

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE ES SCIENCES (BIOPHYSIQUE)

PAR

MICHEL R. TESSIER

B. SC. (BIOLOGIE MEDICALE)

EFFET DE L'ENVIRONNEMENT MOLECULAIRE

SUR LA SEQUENCE PHOTOLYTIQUE DE LA RHODOPSINE BOVINE

DECEMBRE 1984

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

Le phénomène de la vision est issu de la transformation de l'énergie lumineuse en influx nerveux. Initialement, la lumière doit être absorbée par le pigment visuel pour engendrer les étapes de conversion énergétique. Ces dernières requièrent des modifications physico-chimiques membranaires, notamment en terme de perméabilité aux ions et d'organisation moléculaire du pigment visuel (rhodopsine), pour assurer la transmission des informations perçues par l'oeil vers le cerveau.

La rhodopsine est localisée dans les cellules photoréceptrices de la rétine. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire contenue dans la membrane de disques empilés dans le segment externe des cellules en bâtonnet. La rhodopsine se compose d'une portion apoprotéique, l'opsine, associée par une liaison de base de Schiff à un chromophore, le 11-cis rétinal. L'excitation lumineuse entraîne l'isomérisation du chromophore à sa forme tout-trans. Par la suite, la rhodopsine s'engage dans des changements conformationnels définissant la séquence photolytique de ses intermédiaires. La matrice phospholipidique d'origine de la rhodopsine est caractérisée par une grande fluidité et un fort taux d'insaturation. L'environnement moléculaire du pigment visuel influence sa photodécoloration. Un des intermédiaires de la rhodopsine serait directement impliqué dans le processus de la transduction visuelle.

Nous avons étudié la séquence photolytique de la rhodopsine bovine en spectroscopie d'absorption électronique à basse température. Nous

avons par la suite orienté notre étude sur l'analyse de la transition métarhodopsine I → II en photolyse éclair à la température ambiante. Nous avons utilisé des échantillons de rhodopsine dans la membrane discale des S.E.B., ou purifiée et solubilisée dans un détergent.

Les mêmes intermédiaires de photodécoloration sont observés dans tous les échantillons: batho-, lumi-, méta-I et métarhodopsine II. La conversion thermique des intermédiaires permet de déterminer les températures de transition. L'étape métarhodopsine I → II s'effectue à 258 K dans les S.E.B., à 235 K dans l'Ammonyx-LO et à 250 K dans le L-1690.

Cependant lorsque la rhodopsine est solubilisée dans le L-1690, sa séquence photolytique est ralentie, incomplète et comporte deux processus de formation de la métarhodopsine II. A basse température, cette double origine de la métarhodopsine II est révélée par les spectres de différence. En photolyse éclair, une cinétique composée de deux réactions de premier ordre ($\tau_{25^\circ\text{C}}$: 61 μs et 310 μs) est enregistrée sur l'échelle de temps correspondant à la formation de la métarhodopsine II. Dans l'Ammonyx-LO, la méta-II est formée exclusivement à partir de la métarhodopsine I ($\tau_{25^\circ\text{C}}$: 60 μs).

Nous proposons que le pigment visuel est photodécoloré sans passer par l'étape métarhodopsine I. La lumirhodopsine pourrait se convertir directement en métarhodopsine II et être impliquée dans la transduction visuelle.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma famille pour l'encouragement manifesté à mon égard, et surtout pour la compréhension des efforts fournis.

Merci à M. Roger M. Leblanc (directeur du projet), à M. François Boucher (directeur de travaux pratiques) et à toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Votre présence et votre support ont été appréciés à leur juste valeur.

Un merci spécial aux Moody Blues pour "The Present" et l'inspiration...

A Christian, Johanne et à Renée, pour le support et l'amitié, je n'oublie pas ...

A Louise, pour la patience, l'aide et l' "encadrement" ...

Ce travail de recherche a été réalisé grâce à des bourses du C.R.S.N.G. et du Fonds F.C.A.C.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME	ii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	xv
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES	xvi
 I- INTRODUCTION	1
1. La vision	1
2. Les cellules photoréceptrices	2
3. Le pigment visuel	5
4. L'environnement moléculaire de la rhodopsine	12
5. La séquence photolytique de la rhodopsine	15
6. La transduction visuelle	24
7. Pertinence du travail	30
8. Problématique du travail	33
 II- MATERIEL ET METHODES	41
1. Matériel et méthodes	41
2. Purification de la rhodopsine bovine	50
A. Procédure de purification de la rhodopsine	51
a. Préparation des membranes discales	51
b. Préparation de rhodopsine purifiée dans un détergent	54
c. Chromatographie d'affinité	56

	Page
B. Contrôle de la purification de la rhodopsine	58
a. Evaluation quantitative	58
b. Evaluation qualitative	59
C. Nature des échantillons de rhodopsine	61
D. Caractérisation des échantillons de rhodopsine	62
a. Dosage du nombre de phospholipides par rhodopsine	62
i. Préparation de la solution colorante	62
ii. Minéralisation des phospholipides	63
iii. Dosage du phosphore inorganique	64
b. Electrophorèse de rhodopsine sur gel de polyacrylamide	65
i. Préparation des gels de polyacrylamide	65
ii. Préparation des échantillons de rhodopsine	66
iii. Electrophorèse	67
iv. Coloration des gels	68
c. Evaluation de l'état d'agrégation de la rhodopsine à l'aide d'un tamis moléculaire	69
i. Etalonnage de la colonne	69
ii. Chromatographie des échantillons de rhodopsine	70
3. Caractérisation des détergents	71
A. Les détergents	71
B. Détermination de la concentration micellaire critique	75
a. Approche théorique	75
b. Préparation des échantillons	77
c. Mesures des tensions superficielles	78

	Page
C. Evaluation de la rigidité micellaire	78
a. Polarisation de fluorescence	78
i. Approche théorique	78
ii. Sonde fluorescente utilisée	80
iii. Préparation des échantillons	80
iv. Mesure de polarisation de fluorescence	81
b. Résonnance paramagnétique électronique	82
i. Approche théorique	82
ii. Marqueur de spin utilisé	84
iii. Préparation des échantillons	84
iv. Mesure de résonnance paramagnétique électronique	86
4. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine par spectroscopie électronique à basse tempé- rature	88
A. Principe de la spectroscopie électronique à basse température de la rhodopsine	88
B. Nature et traitement des échantillons	88
C. Description du montage expérimental	90
D. Procédure expérimentale	93
5. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine en photolyse éclair	95
A. Principe de la photolyse éclair de la rhodopsine ..	96
B. Nature et traitement des échantillons	96
C. Description du montage expérimental	97
a. Axe d'analyse	99
b. Axe d'excitation	102
c. Alignement du montage	103
d. Composantes accessoires	106

	Page
D. Procédure expérimentale	107
a. Ajustement du laser à colorant	107
i. Colorant	107
ii. Circulation du colorant	107
iii. Source de tension	108
b. Ajustement de l'oscilloscope	108
c. Ajustement du spectrofluorimètre	109
d. Protocole expérimental	109
 III- RESULTATS ET DISCUSSION	 112
1. Généralités	112
2. Purification de la rhodopsine bovine	112
A. Méthode de purification de la rhodopsine	112
a. Isolation des membranes discales	112
i. Dissection des yeux pour obtenir les rétines	113
ii. Homogénéisation des rétines pour briser les cellules et libérer les S.E.B.	113
iii. Séparation des S.E.B. de fragments de densité différente	114
iv. Purification des S.E.B. sur gradient continu de sucre	114
b. Fractionnement au sulfate d'ammonium	117
c. Chromatographie d'affinité	119
B. Rendement de la purification de la rhodopsine ...	120
C. Pureté spectrale de la rhodopsine	124
D. Caractérisation des échantillons de rhodopsine ..	126
a. Nombre de phospholipides par rhodopsine	126
b. Présence de contaminants	130
c. Etat d'agrégation de la rhodopsine	131

	Page
3. Caractérisation des détergents	133
A. Généralités - Solubilisation et stabilité thermique de la rhodopsine	133
B. Concentration micellaire critique	135
C. Rigidité micellaire	138
a. Polarisation de fluorescence	138
b. Résonnance paramagnétique électronique	141
4. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine par spectroscopie électronique à basse température	144
A. Effet de la rigidité et de l'hydrophobicité sur la séquence photolytique	144
B. Modifications des spectres d'absorption en fonction de la température	145
C. Température de transition	150
D. Evolution de la réaction métarhodopsine I \rightarrow II en fonction du temps	153
E. Evolution de la réaction métarhodopsine I \rightarrow II en fonction de la température	156
F. Origine de la métarhodopsine II	158
G. Discussion des résultats	161
5. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine en photolyse éclair	166
A. Performance du système de photolyse éclair	166
B. Cinétique chimique	173
C. Cinétique en fonction de la longueur d'onde d'analyse, mesurée à la température ambiante	176
D. Effet de la concentration sur la vitesse de réaction	182
E. Effet de la température sur la vitesse de réaction	186
F. Paramètres thermodynamiques d'activation	190

	Page
G. Discussion des résultats	196
IV- CONCLUSION	206
BIBLIOGRAPHIE	216
ANNEXES	248

LISTE DES TABLEAUX

	Page
I-1 Températures de transition entre les intermédiaires de la rhodopsine bovine	36
I-2 Vitesse de formation et paramètres thermodynamiques associés à la formation de métarhodopsine II	38
II-1 Liste des produits chimiques	43
II-2 Liste des solvants organiques	47
II-3 Liste des appareils et des instruments de mesure	48
II-4 Variation du rapport $A_{278 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$ en fonction de la méthode de purification utilisée	60
II-5 Filtres utilisés à la sortie de la source d'analyse	100
II-6 Position des éléments sur le rail optique par rapport au point 0 cm correspondant à l'entrée du spectrofluorimètre	104
II-7 Position des éléments par rapport au niveau 0 cm de la table d'appui mesurée à mi-hauteur de l'ouverture optique	105
II-8 Largeur des fentes du spectrofluorimètre selon la longueur d'onde d'analyse	110
III-1 Purification de la rhodopsine bovine	121
III-2 Rendement et pureté spectrale	123
III-3 Propriétés des détergents	137
III-4 Polarisation de fluorescence dans le L-1690 et dans l'Ammonyx-L0.	139
III-5 Viscosité (η) absolue des solutions de sucre	140
III-6 Températures de transition entre les intermédiaires	152
III-7 Origine des intermédiaires déterminée par les spectres de différence	159
III-8 Variation d'absorbance	174
III-9 Rhodopsine purifiée dans l'Ammonyx-L0. Cinétique en fonction de la longueur d'onde d'analyse	178

	Page
III-10 Rhodopsine purifiée dans le L-1690. Cinétique en fonction de la longueur d'onde d'analyse	181
III-11 Cinétique de formation de la métarhodopsine II à 25°C. .	183
III-12 Effet de la concentration sur la cinétique de formation de la métarhodopsine II à 25°C	184
III-13 Effet de la température sur la cinétique de formation de la métarhodopsine II	187
III-14 Effet de la température sur la cinétique de formation de la métarhodopsine II dans l'Ammonyx-L0	188
III-15 Effet de la température sur la cinétique de formation de la métarhodopsine II dans le L-1690	191
III-16 Paramètres thermodynamiques associés à la formation de la métarhodopsine II à 293K	193

LISTE DES FIGURES

	Page
I-1 Ultrastructure d'une cellule photoréceptrice en bâtonnet	4
I-2 Chromophores des pigments visuels	7
I-3 Séquence des acides aminés de la rhodopsine bovine	9
I-4 Spectre d'absorption de la rhodopsine bovine	11
I-5 Arrangement moléculaire de la membrane discale	14
I-6 Isomérisation du chromophore de la rhodopsine bovine	16
I-7 Séquence photolytique de la rhodopsine bovine	19
I-8 Hypothèse du GMP cyclique	29
II-1 Structure chimique des détergents	73
II-2 Comportement des détergents en solution aqueuse	76
II-3 Structure chimique de l'ANS et du marqueur de spin	81
II-4 Montage expérimental - Spectroscopie d'absorption électronique à basse température	91
II-5 Organisation interne du cryostat	92
II-6 Montage expérimental - Photolyse éclair	98
III-1 Position des bandes séparées sur gradient continu de sucre	116
III-2 Spectre d'absorption électronique de S.E.B.	127
III-3 Spectre d'absorption électronique de rhodopsine purifiée solubilisée dans l'Ammonyx-LO	128
III-4 Spectre d'absorption électronique de rhodopsine purifiée solubilisée dans le L-1690	129
III-5 Profil d'élution sur tamis moléculaire Biogel A5	132
III-6 Détermination de la CMC du L-1690	136

	Page
III-7 Détermination de la rigidité micellaire par polarisation de fluorescence	142
III-8 Spectres RPE de l'Ammonyx-LO et du L-1690	143
III-9 Spectres d'absorption électronique des intermédiaires de la rhodopsine irradiée à 77 K	147
III-10 Déplacement du maximum d'absorption de la rhodopsine irradiée en fonction de la température	149
III-11 Détermination des températures de transition	151
III-12 Modification du spectre d'absorption en fonction du temps - Partie A	154
III-13 Modification du spectre d'absorption en fonction du temps - Partie B	155
III-14 Effet de la température sur l'équilibre métarhodopsine I → II	157
III-15 Spectres de différence associés à la formation de la métarhodopsine II	160
III-16 Variations d'absorbance associées à la formation de la métarhodopsine II	167
III-17 Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans l'Ammonyx-LO à 25° C	177
III-18 Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans le L-1690 à 25° C	179
III-19 Graphique d'Arrhénius - Rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-LO	189
III-20 Graphique d'Arrhénius - Rhodopsine solubilisée dans le L-1690	192
IV-1 Séquence photolytique de la rhodopsine de la membrane discale des S.E.B.	207
IV-2 Séquence photolytique de la rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-LO	208
IV-3 Séquence photolytique de la rhodopsine solubilisée dans le L-1690	211

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

	Page
III-1 Variation de signal (mV) enregistrée à 385 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm	169
III-2 Variation de signal (mV) enregistrée à 450 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm	170
III-3 Variation de signal (mV) enregistrée à 497 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm	171
III-4 Variation de signal (mV) enregistrée à 520 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm	172

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

A	absorbance
° Å	Angstrom
ANS	acide 8-anilino- 1-naphthalène sulfonique
ATP	adénosine 5' - monophosphate
batho-	bathorhodopsine
C (°)	degré Celsius
cal	calorie
cm	centimètre
CMC	concentration micellaire critique
Con A	concanavaline A
cp	centipoise
CTAB	bromure de céthyltriméthylammonium
DC	courant direct
DDAO	Ammonyx-LO
DTAB	bromure de diéthyltriméthylammonium
Ea	énergie d'activation
EDTA	éthylènediamine tétraacétate
g	gramme
G ⁺ (Δ)	énergie libre d'activation de Gibbs
GDP	guanosine diphosphate
GHz	gigahertz
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GTP	guanosine triphosphate
H ⁺ (Δ)	enthalpie d'activation

hypso-	hypSORHODOPSINE
k	constante de vitesse
K	degré Kelvin
Kcal	kilocalorie
kHz	kilohertz
l	litre
L-1690	monoester de lauryl sucrose
LDAO	AmMONYX-LO
log	logarithme en base 10
lumi-	lUMIRHODOPSINE
M	molaire
mA	milliampère
max	maximum
méta- I	mÉTARHODOPSINE I
méta- II	mÉTARHODOPSINE II
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
ms	milliseconde
mV	millivolt
mW	milliwatt
nm	nanomètre
ns	nanoseconde
p	polarisation

P_o	polarisation intrinsèque
Pa	pascal
PC	phosphatidylcholine
PDE	phosphodiesterase
PE	phosphatidylethanolamine
P_i	phosphore inorganique
p/p (%)	pourcentage poids / poids
ps	picoseconde
PS	phosphatidylserine
PSI	livre par pouce carré
p/v (%)	pourcentage poids / volume
RPE	résonnance paramagnétique électronique
s	seconde
S	paramètre d'ordre moléculaire
$S^+ (\Delta)$	entropie d'activation
SDS	sodium dodécyl sulfate
S.E.B.	segment externe des bâtonnets
T	température
T (%)	pourcentage de transmittance
TEMED	N, N, N', N'-, tétraméthyléthylènediamine
uv	ultraviolet
V	volt
v/v (%)	pourcentage volume / volume
ϵ	coefficient d'extinction molaire
η	viscosité

λ	longueur d'onde
μg	microgramme
μl	microlitre
μm	micromètre
μs	microseconde

I- INTRODUCTION

1. La vision

La surface de la terre est baignée d'énergie électromagnétique. Une faible partie de ce spectre d'énergie est utile aux organismes vivants. Les plantes vertes ont adopté des pigments caroténoïdiens et chlorophylliens qui absorbent entre 300 et 800 nanomètres. Chez les animaux, le phénomène de la vision est issu de la transformation de l'énergie lumineuse du visible en influx nerveux.

The multitude d'informations en provenance de l'environnement physique sont perçues, codées, sélectionnées et acheminées lors du processus visuel (Gordon, 1982). L'oeil des vertébrés est le récepteur le plus sophistiqué (Ralph, 1978) et bien qu'il soit complexe, sa fonction biologique de photoréception est limitée à la rétine.

La rétine est la seule partie photosensible de l'oeil et elle tapisse le fond du globe oculaire. Morphologiquement, la rétine est un assemblage cellulaire bien organisé. Elle se compose des cellules photoréceptrices et de plusieurs couches distinctes de cellules nerveuses (Pirenne et al., 1972). C'est au niveau du cortex cérébral que se définit l'image transmise par le réseau nerveux.

L'oeil pourrait être considéré comme un compteur de photons. Un seul photon absorbé par une cellule photoréceptrice génère un potentiel d'action mesurable. Cet acte biologique élémentaire n'est qu'une partie infime du processus de la vision, encore décrit partiellement en termes moléculaires.

2. Les cellules photoréceptrices

Chez les vertébrés, il existe deux types distincts de cellules photoréceptrices, les cônes et les bâtonnets. Les cônes sont courts et trapus, les bâtonnets sont minces et allongés. La forme des cellules leur permet de concentrer la lumière sur le pigment visuel.

Les cellules photoréceptrices sont localisées au bas de la rétine, appuyées contre la couche pigmentée de mélanine de la choroïde. La lumière doit traverser les cellules nerveuses, le tissu conjonctif et les vaisseaux sanguins, avant d'être absorbée par les cellules photosensibles (Brown, 1965). Sous illumination, la cellule photoréceptrice s'hyperpolarise temporairement. Le changement du potentiel membranaire serait la seule réponse des cellules photoréceptrices à la lumière (Rodieck, 1973). La cellule photoréceptrice n'est pas seulement un détecteur de quanta pouvant transformer l'intensité lumineuse reçue en réponse électrique à la plus haute sensibilité possible; elle peut s'adapter à la lumière et à l'obscurité. Elle contrôle automatiquement sa sensibilité sur une gamme d'intensités relatives variant de zéro à un million (Uhl et Abrahamson, 1981). La sensibilité des bâtonnets est deux fois plus grande que celle des cônes, et ils permettent de voir en lumière atténuee. Par contre, la résolution est faible avec les bâtonnets car il peut y avoir un millier de cellules connectées à une même cellule ganglionnaire (Gordon, 1982). Les cônes répondent à de plus fortes intensités lumineuses et sont concentrés à la macula. Il n'y a souvent qu'un seul cône transmettant l'information à une seule cellule ganglionnaire (Gordon, 1982). L'image est alors très

bien définie. Les cônes, de trois types, permettent la vision photopique et notamment la discrimination des couleurs. Contrairement aux bâtonnets contenant tous le même pigment, les cônes contiennent des pigments différents.

Chez la plupart des espèces, les bâtonnets sont beaucoup plus abondants que les cônes. Plus spécifiquement, chez les bovins, on retrouve exclusivement des cellules en bâtonnets.

Morphologiquement (figure I-1) et fonctionnellement, les bâtonnets sont divisés en deux segments. Le segment interne renferme un nombre considérable de mitochondries, le noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Il coordonne les activités métaboliques usuelles à toute cellule et synapse avec les cellules bipolaires et horizontales de la rétine.

Nous nous intéressons principalement au segment externe. Il s'agit d'une structure cylindrique de diamètre égal à $1 \mu\text{m}$ et longue de $10 \mu\text{m}$ (Hagins et al., 1973, Korenbrot et al., 1973). Le S.E.B. est formé par l'empilement de 500 à 2000 structures membranaires aplatis, chacune renfermant environ 10^5 molécules de pigment visuel (Dratz et Hargrave, 1983). Tous ces disques sont physiquement indépendants et séparés du milieu extracellulaire par la membrane plasmique qui les enveloppe (De Robertis et Lasansky, 1961). Les segments interne et externe des cellules photoréceptrices sont reliés par un étroit et fragile faisceau de microtubules appelé cil connectif. (Dartnall, 1972).

