NH_2 deux résidus carbohydrates attachés de façon covalente à la protéine. Ces résidus constitués de mannose et de N-acétylglucosamine possèdent une affinité pour la ConA (De Grip, 1982). A saturation, on retrouve une rhodopsine liée à chaque monomère de ConA (Renthal et al., 1976). Cette interaction spécifique est à la base de la chromatographie d'affinité servant à purifier et à concentrer la rhodopsine. La rhodopsine solubilisée est chargée sur la colonne qui est ensuite lavée avec le détergent choisi, éliminant ainsi les indésirables (lipides et autres) qui se trouvent toujours en présence de la rhodopsine. Presque toute la rhodopsine demeure ainsi rattachée à la colonne jusqu'à ce qu'elle soit éluée par l'addition du 1-O-méthyl- α -D-glucopyranoside (0,08M) dans la solution de détergent. Ce sucre déloge la rhodopsine du site de liaison avec la ConA, celui-ci ayant une plus grande affinité pour ce site que les saccharides de la rhodopsine. Le profil d'élution avec quelques détergents est montré à la figure 7. On obtient un profil d'élution par mesure

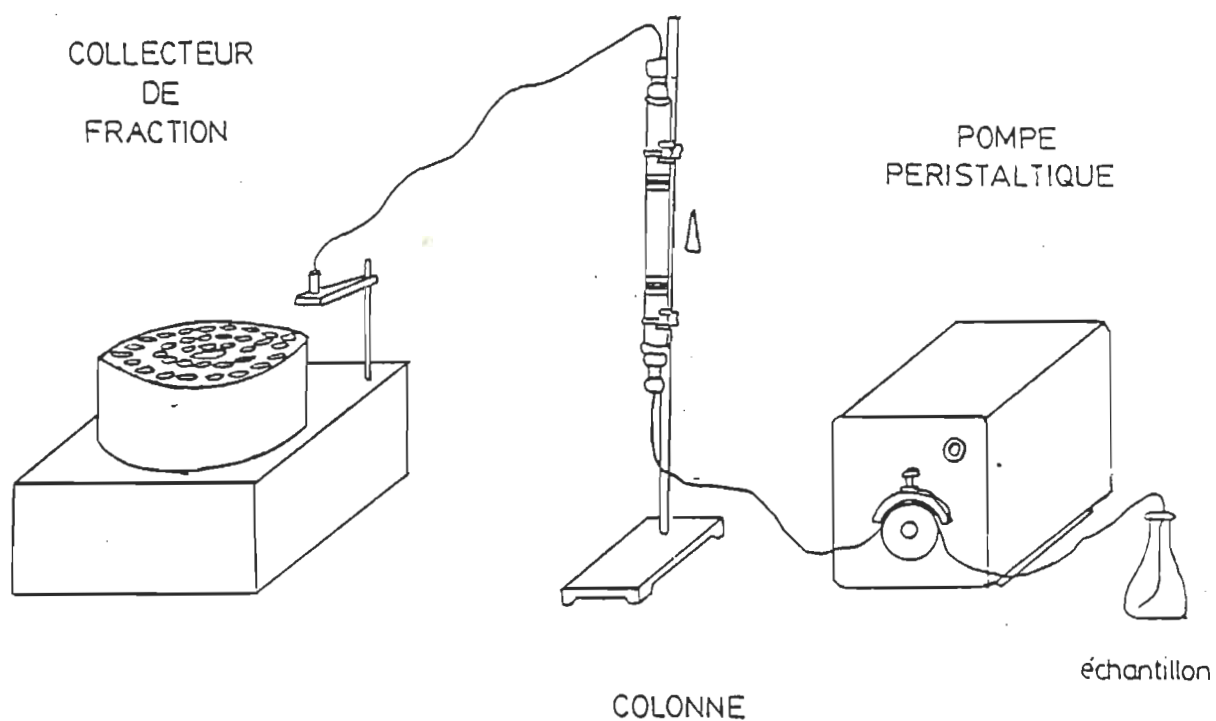


Figure 6 : Schéma du montage de chromatographie.

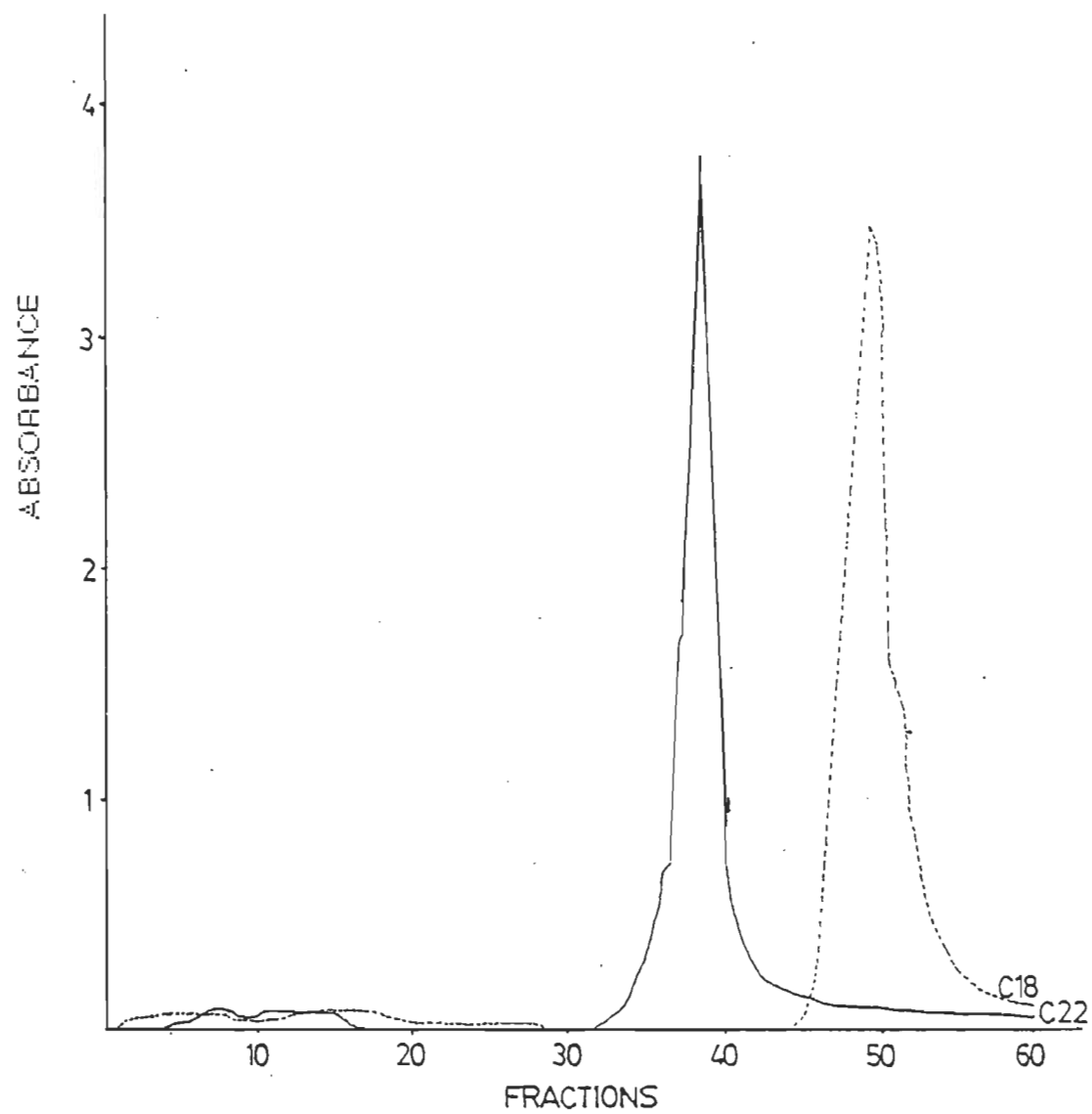


Figure 7: Profil d'élution typique de la rhodopsine solubilisée.

successive de l'absorbance d'un volume d'éluant d'environ 2,5 ml. Ces mesures se font à l'aide d'un spectrophotomètre muni d'un porte-cuvette positionné près du détecteur de façon à ce que la turbidité de la solution n'influence pas, ou très peu, la mesure (figure 8).

2.2.4 Dialyse

Nous utilisons deux types de fractions distinctes lors de la dialyse. Les fractions ayant une absorbance supérieure à 1,2 (parcours optique de 1 cm) à 500 nm sont mélangées dans un même sac à dialyse. Les fractions ayant une absorbance supérieure à 0,2 à 500 nm sont mélangées dans un autre sac à dialyse (Spectrapor, 25 mm X 100', poids moléculaire de coupure entre 12 000 et 14 000 daltons). Ces fractions sont dialysées contre 4 litres d'un tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 pendant environ 18 heures. Elles sont ensuite séparées en aliquotes de 3 ml qui sont ensuite entreposés à -20°C pour utilisation ultérieure. Ceci permet d'éviter les pertes car seulement la quantité nécessaire lors d'une expérience est décongelée. Les fractions ayant la plus faible absorbance servent à optimiser le montage de photolyse.

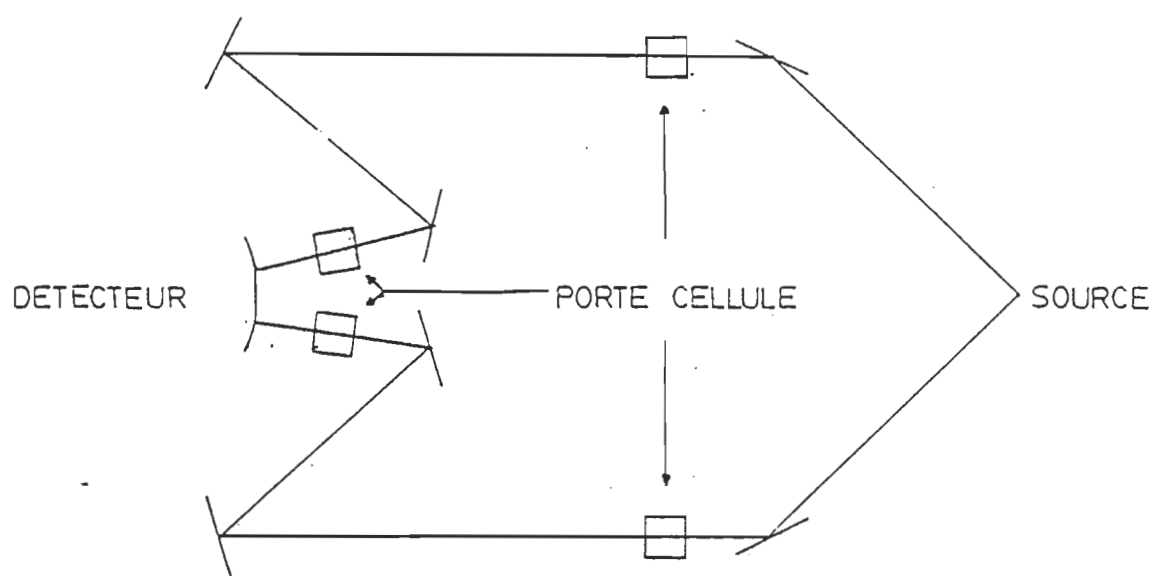


Figure 8: Schéma du spectrophotomètre.