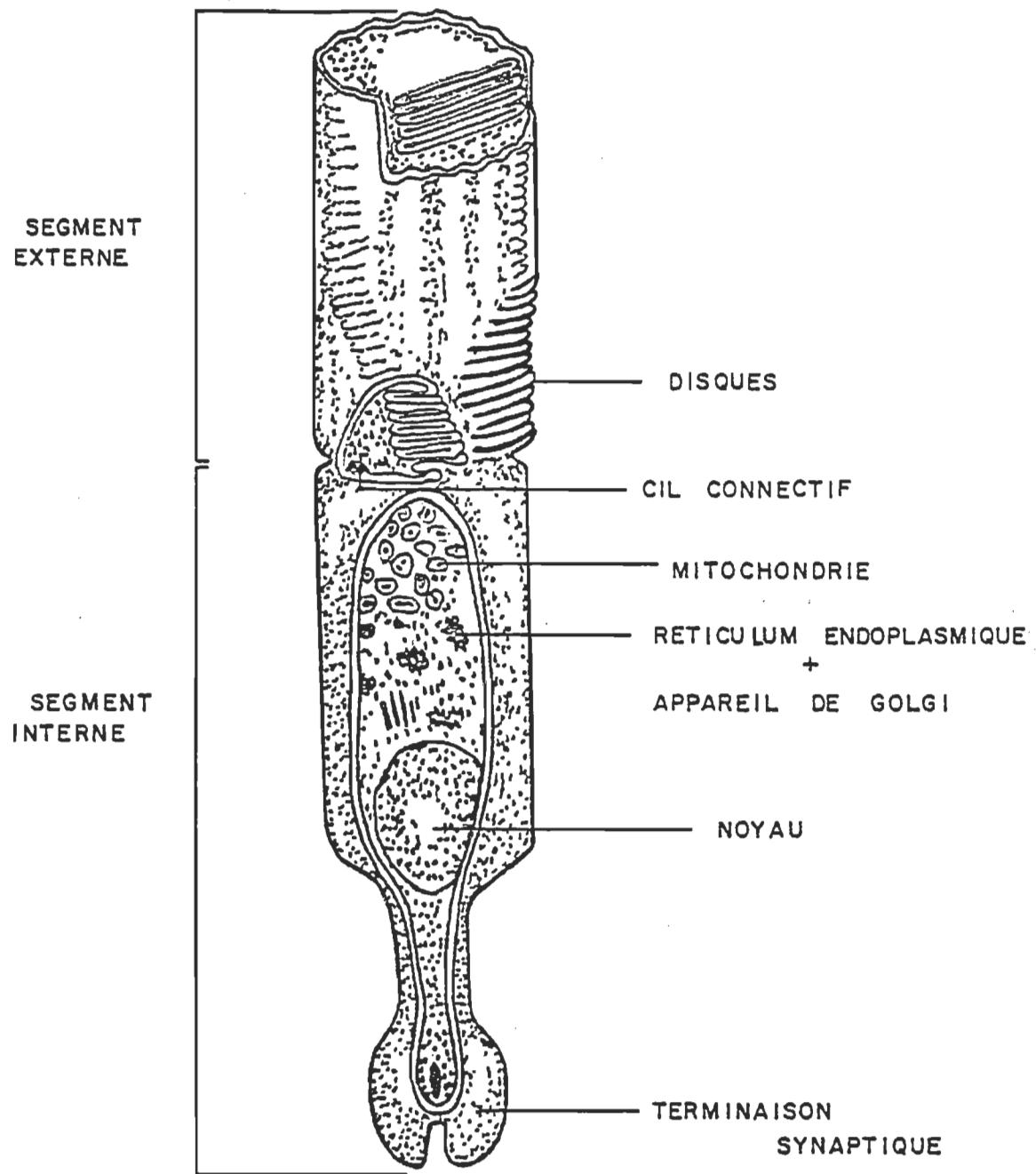


Figure I-1: Ultrastructure d'une cellule photoréceptrice en bâtonnet (Fain, 1979).

La membrane plasmique représente seulement 1 à 3.5% de la membrane totale du S.E.B. (Daemen, 1973). Le pigment visuel se retrouve dans la membrane discale et dans la membrane plasmique. C'est cependant dans la membrane discale que sont incluses la presque totalité des molécules de rhodopsine (Jan et Revel, 1974, Basinger et al., 1976). La membrane des disques est composée d'une bicouche de lipides épaisse de 60 à 70 Å. On retrouve aussi dans cette membrane les molécules de pigment visuel et les autres protéines membranaires. La membrane discale délimite un petit espace intradiscal aqueux: le lumen. Les deux systèmes membranaires fermés du S.E.B., la membrane discale entourant le lumen des disques et la membrane plasmique retenant les disques et le cytoplasme, constituent des compartiments osmotiques et électriques séparés (Rüppel et Hagins, 1971, Korenbrot et al., 1973). Dans des conditions normales, les membranes discales sont constamment renouvelées à la base du segment externe. La formation de nouvelles membranes par des invaginations de la membrane plasmique est couplée à la phagocytose des vieux disques par l'épithélium pigmentaire à l'extrémité apicale.

3. Le pigment visuel

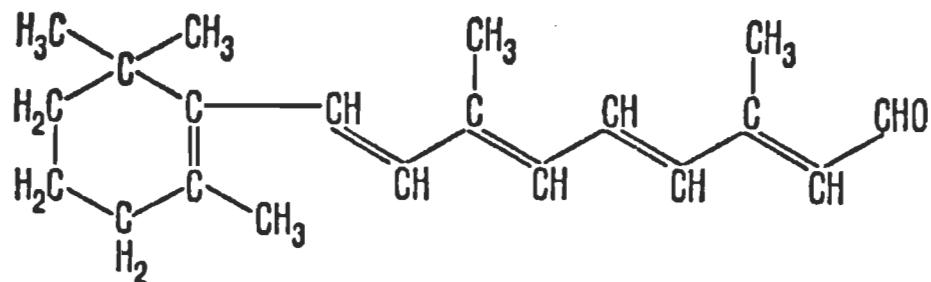
Seules les radiations absorbées affectent la matière. Dans les cellules photoréceptrices en bâtonnets, la molécule qui absorbe la lumière visible est un pigment rouge appelé rhodopsine. La rhodopsine est la principale protéine membranaire des disques et elle est responsable du processus primaire de la vision.

Originellement nommée pourpre rétinien, la rhodopsine a été extraite pour la première fois il y a plus d'un siècle (Kühne, 1877). Lorsque le pigment visuel absorbe de la lumière, il s'engage dans une série de changements structuraux l'amenant à se scinder en deux constituants: une protéine incolore, l'opsine, et un groupe prosthétique jaune, le rétinal (Wald, 1968).

Comme aucun acide aminé n'absorbe dans le visible, c'est le chromophore jaune qui est le siège initial de l'excitation de la rhodopsine par la lumière visible. Le chromophore de la rhodopsine est un aldéhyde de la vitamine A (Wald, 1935). Tous les chromophores de pigments visuels sont dérivés de deux aldéhydes de polyène: le rétinal et le 3-déhydrorétinal (figure I-2).

Le rétinal possède quatre doubles liaisons C = C sur sa chaîne latérale. Chacun de ces doubles liens peut potentiellement être cis ou trans. Le chromophore de la rhodopsine bovine, le rétinal, peut exister sous plusieurs formes isomères selon la planarité des doubles liaisons et la torsion de la chaîne isoprénoidé. C'est l'isomère 11-cis qui se retrouve chez le pigment visuel adapté à l'obscurité. Le chromophore est attaché à un groupement ϵ -aminé de la lysine 296 (Abdulaev et al., 1982) de l'opsine par une liaison de base de Schiff (Hubbard et Wald, 1952, Bownds, 1967). Il demeure à être établi si la liaison chimique entre l'opsine et le chromophore est protonée ($>\text{C}=\overset{+}{\text{NH}}$), non protonée ($>\text{C}=\overset{\cdot}{\text{N}}^-$) ou susceptible d'être liée à un hydrogène d'un groupe donneur (Favrot et al., 1978). Ce détail a une signification considérable parce

A.



B.

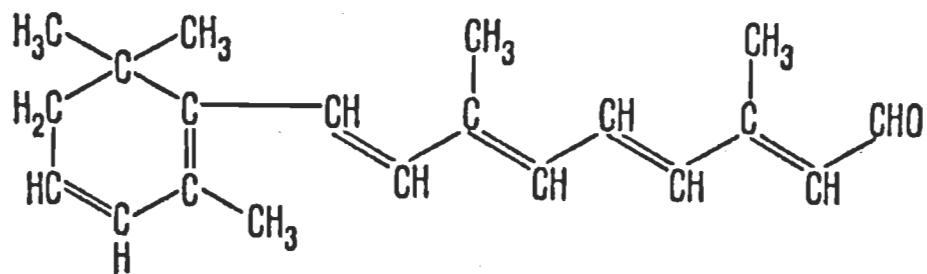


Figure I-2: Chromophores des pigments visuels.

- A. Le rétinal (aldéhyde de la vitamine A₁)
- B. Le 3-déhydrorétinal (aldéhyde de la vitamine A₂).

qu'il détermine le spectre d'absorption du pigment visuel et la nature du processus photochimique primaire à l'origine du phénomène de la transduction visuelle. La forme 11-cis du rétinal souffre de torsion et d'encombrement, elle ne devrait pas exister selon les lois établies de la stéréochimie. La rhodopsine exposée à la lumière a un chromophore isomérisé, le tout-trans rétinal. Cet isomère est le plus stable de tous les rétinals.

L'apoprotéine est appelée opsine. Il s'agit d'une chaîne polypeptidique simple constituée de 348 résidus d'acides aminés (Ovchinnikov et al., 1982, Hargrave et al., 1983) dont la séquence est illustrée à la figure I-3. Le poids moléculaire de la rhodopsine bovine est voisin de 40 000 daltons (Daemen et al., 1972, Daemen, 1973) et son coefficient d'extinction molaire (ϵ) se situe aux environs de $40\ 000\ \text{litre}\ \text{mole}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (Shichi, 1970). La rhodopsine est une glycoprotéine incluse asymétriquement dans la membrane discale (Chen et Hubbell, 1973, Raubach et al., 1974). L'extrémité carboxyle et les sites de phosphorylation se trouvent dans l'espace cytoplasmique (Rölich, 1976, Hargrave et al., 1982). La fonction de la phosphorylation de la rhodopsine n'est pas connue. Sa lenteur lui suggère un rôle dans les processus d'adaptation plutôt que dans la fermeture des pores à sodium (Bownds, 1981). Cependant il semble évident que la cinétique de phosphorylation doit être très différente pour chacun des sites. La portion aminée terminale et les sucres se retrouvent dans l'espace intradiscal (Hargrave et Fong, 1977, Hargrave et al., 1980). Les sucres sont le N-acétyl-glucosamine et le mannose, ils sont au nombre de douze à quatorze et regroupés en deux ou trois

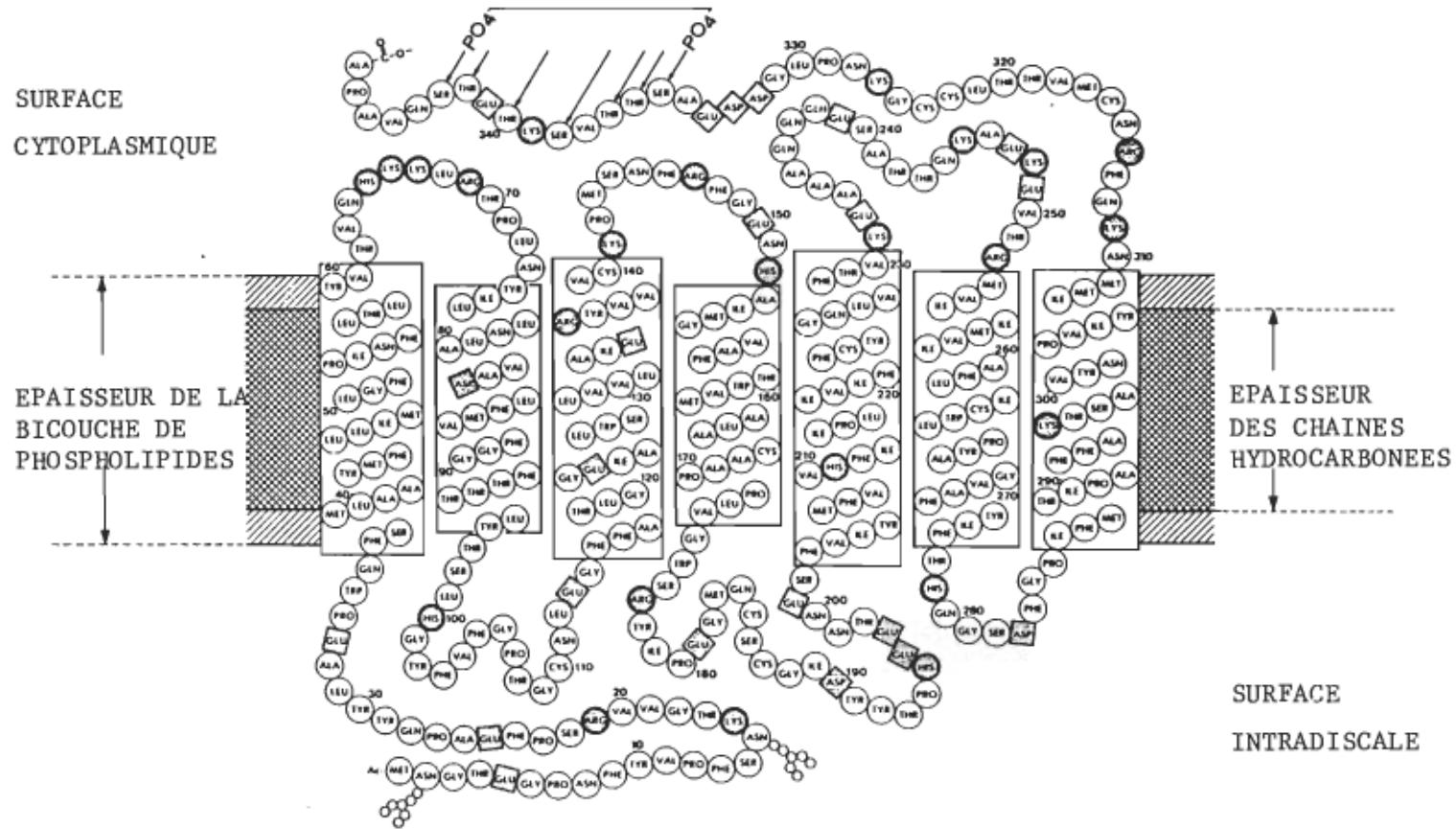


Figure I-3: Séquence des acides aminés de la rhodopsine bovine (Dratz et Hargrave, 1983). La rhodopsine est constituée de 348 acides aminés. L'extrémité carboxyle est exposée à la surface cytoplasmique du bâtonnet, tout comme les sites de phosphorylation indiqués par des flèches. Les acides aminés ayant des chaînes latérales chargées positivement sont représentés par des cercles ombrés. Les acides aminés à chaînes latérales chargées négativement sont indiqués par des carrés ombrés. Les hélices α sont représentées par les rectangles perpendiculaires au plan de la membrane discale. L'extrémité aminée, à la surface intradiscale, porte les hydrates de carbone représentés par des chaînes de petits cercles.

oligosaccharides (Fukuda et al., 1979, Liang et al., 1979). Entre ses deux extrémités, la rhodopsine traverse la membrane sept fois par le biais d'une structure arrangée à 60% en α hélices perpendiculaires au plan de la membrane (Dratz et al., 1979, Ovchinnikov, 1982). Près de l'extrémité carboxyle, le chromophore associé au pigment visuel intact est parallèle au plan de la membrane discale, situé au centre de la bicouche et contenu dans un environnement hydrophobe (Fager et al., 1978, Thomas et Stryer, 1982, Dratz et Hargrave, 1983). Tous les chromophores dans la membrane discale sont orientés dans un plan parallèle à la surface du disque et perpendiculaire à la direction de propagation de la lumière, permettant ainsi une absorption maximale des photons (Denton, 1959, Liebman, 1972).

Le complexe chromoprotéique non photolysé présente un spectre d'absorption uv-visible caractéristique (figure I-4). Le spectre d'absorption de la rhodopsine est passablement différent de celui du chromophore seul car ce dernier absorbe aux environs de 380 nm. La rhodopsine est caractérisée par une bande (α) majeure d'absorption dans le visible, centrée à 498 nm et attribuée au 11-cis rétinal lié par un lien aldimine à l'opsine. Les deux autres maxima d'absorption sont situés à des longueurs d'onde plus petites. Une bande (β) mineure située à 340 nm est due à la présence de rétinal libre. C'est à 278 nm qu'on retrouve la bande (γ) d'absorption la plus importante. Elle est caractéristique de la présence d'acides amides aromatiques, constituants de la protéine (Honig et Ebrey, 1974, Shichi, 1983). L'environnement de la glycoprotéine fournit une perturbation substantielle et précisément contrôlée de la structure électronique du chromophore. Plusieurs modes possibles de pertur-

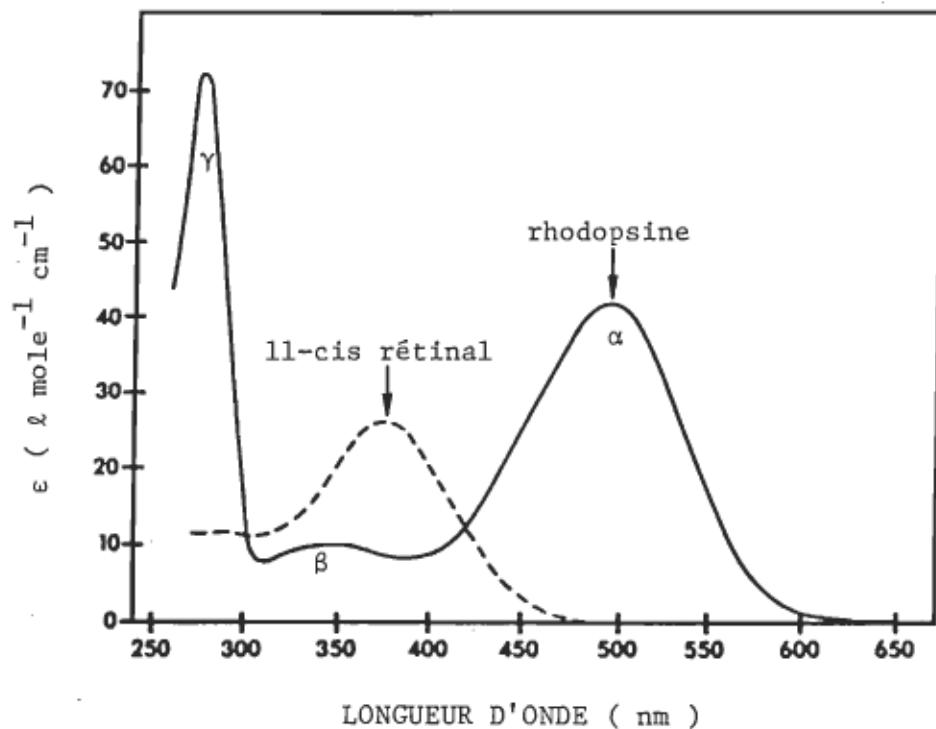


Figure I-4: Spectre d'absorption de la rhodopsine bovine (Hargrave, 1982 d'après une adaptation de Ebrey et Honig, 1975). En trait plein, spectre d'absorption du 11-cis rétinal lié à l'opsine. Les bandes α , β et γ se situent respectivement à 498, 340 et 278 nm. En trait discontinu, spectre d'absorption du chromophore seul ($\lambda_{\text{max}} \approx 375 \text{ nm}$).

bation spectrale du chromophore par le microenvironnement ont été suggérés: soit une distribution coulombique de groupes chargés le long de la chaîne polyénique (Kropf et Hubbard, 1958), soit une interaction dispersive entre la chaîne polyénique et les groupes fortement polarisables comme les acides aminés aromatiques (Irving et al., 1970) ou bien une torsion de certains liens de la chaîne polyénique (Kakitani et Kakitani, 1977). Les processus induits par la lumière changent le microenvironnement du chromophore et simultanément la perturbation peut être identifiée et évaluée car elle est accompagnée de changements spectraux.

4. L'environnement moléculaire de la rhodopsine

La rhodopsine pourrait servir de transducteur de la vision en agissant comme un pore à ions (Hagins, 1972) ou en interagissant à sa surface hydrophile avec des enzymes cytoplasmiques solubles (Hubbell et Bownds, 1979). La connaissance de la topographie et de l'organisation de la rhodopsine dans la membrane discale peut aider à comprendre son mode d'action.

Jusqu'à très récemment, on croyait que la rhodopsine dominait largement la portion protéique du segment externe. Smith et al. (1975) et Krebs et Kühn (1977) ont établi que la rhodopsine comprendrait 95% des protéines membranaires intrinsèques de la membrane discale. Ce chiffre a été mis en doute par Siebert et al. (1977) lorsqu'ils ont isolé, par électrophorèse, trois bandes dans la région voisine de 40 000 daltons. Une seule de ces bandes est de la rhodopsine (Uhl et al., 1979), les deux autres sont attribuées à d'autres protéines transmembranaires intrinsèques. En conséquence,

la rhodopsine pourrait ne représenter que 60% des protéines de la membrane discale (Uhl et Abrahamson, 1981).

L'architecture de la membrane discale est illustrée à la figure I-5. Cette membrane se caractérise par un faible rapport protéine/lipide, soit 35% du poids sec (Olive, 1980). Dans les membranes biologiques, les protéines intégrales sont stabilisées par leur interaction avec les lipides. La membrane discale des S.E.B. bovins a un rapport de soixante-quinze phospholipides pour une rhodopsine (Stubbs et Litman, 1978). L'aspect le plus frappant de la composition lipidique est la quantité très élevée d'acides gras insaturés et le très faible contenu en sphingomyéline. Quatre-vingts à quatre-vingt-dix pour-cent des lipides totaux sont des phospholipides (Daemen, 1973, Olive, 1980): la phosphatidyléthanolamine (PE) 44%, la phosphatidylcholine (PC) 36% et la phosphatidylsérine (PS) 15% sont les principaux. Environ 40 à 50% des chaînes d'acides gras sont de l'acide docosahexanoïque (22:6) (Anderson et al., 1975, Stone et al., 1979). On observe aussi plus de 50% de polyinsaturation chez les acides gras. La majorité des phospholipides de la membrane discale contiennent une chaîne grasse polyinsaturée et une plus saturée, reliées au glycérol (Stone et al., 1979, Olive, 1980). La distribution des lipides membranaires est asymétrique: la PC et la PS se retrouvent préférentiellement sur la face interne tandis que la PE est plus abondante sur la surface externe du disque (Engländer et Engländer, 1977, Nemes et al., 1980). La membrane discale renferme aussi un faible pourcentage d'hydrates de carbone

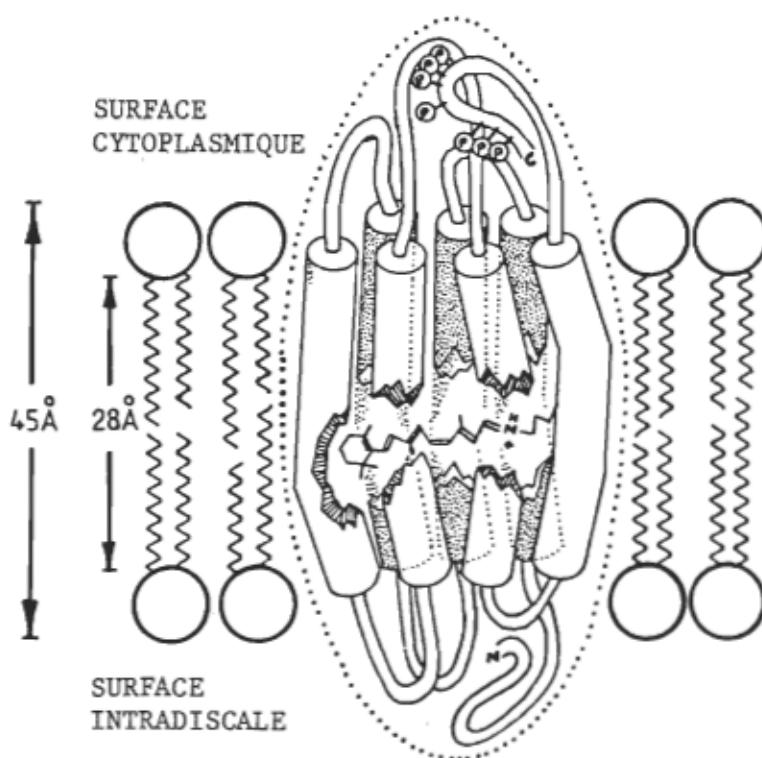


Figure I-5: Arrangement moléculaire de la membrane discale (Dratz et Hargrave, 1983). Représentation schématique de la structure générale de la rhodopsine et de son association avec la bicoche phospholipidique de la membrane discale. La rhodopsine, protéine transmembranaire, est illustrée par un faisceau allongé d'hélices α quelque peu irrégulières, incluses dans la bicoche. Le site de liaison du 11-cis rétinal, presque parallèle au plan de la membrane, est aussi indiqué. Les sept sites de phosphorylation connus sont symbolisés par la lettre P.

(Daemen, 1973).

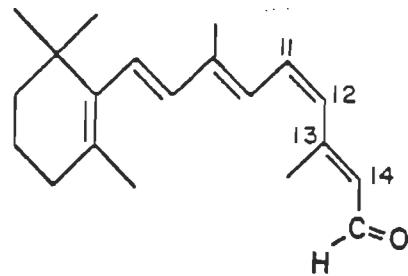
Aux températures physiologiques, la bicouche lipidique fortement insaturée de la membrane discale est extrêmement fluide (Miljanich, 1978), permettant à la molécule de rhodopsine de bouger. La mobilité de la protéine dans la membrane se résume à la diffusion rotationnelle et à une faible diffusion latérale (Brown, 1972, Cone, 1972, Takezoe et Yu, 1981). Ce ne sont pas les interactions rhodopsine-rhodopsine qui limitent les déplacements de la protéine; la rhodopsine est sous forme monomérique dans la membrane discale (Chabre, 1975, Blaurock, 1977). On ne sait cependant pas si elle demeure un monomère à la lumière. La diffusion de la rhodopsine dans la membrane a une importance fonctionnelle certaine dans le processus de récupération du pigment visuel (Liebman et Entine, 1974).

Il existe une relation intime entre la fonction de la rhodopsine et son environnement moléculaire. D'ailleurs la composition lipidique de la membrane discale demeure invariable même lors de carence alimentaire, alors qu'on note déjà des modifications à des endroits vitaux comme le cerveau (Anderson et Maude, 1972).

5. La séquence photolytique de la rhodopsine

Les molécules de rhodopsine sont le site initial de l'interaction avec la lumière qui entraîne l'isomérisation du chromophore de la forme 11-cis à tout-trans rétinal (figure I-6). De nombreuses modifications et réactions chimiques sont initiées par la lumière dans les cellules photoréceptrices des vertébrés. On ob-

A.



B.

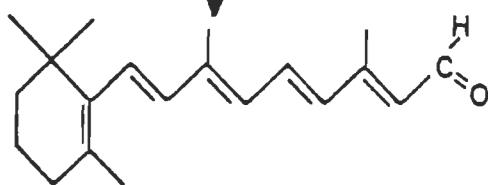


Figure I-6: Isomérisation du chromophore de la rhodopsine bovine.

A. 11-cis rétinal

B. tout-trans rétinal

La flèche ondulée symbolise l'énergie lumineuse ($\text{h}\nu$).

serve des changements de conformation de la rhodopsine, une diminution de la concentration de GMP cyclique, la phosphorylation de la rhodopsine, la déphosphorylation d'autres protéines membranaires et des variations de concentration des ions calcium (Ostroy et al., 1981). L'excitation visuelle implique donc des modifications physico-chimiques membranaires, notamment en terme de perméabilité aux ions mais aussi en terme d'organisation moléculaire du pigment visuel (Maeda et Yoshizawa, 1982).

L'étape initiale du processus visuel est l'absorption d'un photon par une molécule de rhodopsine. Cet acte photochimique implique les étapes suivantes: 1) une excitation électronique du chromophore, 2) des transitions non radiatives par lesquelles l'énergie d'excitation est canalisée dans un état particulier à partir duquel l'événement chimique ou physique initial se produit et 3) l'événement initial lui-même, au cours duquel le chromophore subit un changement intra et/ou intermoléculaire avec transfert concomitant d'une fraction importante de l'énergie d'excitation électronique à la protéine (Uhl et Abrahamson, 1981).

Les événements s'enchaînent par la suite à l'obscurité. La rhodopsine s'engage dans une séquence de photodécoloration comportant des changements conformationnels de l'opsine avant de se terminer par une hydrolyse relativement lente libérant le rétinal de l'opsine. C'est avant cette dernière étape que se joue le phénomène de la transduction visuelle et un des photoproduits de la rhodopsine y serait directement impliqué.

La rhodopsine est très sensible à la lumière, son rendement quantique de photodécoloration est de 0.67 dans la région visible du spectre d'absorption (Hurley et al., 1977). La séquence photolytique de la rhodopsine bovine (figure I-7) consiste en une suite d'intermédiaires différenciables par leur spectre d'absorption. Les espèces intermédiaires spectrales de la rhodopsine bovine sont une indication séquentielle et cinétiquement reproductible des interactions chromophore-protéine (Ostroy et al., 1981). Tous les intermédiaires ont été découverts en premier lieu grâce à la spectroscopie électronique à basse température et ultérieurement identifiés par photolyse éclair à température ambiante.

A la température de l'hélium liquide, la séquence photolytique débute avec l'hypsorhodopsine (Yoshizawa, 1972). Cet intermédiaire吸erce maximalement à 430 nm, possède un chromophore tout-trans très tordu (Yoshizawa et Shichida, 1982) et n'est pas observé par tous les chercheurs. Une seule expérience de photolyse éclair signale la présence d'un intermédiaire bleu précédant la bathorhodopsine (Kobayashi, 1979, 1980).

A la température de l'azote liquide, le premier photoproduit détectable de la rhodopsine est la bathorhodopsine. L'événement photochimique primaire a été supposé être l'isomérisation cis-trans du chromophore (Rosenfeld et al., 1977, Eyring et al., 1980). Le temps d'apparition de la bathorhodopsine est cependant trop court pour une isomérisation cis-trans complète. La translocation de proton a été proposée en alternative (Van der Meer et al., 1976) mais de-

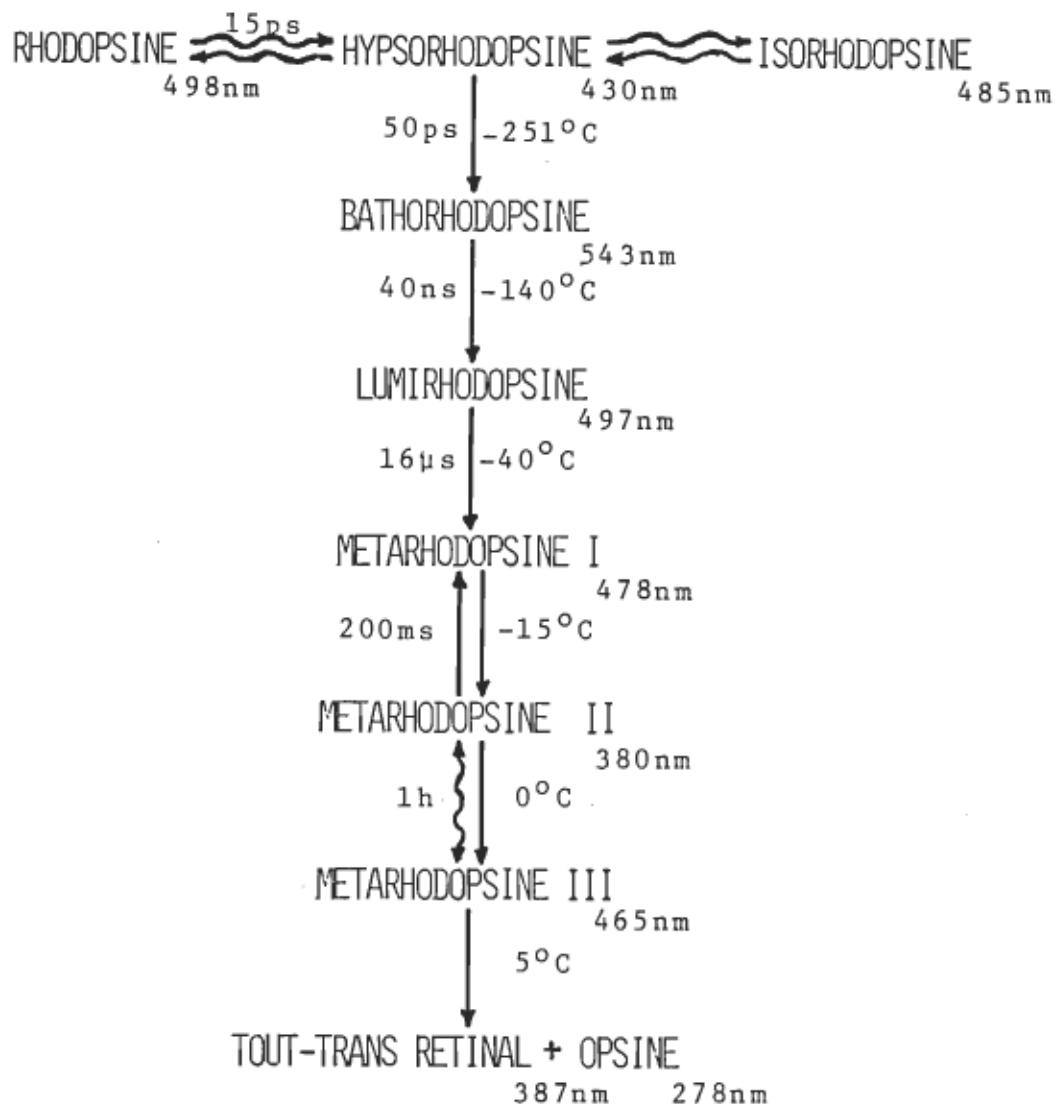


Figure I-7: Séquence photolytique de la rhodopsine bovine (Yoshizawa, 1972, Yoshizawa et Shichida, 1982). Les intermédiaires de blanchiment de la rhodopsine sont l'hypso-, la batho-, la lumi- et les métarhodopsines I, II et III. Les photoréactions sont indiquées par les flèches ondulées et les réactions thermiques par les flèches droites. Les températures de transition d'un intermédiaire à un autre intermédiaire, mesurées en spectroscopie d'absorption à basse température, sont indiquées à la droite des flèches. Les temps de vie des intermédiaires, mesurés en photolyse éclair à température ambiante, sont à la gauche des flèches. Sous irradiation appropriée, la plupart des espèces intermédiaires pourraient se reconvertisir en rhodopsine.

meure controversée (Eyring et Mathies, 1979). La demi-vie de la bathorhodopsine est de 13 à 380 ps à 38°C dans les S.E.B. (Pratt et al., 1964) et de 19 ps dans le DDAO, à 23°C (Busch et al., 1972). A l'origine nommée prélumirhodopsine (Yoshizawa et Wald, 1963), la bathorhodopsine voit le chromophore passer de la forme 11-cis à une configuration tout-trans contrainte et distordue entre le onzième et le douzième carbone. Ce changement de configuration amène un large déplacement bathochromique du maximum d'absorption qui se retrouve à 543 nm (Yoshizawa et Wald, 1963, Abrahamson et Ostroy, 1967). Le coefficient d'extinction molaire de cet intermédiaire est de 45 900 l mole⁻¹ cm⁻¹ (Yoshizawa et Wald, 1963). Dans la suite du blanchiment, les modifications conformationnelles de l'op-sine entraînent un changement d'orientation du chromophore dans le plan perpendiculaire à la membrane discale (Kawamura et al., 1977).

En réchauffant la bathorhodopsine à l'obscurité, on note l'apparition du second intermédiaire de la séquence photolytique (Broda et Goodeve, 1941). Pendant la conversion thermique de la batho-en lumirhodopsine, le chromophore complète son isomérisation à la forme tout-trans non tordue. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de la lumirhodopsine est quinze pour-cent plus grand que celui de la rhodopsine, ce qui suggère la configuration trans du chromophore (Hubbard et Kropf, 1958). Par rapport à la rhodopsine, la lumi-rhodopsine présente un déplacement hypsochromique, son maximum d'absorption se situe à 497 nm. A 37°C, la demi-vie de cet intermédiaire est de 100 μs dans les S.E.B. et 150 μs dans la digitonine.

(Von Sengbusch et Stieve, 1971). Les petites valeurs des paramètres d'activation pour la réaction batho- \rightarrow lumirhodopsine suggèrent un changement conformationnel ou un déplacement de charge très mineur lors de cette étape. Le transfert d'énergie du chromophore à la protéine est complété au moment où la lumirhodopsine est formée. Les intermédiaires subséquents dans la séquence photolytique de la rhodopsine représentent une dissipation de cette énergie.

La disparition de la lumirhodopsine n'est pas dépendante de l'environnement aqueux de la protéine. Identifiée par Matthews et al. (1963), la métarhodopsine I présente un changement d'interaction entre le groupe prosthétique et l'opsine à cause d'une modification mineure de la structure de cette dernière. Tout comme la méta-II, la métarhodopsine I est constituée de tout-trans rétinal lié à l'opsine. Elle montre un pic d'absorbance à 478 nm (Ostroy et al., 1966) et a un coefficient d'extinction molaire de $43\ 000\ \text{dm}^3\ \text{mole}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (Hubbard et Kropf, 1959). Les paramètres d'activation mesurés pour la transition lumi- \rightarrow métarhodopsine I sont très diversifiés (Rapp et al., 1970). Un changement dans la nature de la réaction dépendant de la température ou bien la phosphorylation d'un intermédiaire pourrait expliquer la diversité des résultats. Il existerait au moins deux formes isochromiques de métarhodopsine I différenciables par leur cinétique de formation (Stewart et al., 1977, Hoffmann et al., 1978). Dans les S.E.B., la demi-vie de cet intermédiaire est de 693 μs à 34°C (Applebury et al., 1974) et de 370 μs (Stieve et al., 1973) à 580 μs (Busch et al., 1972) à 37°C . Dans le DDAO, on enregistre une valeur de 53 μs à 23°C (Applebury et al., 1974) comparativement à 1 050 μs

à 37°C dans la digitonine (Von Sengbusch et Stieve, 1971).

La conversion thermique des intermédiaires de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine se poursuit avec l'augmentation de la température. Le premier intermédiaire apparemment impliqué chimiquement dans des processus intermoléculaires serait soit la métarhodopsine I, soit la métarhodopsine II (Uhl et Abrahamson, 1981). Lors du passage métarhodopsine I → II, des lipides (Applebury et al., 1974, O'Brien et al., 1977), des ions H_3O^+ (Falk et Fatt, 1966, Emrich et Reich, 1974) et de l'eau (Kimbrel et al., 1970, Bonting et al., 1977) sont nécessaires. L'énergie d'activation (≈ 33 Kcal/mole) pour la transition est consistante avec la scission de quatre à six liens hydrogène qui accompagne habituellement les modifications de conformation des protéines.

Plusieurs critères favorisent l'idée d'un changement conformationnel majeur lors de la réaction métarhodopsine I → II: 1) les grandes valeurs d'enthalpie et d'entropie d'activation, 2) l'accèsibilité du site de liaison du chromophore au borohydrure de sodium et 3) le site de liaison du chromophore devient déprotoné alors que la protéine prend des protons du milieu environnant. Cette transition est très sensible à la composition de son microenvironnement (Liebman et al., 1974, Dowmer et Engländer, 1977, Ostroy, 1977). Dans la digitonine à 20°C, la demi-vie de la métarhodopsine II est de 4 076 s (Von Sengbusch et Stieve, 1971).

Les espèces métarhodopsines I et II sont en équilibre dépen-

dant du pH et de la température. Des températures élevées et un pH acide favorisent la formation de métarhodopsine II. Cet intermédiaire吸吸 avec un maximum à 380 nm et a le même coefficient d'extinction molaire que la rhodopsine (Matthews et al., 1963). A compter de cette transition, le pigment visuel est décoloré et apparaît jaune pâle.

In situ, la disparition de la métarhodopsine II pourrait suivre deux voies physiologiques. Ostroy et Abrahamson (1966) soutiennent qu'elle se transforme quantitativement en métarhodopsine III, aussi appelé pararhodopsine ($\lambda_{\text{max}} 465 \text{ nm}$). Cette dernière forme le N-rétylidène opsine dont l'hydrolyse libère le rétinal de l'opsine. Selon Matthews et al. (1963), la métarhodopsine II s'hydrolyse directement en tout-trans rétinal et opsine, la métarhodopsine III est ici un produit secondaire et peut-être même un artefact. Quoiqu'il en soit, la disparition de la métarhodopsine II entraîne un déploiement de la protéine et l'exposition de deux groupes sulfhydryles (Kimble et Ostroy, 1973). Les maxima d'absorption du tout-trans rétinal et de l'opsine sont situés respectivement à 387 et 278 nm. Un processus enzymatique permet la ré-isomérisation du rétinal à sa forme 11-cis.

La quantité de pigment visuel contenue dans l'oeil n'est pas infinie. L'hydrolyse des métarhodopsines II ou III est donc suivie d'un processus de ré-assemblage. Le pigment photosensible doit pouvoir être régénéré une fois modifié par la lumière, sinon la vision serait un phénomène éphémère. Par contre, la rhodopsine

doit être stable à l'obscurité sinon sa décomposition spontanée produirait des sensations lumineuses parasites. Enfin, la forme modifiée du pigment, induisant la vision, doit s'éliminer très vite sinon la sensation lumineuse se prolongerait en l'absence de stimulus. La vision est un phénomène physiologique très rapide et l'entièvre séquence photolytique de la rhodopsine bovine ne dure que quelques millisecondes *in vivo*.

6. La transduction visuelle

On pourrait définir la transduction visuelle comme étant la conversion de l'énergie lumineuse absorbée par la cellule photoréceptrice en potentiel d'action. Il est logique de penser qu'au moins une étape de la séquence photolytique de la rhodopsine soit impliquée dans le déclenchement du phénomène de transduction. Considérant les processus physiques ou chimiques possibles de communication de la rhodopsine avec son environnement, l'étape déclencheante ne se produit pas avant la disparition de la lumi-, ni après la disparition de la métarhodopsine II.

La rhodopsine photoactivée pourrait 1) former un pore, 2) se lier à ou relâcher une substance, 3) se lier à une autre composante membranaire, permettant à cette composante de former un pore ou de devenir enzymatiquement active ou 4) être un enzyme activé par la lumière. Tous ces processus requièrent un changement de conformation de l'opsine induit par la lumière, ce qui n'a pas été observé avant la disparition de la lumirhodopsine (Ebrey et Honig, 1975). La disparition de la métarhodopsine II et les réactions subséquentes

sont beaucoup trop lentes pour être impliquées dans la transduction.

Le résultat ultime de l'absorption de photons par la rhodopsine est une diminution du flux d'ions Na^+ à travers la membrane plasmique du S.E.B., engendrant une onde d'hyperpolarisation (Hagins et al., 1970, Zuckerman, 1973, Wormington et Cone, 1978).

Presque toutes les molécules de rhodopsine sont dans les membranes discales, isolées de la membrane plasmique. Le signal entraînant l'hyperpolarisation doit être transporté des disques vers la membrane plasmique. Un messager interne doit donc être modulé pour coupler la production d'un intermédiaire de la séquence de blanchiment à la fermeture des pores à sodium. Une seule photoisomérisation peut bloquer le flux de 10^6 ions Na^+ vers l'intérieur du S.E.B. (Stryer et al., 1981). Il a été calculé qu'entre l'absorption initiale d'un photon et les événements électriques qui s'ensuivent, une amplification de l'ordre de 10^7 doit se produire dans la cellule photoréceptrice (Kohnken et al., 1981).

Le premier messager proposé a été le calcium (Hagins, 1972). Sous exposition de la cellule photoréceptrice à la lumière, l'ion Ca^{++} est relâché par les disques dans le cytoplasme. La rhodopsine photoexcitée agirait comme un pore à calcium, permettant un déplacement d'ions par diffusion vers la membrane plasmique. Le calcium pourrait alors obstruer les pores à Na^+ de la membrane plasmique ou en modifier le champ électrique.

L'hypothèse de Hagins propose que le calcium soit pompé activement dans les disques à l'obscurité, maintenant peu de cet ion dans le cytoplasme. L'accumulation de Ca^{++} dans les disques dépend de la concentration du Ca^{++} cytoplasmique et tire l'énergie requise de l'hydrolyse de GTP (Fatt, 1979). Plusieurs évidences expérimentales supportent l'hypothèse du calcium. En absence de Ca^{++} ou en présence de complexe Ca^{++} -chélatant, la cellule photoréceptrice est désensibilisée. A l'obscurité, les disques sont chargés de calcium bien que le transport actif de cet ion n'ait jamais été mis clairement en évidence. L'attrait le plus évident de cette hypothèse demeure sa simplicité et sa vraisemblance est maintenant reconsidérée (Fatt, 1979, Bownds, 1981, Uhl et Abrahamson, 1981). Le Ca^{++} ne peut ni être assez efficace ni quantitativement assez abondant pour satisfaire l'amplification requise dans le phénomène de transduction (Fatt, 1979, Uhl et Abrahamson, 1981). Sa diffusion dans le cytoplasme est trop lente et on le suppose complexé à une protéine (Kaupp et al., 1979). Plus encore, Szuts (1980) a démontré que le pompage et le relargage de Ca^{++} par la membrane discale n'est pas une propriété significative.