2.2.5 Lavage de la colonne

Après avoir purifié la rhodopsine sur la colonne, il est possible de récupérer le gel (ConA) en vue d'une utilisation ultérieure. Pour ce faire nous devons nettoyer la colonne à l'aide de 5 à 10 volumes de colonne d'une solution d'éthylène glycol. Il suffira de reconditionner le gel à l'aide du tampon de départ à la prochaine utilisation.

2.2.6 Caractéristiques des détergents utilisés

Cette section décrit les différents détergents utilisés dans ce travail. Elle se veut une brève description des détergents et de leurs caractéristiques individuelles. Contrairement à beaucoup d'autres détergents qui modifient la structure de la rhodopsine, ne serait-ce que légèrement, les esters d'acides gras de sucrose semblent être de bons détergents (Pontus et Delmelle, 1975). Leur douceur a déjà été rapportée (De Grip, 1982; Nashima et al., 1978) et ils semblent être capables d'extraire la rhodopsine des lipides qui l'entourent tout en simulant l'environnement naturel de la protéine. Ces esters d'acides gras et de sucrose sont synthétisés par Ryoto co. Ltd (Tokyo) et sont, de base, appliqués comme additif alimentaire. Ces détergents contiennent tous moins de 0,1% d'acides gras

Solution d'éthylène glycol

Tris 20 mM

CaCl₂ 1 mM

MgCl₂ 1 mM

MnCl₂ 1 mM

NaCl 1 M

Ethylène glycol 50% v/v

pH 7,5

libres. Leur description est donnée de la façon suivante: nom de commerce, nombre de carbones de la chaîne aliphatique, nom scientifique de cette chaîne, pourcentage de chaîne de ce type, pourcentage de mono, di- et triseters respectivement.

Dans une série homologue d'amphiphiles, l'élongation de la chaîne hydrophobe s'accompagne normalement d'un accroissement de la taille des micelles et d'une augmentation de la densité des chaînes. Pour les esters de sucrose, on sait que la quantité de monomères par micelle passe de 70 à 200 quand la chaîne s'allonge de 8 à 22 atomes de carbone (Kawaguchi et al., 1983). Par ailleurs, la mobilité des sondes ESR incorporées dans de telles micelles est fortement atténuée lorsque leur taille est ainsi accrue (voir figure 9). De plus, les isothermes de pression de surface mesurés à l'interface air/eau montrent clairement que les esters à longue chaîne forment des films beaucoup plus rigides que les esters à courte chaîne (Munger et al., en préparation). Ces esters apparaissent donc comme un milieu de choix pour l'étude de l'effet de l'environnement sur l'activité de la rhodopsine.

Liste des détergents

CPN 590	C8	Caprylic acid	98%	30%	40%	30%
CT 1695	C10	Capric acid	98%	75%	20%	5%
L 1695	C12	Lauric acid	98%	95%	5%	
M 1695	C14	Myristic acid	98%	80%	15%	5%
PM 90	C16	Palmitic acid	70%	95%	5%	
	C18	Stearic acid	30%			
SM 90	C18	Stearic acid	70%	95%	5%	
	C16	Palmitic acid	30%			
B 1565	C22	Behenic acid	67%	70%	20%	10%
	C18	Stearic acid	33%			
O 1695	C18:1	Oleic acid	98%	75%	20%	5%

Digitonin Pureté de 80% Sigma chemical company

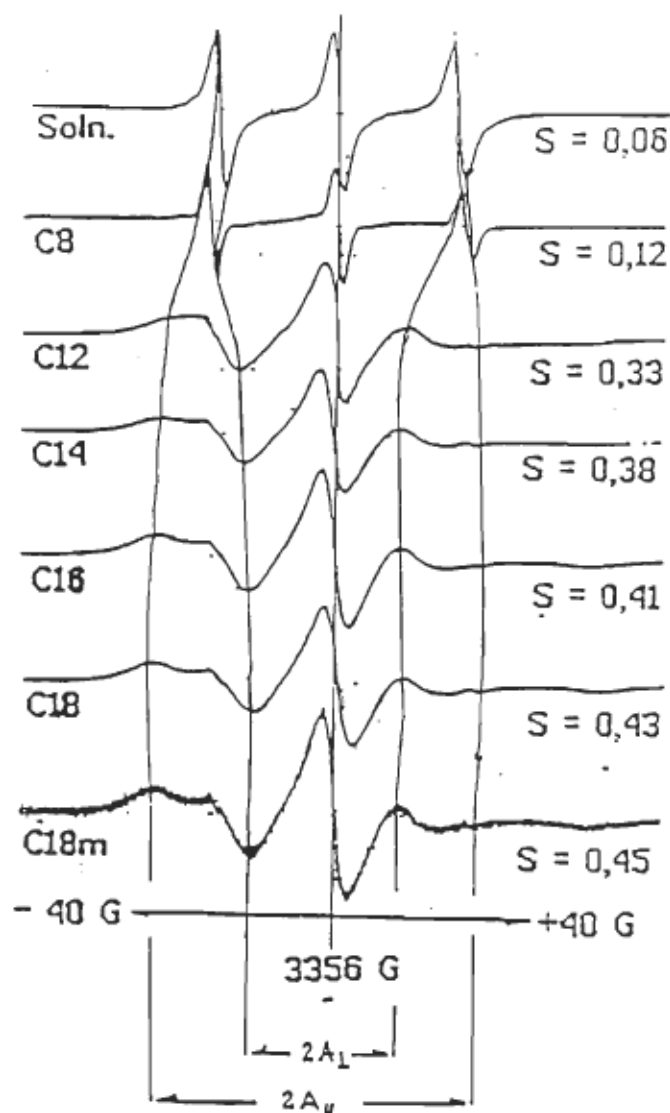


Figure 9: Spectres ESR d'une sonde dispersée dans les esters de sucrose de différentes longueurs de chaîne (C8-C18). Le spectre est centré à 3356 Gauss et correspond à un balayage total de 80 Gauss. Le paramètre d'ordre (S) augmente avec la longueur de chaîne.

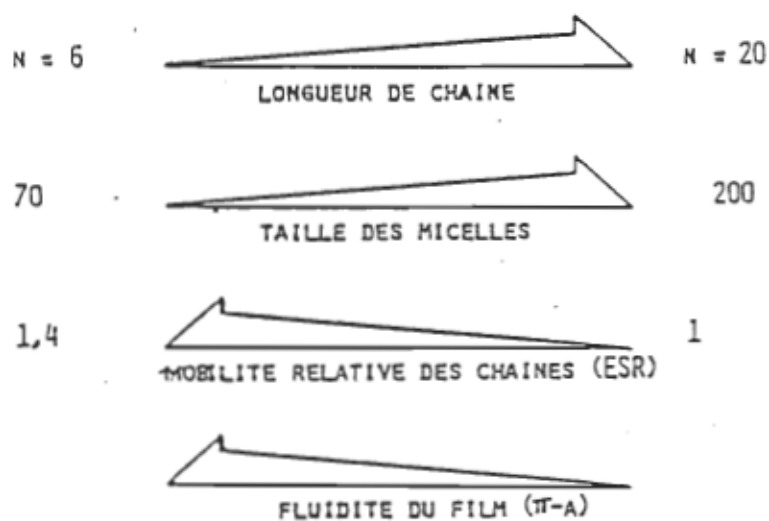
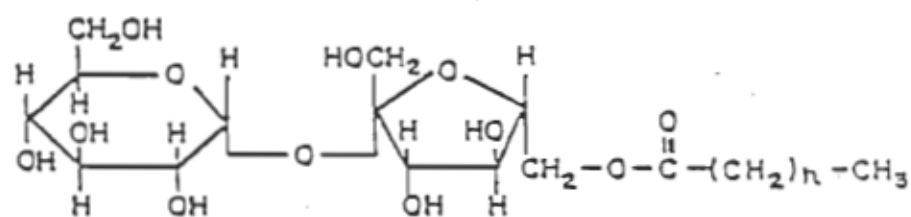


Figure 10: Caractéristiques des détergents.

PHOTOLYSE

3.1 Principe de la technique

La photolyse éclair répond au besoin qu'ont les scientifiques d'étudier un changement chimique ou physique rapide induit par la lumière. A l'aide d'un faisceau actinique de très courte durée, il s'agit d'induire la réaction chimique. Ensuite, il suffit d'avoir un système d'analyse dont la rapidité est suffisante pour suivre les changements induits par la lumière. Ces changements peuvent être de plusieurs types. En ce qui nous concerne, nous observons les changements d'absorbance induits par l'apparition de nouvelles espèces ou la disparition des espèces présentes au départ de la réaction photochimique.

3.2 Le faisceau actinique

Dans le but de déclencher la cascade réactionnelle impliquée dans la photolyse de la rhodopsine, il est nécessaire de blanchir cette protéine. Pour ce faire nous utilisons une impulsion laser dont la longueur d'onde est de 532 nm. Cette longueur d'onde est la seconde harmonique d'un laser Néodymium/YAG (System 2000, JK Lasers Limited,

England)(schéma du montage, figure 11). Cette impulsion est obtenue à l'aide d'un "Q-switch" qui donne une impulsion de 10 nanoseconde et une énergie d'environ 5 mJ. La dimension du faisceau est d'environ 3 mm de diamètre. Toutefois, toute cette énergie ne parvient pas à la rhodopsine. En effet, l'impact du faisceau sur la cellule contenant la rhodopsine se fait sur la face en verre dépoli de la cuvette. Ceci diffuse la lumière et évite ainsi la destruction partielle de l'échantillon par le faisceau ("blasting").

3.3 Le faisceau d'analyse

L'observation de l'effet produit par le faisceau actinique sur le système se fait à l'aide d'un spectrophotomètre dont la conception et les composantes varient selon le chercheur, ses moyens, et le système étudié. Dans notre cas, le faisceau d'analyse du spectrophotomètre est produit par une lampe Xenon/Mercure de 200 watts. Pour éviter un blanchiment causé par une trop longue pré-exposition de la rhodopsine à la lumière, l'observation du système est synchronisée avec l'impulsion laser. Ceci est réalisé à l'aide d'un obturateur électromécanique (Uniblitz, modèle 100-2B de Optikon) placé dans le trajet du faisceau d'analyse. La longueur d'onde du faisceau est dépendante de la réaction que l'on veut étudier.

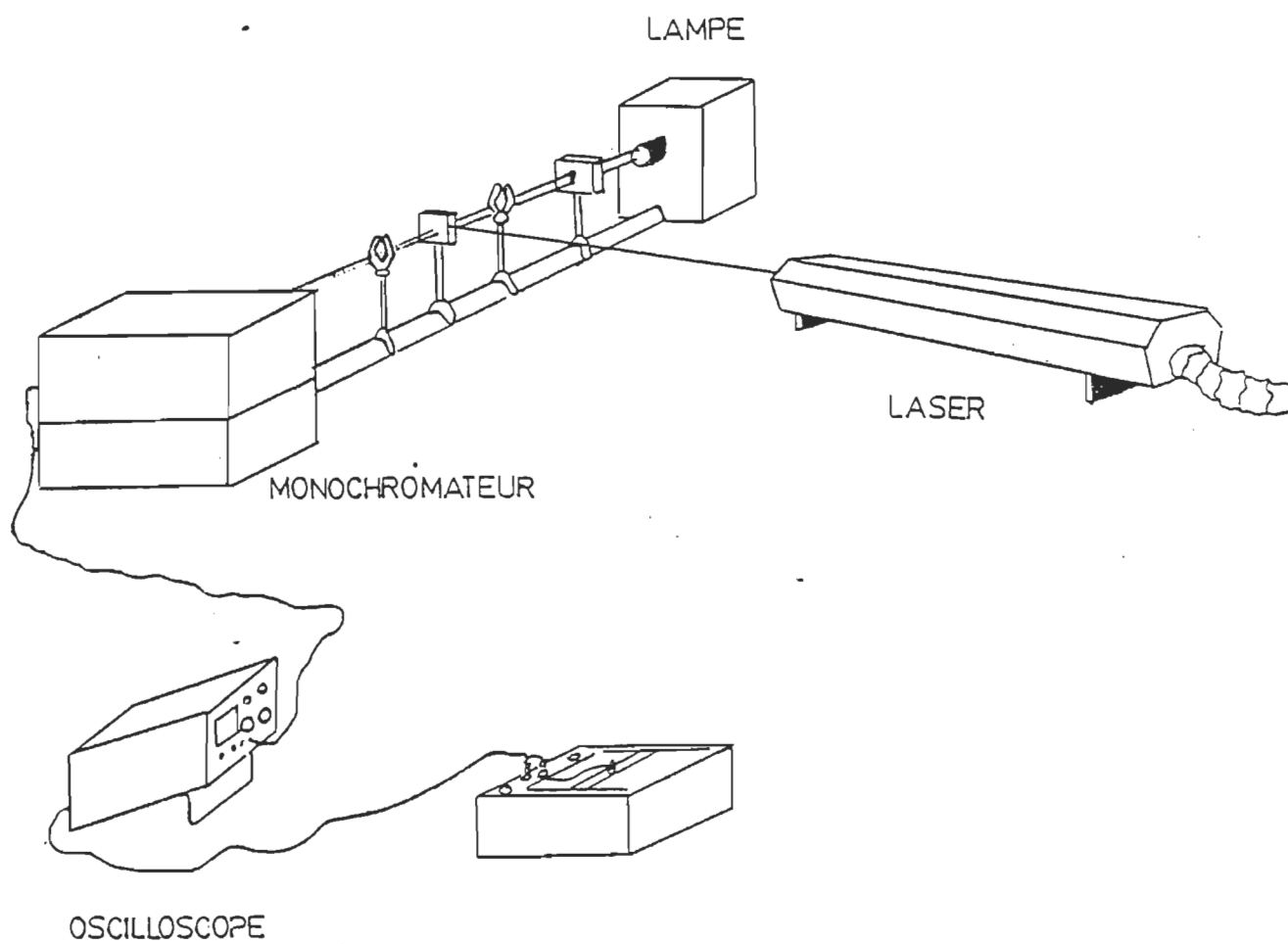


Figure 11 : Schéma du montage expérimental de photolyse éclair.

Elle est obtenue à l'aide d'un monochromateur (Oriel Corporation). Dans le but d'obtenir le meilleur signal possible, des lentilles convergentes ont été disposées à deux endroits sur le trajet du faisceau d'analyse (figure 12). La première lentille concentre le faisceau dans l'échantillon, le point focal étant situé à environ 5 mm de la cuvette. La seconde lentille récupère le faisceau et le dirige vers la fenêtre d'un second monochromateur (Spex spectrometer). La longueur d'onde d'observation de ce second monochromateur est la même que celle du premier.

3.4 La cuvette

La cuvette servant de support à l'échantillon est une cuvette de quartz de 4 mm X 1 cm, la section de 1 cm étant dans le parcours du faisceau d'analyse. Cette cuvette est thermostatée de même que le porte-cuvette. Deux des faces de la cuvette sont dépolies, et une de ces faces sert d'agent disperseur pour le faisceau actinique. Le porte-cuvette étant mobile verticalement, le faisceau d'analyse de même que le faisceau actinique sont dirigés le plus possible vers le fond de la cuvette. Ceci permet des mesures sur de plus petits aliquotes d'échantillons (environ 0,3 ml).

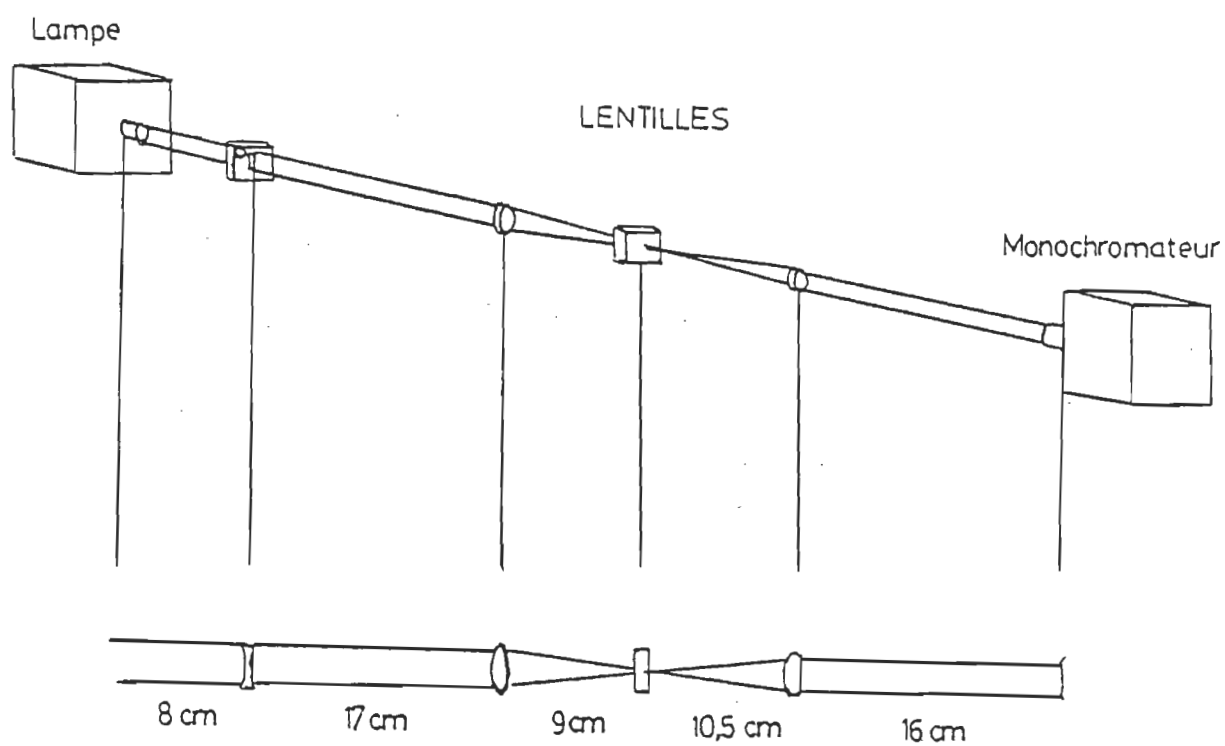


Figure 12 : Description du faisceau d'analyse.

3.5 Le contrôle de la température

Le contrôle de la température s'effectue à deux endroits (figure 13). La cuvette ainsi que le porte-cuvette sont thermostatés, évitant ainsi des fluctuations de température par dispersion de chaleur entre la cuvette et le porte-cuvette. Le contrôle de température s'effectue par circulation d'un mélange d'eau et d'antigel maintenu à température constante à l'aide d'un bain thermostaté (MGW Lauda RC3, Brinkmann). La température est contrôlée de l'extérieur à l'aide d'un thermomètre de précision. Ce système nous permet de faire des mesures entre 0°C et 35°C sans problème.

3.6 L'amplification du signal

Les variations d'absorbance sont observées à l'aide d'une photodiode (Hamamatsu) ou d'un photomultiplicateur (RCA IP28). Ces deux éléments mesurent de faibles fluctuations au niveau de l'intensité du faisceau d'analyse transmise par l'échantillon. Il s'avère nécessaire d'amplifier ce signal. Pour ce faire, le signal observé traverse un circuit d'amplification avant d'être acheminé vers un oscilloscope.