Plus récemment, un autre messager a été proposé: le GMP cyclique (Stryer et al., 1981). Les S.E.B. renferment une très forte concentration de GMPc, plus que dans tout autre tissu nerveux. Sous illumination, cette concentration diminue de façon très marquée (Woodruff et Bownds, 1979). Le GMPc garde les pores à sodium ouverts et l'illumination en entraîne la fermeture suite à une di-

minution de GMPc (Stryer et al., 1981). L'hypothèse du GMPc introduit une amplification en deux paliers: 1) l'activation de plusieurs centaines de molécules de phosphodiesterase et 2) l'hydrolyse de GMPc par la PDE activée (Liebman et Pugh, 1979). L'activation de la PDE requiert la présence de GTP et le contact avec un photoproduit de la rhodopsine (Wheeler et Bitensky, 1977, Yee et Liebman, 1978). L'hydrolyse du GTP n'est pas requise pour l'activation de la PDE (Wheeler et Bitensky, 1977, Robinson et Hagins, 1977, 1979).

En plus de la rhodopsine, deux protéines membranaires périphériques sont nécessaires à l'explication du mécanisme: la phosphodiesterase et une protéine GTP-liante (Kühn et al., 1981). A l'obscurité, presque toute la protéine GTP-liante est associée à du GDP et n'active pas d'enzyme. La rhodopsine photoexcitée catalyse l'échange de GDP pour du GTP sur la protéine GTP-liante possédant une activité GTPase lente (Wheeler et Bitensky, 1977, Fung et Stryer, 1980). Une seule molécule de rhodopsine est capable d'activer 500 molécules de protéine GTP-liante (Yee et Liebman, 1978, Liebman et Pugh, 1980). La forme activée de la protéine GTP-liante active une GMPc phosphodiesterase (Liebman et Pugh, 1981, Bennett, 1982). Une rhodopsine photolysée induit finalement l'activation de 500 molécules de PDE, chacune hydrolysant des milliers de GMPc (Fung et Stryer, 1980). La conductance au Na^+ de la membrane plasmique est diminuée ce qui provoque le potentiel d'action (Miller, 1981, Miller et Laughlin, 1983). L'hydrolyse lente du GTP sur la protéine GTP-liante renverse l'activation de la PDE (Bitensky et

al., 1978) et retourne aussi la protéine GTP-liante (aussi appelée protéine G et transducine) à sa forme inactive associée au GDP.

L'hypothèse du GMP cyclique (figure I-8) propose une suite de réactions assez rapides et une amplification suffisante pour expliquer la transduction visuelle (Stryer et al., 1981). Elle ferait cependant intervenir un trop grand nombre de protéines. La vitesse des réactions enzymatiques, et en particulier celle de la formation du GMPC, représente un facteur critique de ce mécanisme (Fleischmann et Denisevich, 1979). Les concentrations de GTP et de GMPC sont aussi des facteurs critiques dans la séquence d'amplification entre les disques et la membrane plasmique (Woodruff et Bownds, 1979, Fung et Stryer, 1980, Liebman et Pugh, 1980). D'autres agents de régulation peuvent aussi jouer un rôle limitatif (Stavenga et De Grip, 1983): 1) la phosphorylation des intermédiaires de la séquence photolytique (Yamamoto et Shichi, 1983), 2) une kinase spécifique (Kühn, 1981) et 3) la modulation de l'activité de la PDE par une protéine inhibitrice (Hurley, 1982).

L'hypothèse du calcium et celle du GMP cyclique ne sont peut-être pas irréconciliables puisque ces deux substances miment l'action de la lumière sur la cellule photoréceptrice. D'ailleurs non seulement l'addition de Ca^{++} diminue la perméabilité de la membrane plasmique au sodium (Bownds et Brodie, 1975) mais aussi elle diminue la concentration de GMPC dans les S.E.B. (Woodruff et Bownds, 1979). On peut supposer que le rôle du Ca^{++} serait de participer à l'activation de la PDE (Fatt, 1979). Il existe dans les S.E.B. une pro-

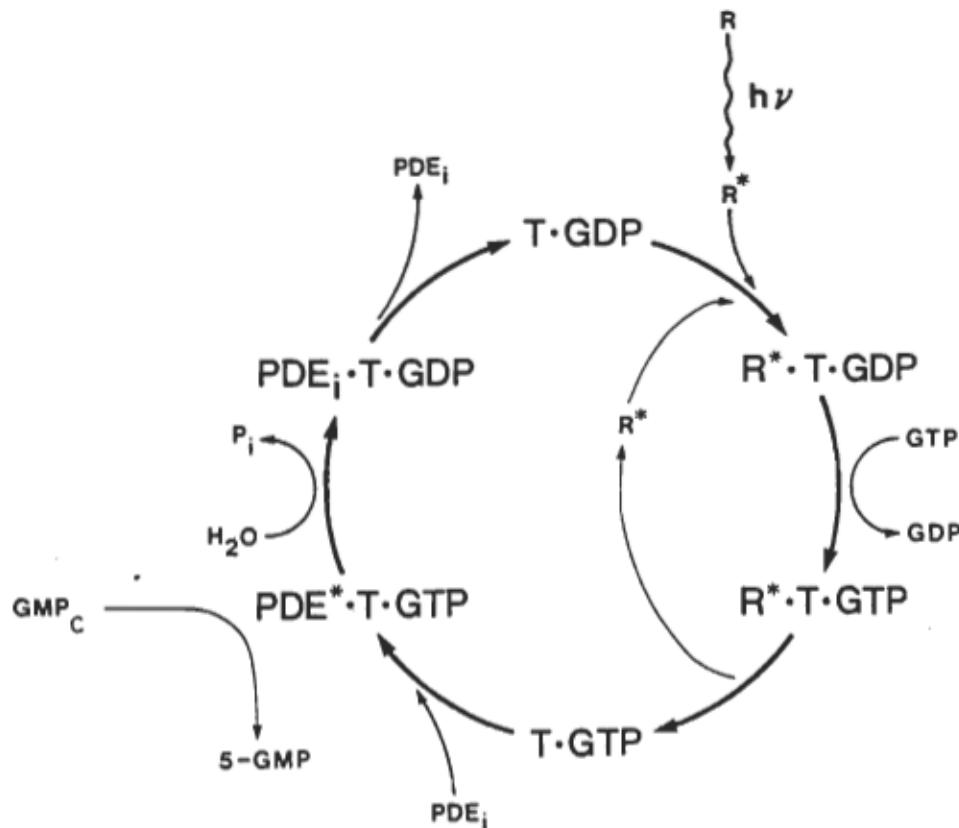


Figure I-8: Hypothèse de GMP cyclique (Stryer et al., 1981). La transduction visuelle pourrait s'expliquer par une amplification en deux paliers. Une rhodopsine photolysée peut catalyser l'échange de GDP pour du GTP sur plusieurs centaines de protéines GTP-liantes. Ces dernières sont alors capables d'activer la phosphodiestérase qui peut hydrolyser des milliers de GMP_c. La signification des abréviations utilisées est la suivante: R (rhodopsine), R* (rhodopsine photolysée), T (protéine GTP-liante), PDE_i (phosphodiestérase inactivée) et PDE* (phosphodiestérase activée).

téine, la calmoduline, impliquée dans la régulation de réactions sensibles à la concentration des ions calcium (Kohnken et al., 1981). Il a été démontré qu'une PDE du cerveau a une activité modulée par la calmoduline (Cheung, 1971). La calmoduline des S.E.B. ne semble cependant pas régulariser le GTP ni la PDE activée par la lumière (Kohnken et al., 1981).

Bien des études seront nécessaires pour élucider le phénomène de la transduction visuelle en termes moléculaires. Les modèles existants sont incomplets. Aucun d'eux ne tient compte du fait que les disques pompent des protons à l'obscurité (Bennett, 1978). Les disques gonflent à l'obscurité, ce qui confirme l'entrée des H^+ . La pompe à protons serait une ATPase. Curieusement, les déplacements du Ca^{++} et de H^+ seraient couplés (Kaupp et al., 1981) et étrangement, le GMPc favorise le pompage de H^+ dans les disques puisqu'il est un activateur de l'ATPase (Abrahamson, 1982).

7. Pertinence du travail

La membrane discale est le siège d'une fonction biologique essentielle. D'intenses recherches sont en cours pour établir un lien entre l'événement photochimique primaire chez la rhodopsine et l'hyperpolarisation de la membrane plasmique des cellules photoréceptrices. Un des intermédiaires photochimiques de la rhodopsine serait impliqué dans la transduction visuelle.

De nombreuses études ont suggéré l'importance de la réaction métarhodopsine I \rightarrow II. Abrahamson et Ostroy (1967) ont proposé que cette transition est responsable du processus de phototrans-

duction, étant la dernière réaction assez rapide dans la séquence photolytique. Elle implique aussi des changements de conformation majeurs et des interactions avec l'environnement moléculaire. Des études récentes ont relié la transition métarhodopsine I → II au largage de Ca^{++} par la membrane discale (Kaupp et al., 1980). Une augmentation de perméabilité au Ca^{++} associée à l'intermédiaire métarhodopsine II a été observé dans la membrane discale (Smith et al., 1977) et aussi dans des vésicules de PC et PE d'oeuf, et de PS bovine (Tyminski et al., 1982). La transition métarhodopsine I → II est associée à l'activation de la phosphodiesterase (Parkes et al., 1979). La métarhodopsine II est couplée à la protéine GTP-liante (Bennett et al., 1982, Emeis et al., 1982) ou à une protéine ATP-liante (Zuckerman et al., 1982). Le pompage rapide de protons qui accompagne la transition métarhodopsine I → II (Kaupp et al., 1979 a, b, Bennett, 1980) serait couplé au largage de Ca^{++} (Kaupp et al., 1981) en raison de cinétiques similaires et d'une dépendance du pH. Le site sensible au pH impliqué dans la transition des métarhodopsines réside sur la face interne de la membrane discale (Schnetkamp et al., 1981). Dans un autre ordre d'idée, la formation de la métarhodopsine II cause une diminution de la concentration des nucléotides triphosphatés du S.E.B. (Zuckerman et Weiter, 1980).

Notre recherche vise à approfondir la compréhension du mécanisme moléculaire de la vision. L'étude de ce phénomène exige une bonne connaissance des interactions de la rhodopsine avec son environnement moléculaire. Nous avons constaté dans la section précédente que la transition métarhodopsine I → II est possiblement à

l'origine du changement d'équilibre initiant la transduction visuelle. Cette transition est particulièrement dépendante de la composition de l'environnement lipidique du pigment visuel. La bicouche de la membrane discale est particulièrement fluide et riche en acides gras à longues chaînes insaturées. Il y a tout lieu de croire que la présence de ces lipides joue un rôle important dans la transduction visuelle car ils influencent grandement la vitesse de décoloration de la rhodopsine. Ainsi la rhodopsine délipidée, en présence de détergent, montre une vitesse de formation de la métarhodopsine II de l'ordre de 100 μ s, soit 1 000 fois plus rapide que dans la membrane discale (Applebury et al., 1974, Litman et al., 1981). D'autre part, quand les phospholipides naturels sont remplacés par des lipides à chaînes saturées, la même réaction est ralentie 150 fois (O'Brien et al., 1977). Pour cette raison et aussi parce que les modifications spectrales sont très importantes lors de cette transition, notre étude de la séquence photolytique sera principalement orientée vers les métaintermédiaires. Le pigment visuel sera photolysé dans ses lipides d'origine, dans un détergent connu (Ammonyx-L0) et aussi dans un nouveau détergent employé pour solubiliser la rhodopsine bovine (L-1690). Il est cependant possible que les variations structurales entre les membranes et les micelles de détergents soient responsables des différences observées. Le rayon de courbure des micelles de détergent et l'interaction avec l'eau peuvent affecter grandement le taux de transformation d'un intermédiaire en un autre intermédiaire au cours de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine (Kusumi et al., 1983).

8. Problématique du travail

Avant d'étudier la photodécoloration du pigment visuel, nous devons l'extraire des tissus biologiques frais et le purifier convenablement. La méthode choisie doit être quantitativement rentable et rendre la rhodopsine sous une forme exempte de contaminants. Nous avons combiné l'utilisation de gradients de sucre (Papermaster et Dreyer, 1974), le fractionnement au sulfate d'ammonium (Makino et al., 1977) et la chromatographie d'affinité sur concanavagine (van Breugel et al., 1977) pour obtenir nos échantillons de rhodopsine, soit dans la membrane discale avec les lipides naturels, soit dans un détergent remplaçant l'enrobage lipidique original. Les S.E.B. sont obtenus par agitation et homogénéisation douce des rétines dans une solution de sucre tamponnée contenant des sels. Cette solution minimise la fragmentation des cellules, simplifiant l'élimination des contaminants lors des étapes suivantes. La composition en sels réduits les effets de Donnan et le sucre permet de faire flotter les S.E.B. On retrouve environ 2 mg de rhodopsine dans une rétine et il n'est pas rare d'en récupérer plus de la moitié lors de la séparation sur gradient de sucre (Papermaster et Dreyer, 1974, Makino et al., 1977). Des concentrations de 37% à 60% en sulfate d'ammonium saturé permettent de séparer la rhodopsine de ses contaminants. On retrouve 70 à 90% de la rhodopsine des S.E.B. entre 50% et 60% de saturation en sulfate d'ammonium. Le rapport A_{278}/A_{498} peut varier de 1.60 à 1.90 (Makino et al., 1977). La purification du pigment se termine avec la chromatographie

d'affinité dont le rendement est de 90% (van Breugel et al., 1977). Les détergents qui y sont employés sont choisis de façon à ne pas altérer significativement les propriétés spectrales du pigment visuel. L'Ammonyx-LO et le L-1690 déplacent l'équilibre des métarhodopsines vers la production de métarhodopsine II (Mc Connell et al., 1981, Motoyama et Kito, 1981). La fluidité micellaire relative de chacun des détergents a été évaluée par des mesures de polarisation de fluorescence et de résonnance paramagnétique électronique.

Chacun des intermédiaires de la séquence de photodécoloration de la rhodopsine est différentiable spectralement, soit en fonction de sa stabilité thermique, soit en fonction de sa cinétique de transformation en un autre intermédiaire. Notre travail repose sur une double approche expérimentale de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine; soit l'utilisation de la spectroscopie électronique à basse température et de la photolyse éclair.

Aux températures ambiante et physiologique, cette séquence n'est pas observable. Le passage d'un intermédiaire à un autre est alors trop rapide. A basse température, la séquence photolytique est ralentie et chacun des intermédiaires est stable sur une plage de température qui lui est propre. A la température de l'hélium liquide (4 K), la rhodopsine irradiée en lumière orangée produit l'hypsorhodopsine. Si la rhodopsine est illuminée avec de la lumière bleue, à la température de l'azote liquide (77 K), le premier intermédiaire stable est la bathorhodopsine. L'irradiation dans le bleu prévient la formation d'un pigment amorphe et stable,

l'isorhodopsine (Yoshizawa, 1972, Yoshizawa et Shichida, 1982). En augmentant la température, sans illumination subséquente, on peut enregistrer le spectre d'absorption caractéristique de chacun des intermédiaires. Le passage d'un intermédiaire au suivant a lieu à une température spécifique, appelée température de transition. Le tableau I-1 présente des valeurs obtenues par d'autres chercheurs. L'origine de chaque intermédiaire est révélée par des spectres de différence et chaque transition peut être évaluée en fonction du temps et de son niveau d'accomplissement. Pour éviter les fissures dans les échantillons refroidis à 77 K, on y ajoute du glycérol (Yoshizawa, 1972). Ce dernier favoriserait la production de métarhodopsine II (Motoyama et Kito, 1981).

En photolyse éclair, l'étude des premiers processus intermédiaires de la rhodopsine excitée nécessite un équipement très élaboré. A 37°C, la transition rhodopsine + bathorhodopsine est excessivement rapide, de l'ordre de la nanoseconde (Busch et al., 1972, Rosenfeld et al., 1972, Bensasson et al., 1977). Les premières transitions de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine seraient des combinaisons de plusieurs réactions de premier ordre (Applebury et Rentzepis, 1982). La transition métarhodopsine I + II peut être suivie à l'aide d'une instrumentation conventionnelle possédant une résolution de l'ordre de la microseconde. Les cinétiques de disparition de la métarhodopsine I ou de formation de la métarhodopsine II sont fortement influencées par l'environnement moléculaire du pigment visuel. Les échantillons de rhodopsine ont

Tableau I-1

Températures de transition entre les intermédiaires de la rhodopsine bovine

Auteurs et Environnement	Batho- → Lumirhodopsine	Lumi- → Métarhodopsine I	Méta-I → Métarhodopsine II
Yoshizawa (1972)			
Digitonine - 66% glycérol	133 K	233 K	258 K
S.E.B. - 75% glycérol			
Motoyama et Kito (1981)			
S.E.B. - 75% glycérol	130 K	205 K	250 K
Applebury et al. (1974)			
Ammonyx-LO - 50% éthylène glycol	130 K	> 160 K	233 K
Motoyama et Kito (1981)			
L-1690 - 67% glycérol	115 K	230 K	235 K

été photolysés dans l'Ammonyx-L0 et dans le L-1690. La trop grande diffusion de lumière par les membranes discales des S.E.B. oblige à les solubiliser pour ce type d'expérience, ou bien exigerait l'utilisation d'une sphère intégratrice. A température ambiante, la transition est de l'ordre de la milliseconde dans la membrane discale et de dizaines de microsecondes dans les détergents (Abrahamson et Wiesenfeld, 1972, Applebury et al., 1974).

Plusieurs renseignements ressortent de l'analyse des cinétiques mesurées en photolyse éclair. L'évolution des réactions en fonction du temps permet le calcul des constantes de vitesse. Les paramètres thermodynamiques d'activation associés à la transition métarhodopsine I → II sont déterminés par la dépendance thermique des vitesses de réaction. Les variations d'enthalpie et d'entropie d'activation sont le reflet des changements conformationnels qui se produisent lors de la transition. Le tableau I-2 présente des résultats antérieurs à notre recherche.

La problématique du travail repose sur l'étude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine, plus particulièrement de la transition métarhodopsine I → II, dans des environnements moléculaires bien caractérisés. La spectroscopie électronique à basse température et la photolyse éclair ont été adaptées à ce travail.

Tableau I-2

Vitesse de formation et paramètres thermodynamiques
associés à la formation de métarhodopsine II

Auteurs Échantillon	Température k (s^{-1})	Température k (s^{-1})	ΔG^\ddagger	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger
Prat et al. (1964)	$10^\circ C$	$20^\circ C$			
S.E.B.	6.0	50	35	28	70
	1.3	12	37	29	74
Von Sengbusch et Stieve (1971)	$37^\circ C$		$E_A = 33.7$ Kcal/mole		
Suspension de S.E.B.	1 180				
Rapp (1971)	$18^\circ C$	$39.4^\circ C$			
S.E.B. soniqués	41.4	1 480	14-15	30.7	54.8
Applebury et al. (1974)	$20^\circ C$		$E_A = 35$ Kcal/mole		
S.E.B. soniqués	55		14.5	35	69
Baker et al. (1977)	$20^\circ C$				
S.E.B. soniqués	72.9		14.5	40.2	88.3
Lewis et al. (1981)	$10^\circ C$	$20^\circ C$			
Suspension de S.E.B.	7.2	50	$E_A = 31.3$ Kcal/mole		
	2.1	10	$E_A = 24.2$ Kcal/mole		

Tableau I-2 (suite)

Auteurs Echantillon	Température $k\text{ (s}^{-1}\text{)}$	Température $k\text{ (s}^{-1}\text{)}$	ΔG^\ddagger	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger
O'Brien (1982)	22°C				
S.E.B.	75				
S.E.B. et PC d'oeuf	77				
Wulff et al. (1958)	28°C	36.7°C			
Rhodopsine-digitonine (pH = 7)	3 300 120 21	22 000 2 700 200	12.5 14.5 15.8	36.2 50.2 43.0	78 119 90
Abrahamson et al. (1960)	6.7°C	15.8°C			
Rhodopsine-digitonine (pH = 7)	577 45.5 0.88	303 9.9	15.0 15.6	37.1 43.1	76.5 95.2
Ostroy et al. (1966)	-9.2°C	-13.7°C			
Rhodopsine-digitonine (pH = 5.85) (33% glycérol) (pH = 4.5)	0.0353 0.0836	0.0051 0.0121		59.9 58.7	162 159
Pratt et al. (1964)	5°C	25°C			
Rhodopsine-digitonine (pH = 7)	0.45 0.09	126 17		43 41	97 83
Von Sengbusch et Stieve (1971)	37°C				
Rhodopsine-digitonine	1 150		$E_A = 33.0 \text{ Kcal/mole}$		

Tableau I-2 (suite)

Auteurs Echantillon	Température $k (s^{-1})$	Température $k (s^{-1})$	ΔG^\ddagger	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger
Applebury et al. (1974)	20°C			$E_A = 19 \text{ Kcal/mole}$	
Rhodopsine-Ammonyx-LO	11 000		11.5	19	28
Baker et al. (1977)	20°C				
Rhodopsine-Digitonine	86.6		14.5	56.6	143.8
Rhodopsine-CTAB	4 770		12.1	31.4	65.8
Rhodopsine-Ammonyx-LO	9 750		11.7	19.2	25.6
Rhodopsine-Emulphogène	11 700		11.6	17.0	18.3
BC-720 (pH = 6.5)					

II- MATERIEL ET METHODES

1. Matériel et méthodes

Cette section présente notre démarche expérimentale. On y retrouve l'ensemble de nos protocoles et le détail de chacune des manipulations. L'ordre de présentation choisi reflète la progression logique, la pertinence et les buts visés par notre recherche. Dans un premier temps, nous avons dû isoler et purifier la rhodopsine bovine. Dans un second temps, il convenait de caractériser la protéine et son environnement moléculaire; et dans un troisième temps, nous avons étudié la séquence photolytique du pigment visuel.

La liste des produits chimiques, des solvants et des appareils utilisés fait l'objet des trois prochains tableaux. Des renseignements relatifs à la qualité, la pureté, la provenance ou autres caractéristiques du matériel utilisé y sont inclus.

En recherche fondamentale, les buts fixés sont souvent atteints en se référant aux chercheurs nous ayant précédés. Nos travaux ont emprunté à d'autres chercheurs certains de leurs éléments.

Notre méthode de purification de la rhodopsine bovine s'apparente à celle de Makino et al., (1977). L'utilisation de gradients continus de sucre permet d'obtenir des S.E.B. sous une forme très pure, et facilite le fractionnement au sulfate d'ammonium. La chromatographie d'affinité parachève la délipidation de la rhodopsine et permet de la solubiliser dans le détergent choisi. Pour caractériser la protéine et son environnement moléculaire, nous avons

fait appel à des méthodes d'analyse conventionnelles.