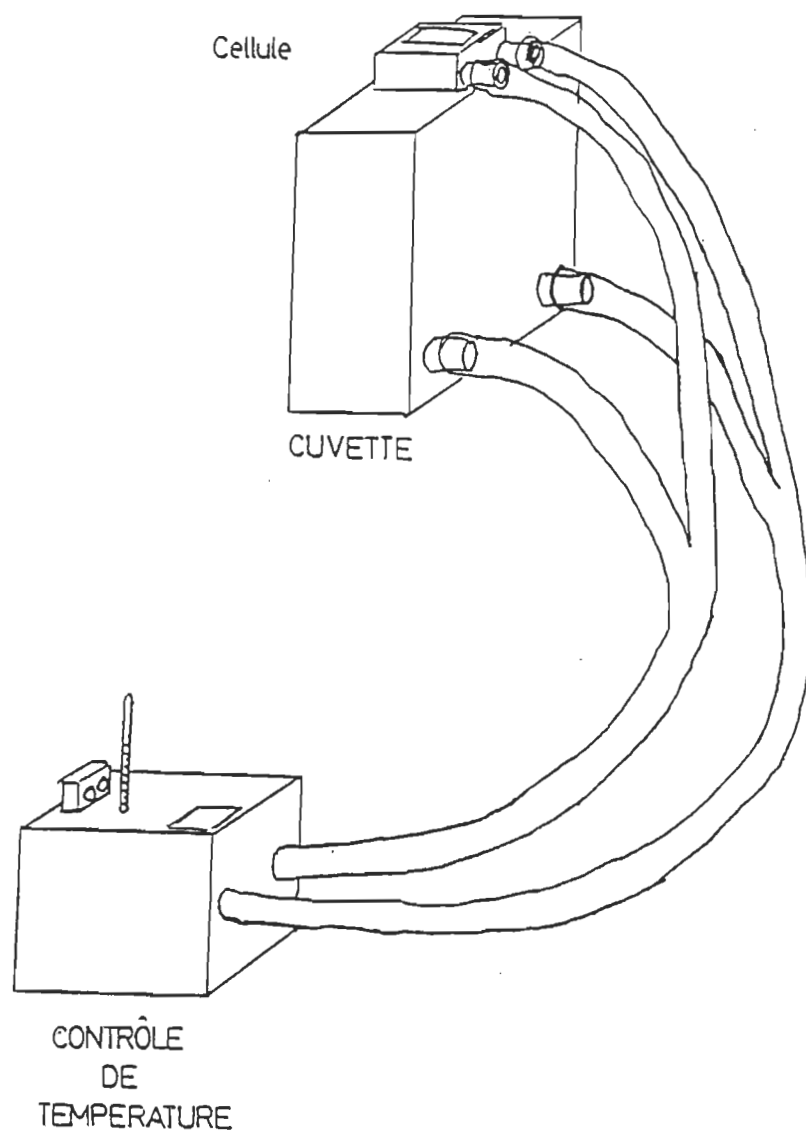


Figure 13 : Description du porte-cuvette thermostaté.

3.7 Obtention des résultats

Les cinétiques des différentes solutions de rhodopsine sont représentées par la mesure de la variation de l'absorbance en fonction du temps. Ces variations sont amplifiées et acheminées vers un oscilloscope. Selon la vitesse de la cinétique, le signal est dirigé vers un oscilloscope différent. Pour les cinétiques rapides (vitesse $< 20 \mu s$), l'oscilloscope utilisé est un Philips (PM 3315(U) digital storage). Pour les cinétiques plus lentes, nous utilisons un Nicolet (4094 digital storage) en raison de sa plus grande maniabilité au niveau des différentes expansions possibles du signal. Dans les deux cas, après avoir maximisé la qualité du signal, nous acheminons le résultat vers une table traçante X-Y (7015B X-Y recorder, Hewlett Packard). Celui-ci est ainsi immortalisé pour la postérité dans nos archives. Cette copie servira à fournir les renseignements nécessaires à l'analyse des résultats.

3.8 Traitement des résultats

A partir des variations d'absorbance (A), les valeurs de A sont introduites dans un programme de traitement de courbe (Curfit pour Apple IIe). Celui-ci calcule les logarithmes de A en fonction du temps, déterminant ainsi la valeur du temps de

demi-vie de la réaction (voir annexe 1). Ce programme détermine également le coefficient de corrélation de la droite obtenue. Il permet ainsi d'estimer si nous avons affaire à une cinétique du premier ou du deuxième ordre. Ce programme est bien sûr adapté à nos besoins, et travaille avec un programme qui trace les courbes ainsi traitées.

RÉSULTATS

4.1 Préparation des échantillons

4.1.1 Spectre d'absorption de la rhodopsine

La rhodopsine constitue environ 95% (Smith et al., 1975; Krebs et Kühn, 1977) de la masse protéique de la membrane discale. Lorsqu'elle est purifiée dans les détergents, elle montre deux bandes d'absorption principales, une à 280 nm (résidu aromatique à l'intérieur de la protéine) (Honig et Ebrey, 1974; Shichi, 1983) et l'autre à 500 nm (base de Schiff du 11-cis rétinale). Un exemple du spectre de la rhodopsine est donné à la figure 14.

4.1.2 Critère de pureté

Différentes procédures de purification sont utilisées si l'on désire effectuer une recherche qualitative ou quantitative sur les membranes des SEB. Toutefois, ces procédures impliquent toujours les étapes de sédimentation/flottation dans un gradient continu ou discontinu de sucrose ou de ficoll. Notre méthode fut décrite précédemment. Ces méthodes de purification donnent généralement des préparations

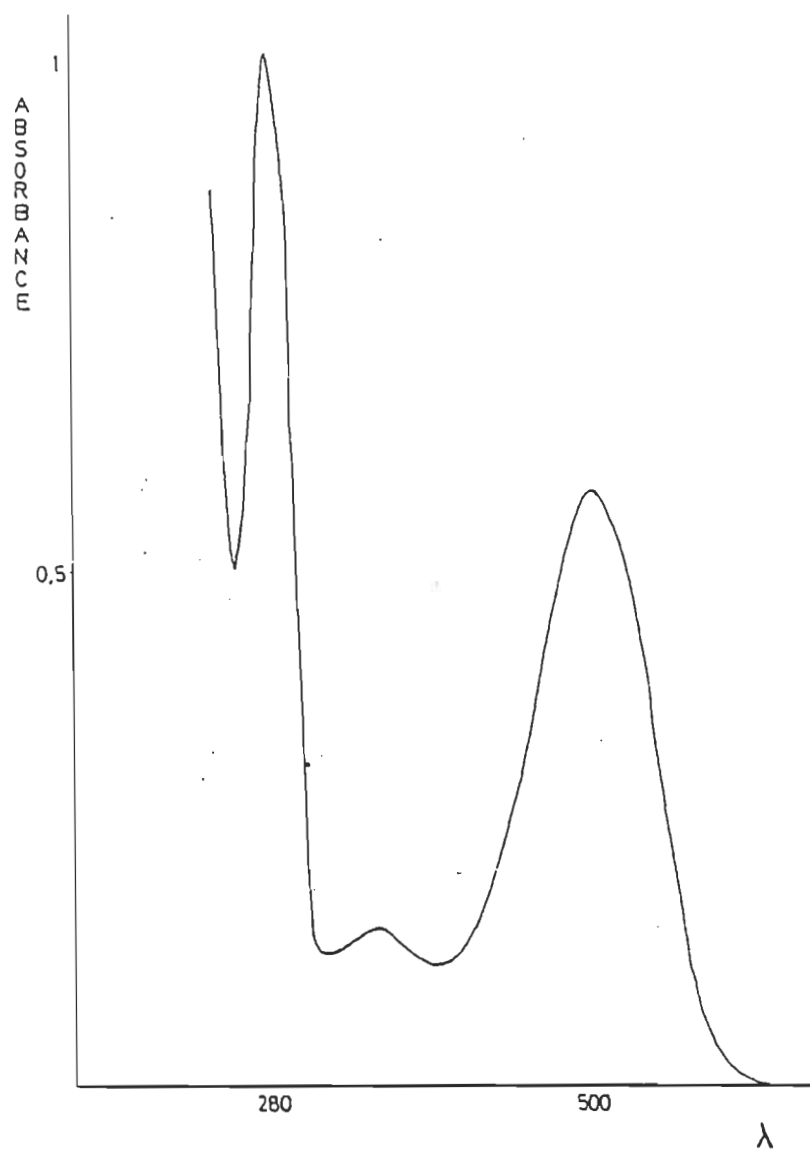


Figure 14 : Spectre d'absorption de la rhodopsine.

membranaires de pureté équivalente, tel que démontré par différents auteurs, utilisant la spectroscopie d'absorption UV-visible. Ce critère de pureté est généralement utilisé pour montrer l'efficacité de la procédure de purification. Il est admis qu'une préparation est passablement pure si le rapport A_{280}/A_{500} est inférieur à 2,2 (Salesse et al., 1984). Nos rapports A_{280}/A_{500} sont, après dialyse, généralement inférieurs à 1,8. On peut donc considérer nos échantillons de rhodopsine comme étant purs.

4.1.3 Efficacité de solubilisation

La rhodopsine est une protéine transmembranaire. Pour la caractériser, nous devons la solubiliser à l'aide d'un détergent. Ceux sélectionnés consistent en une série d'esters de sucrose. Ce sont des molécules dont les effets sur la rhodopsine sont connus. Ces esters sont des agents solubilisateurs doux mais efficaces, c'est-à-dire qu'on peut les substituer aisément au phospholipides naturels entourant la rhodopsine. Celle-ci est très stable dans ce milieu et sa régénération y est possible (Motoyama et al., 1986; Fong et al., 1982). Ces esters sont disponibles avec une variété intéressante de longueurs de chaîne tout en ayant une pureté raisonnable (ref. section matériels).

4.1.4 Extraction du O-méthyl- α -D-glucopyranoside des préparation de rhodopsine

Une autre caractéristique intéressante du détergent est la difficulté éprouvée à le dialyser. Certains trouvent défavorable cette propriété du détergent (Fong et al., 1982). Nous avons utilisé ce "défaut" à notre avantage. En effet, lors de l'extraction du O-méthyl- α -D-glucopyranoside par dialyse, il n'y aura pas diminution significative de la concentration du détergent. La dialyse s'effectue sur une période de 18 heures avec un changement de solution (tampon Tris, 20 ml contre 4 litres) après 9 heures.

4.1.5 Incubation avant cinétique

Après dialyse, la solution de rhodopsine purifiée dans le détergent est séparée en aliquotes de 3 ml. L'échantillon utilisé pour la photolyse est d'abord incubé à 37°C pendant environ 1/2 heure. Ceci enlève la turbidité produite par la formation de grosses micelles pendant l'entreposage à basse température.

4.2 Mesure de l'absorption transitoire des intermédiaires

4.2.1 Dépendance thermique de la réaction

métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II

L'étude par photolyse au niveau de l'étape métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II, c'est-à-dire lorsqu'on observe à 400 nm, fut effectuée de façon extensive dans notre laboratoire. La figure 15 illustre un exemple de résultat obtenu en photolyse éclair. Ce qu'on y observe est une variation de l'absorbance en fonction du temps. Cette variation atteint un plateau qui correspond à l'équilibre réactionnel entre la métarhodopsine I et II. L'analyse se fait à 400 nm parce qu'à cette longueur d'onde, l'amplitude de la différence entre l'absorbance de la métarhodopsine I et celle de la métarhodopsine II est maximale sous nos conditions expérimentales.