Notre étude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine comporte deux volets. En premier lieu, nous avons utilisé la spectroscopie électronique à basse température selon une technique s'inspirant fortement des travaux de Yoshizawa (1972). La préparation des échantillons dans le glycérol est caractéristique des expériences à basse température. Nos particularités se situent au niveau de l'irradiation du pigment visuel et de l'enregistrement des spectres d'absorption après stabilisation des espèces présentes à une température donnée. En second lieu, les expériences de photolyse éclair présentent des similitudes avec les travaux de plusieurs auteurs dont Rapp, (1979) pour la description du montage, Lewis et al., (1981) pour l'utilisation d'un laser à colorant, Litman et al., (1982) pour le choix du colorant, Stewart et al., (1976) pour la quantité de pigment photolysé par un éclair et Applebury et al., (1974) et Baker et al., (1977) pour les cinétiques de référence dans l'Ammonyx-L0. L'utilisation de L-1690 pour les études à basse température et celles en photolyse éclair demeure un point majeur d'originalité.

Tableau II-1

Liste des produits chimiques

Produit chimique	Provenance	Caractéristiques
acide acétique	Fisher Sci. Co.	Reagent 99.8%
L-acide ascorbique	Fisher Sci. Co.	Reagent grade
acide chlorhydrique	J.T. Baker	Analyzed reagent spécifié A.C.S.
acide cholique (sel de sodium)	Sigma Chem. Co.	98%
acide perchlorique	J.T. Baker	Analyzed Reagent
acide sulfurique	J.T. Baker	Analyzed Reagent spécifié A.C.S.
acrylamide	Bio-Rad Lab.	Electrophoresis purity Reagent, > 99.9%
Ammonyx-LO	Onyx Chem. Co.	30% v/v
ANS (sel d'ammonium)	Fisher Sci. Co.	
argon	St-Maurice Oxygène	pré-purifié
azote	St-Maurice Oxygène	
azoture de sodium	Fisher Sci. Co.	purifié

Tableau II-1 (suite)

Produit chimique	Provenance	Caractéristiques
bicarbonate de sodium	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S.
Biogel	Bio-Rad Lab.	A5
bis-acrylamide	Bio-Rad Lab.	Electrophoresis purity Reagent
bleu de bromophénol	Sigma Chem. Co.	
carbonate de sodium	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S.
chlorure de calcium	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. 99.9%
bleu de Coomassie brillant	Sigma Chem. Co.	
chlorure de manganèse	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. cristallin
chlorure de magnésium	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. cristallin
chlorure de sodium	J.T. Baker	Reagent cristallin 99.7%
concanavaline-A Sépharose 4B	Sigma Chem. Co.	suspension 10 mg /ml
Coumarin	Exciton	504
Dextran bleu	Sigma Chem. Co.	
12 (4,4 diméthylloxazolidine) N-oxyl d'acide stérique	Serdary Res. Lab.	

Tableau II-1 (suite)

Produit chimique	Provenance	Caractéristiques
EDTA (sel disodique)	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. 99.3%
éthylène glycol	Fisher Sci. Co.	certifié
β -D (+) glucose	Sigma Chem. Co.	
glycérol	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. 99.5%
2-mercaptopéthanol	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S.
α -méthyl-D-mannopyranoside	Aldrich Chem. Co.	99%
molybdate d'ammonium	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S.
persulfate d'ammonium	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S.
phosphate de sodium (dibasique)	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. anhydre
phosphate de sodium (monobasique)	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. 99.7%
riboflavine	Sigma Chem. Co.	
SDS	Fisher Sci. Co.	Laboratory grade
solution standard de phosphore	Sigma Chem. Co.	
sucrose	Sigma Chem. Co.	Grade I, cristallin
sulfate d'ammonium	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. granulaire
tartrate de potassium et d'antimoine	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S. 99.8%

Tableau II-1 (suite)

Produit chimique	Provenance	Caractéristiques
TEMED	Bio-Rad Lab.	Electrophoresis purity Reagent
Tris ou tri hydroxyméthyl aminométhane	Aldrich Chem. Co.	Grade ultrapur 99.9 + %, hygros- copique
Triton X-100	Sigma Chem. Co.	

Tableau II-2

Liste des solvants organiques

Solvant	Provenance	Caractéristiques
chloroforme	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S.
hexanes	Fisher Sci. Co.	certifié
ligroïne	Anachemia Ltd	spécifié A.C.S.
méthanol	Fisher Sci. Co.	certifié A.C.S.

Tableau II-3

Liste des appareils et des instruments de mesure

Article	Provenance	Caractéristiques
appareil à microdigestion Kjelhdal	Labconco Corp.	
bain thermostaté	Brinkmann Lauda	modèle T2
balance électronique	Ohaus	modèle 1500D
cellule à électrophorèse	Bio-Rad Lab.	modèle 150A
cellules optiques	Hellma	Quartz (1 et 0.1 cm)
centrifugeuse	Sorvall	modèle RC5-B
collecteur de fractions	Gilson	modèle FC-80K
colonnes à chromatographie	Pharmacia fine Chemicals et LKB	modèle K 16/40 modèle 2137
cryostat	Oxford Limited	
lampe tungstène-halogène	Philips Electronics	100 watts
laser à colorant	Synergetics	modèle Chromobeam 1050
lyophilisateur	Labconco Corp.	
pH mètre	Corning	modèle 10

Tableau II-3 (suite)

Article	Provenance	Caractéristiques
projecteur	Kodak	Ektagraphic modèle AF-2
oscilloscope digital	Nicolet	modèle 4094
spectrofluorimètre	Varian	modèle MPF-2A
spectrofluorimètre	Spex	1870
spectrophotomètres	Varian Pye Unicam	modèle Cary 17-D modèle SP-8-100
spectrophotomètre RPE	Varian	modèle E-231 Century Series
tensiomètre	Fisher Sci. Co.	modèle 20
traceuse x-y	Hewlett-Packard	modèle 7015-B
ultracentrifugeuse	IEC	modèle B-60

2. Purification de la rhodopsine bovine

La rhodopsine est une glycoprotéine transmembranaire insoluble dans l'eau. Elle est la principale protéine de structure et surtout de fonction de la membrane discale. *In vivo*, le pigment visuel est continuellement régénéré dans son environnement phospholipidique très fluide.

In vitro, la rhodopsine se décompose de façon irréversible sous exposition à la lumière blanche. En conséquence, les procédures d'isolation doivent être effectuées sous éclairage rouge peu intense ($> 620\text{nm}$). La protéine étant thermolabile, les manipulations se font à une température voisine de 4°C afin d'éviter sa dénaturation.

Aux différentes étapes du processus de purification l'intégrité et la pureté de la rhodopsine sont évaluées, permettant un contrôle rigoureux des échantillons soumis aux études de la séquence photolytique. Plusieurs propriétés physiques et biochimiques de la rhodopsine bovine sont mises à profit lors de sa purification. On fait intervenir tour à tour:

1) son poids moléculaire et la densité caractéristique des S.E.B. intacts lors de la préparation des membranes disciales.

2) sa sensibilité aux fortes concentrations de sels neutres.

En augmentant la force ionique, la solubilité de la rhodopsine diminue si bien qu'à une concentration de sel suffisamment élevée, la protéine précipite en conservant sa

conformation native.

3) sa composition en hydrates de carbone et sa solubilité dans les détergents lors de la chromatographie d'affinité.

A. Procédure de purification de la rhodopsine

L'approvisionnement en matériel biologique frais a lieu à l'Abattoir de la Mauricie Inc. situé à Saint-Louis-de-France. Les yeux sont prélevés des bêtes abattues, puis entreposés à l'obscurité dans un contenant maintenu en chambre froide.

a. Préparation des membranes discales

- Disséquer les yeux de boeufs, au nombre de 100 à 200, dès leur arrivée au laboratoire. Une hémisection transverse permet d'évider le contenu de l'oeil (cristallin et humeurs). Inverser l'oeil, le fond du globe oculaire étant alors sa surface externe.
- Ramasser délicatement la rétine avec le doigt, autour de son point d'attache au nerf optique. Couper la rétine à ce niveau et récolter dans un bécher refroidi sur glace.
- Suspendre les rétines dans le tampon d'isolement à raison de 0.75 ml par rétine. Le milieu d'isolement est un tampon phosphate 15 mM contenant 120 mM de NaCl, 0.4 mM de CaCl₂, 0.4 mM de MgCl₂, 5.0 mM de glucose et ajusté à pH 7.2.
- Faire tourner 10 - 15 minutes à vitesse moyenne, sur un

agitateur magnétique. Lorsque la suspension est mousseuse, terminer le mélange manuellement en brassant vigoureusement. Cette étape a pour but de briser le cil connectif entre les segments interne et externe.

- Filtrer sur 4 épaisseurs de gaze à raison de 50 rétines à la fois. Doubler le volume du filtrat avec du sucre 80% p/v.
- Disposer uniformément dans des tubes à centrifugation en polycarbonate de capacité égale à 40 ml. Déposer environ 1.5 ml de tampon d'isolement par-dessus le sucre.
- Centrifuger 45 minutes à 10 000 tours /minutes. La centrifugeuse utilisée est une Sorvall RC-5B munie d'un rotor à godets oscillants HB-4. En raison de leur faible densité, 1.14 g/ml (Godchaux et Zimmerman, 1979), les S.E.B. flottent sur le sucre tandis que certains contaminants sédimentent.
- Récolter la bande de S.E.B. à la surface du sucre et diluer 4 à 8 fois avec du tampon d'isolement. Bien mélanger les préparations à l'aide d'un Vortex.
- Centrifuger 30 minutes à 15 000 tours /minutes en utilisant lors de cette étape, un rotor SS-34. Cette manipulation permet d'éliminer les contaminants solubles dans le tampon d'isolement.

- Reprendre les culots de S.E.B. dans du milieu d'isolation ajusté à 40% p/v en sucrose. Répéter les étapes de flottation et de sédimentation.
- Suspendre les culots de S.E.B. dans un volume minimal de tampon d'isolation (5 - 10 ml). Déposer les préparations de S.E.B. sur le dessus d'un gradient continu de sucre (36% - 26%) à raison de 1.5 à 2.5 ml par gradient.
- Ultracentrifuger les gradients à 20 000 tours/minute pendant environ 15 heures. L'ultracentrifugeuse est une IEC B-60 équipée d'un rotor à godets oscillants SB 110. Les tubes sont en polyallomère et peuvent contenir 37 ml. La différence de densité entre les S.E.B. intacts et les autres constituants permet d'éliminer les contaminants.
- Récolter la bande supérieure après avoir éliminé la portion du gradient qui la recouvre. Evaluer en spectroscopie uv-visible la pureté spectrale et la quantité de rhodopsine présente. La bande inférieure contient des S.E.B. de mauvaise qualité et peu abondants. Le culot est composé d'impuretés.
- Diluer au moins 5 fois avec de l'eau distillée et mélanger sur Vortex. Centrifuger 60 minutes à 18 000 tours/minute. Utiliser une centrifugeuse Sorvall avec le rotor SS-34 et des tubes en polycarbonate.

- Récupérer les culots de S.E.B. et resuspendre dans l'eau distillée en vue de faire éclater la membrane plastique. Répéter la centrifugation.

- Si les membranes discales ne sont pas utilisées immédiatement, il convient de les stocker au congélateur sous atmosphère d'azote ou d'argon.

b. Préparation de rhodopsine purifiée dans un détergent

- Suspendre les culots de S.E.B. dans environ 10 ml d'eau distillée. Dans de l'azote liquide, congeler la préparation sur la plus grande surface possible d'un pot à lyophiliser. Les préparations sont lyophilisées pour une période de 6 à 12 heures.

- Recueillir les membranes discales séchées dans un mortier froid. Ajouter 25 - 30 ml d'hexane et broyer la préparation. Environ la moitié des phospholipides sont solubilisés dans la phase organique.

- Décanter dans des tubes en verre. Centrifuger 15 minutes à 10 000 tours/minute. Conserver le précipité et répéter le lavage avec le solvant organique une autre fois.

- Etendre le précipité en une mince couche sur la paroi du tube. Déposer le tube à plat dans un dessicateur et sécher sous vide environ une heure.

- Dissoudre dans 25 à 30 ml de tampon Tris-Cl 25 mM, pH 8.5 ajusté à 2% d'acide cholique et 20% de sulfate d'ammonium saturé. Clarifier la solution en centrifugeant 15 minutes à 10 000 tours /minute.
- Dialyser le surnageant pendant 4 heures contre 2 litres de tampon Tris-Cl 25 mM, pH 8.5. Remplacer le tampon à toutes les heures. La dialyse élimine quantitativement le sulfate d'ammonium.
- Ajuster le dialysat à 33% de saturation en sulfate d'ammonium. Laisser reposer une nuit à 4°C. Centrifuger 30 minutes à 15 000 tours /minute pour précipiter des contaminants protéiques comme l'opsine.
- Mesurer précisément le volume de surnageant. Ajuster successivement à 47%, 50%, 53%, 55%, 57% et 59% de saturation en sulfate d'ammonium. Le sulfate d'ammonium saturé doit être à la température ambiante. L'addition doit être rapide (5 gouttes /seconde) et sous agitation continue.
- A chacune des étapes du fractionnement au sulfate d'ammonium, la préparation doit être incubée 1 heure dans des tubes de polycarbonate avant d'être centrifugée 30 minutes à 15 000 tours /minute. Ce fractionnement vise à éliminer des impuretés lipidiques et protéiques tout en favorisant la précipitation de la rhodopsine.

- En spectroscopie uv-visible, évaluer le contenu en rhodopsine de chaque surnageant et de chaque précipité. Les précipités sont dissous dans un volume minimal de tampon tris-Cl 25 mM, pH 8.5 ajusté à 0.5% d'acide cholique.
- Regrouper les précipités solubilisés selon la quantité et la pureté spectrale de la rhodopsine présente.
- Dialyser contre 4 litres de tampon tris-Cl 25 mM, pH 8.5 pendant 48 heures. Eviter que le contenu du sac à dialyse se dilue pendant l'élimination du sulfate d'ammonium et d'une partie de l'acide cholique.

c. Chromatographie d'affinité

Une chromatographie d'affinité sur gel de concanavaline-A sépharose 4B parachève la purification de la rhodopsine, en permettant de remplacer l'acide cholique par un autre détergent. La rhodopsine renferme des hydrates de carbone, le N-acétylglucosamine et surtout le mannose, qui lui permettent de se lier spécifiquement à des sites récepteurs de la concanavaline (Steinemann et Stryer, 1973, Fukuda et al., 1979).

- Dans une colonne à chromatographie (Pharmacia Fine Chemicals K 16/40), compacter uniformément le gel sur une hauteur d'environ 15 cm. Conditionner avec 250 ml de tampon tris-Cl 100 mM, pH 7.3 ajusté à 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂ et 1 M NaCl. L'éluat doit être à un pH de 7.3.

La suite de la chromatographie est entièrement réalisée au réfrigérateur.

- Charger la rhodopsine dialysée sur la colonne après lui avoir ajouté du détergent (0.2% p/v) ce qui minimise les chances de blocage de la colonne. Ne pas introduire plus de 50 mg de rhodopsine sur le gel.
- Laver la colonne avec plusieurs volumes de Tris-Cl 50 mM, pH 7.3 ajusté à 0.2% de détergent. La rhodopsine est purifiée, soit dans le L-1690, soit dans l'Ammonyx-L0. Le lavage de la colonne est complété quand le spectre des fractions est à son plus bas niveau d'absorbance entre 250 nm et 700 nm. Les protéines non fixées à la concanavaline, l'opsine dénaturée et le reste des lipides sont élués à cette étape. L'infime fraction de concanavaline désorbe du gel de sépharose lors du lavage.
- Eluer la rhodopsine purifiée et délipidée avec du Tris-Cl 50 mM, pH 7.3, ajusté à 0.45 M en α -méthyl-D-mannopyranoside. La rhodopsine est décrochée de la concanavaline car le sucre éluant a une plus grande affinité pour le gel. Les fractions d'élution ont un volume moyen de 2 ml et sont recueillies par un collecteur Gilson. Chacune est soumise à un examen spectrophotométrique.
- Regrouper les fractions d'élution selon la quantité et la pureté spectrale de la rhodopsine présente. Les frac-

tions trop diluées ou contaminées sont rejetées. Les fractions les plus concentrées sont aussi les plus pures.

- Dialyser contre 2 litres de tampon Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, pendant 24 heures afin d'éliminer le sucre éluant.

Eviter que la rhodopsine se dilue.

- Si la rhodopsine n'est pas utilisée immédiatement, stocker au congélateur sous atmosphère d'azote ou d'argon. Eviter les périodes d'entreposage prolongées car la protéine tend à précipiter et la pureté spectrale à se détériorer.

- Le spectrophotomètre utilisé pour l'entièvre démarche de purification de la rhodopsine bovine est un Pye Unicam modèle SP-8-100.

Afin d'optimiser la démarche expérimentale, les préparations de rhodopsine sont soumises à des contrôles spécifiques dans le but de bien caractériser chacun des échantillons.

B. Contrôle de la purification de la rhodopsine

a. Evaluation quantitative

La bande α du spectre d'absorption de la rhodopsine est attribuée au 11-cis rétinal lié à l'opsine. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de la rhodopsine bovine à 498 nm est de $40\ 000\ \text{dm}^3\ \text{mole}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$, soit exactement la même valeur que son poids moléculaire 40 000 daltons

(Wald et Brown, 1953, Shichi, 1970). Cette similitude fortuite permet d'évaluer rapidement et précisément la quantité de rhodopsine présente dans un échantillon donné. L'opération consiste à multiplier l'absorbance sur 1 cm à 498 nm par le volume de l'échantillon pour obtenir la quantité de rhodopsine:

$$A_{498 \text{ nm}}^{\text{1cm}} \times \text{volume (ml)} = \text{Quantité de rhodopsine (mg)}$$

b. Evaluation qualitative

L'absorbance de la rhodopsine à 278 nm est principalement due à son contenu en tryptophane et en tyrosine. A cause de la contribution de ces acides aminés aromatiques, l'absorbance de la rhodopsine à 278 nm est approximativement 1.6 fois supérieure à l'absorbance à 498 nm (Hargrave, 1982).

Selon le détergent utilisé pour solubiliser la rhodopsine, le rapport A_{278}/A_{498} est variable. Les travaux de Mc Connell et al., (1981) démontrent bien l'effet du détergent sur le rapport des absorbances. La méthode de purification utilisée pour obtenir le pigment visuel influence aussi la pureté spectrale, comme démontré dans le tableau II-4.

Tableau II-4

Variation du rapport $A_{278 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$

en fonction de la méthode de purification utilisée

Déttergent	Type de chromatographie	A_{278} / A_{498}	Référence
Ammonyx-LO	Gel d'hydroxylapatite	1.8	Applebury et al., 1974
Ammonyx-LO	Gel d'agarose	1.6	Hargrave, 1976
CTAB	Gel de séphadex G-200	1.6-1.7	Heller, 1968
Digitonine	Gel d'hydroxylapatite	1.86	Bowness, 1959
DTAB	Gel d'hydroxylapatite	1.70	Hong et al., 1982
Emulphogène BC-720	Gel de phosphate de calcium	1.75	Shichi et al., 1969
Emulphogène BC-720	Gel d'agarose	1.70	O'Brien, 1982
Emulphogène BC-720	Gel d'agarose	1.6-2.1	Plantner et Kean, 1983
Octyl glucoside	Gel de concanavaline-A Sépharose-4B	1.75	Litman, 1982

La mesure du rapport des absorbances A_{278}/A_{498} demeure très indicative de la présence de contaminants protéiques. Des valeurs inférieures à 2.0 sont associées à des préparations de rhodopsine très pure.

Le calcul du rapport A_{400}/A_{498} est aussi un bon indice de pureté spectrale. Une plus petite valeur signifie une meilleure définition de la bande spécifique à la rhodopsine; bien que le détergent choisi puisse influencer le rapport des absorbances. Une valeur de A_{400}/A_{498} située entre 0.21 et 0.24 est indicative d'une bonne pureté spectrale; la présence de contaminants comme l'hémoglobine ou les cytochromes peut augmenter le rapport à 1.0 (Nashima et al., 1978).

C. Nature des échantillons de rhodopsine

Les échantillons utilisés lors des expériences qui suivront sont prélevés à différentes étapes de la procédure de purification décrite précédemment.

La rhodopsine dans les membranes discales est obtenue après l'éclatement de la membrane plasmique du segment externe lors des lavages à l'eau distillée. Pour certaines études, notamment en photolyse éclair, les membranes discales seront solubilisées dans le L-1690 ou l'Ammonyx-LO.

La rhodopsine purifiée est solubilisée dans un détergent. Sa purification a été complétée par la chromatographie d'affi-

nité avant la dialyse finale.

D. Caractérisation des échantillons de rhodopsine

En plus d'être contrôlés lors du processus de purification, les échantillons de rhodopsine sont soumis à des évaluations complémentaires à leur degré de pureté spectrale.

Les analyses présentées dans cette section visent à contrôler des facteurs déterminants dans l'étude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine.

Le nombre de phospholipides associés à la protéine ou son état d'agrégation sont susceptibles de modifier significativement le comportement de la protéine lors de son blanchiment.

a. Dosage du nombre de phospholipides par rhodopsine

Le dosage du phosphore inorganique est fait suivant la méthode de l' "American Society for Testing and Materials", (1977). La concentration en P_i des phospholipides est déterminée par l'emploi d'une courbe d'étalonnage.

i. Préparation de la solution colorante

- Peser 0.13 g de tartrate de potassium et d'antimoine et 5.6 g de molybdate d'ammonium. Dissoudre dans 700 ml d'eau distillée.
- En brassant, ajouter 70 ml de H_2SO_4 concentré. Refroidir et diluer à 1 litre.

- Dissoudre 0.5 g d'acide ascorbique dans 100 ml de la solution pour obtenir la solution réductrice.

ii. Minéralisation des phospholipides

- Dans des ballons Kjelhdal, préparer les standards, les échantillons et la référence en pipettant:

1) 4 ml d'une solution standard contenant 10 mg de phosphore / 100 ml.