Les études sur la dépendance thermique de l'étape métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II permettent d'observer une diminution du temps de demi-vie de cette cinétique pour toutes les longueurs de chaînes entre 0°C et 35°C. Le tableau 1 résume ces observations de temps de demi-vie en fonction de la température d'observation. Cette diminution est d'environ deux ordres de grandeur, c'est-à-dire que le temps

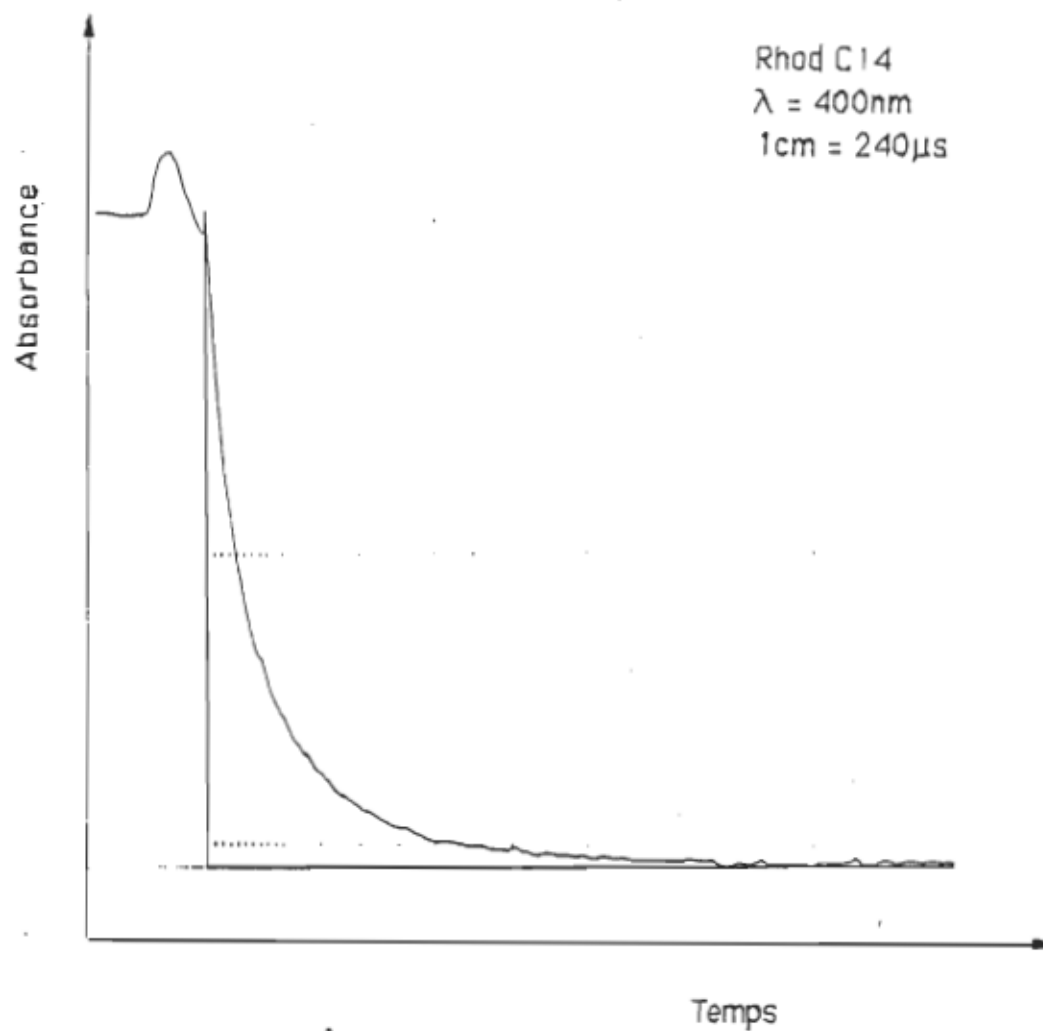


Figure 15 : Cinétique de formation de la métarhodopsine II à 30°C..

Tableau 1

Demi-vie de la réaction métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II à différentes températures pour la rhodopsine purifiée dans les esters de sucrose de différentes longueurs de chaînes.

	chaîne	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₈	C ₂₂
Temp.							
0°C					50ms		
5°C		5,4ms	1,65ms	3,1ms	20ms	17ms	16ms
10°C		2,25ms	950 μ s	1,8ms	5ms	7,6ms	4ms
15°C		535 μ s	640 μ s	1,0ms	1,4ms	1,6ms	1,65ms
20°C		260 μ s	260 μ s	280 μ s	1ms	700 μ s	1,3ms
25°C		110 μ s	120 μ s	125 μ s	445 μ s	430 μ s	410 μ s
30°C		31 μ s	65 μ s	56 μ s	225 μ s	370 μ s	175 μ s
35°C		21 μ s	32 μ s	28 μ s	90 μ s	95 μ s	120 μ s

de demi-vie est environ 100 fois moindre à 35°C qu'à 0°C. Ce résultat est consistant avec ceux rapportés par différents auteurs (Rapp, 1979; Parkes et Liebman, 1984).

4.2.2 Effet de la longueur des chaînes

Tel que décrit auparavant, la longueur des chaînes utilisées varie entre 8 et 22 carbones. L'augmentation graduelle de la longueur des chaînes des esters de sucrose augmente la taille des micelles (passage de 70 à 200 monomère/micelle respectivement) et la rigidité du milieu. Cette rigidification fut démontrée par une étude utilisant la spectroscopie ESR. Les résultats obtenus pour l'étape métarhodopsine I → métarhodopsine II montrent un effet de la longueur des chaînes pour toutes les températures observées. On peut voir l'effet de la longueur des chaînes sur le temps de demi-vie à chaque température à la figure 16. Celle-ci montre un effet causé par l'environnement sur la photochimie de la rhodopsine. Cet effet consiste en un ralentissement de la vitesse de la réaction (augmentation du temps de demi-vie) avec l'augmentation de la longueur des chaînes et cela pour chaque température. Ces résultats sont interprétés comme étant signe de changements importants au niveau de la structure moléculaire de la rhodopsine. Ces changements sont

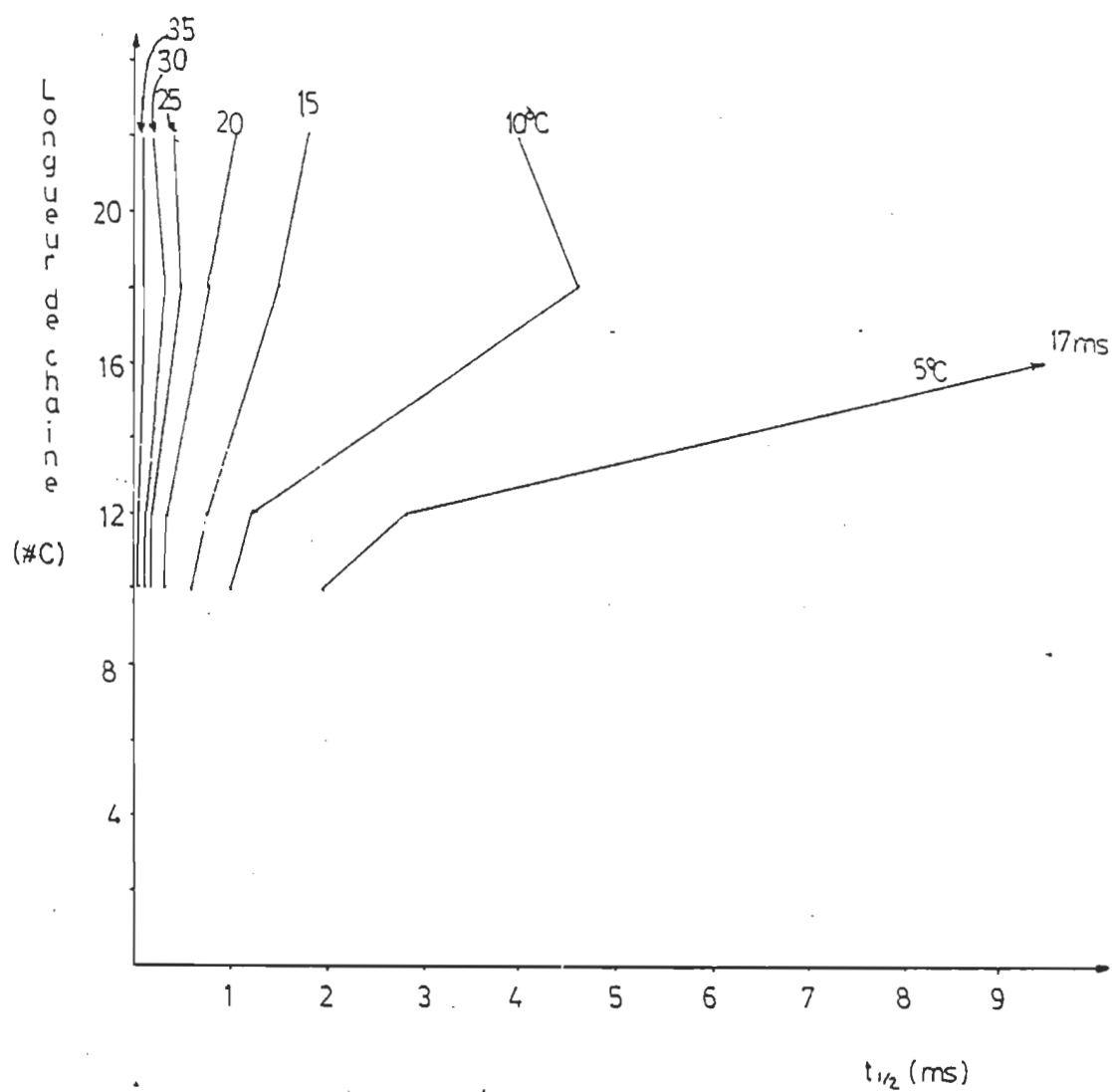


Figure 12 : Variation du temps de demi-vie pour chaque longueur de chaîne à toutes les températures étudiées pour la réaction métarhodopsine I → métarhodopsine II.

modulés par la longueur des chaînes des esters de sucrose et sont observés dans l'ordre de la milliseconde.

4.2.3 Effet de la digitonine

Connaissant l'effet rigidifiant de la digitonine sur les micelles (Motoyama et al., 1985), nous avons tenté une expérience avec celle-ci. Nous avons ajouté une faible quantité de digitonine dans une préparation de rhodopsine contenant l'ester de sucrose à 22 carbones. Ceci permet de ralentir la cinétique métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II par un facteur supplémentaire de 5 fois. Nous avons alors espoir d'observer la cinétique lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I à 450 nm. L'analyse à cette longueur d'onde permet d'observer la disparition de la lumirhodopsine. L'expérience montra effectivement la fin de la cinétique Lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I (figure 18). Le ralentissement produit par la digitonine nous permet donc d'espérer un effet de la longueur des chaînes à cette étape de la photochimie de la rhodopsine. L'utilisation ultérieure d'un oscilloscope plus rapide nous permettra d'observer la cinétique en son entier, et non pas la fin seulement, comme à la figure 17 (on obtient une ligne verticale pour une grande variation d'absorbance si l'appareil n'est pas suffisamment rapide pour amasser des points pendant cette période de temps).

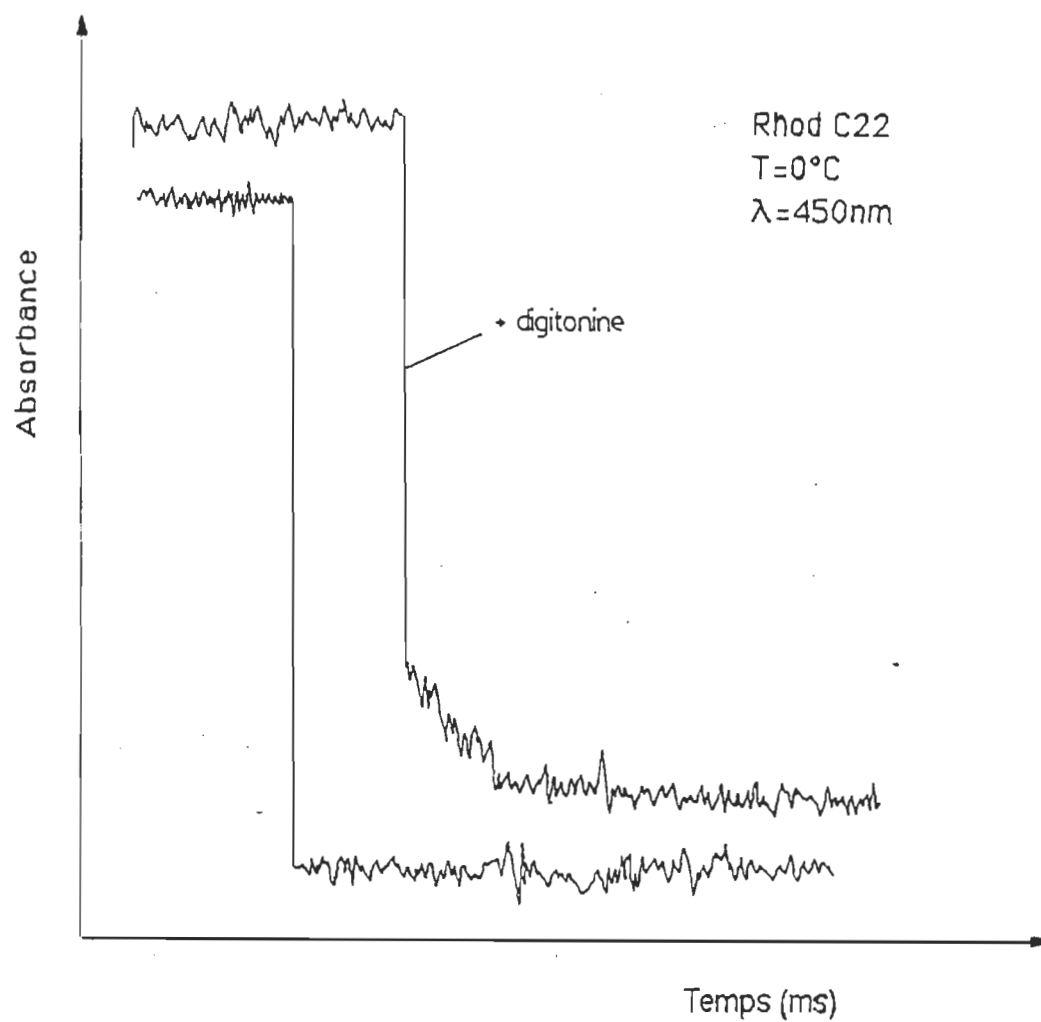


Figure 17 : Cinétique montrant l'effet de ralentissement de la digitonine.

4.2.4 ΔS^\ddagger et ΔH^\ddagger de ces cinétiques

Plusieurs auteurs n'utilisent pas, ou ne font pas allusion, aux données de temps de demi-vie et préfèrent utiliser l'enthalpie d'activation (ΔH^\ddagger) et l'entropie d'activation (ΔS^\ddagger) lorsqu'ils étudient les cinétiques impliquant les intermédiaires de photolyse de la rhodopsine (Parkes et Liebman, 1984; Williams et Baker, 1982). A partir des données de dépendance thermique des cinétiques, nous avons calculé les paramètres d'activation ΔS^\ddagger et ΔH^\ddagger . Ceux-ci se sont avérés être du même ordre de grandeur que ceux obtenus par ces différents auteurs. Le tableau 2 montre les valeurs que nous avons obtenues pour ces paramètres et l'annexe B décrit la façon de les obtenir.

4.2.5 Effet de la longueur des chaînes sur l'étape lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I

Les résultats obtenus pour l'étape lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I à 23°C sont pour le moins intéressants. On retrouve à la figure 19 un exemple de résultat. L'analyse a été faite à 450 nm car à cette longueur d'onde la variation d'absorbance entre la lumirhodopsine et la métarhodopsine I est maximale sous nos conditions expérimentales. De plus, à

Tableau 2

Paramètres d'activations associées à la réaction métarhodopsine I
→ métarhodopsine II.

	chaîne	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₈	C ₂₂
ΔH^\ddagger (kCal/mol)		+29,4	+21,4	+29,4	+23,3
ΔS^\ddagger (Cal/mol*K)		+100	+73,5	+100	+80

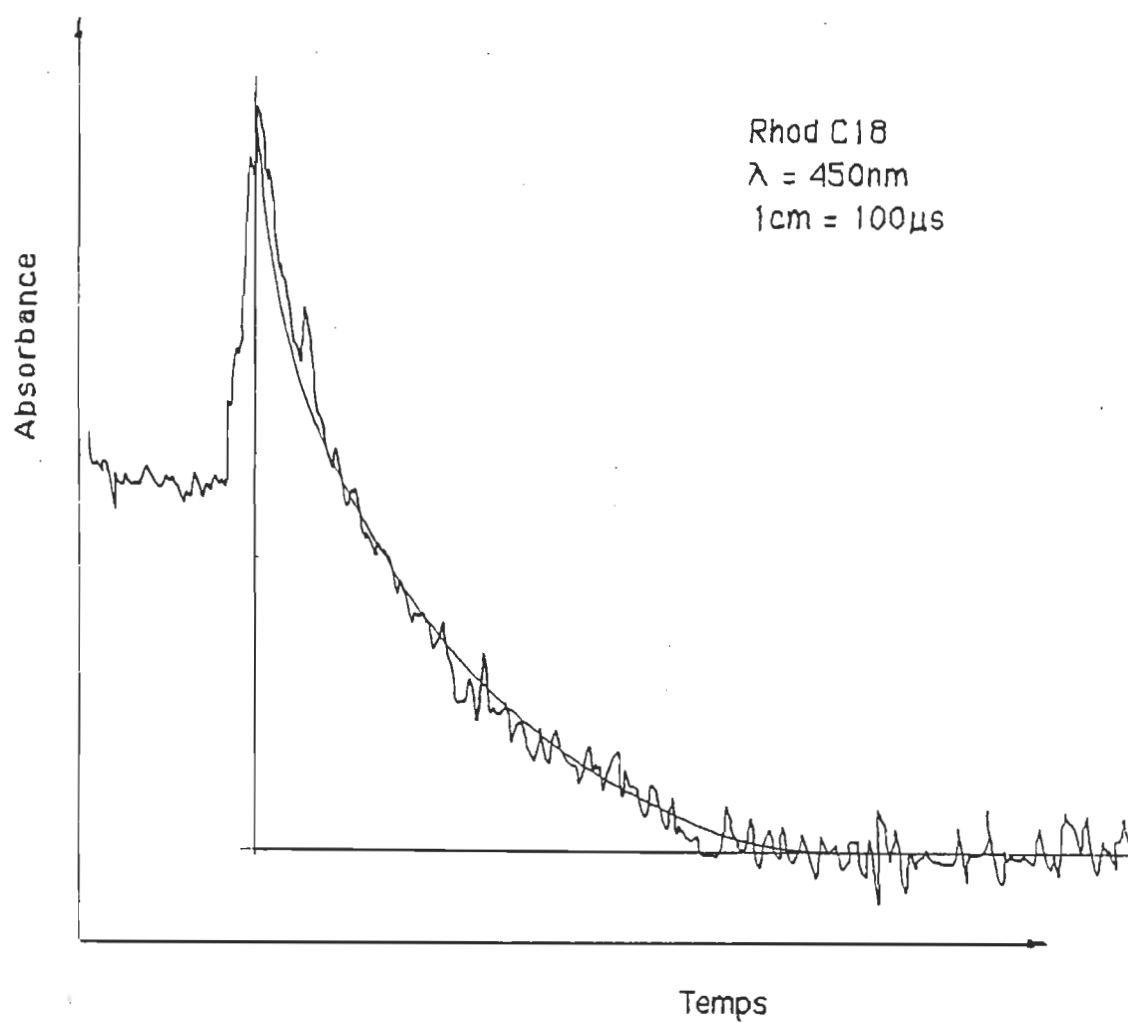


Figure 18 : Cinétique de formation de la métarhodopsine I à 23°C.

cette longueur d'onde, on ne peut confondre la réaction avec une éventuelle phase rapide de la réaction métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II car les deux phénomènes donnent des signaux optiques de signe opposé. Ces résultats montrent que l'influence de la longueur des chaînes va dans le même sens que pour l'étape métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II, c'est-à-dire une augmentation du temps de demi-vie avec la longueur de la chaîne. Toutefois, au lieu d'être une augmentation graduelle du temps de demi-vie, on observe une soudaine augmentation pour les longues chaînes (voir tableau 3). Cette soudaine augmentation est d'environ un ordre de grandeur. Les valeurs point par point des courbes permettant de déterminer le temps de demi-vie présentent un coefficient de corrélation plus grand pour les longues chaînes, comme c'est le cas pour la réaction métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II, et comme pour cette réaction, les résultats sont reproductibles. On doit noter ici que c'est la première fois qu'un effet de l'environnement est observé à l'étape lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I de la séquence photolytique.