2) environ 250 mg (déterminé précisément) de rhodopsine dans les membranes discales en suspension aqueuse, ou environ 500 mg (déterminé précisément) de rhodopsine purifiée et solubilisée dans le L-1690 ou dans l'Ammonyx-LO .

3) Ne rien pipetter dans le ballon de référence (blanc).

- Ajouter 8 gouttes d'acide perchlorique concentré dans chaque tube Kjelhdal pour l'hydrolyse acide des phospholipides.

- Chauffer pendant 5 heures sur l'appareil à micro-digestion Kjelhdal. Les phospholipides noircissent pendant que la solution étalon et la référence demeurent incolores.

- Ajouter 3 gouttes de peroxyde d'hydrogène 30% v/v pour que les solutions redeviennent claires.

- Transférer les préparations hydrolysées dans des ballons volumétriques. Rincer 5 fois tous les ballons avec de l'eau distillée. Utiliser un ballon volumétrique de 100 ml pour la solution étalon et des ballons jaugés de 50 ml pour les autres solutions.

- Ajouter 10 ml de solution colorante à chaque ballon, ensuite remplir au trait de jauge avec de l'eau distillée.

iii. Dosage du phosphore inorganique

- Laisser développer l'intensité de la coloration 10 minutes et doser à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 17-D à 880 nm en moins de 30 minutes.

- Le témoin permet d'ajuster le zéro d'absorbance tandis que la solution étalon et des dilutions appropriées permettent d'établir la courbe d'étalonnage.

- La concentration des échantillons de rhodopsine en phosphore inorganique est interpolée sur la courbe d'étalonnage.

Le nombre de phospholipides associés à la protéine photosensible est déterminant en ce qui a trait à sa cinétique de blanchiment (O'Brien, 1982). Dans le même ordre d'idée, l'évaluation de l'état d'agrégation est très importante. Nous savons que la rhodopsine non illuminée n'est pas agréée dans les membranes discales intactes ou dans les solu-

tions micellaires de détergents tels l'octylglucoside (Borochov-Neori et al., 1983) ou l'Ammonyx-LO (Applebury et al., 1974). Le pigment visuel n'existe pas sous forme d'oligomères en raison de sa mobilité par rotation et par translation. Les mesures en diffraction des rayons X sont aussi en faveur d'une rhodopsine non agrégée. Borochov-Neori et al. (1983) suggèrent un changement d'état d'agrégation de la rhodopsine excitée dans les solutions micellaires ou dans les vésicules de phospholipides. Chez la grenouille, dans la membrane discale, la rhodopsine pourrait avoir la taille d'un dodécamère (Fatt, 1981). La chromatographie de rhodopsine micellaire sur tamis moléculaire nous permettra de comparer l'état d'agrégation de la protéine dans les détergents utilisés. Nous savons que la rhodopsine est presque exclusivement sous forme monomère dans l'Ammonyx-LO (Applebury et al., 1974). A titre purement qualitatif, nous avons aussi vérifié la présence de grande quantité de contaminants dans nos préparations de rhodopsine à l'aide de la méthode d'électrophorèse SDS Page (Weber et Osborn, 1969).

b. Electrophorèse de rhodopsine sur gel de polyacrylamide

i. Préparation des gels de polyacrylamide

- Pipetter 3.4 ml d'une solution aqueuse à 22.2% en acrylamide et 0.6% en bis-acrylamide. L'acrylamide doit avoir été préalablement recristallisé dans du

chloroforme. Si la solution a été préparée à l'avance, elle doit avoir été conservée à l'abri de la lumière.

- Ajouter successivement 10 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7.0, ajusté à 0.05% en SDS, 2 µl de 2-mercaptopéthanol et 45 µl de TEMED.

- Mettre les tubes à électrophorèse dans une solution de silicone 2% pendant 30 minutes. Sécher les tubes à l'étuve. Obturer la base des tubes à l'aide de para-films.

- Avant de préparer les gels, ajouter 1.5 ml de persulfate d'ammonium 1.5% p/v. Le persulfate d'ammonium est essentiel à la polymérisation des gels et doit être préparé juste avant usage.

- Avec une pipette Pasteur, remplir les tubes au même niveau avec la solution de polyacrylamide. Il doit rester 1.5 cm de libre au-dessus du gel. Eviter les bulles d'air. La polymérisation nécessite environ 30 minutes à la température ambiante.

ii. Préparation des échantillons de rhodopsine

- Dans des tubes à essai de 5 ml, ajouter successivement 20 à 40 µl de solution de rhodopsine concentrée à 2 mg/ml. 20 µl d'urée 10 M, 10 µl de bleu de

bromophénol 0.05% p/v, 2 µl de 2-mercptoéthanol et 10 µl de SDS 5% p/v.

- Incuber les échantillons dans l'eau bouillante pendant 1 minute.

- Ajouter quelques grains de sucre pour augmenter la densité des échantillons et éviter une remontée à la déposition sur le gel de polyacrylamide.

iii. Electrophorèse

- Insérer les gels dans la cellule à électrophorèse (Bio-Rad modèle 150 A). Plonger les gels dans la cuve inférieure du montage contenant le tampon phosphate 50 mM, 0.05% p/v en SDS. Eviter les bulles d'air sous les tubes dont le para-film a été préalablement enlevé.

- Remplir le dessus des tubes de tampon de même que la cuve supérieure.

- Déposer 40 µl d'échantillon de rhodopsine à l'aide d'une seringue entre la surface du gel et le tampon. Fermer l'appareil à électrophorèse.

- Faire passer un courant de 8 mA par gel en migration. Laisser migrer environ 4 heures. Eviter que les cuves inférieure et supérieure viennent en contact direct dans le cas où des gels glisseraient hors des

tubes. La source de tension est le modèle 500/200 de Bio-Rad.

- En évitant de les briser, récupérer les gels en appliquant une faible pression à une extrémité des tubes. Indiquer la position du marqueur colorant en insérant une fine aiguille d'acier dans le gel.

iv. Coloration des gels

- Pendant 3 heures, incuber les gels dans des tubes remplis de solution colorante composée de 45% méthanol, 9.2% acide acétique et 0.12% bleu de Coomassie brillant.

- Toujours dans les mêmes tubes, remplacer la solution colorante par une solution décolorante de méthanol (45%) et d'acide acétique (9.2%). Incuber 15 heures.

- Remplacer la solution décolorante par une solution de méthanol (5%) et d'acide acétique (7.5%). Laisser tremper 6 - 8 heures.

- Mesurer le chemin parcouru par la marqueur colorant et par la protéine. Calculer les mobilités relatives de chaque protéine.

- Les gels peuvent être conservés dans l'acide acétique 7% v/v.

c. Evaluation de l'état d'agrégation de la rhodopsine à l'aide d'un tamis moléculaire

- Dans une colonne à chromatographie LKB 2137 (650 mm X 16 mm), compacter uniformément du Bio-Gel A5 en solution tamponnée (Tris-Cl 50 mM, pH 7.3) sur une hauteur de 50 cm pour un volume égal à 400 ml. La colonne est maintenue à 15°C par un bain thermostaté Brinkmann Lauda RC3 modèle T2.

Le tamis moléculaire permet de discriminer les substances de poids moléculaire se situant entre 10 000 et 5 000 000 de Daltons.

i. Etalonnage de la colonne

Deux standards sont utilisés pour étalonner la colonne.

1) La riboflavine est une petite molécule (P.M. 376.4 g) qui pénètre les billes de gel et nous indique le volume total de la colonne. Elle présente trois maxima d'absorption, soit à 444 nm, 372 nm et 268 nm.

- Injecter sur la colonne 1 ml de riboflavine tamponnée et concentrée à 0.5 mg/ml.

- Recueillir les fractions d'élution en employant un collecteur Gilson à raison de 100 gouttes à la fois.

- Lire les absorbances de chacune des fractions à 444 nm.

2) Le Dextran bleu est une macromolécule (P.M. 2 000 000 g) qui passe entre les billes de gel et nous donne le volume mort de la colonne. Ses maxima d'absorption sont situés à 616, 381 et 259 nm.

- Injecter sur la colonne conditionnée avec le tampon 1 ml de Dextran bleu concentré à 1 mg/ml.

- Doser les fractions de 50 gouttes à 616 nm.

ii. Chromatographie des échantillons de rhodopsine

Deux types d'échantillons sont déposés sur la colonne, soit la rhodopsine purifiée dans le L-1690 ou dans l'Ammonyx-L0.

- Avant d'introduire la rhodopsine, conditionner la colonne 15 heures avec du Tris-Cl 50 mM , pH 7.3, ajusté à 0.2% du détergent solubilisant la protéine.

- Injecter 1 ml de rhodopsine concentrée à 1 mg/ml.

- Recueillir des fractions de 70 gouttes et lire l'absorbance de chaque fraction à 498 nm. Vérifier si le recouvrement de la protéine déposée est quantitatif.

- Dresser le profil d'élution des marqueurs et de la protéine solubilisée dans chacun des détergents. La

rhodopsine doit se retrouver entre la riboflavine et le Dextran bleu.

Nous avons maintenant caractérisé nos préparations de rhodopsine relativement à des paramètres susceptibles d'affecter la séquence photolytique. Il nous reste à caractériser les détergents servant d'environnement moléculaire à la rhodopsine purifiée.

3. Caractérisation des détergents

A. Les détergents

Les lipides forment un groupe hétérogène de molécules incluant, entre autres, les phospholipides .

Ils contiennent tous des groupes non polaires de nature aliphatische ou aromatique et ont aussi des groupes polaires. Les portions aliphatiques et aromatiques sont hydrophobes tandis que les portions polaires sont hydrophiles. En conséquence, les lipides sont des amphiphiles.

Les phospholipides forment spontanément une bicoche thermodynamiquement stable. Le phénomène d'auto-association des chaînes hydrocarbonées hydrophobes au centre de la bicoche permet aux groupements hydrophiles d'interagir avec les molécules d'eau.

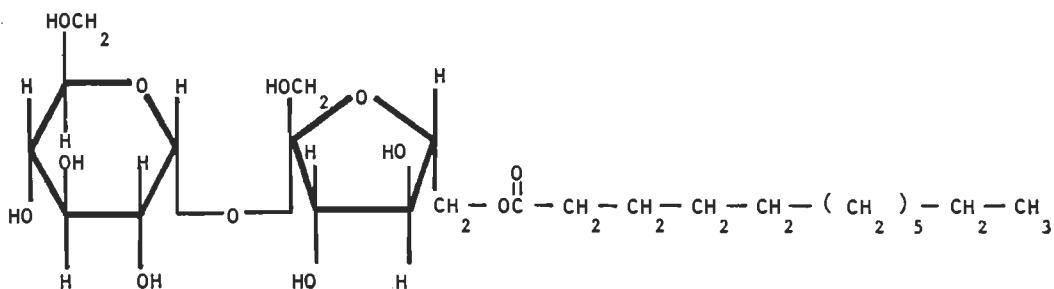
La matrice phospholipidique de la membrane discale est particulièrement fluide à cause du fort taux d'insaturation

des chaînes d'acides gras (Anderson et al., 1975). Ceci permet à la rhodopsine de se déplacer dans la membrane, mais surtout de subir tous les changements conformationnels nécessaires à l'accomplissement de sa fonction biologique. Dans les détergents, la séquence photolytique du pigment visuel est généralement accélérée, mais plus facilement observable en raison de la transparence des solutions.

Lors du processus de purification de la rhodopsine, les phospholipides d'origine sont éliminés. La protéine, non hydro-soluble, est alors solubilisée dans un détergent. Les détergents doivent satisfaire à plusieurs exigences: 1) le détergent doit avoir une structure chimique définie et la meilleure pureté possible, 2) le détergent doit être soluble et solubiliser quantitativement la rhodopsine, 3) le détergent ne doit pas absorber dans l'ultraviolet, 4) le détergent doit pouvoir être éliminé facilement et 5) la rhodopsine doit être stable dans le détergent qui, en plus, ne doit pas perturber la conformation de la protéine (Fong et al., 1982). Peu de détergents satisfont à tous ces critères. Par exemple, il est fréquent de rencontrer des détergents dont la composition en chaînes hydrocarbonées est hétérogène.

Les détergents que nous employons sont le L-1690 et l'Ammonyx-LO; la structure chimique du composant majoritaire des deux surfactants est illustrée à la figure II-1.

A.



B.

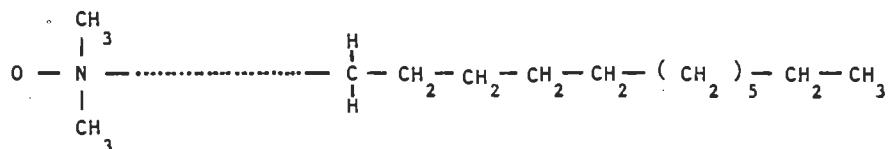


Figure II-1: Structure chimique des détergents.

- A. Le L-1690 (monoester de lauryl sucrose)
- B. Le LDAO ou Ammonyx-L0 (N-oxyde de dodécyldiméthylamine)

La séquence photolytique de la rhodopsine bovine purifiée dans l'Ammonyx-LO a été étudiée, notamment par Applebury et ses collaborateurs en 1974. Ce détergent est disponible commercialement en solution 30% p/p, cette solution est composée de 65% en oxyde de dodécyldiméthylamine et de 35% en oxyde de tétradécyldiméthylamine. Le poids moléculaire de l'Ammonyx-LO est estimé à environ 240 grammes, entre les valeurs limites de 229 à 257 grammes (Mc Connell et al., 1981). Une micelle d'Ammonyx-LO peut compter jusqu'à 3 500 molécules de détergent pour une molécule de rhodopsine (Mc Connell et al., 1981). A un pH supérieur à 7.0, l'Ammonyx-LO est neutre. En solution, il est optimalement transparent dans le visible et une partie de l'ultraviolet, soit jusqu'à 220 nm (Fong et al., 1982).

Peu d'études de blanchiment du pigment visuel des vertébrés ont été effectuées en utilisant le L-1690. A l'origine, l'estér de sucre est un additif alimentaire solide qui consiste en 80% de monolaurate de sucre et en 20% de di- et trilauroates de sucre. Son poids moléculaire est d'environ 525 grammes (Fong et al., 1982). La structure amphipathique de base de la rhodopsine semble être préservée dans les micelles de L-1690 où elle demeure stable et photosensible (Kusumi et al., 1983). Le groupe hydrophile du L-1690, comme celui de la digitonine, est composé de sucres, ce qui pourrait contribuer à stabiliser la rhodopsine (Nashima et al., 1978). De plus, le L-1690 est non ionique et son absorbance dans l'ultraviolet est négligeable pour les con-

centrations nécessaires à la solubilisation du pigment visuel
(De Grip, 1982)

Nos deux détergents doux ont une efficacité d'extraction similaire pour la rhodopsine bien que celle-ci soit légèrement plus stable dans le L-1690. La conformation de la rhodopsine est conservée dans ces détergents non ioniques (Pober et Stryer, 1975, Pontus et Delmelle, 1975, Osborne, 1976). L'Ammonyx-LO est un détergent qui dialyse bien tandis que le L-1690 ne s'élimine pas ou très peu par dialyse. Une similitude intéressante entre les deux détergents est la présence d'une chaîne aliphatique à douze carbones.

Expérimentalement, la détermination de la concentration micellaire critique nous permettra, dans un premier temps, de connaître approximativement la taille des micelles de détergents. A la température ambiante, la CMC de l'Ammonyx-LO devrait se retrouver entre 0.27 et 2.1 mM (Mukerjee et Mysels, 1971), tandis que celle du L-1690 serait de 0.20 mM (Nashima et al., 1978).

B. Détermination de la concentration micellaire critique

a. Approche théorique

Quand de petites quantités d'un amphiphile sont ajoutées à l'eau (figure II-2), une partie est dissoute sous forme de monomères et une autre partie forme une monocouche à l'interface air-eau. Les molécules dans la monocouche sont en équilibre avec les monomères dans la solution. La concentration de monomères

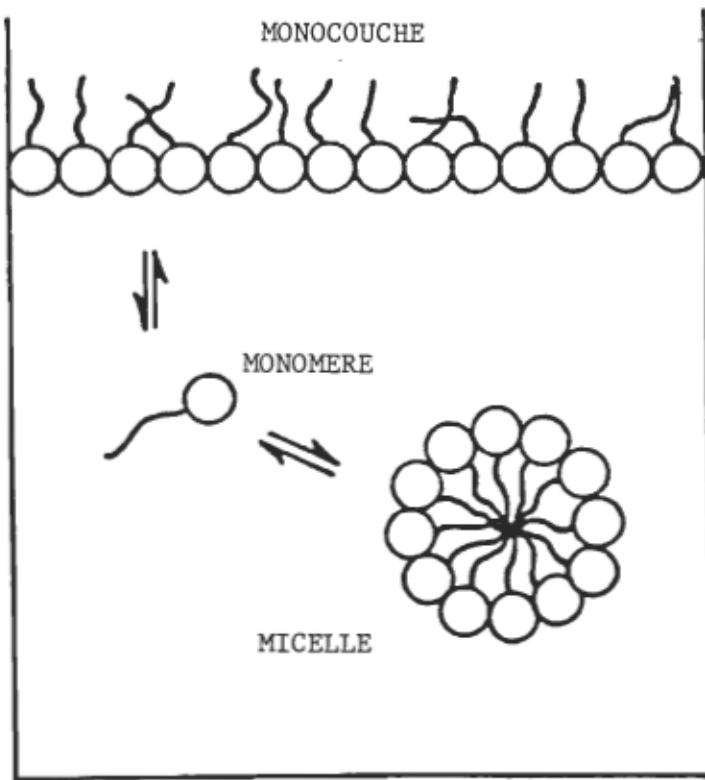


Figure II-2: Comportement des détergents en solution aqueuse (Helenius et Simons, 1975). A faible concentration les détergents (surfactants) forment une monocouche à la surface de la solution. Au fur et à mesure que la concentration de détergent augmente, on retrouve de plus en plus de monomères en solution. A concentration suffisamment élevée, les molécules de détergent forment des micelles.

correspond à une tension de surface caractéristique.

Quand la concentration de monomères atteint une valeur critique, les amphiphiles s'associent pour former des micelles. Les micelles sont définies comme des agrégats colloïdaux thermodynamiquement stables formés par des amphiphiles au-dessus d'un certain niveau de concentration. On appelle concentration micellaire critique la gamme étroite de concentrations de surfactant où les micelles apparaissent dans la solution.

La force motrice pour l'agrégation spontanée des molécules formant des micelles est hydrophobe. L'intérieur de la micelle consiste en groupes hydrophobes séquestrés par les groupes polaires formant la surface de la micelle. Les forces restrictrices lors de la formation des micelles sont les répulsions électrostatiques entre les têtes polaires, l'hydratation, la configuration des têtes polaires et la concentration d'amphiphile (Helenius et Simons, 1975).

b. Préparation des échantillons

Préparer des solutions de détergent dont les concentrations varient entre 0.005% et 0.5% p/v. Pour chacun des échantillons, le détergent est préparé dans l'eau distillée déminéralisée et dans l'eau distillée déminéralisée tamponnée avec du Tris-Cl 50 mM à pH 8.0. Les détergents employés sont le L-1690 et l'Ammonyx-L0.

c. Mesure des tensions superficielles

- Calibrer le tensiomètre Fisher (modèle 20) avec une masse standard
- Nettoyer l'anneau de Du Nouy dans de l'alcool absolu.
- Flamber l'anneau au-dessus d'un brûleur à gaz. Laisser refroidir.
- Mesurer les tensions superficielles pour les différentes concentrations de chacun des détergents, en prenant soin de bien nettoyer l'anneau de Du Nouy après chaque détermination.
- Sur un graphique, porter les mesures de la tension de surface en fonction de la concentration du détergent.

Il est aussi intéressant d'avoir un aperçu de la fluidité relative des micelles des deux détergents. Les techniques de polarisation de fluorescence et de spectroscopie RPE nous permettent d'évaluer la rigidité micellaire en marquant les détergents au niveau des queues hydrophobes.

C. Evaluation de la rigidité micellaire

a. Polarisation de fluorescence

i. Approche théorique

Certaines molécules ont la capacité d'absorber des photons et de se désactiver en émettant une radiation de longueur d'onde plus grande. Un de ces modes de transition radiative est la fluorescence.

Lorsqu'une molécule fluorescente est insérée dans une membrane ou dans une micelle, ses axes moléculaires reflètent l'orientation des composantes membranaires ou micellaires. L'intensité avec laquelle les photons d'un faisceau de lumière polarisée sont absorbés par une molécule fluorescente dépend de l'orientation de la molécule par rapport à la direction de polarisation du faisceau.

Lorsque le faisceau d'excitation est polarisé dans un plan, l'émission de fluorescence est polarisée dans le même plan si

- la même molécule est responsable de l'absorption de photons et de l'émission de fluorescence,
- les oscillateurs d'absorption et d'émission sont parallèles,
- la molécule ne bouge pas entre l'absorption et l'émission.

Dans les systèmes membranaires et micellaires, la molécule fluorescente n'est pas immobile entre l'acte d'absorption et celui de fluorescence. La fluidité de l'environnement moléculaire conditionne le mouvement de la molécule fluorescente. La viscosité et la température du milieu ont aussi un effet direct sur la lumière polarisée émise par la molécule fluorescente. A viscosité très grande ou à très basse température, le mouvement de la sonde est restreint et la fluorescence est plus intense dans des directions spécifiques déterminées par l'arrangement moléculaire de la membrane ou de la micelle. L'ensemble de ces propriétés permet d'étudier l'orientation et la mobilité des composantes membranaires ou micellaires par émission de fluorescence

polarisée (Yguerabide et Foster, 1981).

En polarisation de fluorescence la mesure est indirecte puisque c'est le mouvement de la molécule fluorescente qui est évalué. Ce mouvement est directement relié à la fluidité de l'environnement moléculaire du fluorophore (Shinitzky et Yuli, 1982).

ii. Sonde fluorescente utilisée

La sonde est l'acide 8 - anilino - 1 - naphthalène sulfonique sous sa forme de sel de magnésium, communément appelé ANS. Sa structure chimique est représentée à la figure II-3 et son poids moléculaire est de 621 grammes.