Tableau 3

Demi-vie de la réaction lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I à 23°C
pour la rhodopsine purifiée dans les esters de sucrose de différentes
longueurs de chaînes.

	chaîne	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₈	C ₂₂
Temp.				-			
23°C		9,8 μ s		10,8 μ s	11,1 μ s	130 μ s	200 μ s

5. Discussion

5.1 Vitesse de transition et équilibre entre les métarhodopsines

Nos résultats montrent un ralentissement continu et progressif de la vitesse de transition entre les métarhodopsines I et II à mesure que s'allonge la chaîne de l'ester de sucrose dans lequel le pigment est dispersé. Si on compare ces résultats avec les observations antérieurement effectuées sur l'équilibre des deux métarhodopsines (Motoyama et al., 1985), on réalise qu'à 4°C, l'équilibre est 5 fois plus déplacé vers la métarhodopsine II dans le lauryl sucrose par rapport à celui qui est mesuré dans le stearyl sucrose. A la même température, la vitesse d'apparition de la métarhodopsine II est également 5 fois supérieure dans ces deux détergents. Ces résultats corroborent donc l'hypothèse voulant que la position de l'équilibre entre les métarhodopsines ne soit déterminée que par la vitesse de la transition $I \rightarrow II$ et que celle de la transition $II \rightarrow I$ soit insensible à l'environnement.

5.2 Transitions conformationnelles

Nous avons vu qu'en rigidifiant progressivement l'environnement qui entoure la rhodopsine, la transition

métarhodopsine I \rightarrow II était progressivement ralentie par un facteur 5. Dans les mêmes conditions expérimentales, la transition lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I est, elle, abruptement ralentie par un facteur 10 quand la chaîne de l'ester de sucrose s'allonge de 14 à 18 carbones. Afin de comprendre la signification de ces effets, il est probablement opportun de d'abord rappeler la structure des complexes rhodopsine-détergent.

A l'état pur, les micelles de détergent sont rarement des structures sphériques. Elles sont plutôt de forme elliptique de rapport axial autour de 2 (Tanford, 1974). Par ailleurs, l'interaction entre la rhodopsine purifiée et les détergents est principalement hydrophobe et la structure générale des complexes rhodopsine-détergents en est une où le domaine hydrophobe de la protéine traverse la micelle (Sardet et al., 1976). Indépendamment de la nature du détergent utilisé pour dissoudre la rhodopsine, les complexes formés doivent avoir des géométries équivalentes. En effet, des détergents aussi différents que la digitonine, le Triton X-100, les bromures d'alkyl triméthyl ammonium et l'Amonyx LO, dont la taille micellaire varie de 36 à 140 monomères, se fixent à la rhodopsine à raison d'environ 160 molécules/rhodopsine (Hubbard, 1954; Osborne et al., 1974; Knudsen et Hubbell, 1978; Sardet et al., 1976). C'est donc dire que la structure du complexe est principalement déterminée par la

taille du domaine hydrophobe de la rhodopsine et non pas par les propriétés du détergent.

Comme les esters de sucrose ne se lient pas aux protéines différemment des autres détergents (Makino et al., 1983; Robinson et Tanford, 1975), on peut déduire un modèle du complexe rhodopsine-ester de sucrose tenant compte de la longueur de chaîne de l'ester. Le modèle que nous proposons est présenté à la figure 19. La rhodopsine y fixe un nombre constant de molécules d'ester de sucrose, toutefois, pour respecter cette règle, on doit faire interagir le pigment avec un nombre très différent de chaînes aliphatiques, dépendant de la longueur de celles-ci puisque le domaine hydrophobe de la rhodopsine, pour être solvaté par les chaînes aliphatiques, doit traverser soit le grand, soit le petit axe de la micelle, dépendant de la longueur de chaîne des esters qui la forment.

Considérant que la transition métarhodopsine I \rightarrow II est accompagnée d'un changement conformationnel majeur, on peut aisément comprendre que ce dernier puisse être progressivement inhibé à mesure qu'on rigidifie l'environnement qui le subit. Il est fort probable que cette transition implique une réorganisation importante de la structure de la ceinture d'amphiphile qui entoure le pigment et donc, que la vitesse observée pour ce phénomène varie progressivement avec la longueur de chaîne de l'ester utilisé.

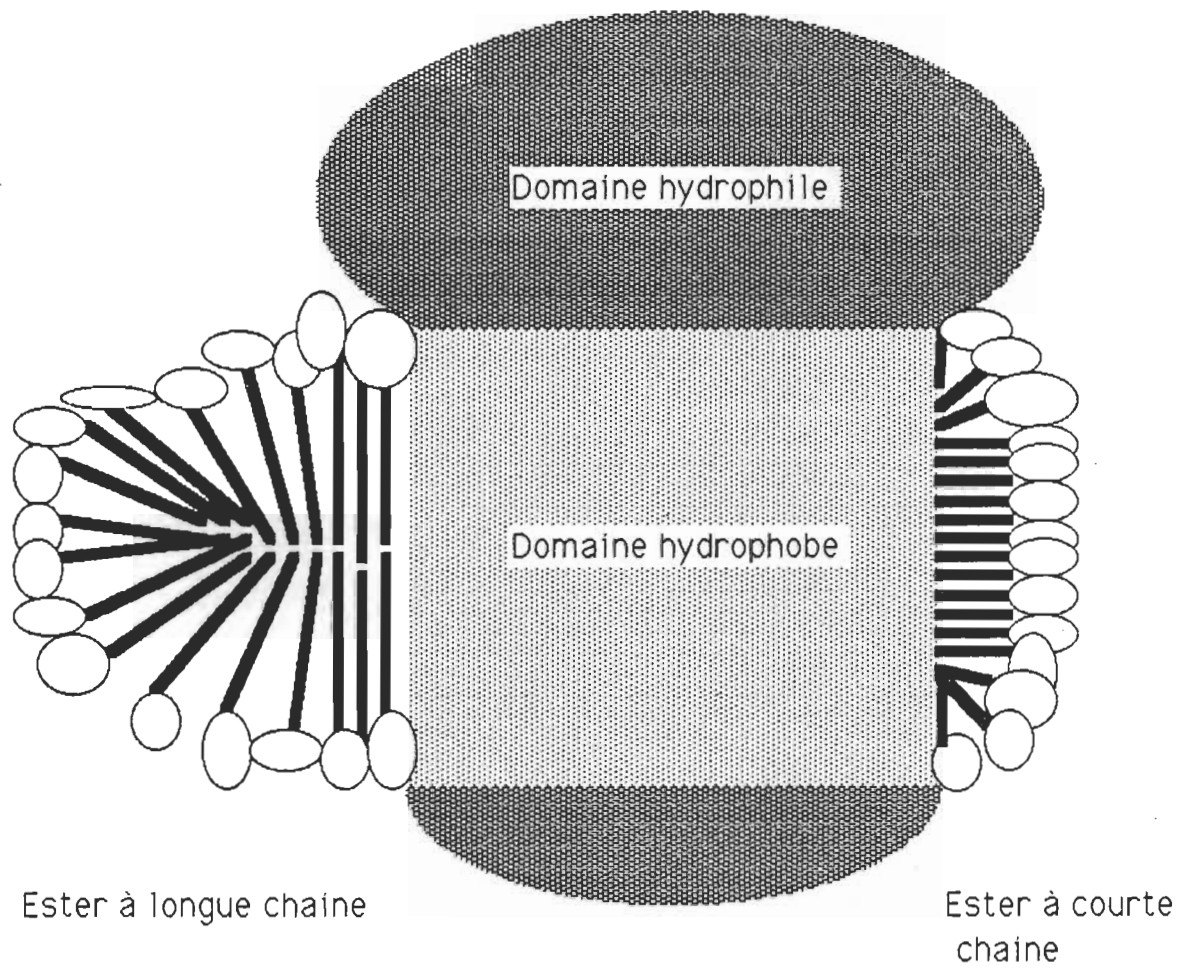


Figure 19: Structure proposée du complexe
rhodopsine-détergent

La transition lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I montre une dépendance très différente de la longueur de chaîne. Sa cinétique en est indépendante pour les courtes chaînes et elle est subitement ralentie lorsque la chaîne atteint 18 carbones de long. Si on admet que la transition métarhodopsine I \rightarrow II est accompagnée de changements des interactions protéine/chaîne hydrophobe sur la plus grande partie de leur interface, il est peu probable que ce soit le cas pour la transition lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I. En effet, comme cette transition n'est affectée que dans les esters à longue chaîne, nous croyons qu'elle correspond à une modification de la structure localisée profondément dans le domaine hydrophobe de la rhodopsine. Un modèle de ces transitions est présenté à la figure 20.

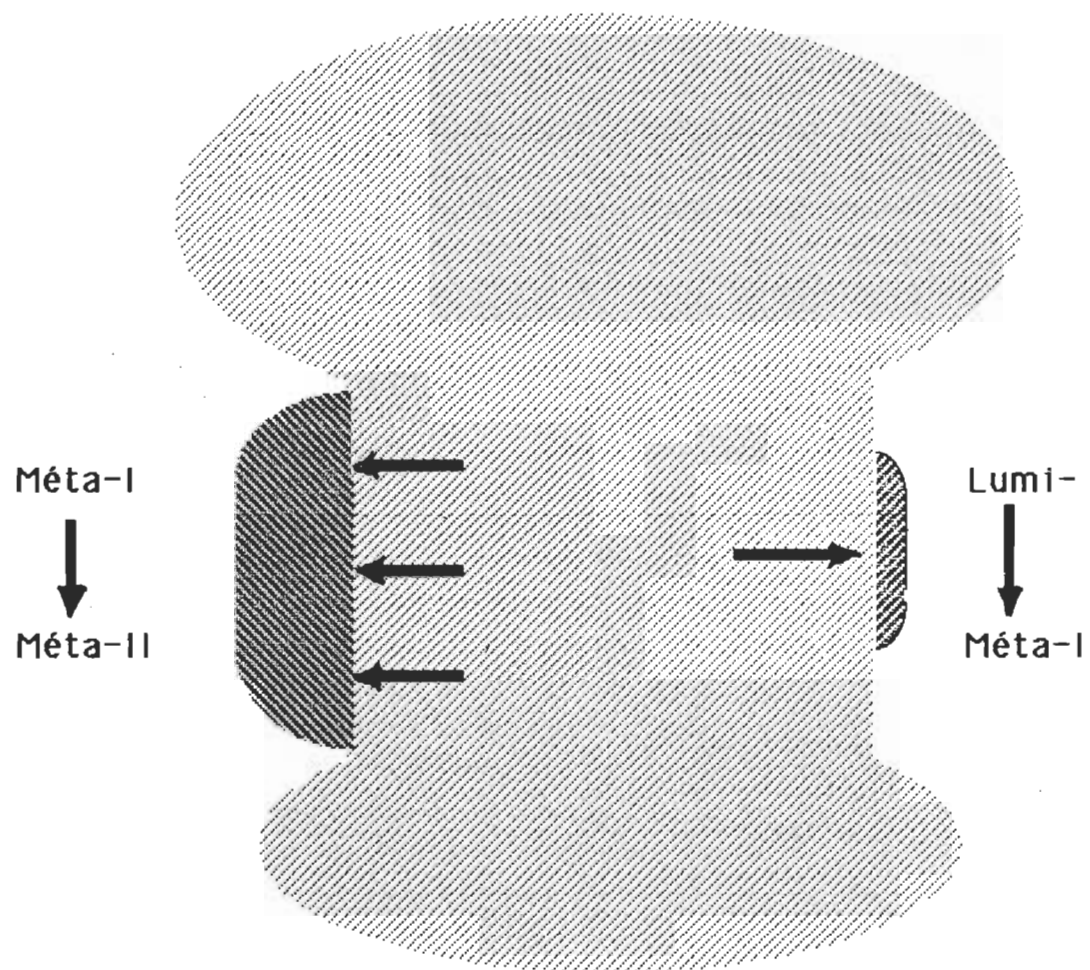


Figure 20: Modèle des transitions conformationnelles durant les transitions lumi- \rightarrow méta-I \rightarrow métarhodopsine-II

CONCLUSION

Nous pouvons retenir que, en ce qui concerne la réaction photochimique métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II, on observe un effet important de la température. Qu'une augmentation graduelle de la longueur des chaînes des esters de sucrose présentes en solution résulte en une augmentation graduelle du temps de demi-vie de la réaction. Ceci démontre un changement structural majeur de la rhodopsine à cette étape.

En ce qui concerne la réaction photochimique lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I, on observe qu'une augmentation graduelle de la longueur des chaînes d'esters de sucrose ne donne pas une augmentation graduelle du temps de demi-vie. On assiste plutôt à un effet limité des courtes chaînes. Ceci nous porte à croire à un changement structural restreint, surtout localisé dans la zone de surface capable d'interagir avec les longues chaînes. Il est important de souligner que le fait d'avoir un changement structural dans l'ordre de la microseconde nous oblige à jeter un nouveau regard sur le phénomène de la transduction de l'énergie lumineuse en influx nerveux.

BIBLIOGRAPHIE

- Atwood, P.J. et Gutfreund, H. (1980) FEBS Lett. **119**, 323.
- Baker, B.N., Donovan, W.J. et Williams, T.P. (1977) Vision Res. **17**, 1157.
- Bonting, S.L., Van Breugel, P.J.M. et Daemen, F.D.M. (1977) Jans Experimental Medecine and Biology, vol. 83, ed. N.G. Bazan, Acad. Press, New York.
- Boucher, F. et Leblanc, R.M. (1985) Photochem. Photobiol. **41**, 459.
- De Grip, W. J. in Methods in Enzymology, Vol. 81, 256, ed. L. Packer, Academic Press, Toronto, 1982.
- De Grip, W. J. in Methods in Enzymology, Vol. 81, 197, ed. L. Packer, Academic Press, Toronto, 1982.
- Dratz, E. A., Hargrave, P. A. (1983), TIBS 1983, 128.

Fong, S. L., Tsin, A. T. C., Bridges, C. D. B., Liow, G. I. in
Methods in Enzymology, vol. 81, 133, ed. L. Packer, Academic Press, Toronto, 1982.

Fung, B.K., Stryer, L. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) **77**,
2500.

Hagins, W. A., Penn, R. D., Yoshikami, S. (1970) Biophys. J., **10**,
380.

Heitzmann, H. (1972) Nature new biol. **235**, 114.

Heller, J. (1968) Biochemistry **7**, 864.

Honig, B. (1982) dans Biological events probed by ultrafast
laser spectroscopy, p. 281, Ed. R. Alfano, Academic Press,
New York.

Honig, B., Ebrey, T. G. (1974) Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **3**,
151.

Hubbard, R., Wald, G. (1952) J. Gen. Physiol., **36**, 269.

Hubbard, R. (1954) J. Gen. Physiol. **37**, 381

- Kawaguchi, T., Hamanaka, T., Mitsui, T. (1983) J. Coll.Interf.Sci., **96**, 437.
- Knudsen, P., Hubbell, W. L. (1978) Membr. Biochem., **1**, 297.
- Korenbrot, J. E., Cone, R. A. (1972) J. Gen. Physiol., **60**, 20.
- Krebs, W., et Kühn, H. (1977) Exp. Eye res. **25**, 511.
- Kühn, H., McDowell, J. H. (1977) Biophys. Struct. Mech., **3**, 199.
- Kusumi, A., Tsuda, M., Akino, T., Ohnishi, S.-I., Terayama, Y. (1983), **22**, 1165.
- Liebman, P.A., Jagger, W.S., Kaplan, M.W. et Bargoot, F.G. (1974) Nature **251**, 31.
- Lamola, A., Yamane, T. et Zipp, A. (1974) Biochemistry **13**, 738.
- Matthews, R. G., Hubbard, R., Brown, P. K., Wald, G. (1963) J. Gen. Physiol., **27**, 215.

Makino, M., Ogimoto, S. et Koga, S. (1983) *Agric. Biol. Chem.* **47**, 319.

Makino, M., Suzuki, T., Ebina, Y. et Nagai, K. (1980) *Biochim. Bio-phys. Acta* **688**, 572.

Motoyama, H., Hamanaka, T., Kawase, N., Boucher, F. et Kito, Y. (1985) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 1152.

Nashima, K., Kawase, N., Kito, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **626**, 390.

Nashima, K., Mitsudo, M., Kito, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **536**, 78.

Ostroy, S.E. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 91.

Ovchinnikov, Y. A. (1982) *FEBS Lett.*, **148**, 179.

Osborne, H.B., Sardet, C. et Helenius, A. (1974) *Eur. J. Biochem.* **44**, 383.

Parkes, J. A., Liebman, P. A. (1984) *Biochemistry*, **23**, 5054.

Pellicone, C. et Vilmaux, N. (1985) FEBS Lett. **152**, 234.

Plantner, J.J. et Kean, E.L. (1976) J. Biol. Chem. **251**, 1548.

Pontus, M., Delmelle, M. (1975) Expl. Eye Res., **20**, 559.

Rapp, J. (1979) Vision Res., **19**, 13741.

Renthal, R., Prober, J. S., Steinemann, A., Stryer, L. in Concanavalin A as a tool, 429, Wiley, New York, 1976.

Robinson, N.C. et Tanford, C. (1975) Biochemistry **14**, 369.

Salesse, C., Boucher, F. et Leblanc, R.M. (1984) Anal. Biochem. **142**, 258.

Sardet, C., Tardieu, A. et Luzzati, V. (1976) J. Mol. Biol. **105**, 383.

Shichi, H. in Biochemistry of vision, Academic Press, New York, 1983.

Smith, H. G. Jr., Stubbs, G. W., Litman, B. (1975) J. Expl. Eye Res., **20**, 211.

Tanford, C. (1974) *J. Phys. Chem.* **78**, 2469.

Stryer, L. in *Biochemistry*, W.H. Freeman and company, San Francisco, 1975.

Warshel, A. et Barbay, N. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1469.

Williams, T.P. et Baker, B.N. (1982) dans *Methods in Enzymology*, vol. 81, ed. L. Packer, Academic Press.

Woodruff, M.L., Bowds, M.D. (1979) *J. Gen. Physiol.*, **73**, 629.

Yau, K.-W., Haynes, L.W. et Nakatani, K. (1987), *Neuroscience Research*, supplément 6, S45.

Yee, R., Liebman, P. A. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 8902.

Yoshizawa, T. et Wald, G. (1963) *Nature* **177**, 1279.

ANNEXE A

Cinétique chimique

La détermination du temps de demi-vie pour une réaction chimique d'ordre 1, s'effectue à l'aide de l'équation :

$$t_{1/2} = 0,693 k^{-1} \quad (1)$$

où k est la constante de vitesse de la réaction.

Afin de déterminer les constantes de vitesse (i.e. les temps de demi-vie) on reproduit les cinétiques obtenues par photolyse sur échelle logarithmique. Une réaction du premier ordre donnera une droite dont la pente multipliée par 2,303 donnera la constante de vitesse et donc (selon l'équation 1) la demi-vie de la réaction.

ANNEXE B

Paramètres d'activations

La détermination des paramètres d'activations est effectuée à partir des cinétiques obtenues lors de la photolyse. L'énergie d'activation, élément nécessaire à la détermination de ces paramètres, est obtenue par la pente d'un graphique d'Arrhénius. L'équation suivante peut vous donner la valeur de l'énergie d'activation :

$$E_a = 2,303 R \mid \operatorname{tg} \alpha \mid \xi \quad (2)$$

où R est une constante ($1,986 \text{ cal K}^{-1} \text{ mole}^{-1}$), α est l'angle entre la droite et l'abscisse et ξ le rapport des échelles adoptées pour l'axe des abscisses et celui des ordonnées.

Il est possible de déterminer tous les paramètres d'activations à l'aide de cette énergie. L'enthalpie d'activation, ΔH , est reliée à l'énergie d'activation par la relation suivante :

$$\Delta H = E_a - RT \quad (3)$$

A l'aide de l'énergie libre d'activation de Gibbs, ΔG , que l'on calcule à l'aide de l'équation suivante :

$$k = k_b T h^{-1} e^{-\Delta G/RT} \quad (4)$$

il est possible de déterminer l'entropie d'activation, ΔS , selon l'égalité suivante :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

k_b est la constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-16}$ erg K^{-1}).

h est la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-27}$ erg s).

T est la température à laquelle la réaction s'effectue.