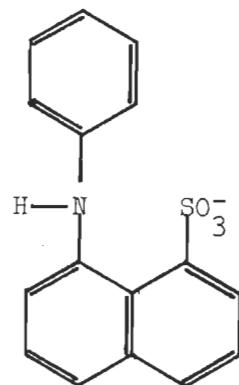
L'ANS s'incorpore spontanément dans les micelles de détergent auquel il s'associe de façon non covalente. C'est un marqueur lipophile à toutes fins pratiques insoluble dans l'eau. Il ne fluoresce qu'en milieu lipidique et son temps de vie radiatif est de 1.2×10^{-8} seconde.

L'ANS marque les chaînes hydrocarbonées des lipides. La dépolari-sation de fluorescence du marqueur est due au mouvement des lipides et non à la rotation de la molécule d'ANS car c'est la visco-sité du milieu baignant les micelles de détergent qui est modifiée. Une modification de la température aurait entraîné un chan-gement de la fluidité des chaînes hydrophobes des détergents et modifié la vitesse de rotation de la molécule d'ANS.

iii. Préparation des échantillons

Les détergents sont marqués avec l'ANS et étudiés en polari-sation de fluorescence.

A.



B.

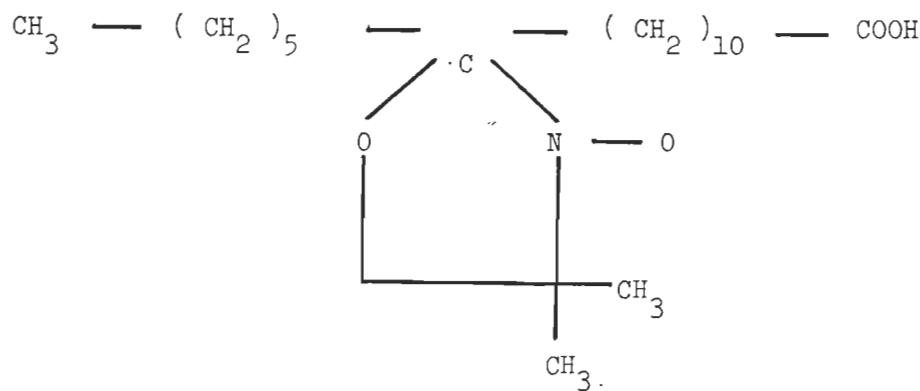


Figure III-3: Structure chimique de l'ANS et du marqueur de spin. Les deux sondes marquent les chaînes hydrocarbonées.

A: ANS (acide 8 - anilino - 1 - naphthalène sulfonique)

B: Marqueur de spin (acide 12 (4,4 - diméthyloxazolidine - N - oxyl) stéarique)

- Préparer 5 solutions de 10 ml pour chacun des détergents. La concentration de détergent est de 0.2% et les solutions sont tamponnées avec du Tris-Cl 50 mM pH 8.0. Elles contiennent respectivement 0%, 9.1%, 18.2%, 27.3% et 36.4% p/v de sucre.

- Chauffer doucement et ajouter la sonde fluorescente jusqu'à saturation des échantillons. Centrifuger pour clarifier les solutions.

iv. Mesure de polarisation de fluorescence

La polarisation de la fluorescence émise par une molécule se mesure au spectrofluorimètre et nécessite l'utilisation de deux polariseurs. La polarisation, p , se définit par

$$p = \frac{I_{EE} - I_{EB} (I_{BE} / I_{BB})}{I_{EE} + I_{EB} (I_{BE} / I_{BB})} \quad (\text{Albrecht, 1961})$$

où I représente l'intensité de fluorescence déterminée par deux indices. Le premier réfère au polariseur d'excitation qui peut transmettre une lumière polarisée parallèlement à la verticale (E) ou à l'horizontale (B). Le deuxième indice réfère au polariseur d'analyse ne transmettant que la lumière polarisée verticalement ou horizontalement.

Perrin a fait un développement mathématique de la théorie sur la polarisation et a proposé la relation suivante

$$(1/p - 1/3) = (1/p_0 - 1/3) (1 + \frac{3\tau_o}{p})$$

où p_0 est la polarisation en absence de mouvement moléculaire, τ_o

le temps de vie radiatif de la molécule fluorescente et ρ le temps de relaxation rotationnel. En tenant compte du fait que $\rho = 3nV/RT$, il est possible de ré-écrire l'équation de Perrin sous la forme

$$(1/p - 1/3) = (1/p_0 - 1/3) \left(1 + \frac{RT}{\eta} \tau_0 \right)$$

où η est la viscosité (poises), R la constante des gaz (8.32×10^7 ergs K $^{-1}$ mole $^{-1}$), T la température (K) et V le volume molaire.

Un graphique de $1/p$ en fonction de T/η , extrapolé à viscosité infinie, donne la valeur de $1/p_0$ qui est indicative du mouvement moléculaire de la sonde fluorescente. La pente de ce graphique est égale à $(1/p_0 - 1/3) RT_0/V$ et permet d'avoir une appréciation du volume des micelles de détergent.

Expérimentalement la procédure est la suivante:

- Mesurer le spectre d'excitation et le spectre d'émission des détergents marqués. Le fluorimètre est un Varian MPF 2A.
- Pour chacun des échantillons, mesurer I_{EE} ($0^\circ, 0^\circ$), I_{EB} ($0^\circ, 90^\circ$), I_{BB} ($90^\circ, 90^\circ$), I_{BE} ($90^\circ, 0^\circ$) au maximum des spectres d'excitation et d'émission.
- Mesurer le temps d'écoulement de l'eau distillée et des solutions tamponnées de sucre dans le viscosimètre. Noter la température des solutions. Calculer la viscosité des solutions.

b. Résonnance paramagnétique électronique (RPE)

i. Approche théorique

Nos molécules de détergents ne possèdent pas de signal

RPE intrinsèque. Elles ne peuvent être étudiées à l'aide de cette technique que si on leur ajoute une sonde porteuse d'électrons non pairés.

Les marqueurs de spin sous forme de radicaux sont particulièrement indicatifs des mouvements moléculaires dans la région des chaînes hydrocarbonées de lipides marqués. Les molécules marquées sont excitées par un champ magnétique d'intensité moyenne (3000 Gauss) qui lève la dégénérescence du spin. L'augmentation d'intensité du champ magnétique augmente l'énergie et induit la transition entre les deux états de spin. L'interaction entre le spin du noyau et celui de l'électron excité détermine les bandes sur les spectres RPE.

Invariablement le marqueur utilisé est un radical nitroxyl. Le spectre de dérivée première de ce radical montre une structure hyperfine en trois bandes moyennée par le mouvement anisotropique de la sonde (Atherton, 1973).

Divers facteurs influencent l'interprétation des spectres RPE. Ces facteurs sont dus au phénomène de relaxation des transitions de spin. Ainsi la hauteur des bandes est indicative de l'amplitude du mouvement moléculaire. La largeur des bandes est assujettie à la vitesse du mouvement et la distance entre les bandes renseigne sur la fluidité de l'environnement moléculaire de la sonde. Plus le mouvement du marqueur de spin est prononcé, meilleure est la définition de la structure hyperfine. Dans un environnement rigide, les bandes seront floues et aplatis (Hubbell et Mc Connell, 1971).

Tout comme en polarisation de fluorescence, la mesure de rigidité micellaire est indirecte. C'est la sonde qui nous informe sur la dynamique de mouvement permis dans un environnement moléculaire donné alors que son mouvement même est conditionné par cet environnement.

ii. Marqueur de spin utilisé

Le marqueur est l'acide 12 (4,4 - diméthyloxazolidine - N - oxyl) stéarique. Sa structure chimique est représentée à la figure II-3 et son poids moléculaire est de 384 grammes.

La sonde démontre une interaction hydrophobe avec la région des chaînes hydrocarbonées des lipides en dispersion aqueuse.. Le mouvement du marqueur de spin est d'autant plus rapide et plus important que les lipides présentent un arrangement moléculaire plus fluide.

iii. Préparation des échantillons

Les détergents sont marqués avec la sonde dont le mouvement est examiné en spectroscopie RPE.

- Dans un ballon jaugé de 10 ml, ajouter avec une micro-pipette la quantité de marqueur de spin nécessaire pour marquer une solution de détergent à 1% p/v dans un rapport 1 mole de marqueur pour 1500 moles de détergent. Evaporer le solvant sous faible jet d'azote.

- Ajuster jusqu'au trait de jauge la solution de détergent 1% tamponnée avec du Tris-Cl 50 mM , pH 8.0. Bien agiter pour dissoudre quantitativement le marqueur de spin.

Le rapport marqueur/détergent (une molécule de marqueur pour 1 500 molécules de détergent) vise à ne pas perturber les propriétés et l'arrangement intrinsèque des micelles de détergent.

iv. Mesure de résonnance paramagnétique électronique

Le grand axe des marqueurs de spin est perpendiculaire à la surface des micelles de détergent. Cette orientation permet d'analyser la fluidité de la région hydrophobe des micelles.

La structure hyperfine anisotropique des spectres RPE permet de déterminer le paramètre d'ordre moléculaire (S) à partir de l'équation suivante:

$$S_{\text{moléculaire}} = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{a_0} \times 0.5407 \quad (\text{Marsh, 1981})$$

$A_{||}$ correspond à la demi-séparation entre les extrêmes hyperfins externes. Les deux extrêmes hyperfins internes sont distancés par $2A_{\perp}$. La composante isotropique hyperfine est a_0 et sa valeur est égale à

$$\frac{1}{3} (A_{\parallel} + 2A_{\perp}) \quad (\text{Marsh, 1981})$$

Les paramètres d'ordre, variant entre 0.2 et 0.8, sont fidèlement évalués par la mesure des écarts hyperfins. Une augmentation du paramètre d'ordre est associée à une moins grande liberté de mouvement du marqueur de spin.

Le paramètre d'ordre (S) permet aussi de calculer l'angle (γ) de mouvement de la sonde par rapport à un axe médian. La relation entre S et γ est la suivante

$$S_{\text{moléculaire}} = \left(\frac{1}{2}\right) (\cos \gamma + \cos^2 \gamma) \quad (\text{Marsh, 1981})$$

La procédure expérimentale se résume ainsi:

- Pipetter l'échantillon dans une cellule de 1 mm d'épaisseur. Placer la cellule de quartz dans la cavité de résonnance.
- Enregistrer les spectres sur un spectrophotomètre Varian E-231 Century Series. Le champ magnétique est de 3358 Gauss ajusté à une fréquence de 100 kHz. La puissance des microondes dans la cavité de résonnance est de 2 mW à une fréquence de 9.4 GHz.

4. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine par spectroscopie électronique à basse température

A. Principe de la spectroscopie électronique à basse température de la rhodopsine

En spectroscopie électronique à basse température, nous étudions la stabilité thermique des intermédiaires de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine. La protéine photosensible est irradiée à la température de l'azote liquide en vue de l'amener à un état excité non réversible qui permettra de suivre la présence de ses intermédiaires en fonction des augmentations subséquentes de la température.

Chacun des intermédiaires est stabilisé sur une plage de températures qui lui est caractéristique. Le spectre d'absorption et la position du maximum d'absorption sont spécifiques pour un intermédiaire donné, de sorte que le profil qualitatif et quantitatif de chaque intermédiaire est évalué pendant l'expérience.

Notre étude porte sur la séquence photolytique entière à l'exception de l'intermédiaire hypsorhodopsine qui n'est observable qu'à la température de l'hélium liquide. Notre approche expérimentale repose sur la spectrophotométrie uv-visible couplée à l'utilisation d'un cryostat permettant l'observation des intermédiaires à basse température.

B. Nature et traitement des échantillons

Les échantillons utilisés pour les expériences permettant l'étude de la séquence photolytique à basse température sont de

quatre types:

- rhodopsine des disques des S.E.B.,
- rhodopsine purifiée dans l'Ammonyx-LO,
- rhodopsine purifiée dans le L-1690,
- rhodopsine purifiée dans le L-1690 et dopée avec de l'Ammonyx-LO.

La procédure de dopage des échantillons à l'Ammonyx-LO, consiste en l'ajout de 0.02 ml de détergent (concentré à 30% p/p) à 2 ml de rhodopsine purifiée dans le L-1690.

- Ajuster les échantillons à une concentration finale de 70% v/v en glycérol. Deux ml d'échantillon sont préparés de la façon suivante.

1.4 ml de glycérol + 0.6 ml d'échantillon de rhodopsine

- Rendre le mélange homogène par une série d'aspirations et de reflux à l'aide d'une pipette Pasteur. La dilution en présence de glycérol ne doit pas faire chuter l'absorbance à une valeur inférieure à 0.25. La présence du glycérol vise à éviter la formation de fissures dans les échantillons refroidis à la température de l'azote liquide et empêche ainsi l'opacification de la préparation tant à la descente qu'à la remontée de la température.

- Pipetter l'échantillon dans une cuvette disposable en polystyrène. Ce type de cuvette résiste aux très basses températures mais absorbe dans l'ultraviolet.

- Laisser reposer l'échantillon quelques heures à 4°C

avant de l'utiliser, ceci pour permettre aux bulles d'air de s'en échapper. Ne pas conserver la rhodop-sine plus de quelques jours dans le glycérol car ses propriétés spectrales seront altérées.

- La cuvette de référence contient une solution tamponnée ajustée à 70% v/v de glycérol.

C. Description du montage expérimental

Le montage est schématisé à la figure II-4. Le spectro-photomètre uv-visible utilisé est un Cary 17-D de Varian.

Perpendiculairement et à la hauteur du faisceau optique du spectrophotomètre, une fenêtre circulaire a été percée dans le compartiment de l'échantillon. Un filtre de bande passante égale à 10 nm et centrée à 440 nm (4400 JPJ C3 de Ditricon Optics Inc.) est ajusté dans la fenêtre d'irradiation.

La source d'excitation est un projecteur à diapositives dont le faisceau de la lampe est concentré sur le filtre à 440 nm.

L'organisation interne du cryostat Oxford Limited est présentée à la figure II-5. Il est ajusté dans le compartiment de l'échantillon du spectrophotomètre. Le cryostat est branché à l'unité du contrôle de la température et à l'unité de pompage de l'azote liquide.

Les fenêtres optiques du cryostat sont alignées avec celles

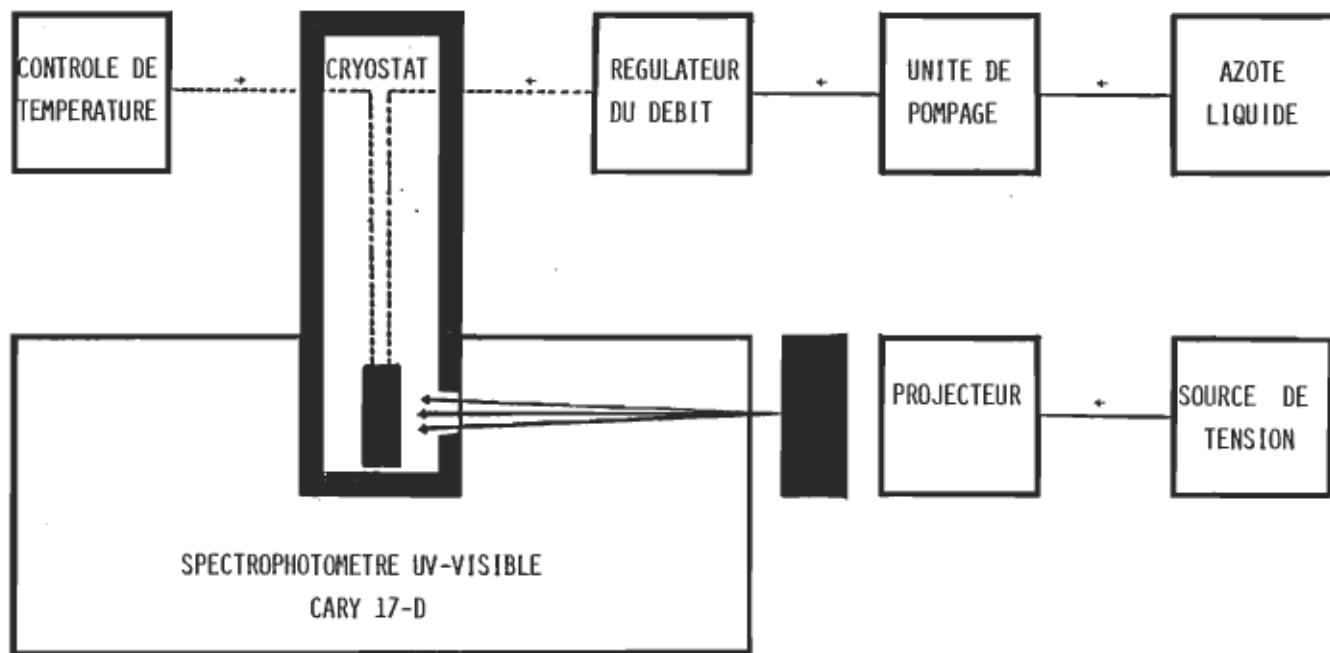


Figure II-4: Montage expérimental - Spectroscopie d'absorption électronique à basse température. L'échantillon de rhodopsine est à l'intérieur du cryostat (Oxford Limited). Il est irradié par un projecteur à dispositives (Ektographic de Kodak) devant lequel est placé un filtre passe-bande centré à 440 nm (Ditric Optics).

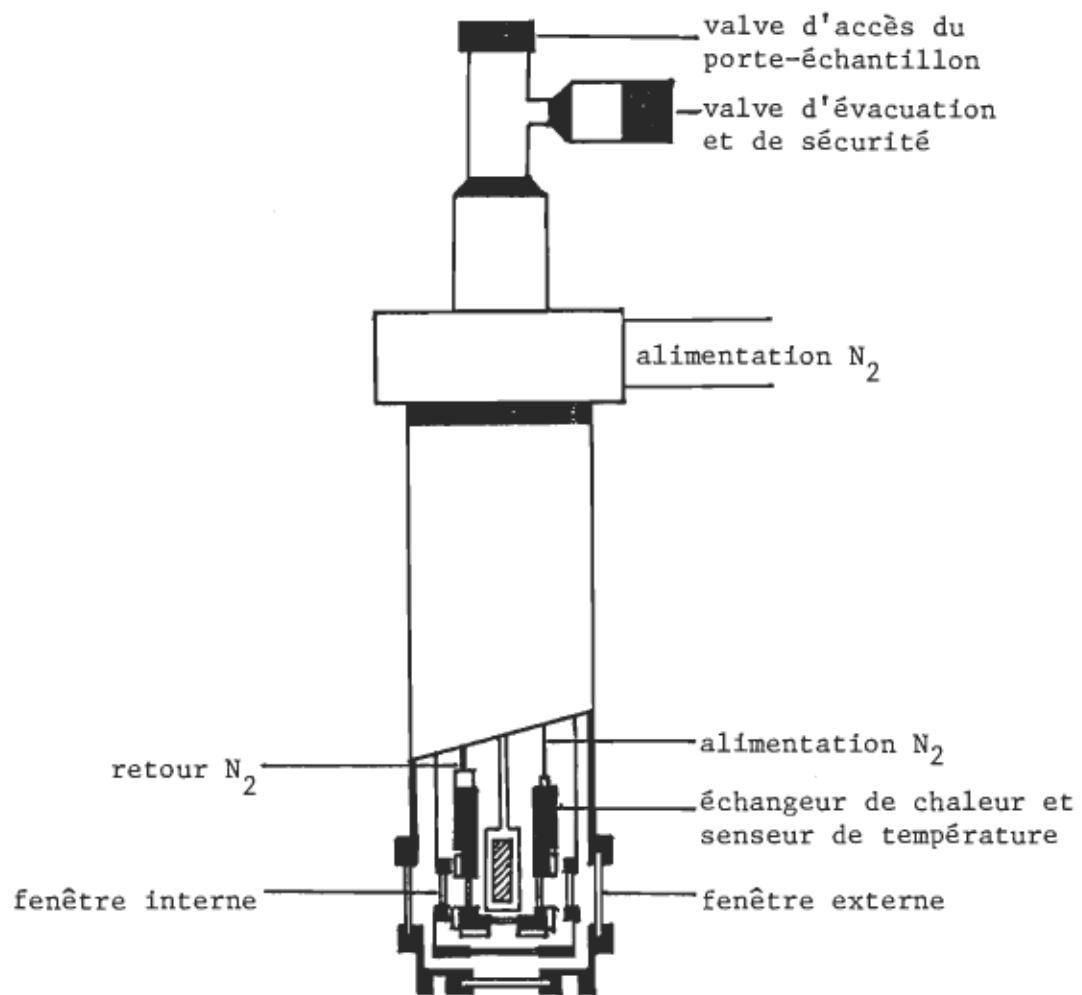


Figure II-5: Organisation interne du cryostat (Oxford Limited). L'échantillon est représenté par des traits obliques (////).

du spectrophotomètre pour permettre une transmission maximale du faisceau d'analyse. Une absorbance d'environ 0.2 est due aux fenêtres du cryostat.

La cuvette disposable contenant l'échantillon est placée dans le porte-échantillon, à son tour inséré dans le cryostat. La référence est placée dans l'autre compartiment du spectrophotomètre.

L'échantillon est orienté de manière à donner une absorbance minimale à 650 nm. La suppression d'absorbance est idéalement de 0.3 unité d'absorbance.

D. Procédure expérimentale

- Saturer le compartiment de l'échantillon avec de l'azote sec qu'on y laisse circuler sous faible débit pendant 10 minutes. Fermer la valve d'entrée. Cette étape vise à empêcher la formation de buée dans le cryostat pendant la durée de l'expérience.
- Brancher une pompe sur le cryostat afin de faire le vide (10^{-3} Torr ou 0.133 Pa) entre l'enveloppe externe et la chambre de l'échantillon.
- Enregistrer un spectre d'absorption de l'échantillon entre 650 et 350 nm (30 nm / po et 1 nm / sec) à la température ambiante. Le spectre doit satisfaire aux exigences suivantes:
 - 1) maximum d'absorbance à 498 nm,
 - 2) absorbance au maximum située entre 0.25 et 0.75,

- 3) absence de contaminants à 410 nm,
 - 4) rapport A_{400} / A_{498} situé entre 0.2 et 0.3.
- Refroidir l'échantillon à la température de l'azote liquide (77 K). Le débit d'azote est alors ouvert au maximum. L'intensité du pompage de l'azote liquide est contrôlée de manière à diminuer la température de 2.0 à 2.5 degrés, en moyenne, à la minute. Le spectre de l'échantillon enregistré à 77 K est augmenté en amplitude et le maximum d'absorption se retrouve à 505 nm (Yoshizawa et Wald, 1963).
- A 77 K, irradier l'échantillon 30 minutes avant d'enregistrer un spectre d'absorption. Une seconde irradiation de 15 minutes permet de s'assurer de la reproduction du spectre, c'est-à-dire que la quantité de bathorhodopsine formée est alors maximale. Utiliser le projecteur à diapositives et le filtre à 440 nm pour exciter la rhodopsine. La lampe, le photomultiplicateur et les fentes du spectrophotomètre doivent être fermés lors des irradiations.
- Augmenter et stabiliser la température à 100 K. Irradier l'échantillon 15 minutes. Enlever le filtre et obturer la fenêtre. Si le spectre d'absorption est identique au précédent, l'étude de la séquence photolytique de la rhodopsine peut se poursuivre.
- Enregistrer les spectres d'absorption à des intervalles de

5 ou 10 degrés Kelvin, selon les modifications spectrales indicatives de la transition d'un intermédiaire à un autre intermédiaire. Avant d'enregistrer tout spectre d'absorption, la température doit avoir été stabilisée au moins vingt minutes. A ce moment, la température de l'échantillon et de la chambre interne du cryostat sont à l'équilibre.

Les spectres d'absorption sont enregistrés aussi longtemps qu'ils se modifient à une même température. Certaines transitions nécessitent plus de deux heures et l'enregistrement de plusieurs spectres à intervalle de 15 minutes.

- Poursuivre l'expérience jusqu'à ce que la température soit à 300 K. Pendant l'entièr e expérience, le débit d'azote est ouvert au maximum. Le pompage de l'azote liquide est diminué graduellement avec l'augmentation de la température.

5. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine en photolyse éclair

Une autre façon d'analyser la séquence photolytique de la rhodopsine bovine consiste à mesurer les vitesses d'apparition ou de disparition de certains intermédiaires. Les résultats obtenus en photolyse éclair devraient concorder avec les informations recueillies en stabilisant ces mêmes intermédiaires à basse température.

A. Principe de la photolyse éclair de la rhodopsine

Près des températures physiologiques, nous étudions les cinétiques de transformation d'un intermédiaire en un autre intermédiaire. L'environnement moléculaire de la protéine et la température sont des facteurs déterminants de ce type d'expérience. Une plus grande fluidité du milieu et une augmentation de la température accélèrent la séquence photolytique.

Les transitions des tous premiers intermédiaires étant trop rapides, notre recherche se limite à l'analyse de la transition métarhodopsine I \rightarrow II et à la disparition de la lumirhodopsine. Si on observe la disparition d'un intermédiaire, la courbe du $\log (A_\infty - A_t)$ en fonction du temps est linéaire pour une réaction de premier ordre. Pour la variation d'absorbance à 380 nm, la courbe du $\log (A_t - A_\infty)$ en fonction du temps est aussi linéaire pour une réaction de premier ordre. Si les processus de formation et de disparition de deux intermédiaires sont concomitants et tous deux de premier ordre, les constantes de vitesse mesurées seront identiques. Notre approche expérimentale repose sur l'utilisation d'un système de photolyse éclair possédant une résolution de l'ordre de la microseconde.

B. Nature et traitement des échantillons

Les échantillons utilisés pour les expériences de photolyse éclair sont les suivants:

- rhodopsine des disques solubilisée dans 3% p/v de L-1690,

- rhodopsine des disques solubilisée dans 3% p/v d'Ammonoxyx-LO,
- rhodopsine purifiée dans le L-1690 0.2% p/v,
- rhodopsine purifiée ajustée à 3% de L-1690,
- rhodopsine purifiée dans l'Ammonyx-LO 0.2% p/v,
- rhodopsine purifiée ajustée à 3% d'Ammonyx-LO).

Contrairement aux études en spectroscopie à basse température, tous les échantillons sont solubilisés dans un détergent et sont utilisés sans traitement ultérieur. Les membranes disciales non solubilisées diffusent trop la lumière pour y observer les cinétiques de blanchiment de la rhodopsine. La préparation d'un échantillon est la suivante:

- Pipetter 1.2 ml d'échantillon dans une cuvette en quartz de parcours optique 1 cm. La cuvette est de type "fluorescence" avec ses quatre faces permettant 100% de transmission du signal optique. L'excitation de l'échantillon se fait perpendiculairement et exactement au même niveau que le faisceau d'analyse.

C. Description du montage expérimental

Représenté à la figure II-6, le système de photolyse éclair se divise en deux sections:

- un axe d'analyse permettant d'observer l'apparition ou la disparition des intermédiaires de la séquence photolytique.

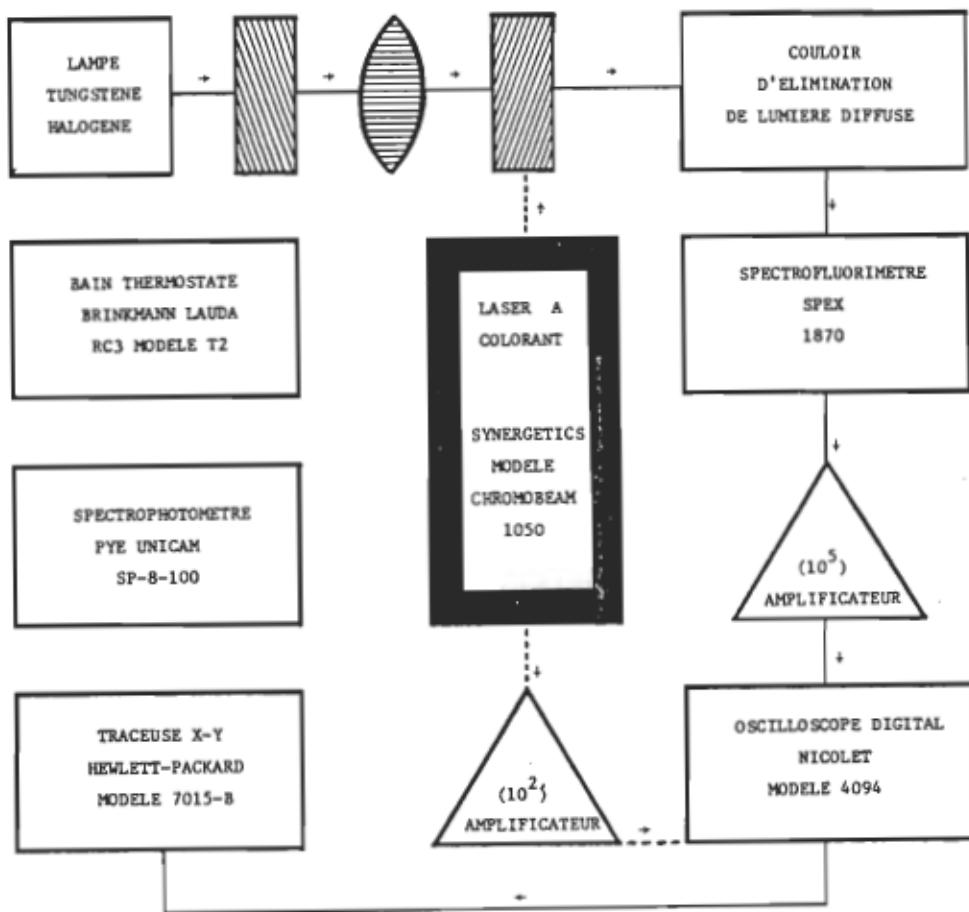


Figure II-6: Montage expérimental - Photolyse éclair. En trait plein, l'axe d'analyse. En trait discontinu, l'axe d'excitation. Le filtre passe-bande est représenté par \\\, la lentille convergente par == et l'échantillon de rhodopsine par //// . Les composantes non reliées au système par des traits sont accessoires.

- un axe d'excitation permettant de déclencher la séquence photolytique.

a. Axe d'analyse

Le faisceau d'analyse est émis par une lampe à filament de tungstène-halogène développant une puissance de 100 watts sous une tension de 12 volts issue de deux piles branchées en parallèle.

La lumière blanche est filtrée à la sortie de la source d'analyse. Les différents filtres passe-bande utilisés sont indiqués au tableau II-5. La longueur d'onde est celle où la transmission de lumière est maximale.

Une seule longueur d'onde est sélectionnée à la fois. Ainsi l'apparition de la métarhodopsine II est bien visualisée à 385 nm où on note une diminution de transmittance de l'échantillon. La cinétique est identique à 450, 500 ou 520 nm, bien qu'ici la disparition de la métarhodopsine I entraîne une augmentation de la transmittance de l'échantillon. Selon la longueur d'onde d'analyse choisie, le sens et l'amplitude de la variation de transmission seront différents mais la vitesse de la réaction demeure la même.

Entre la source et l'échantillon, une lentille fait converger le faisceau d'analyse vers l'échantillon.

Tableau 11-5

Filtres utilisés à la sortie de la source d'analyse

Filtre - λ max (nm)	% T (λ max)	Largeur de bande à mi-hauteur (nm)	Provenance
385	60	40	Baird atomic
450	73.8	36	Baird atomic
500	50	7.4	Ditric optics
520	52.5	88	Baird atomic

Le porte-échantillon est percé de fenêtres d'analyse et perpendiculairement à ces dernières, de fenêtres permettant d'exciter l'échantillon. Sur le trajet du faisceau d'analyse, l'ouverture optique du porte-échantillon est de 1.1 cm, délimitée par un bloc de Teflon et un revêtement opaque.

A la sortie de l'échantillon, le faisceau d'analyse s'engage dans un couloir d'élimination de la lumière diffusée (Xénon Corporation, modèle LB 1296) avant d'atteindre un spectrofluorimètre (Spex 1870) très sensible. La longueur d'onde à laquelle est ajusté le spectrofluorimètre doit être la même que celle transmise par le filtre d'analyse.

Le signal enregistré par le spectrofluorimètre est amplifié avant d'être acheminé vers un oscilloscope digital Nicolet, modèle 4094. L'amplificateur courant/voltage de type domestique multiplie le signal par un facteur de 10^5 . L'oscilloscope permet de visualiser la variation d'intensité du faisceau d'analyse en fonction du temps. L'enregistrement des variations d'amplitude du signal est affiché sur l'écran cathodique de l'oscilloscope.

Les données enregistrées sur l'oscilloscope sont acheminées vers une traceuse X-Y de marque Hewlett-Packard, modèle 7015B. La calibration de la traceuse est de 0.1 volt/pouce. L'expansion du signal tracé, en amplitude

et en temps, est déterminée sur l'oscilloscope.

b. Axe d'excitation

La source d'excitation est un laser à colorant de la compagnie Synergetics, modèle Chromobeam 1050. La longueur d'onde du faisceau laser correspond au spectre de fluorescence du colorant qui circule dans la lampe co-axiale. La décharge de cette lampe excite la fluorescence du colorant pendant une période d'environ 200 nanosecondes, ce qui n'interfère aucunement avec les vitesses de réaction mesurées. Le laser est disposé perpendiculairement à l'axe d'analyse. L'ouverture optique du laser est centrée sur la fenêtre latérale du porte-échantillon.

Une pompe assure la circulation en continu du colorant. La source de tension couplée au laser permet d'appliquer de forts voltages aux bornes de la lampe co-axiale. Le pulseur branché sur la source de tension permet d'actionner le mécanisme de déclenchement du laser par une simple pression du doigt.

Le système de photolyse déclenche et enregistre les données à partir de l'émission de l'éclair de lumière. Directement fixée sur la lampe co-axiale du laser, une fibre optique revêtue d'un enduit conducteur et d'un matériel isolant est reliée à une photodiode dont le

niveau d'amplification est de 10^2 . La photodiode est branchée à l'oscilloscope en mode de déclenchement externe.

c. Alignement du montage

Il convient d'aligner et de positionner soigneusement toutes les composantes des axes d'analyse et d'excitation en vue d'optimiser le signal et la variation de signal perçus par le détecteur, tout en minimisant les bruits parasites.

Les composantes de l'axe d'analyse sont disposées précisément et fixées solidement sur un rail optique rigoureusement droit et stable. La source d'analyse est munie d'un dispositif d'ajustement micrométrique.

Présentées dans les tableaux suivants, les coordonnées de chaque partie du montage sont extrêmement importantes et permettent une performance optimale lors des expériences.

Le laser est perpendiculaire à l'axe d'analyse. Une distance de 7.0 cm sépare l'ouverture optique du laser et le centre du porte-échantillon. L'optique interne du laser doit être ajustée de manière à avoir l'effet laser maximum.

Lors des procédures d'alignement, il est nécessaire

Tableau II-6

Position des éléments sur le rail optique
par rapport au point 0 cm
correspondant à l'entrée du spectrofluorimètre

couloir d'élimination

- limites externes de la première fixation 8.35 à 14.75cm
- limites externes de la seconde fixation 26.00 à 32.35cm

porte-échantillon

- limites externes de la fixation 49.35 à 53.20cm

lentille convergente

- limites externes de la fixation 136.90 à 142.85cm

source d'analyse

- limites externes de la première fixation 158.75 à 165.15cm
 - limites externes de la seconde fixation 171.60 à 177.55cm
-

Tableau II-7

Position des éléments

par rapport au niveau 0 cm de la table d'appui
mesurée à mi-hauteur de l'ouverture optique

spectrofluorimètre

- entrée 31.25cm

couloir d'élimination

- entrée 31.30cm

- sortie 31.25cm

porte-échantillon 31.25cm

lentille convergente 31.20cm

source d'analyse 32.10cm

laser 31.25cm

d'ajouter un filtre neutre (30% T) devant le porte-échantillon, pour deux raisons:

- 1) éviter de saturer et d'endommager le spectrofluomètre avec un signal trop intense pendant une trop longue période de temps,
- 2) vérifier la calibration du signal perçu par le spectrofluorimètre.

L'emplacement de chacune des composantes est délimité par de fins traits de peinture blanche. Ce système permet de déceler au premier coup d'oeil tout déplacement notable des éléments du montage de photolyse éclair.

d. Composantes accessoires

D'autres appareils sont associés au montage. Un bain thermostaté Brinkmann Lauda RC3, modèle T2, permet d'incuber les échantillons à des températures précises, soit à $\pm 0.2^\circ \text{C}$. La vitesse des réactions analysées est fortement dépendante de la température.

Aussi couplé au système, un spectrophotomètre uv-visible Pye Unicam SP-8-100 permet de contrôler les échantillons avant photolyse et aussi d'observer le blanchiment de la rhodopsine soumise à un éclair de lumière intense.

Enfin, une caméra adaptable à l'écran cathodique de l'oscilloscope permet de conserver les résultats expérimentaux sur pellicules photographiques.

D. Procédure expérimentale

a. Ajustement du laser à colorant

i. Colorant

Le colorant employé est le Coumarin 504 de Exciton (Litman et al., 1982). On le prépare à une concentration de 10^{-4} M dans du méthanol contenant 1% p/v d'Ammonyx-LO.

Le choix du colorant est déterminé par la nécessité d'exciter la rhodopsine dans sa bande d'absorption visible.

Le Coumarin 504 émet une impulsion laser centrée à 499 nm.

ii. Circulation du colorant

- Rincer le circuit de pompage avec du méthanol pendant 15 minutes.
- Verser 400 ml de colorant frais dans le réservoir et faire circuler à vitesse maximale pour éliminer toutes les bulles d'air.
- Pour les expériences, ajuster la vitesse de circulation du colorant à 2/3 de la vitesse maximale.
- Vérifier le niveau et l'état du colorant régulièrement car il s'évapore lentement et se dénature relativement rapidement selon l'utilisation. Le colorant est efficace si 10 à 15% de la rhodopsine est blanchie par un seul éclair de lumière verte.

iii. Source de tension

- Ajuster la source de tension à environ 20 000 volts, puis précisément à 20 000 volts quand l'appareil est réchauffé.
- Un pulseur commande le déclenchement du laser. Il est nécessaire d'attendre au moins 3 minutes entre 2 éclairs successifs afin d'obtenir une décharge maximale et reproductible de la lampe co-axiale.
- Purger et pressuriser le laser avec de l'azote sec pour avoir un effet laser maximal.

b. Ajustement de l'oscilloscope

- Enregistrer les données provenant du spectrofluorimètre en mode "Live" et "Hold next" sur la sélection "Data Move". Ajuster le temps par point à $10\mu s$.
- Ajuster le seuil de déclenchement à 300 mV avec une sensibilité maximale. Positionner le contrôle de pente à "Dual". Sélectionner l'échelle de voltage allant de 0 à 2 volts.
- Utiliser le canal A pour recevoir les informations du spectrofluorimètre; mettre les contrôles (+) sur DC et (-) sur "Ground". Le canal B est fermé et ses bornes positive et négative sont mises à la terre.
- Utiliser toutes les positions de mémoire. Conserver une portion de signal correspondant à 10 ms avant

l'éclair de lumière verte.

- Sélectionner le système de couplage "DC". Ne pas employer le filtre 100 kHz car il interfère avec la vitesse des réactions analysées.

c. Ajustement du spectrofluorimètre

- Ajuster la source d'alimentation (Kepco 0-1500 volts) du spectrofluorimètre à 580 volts.
- Ajuster la largeur des fentes selon la longueur d'onde du faisceau d'analyse. L'intensité de la source d'analyse n'est pas constante sur toute la gamme du visible. La hauteur des fentes d'entrée et de sortie est constante, soit 1 mm.

Les sélections ci-haut mentionnées, pour la tension et la dimension des fentes ont aussi pour but de minimiser au maximum le bruit de fond. (Tableau II-8).

d. Protocole expérimental

- Travailler sous éclairage rouge (620 nm) très peu intense. Mettre en marche le laser à colorant, le spectrofluorimètre, l'oscilloscope et l'amplificateur de déclenchement (photodiode).
- Enregistrer un spectre d'absorption de l'échantillon de 650 à 250 nm.
- Incuber l'échantillon au moins 30 minutes à la température désirée, dans le bain thermostaté.

Tableau II-8

Largeur des fentes du spectrofluorimètre
selon la longueur d'onde d'analyse

Longueur d'onde d'analyse (nm)	Largeur des fentes (entrée et sortie) (mm)
385.0	1.2
450.0	0.6
500.0	0.8
520.0	0.8

- Brancher la source d'analyse. Sélectionner la longueur d'onde d'analyse (filtre et spectrofluorimètre).
Mettre un écran opaque devant la lampe.
- Placer, toujours selon la même orientation, la cuvette de quartz contenant la rhodopsine dans le porte-échantillon.
- Lever l'écran devant la source d'analyse. Déclencher immédiatement la source d'excitation laser en actionnant le pulseur. Replacer l'écran.
- Enregistrer le spectre d'absorption de l'échantillon photolysé.
- Sélectionner les expansions d'échelle appropriées de manière à tirer le plus d'informations possible du signal enregistré par l'oscilloscope. Faire tracer le signal. Prendre une photographie de l'écran cathodique (au besoin).
- Répéter l'expérience avec les autres échantillons.

III- RESULTATS ET DISCUSSIONS1. Généralités

La reproductibilité est la qualité première d'un bon résultat. C'est grâce à elle si un résultat original peut être cautionné.

Nos expériences, exécutées selon les procédures décrites précédemment, donnent des résultats reproductibles.

Si on excepte les mesures visant à caractériser les détergents, faites à deux reprises, toutes les autres mesures ont été reproduites au moins cinq fois. Les études de la séquence photolytique de la rhodopsine en spectroscopie d'absorption électronique à basse température représentent six essais dans chaque type d'échantillon. Ce nombre dépasse souvent huit en photolyse éclair, où pas moins de 125 échantillons ont été photolysés.

2. Purification de la rhodopsine bovineA. Méthode de purification de la rhodopsine

La purification de la rhodopsine bovine exige de nombreuses manipulations. L'obtention de la protéine délipidée et solubilisée dans un détergent est l'aboutissement d'une démarche expérimentale nécessitant plus de cent heures.

a. Isolation des membranes discales

L'isolation des S.E.B. à partir de rétines animales se divise en quatre étapes.

i. Dissection des yeux pour obtenir les rétines

Les yeux doivent être disséqués dans les deux ou trois heures suivant l'abattage, l'humeur vitrée s'enlève plus facilement car la rétine n'y adhère pas. Aussi, la rétine se détache aisément de l'épithélium pigmentaire et on évite la présence d'un surplus de contaminants associés à ce tissu (De Grip et al., 1980).

ii. Homogénéisation des rétines pour briser les cellules et libérer les S.E.B.

La cellule photoréceptrice en bâtonnet présente une faiblesse structurale au niveau du cil connectif. Le brassage énergique en solution de sucre (Papernoster et Dreyer, 1974, Schnetkamp et al., 1979), à la main et sur plaque agitatrice, est très efficace pour récupérer les S.E.B. Cette méthode réduit considérablement la quantité de contaminants, en abaissant peu le rendement final. Notre procédure sépare les S.E.B. dans le milieu d'isolement sans sucre, et est suivie d'une filtration qui élimine les gros fragments cellulaires et tissulaires. L'utilisation d'un homogénéiseur avec piston de verre n'est pas recommandée puisque les S.E.B. sont fragmentés et ainsi plus difficiles à purifier.

iii. Séparation des S.E.B. de fragments de densité différente

Les débris cellulaires sont éliminés par au moins deux étapes de centrifugation (Hubbard et al., 1971, Papermaster et Dreyer, 1974). La centrifugation dans du sucre 40% sépare les S.E.B. des contaminants plus denses comme la mélanine. Dans un milieu contenant moins de 28% de sucre, on enlève les impuretés moins denses, ou solubles dans le tampon d'isolement comme l'hémoglobine. Généralement, les S.E.B. sont flottés et sédimentés deux fois.

iv. Purification des S.E.B. sur gradient continu de sucre

A l'origine, notre méthode de purification des S.E.B. consistait en des flottations sur 40% de sucre et des sédimentations dans le tampon d'isolement, répétées jusqu'à l'élimination des contaminants et surtout de l'épaulement à 410 nm présent sur les spectres d'absorption. Cette procédure nécessite beaucoup de temps, souvent dix cycles de flottation/sédimentation, et surtout ne rend pas le matériel aussi pur que sur gradient de densité (De Grip et al., 1972). La méthode de gradient continu est rapide, reproductible et plus efficace que les

flottations ou les gradients discontinus. En utilisant le sucre pour faire les gradients, on dispose d'un produit inoffensif pour le matériel biologique.

En lumière rouge, les bandes séparées sur le gradient (figure III-1) sont observables par leur turbidité. Souvent une mince bande flotte sur le dessus du gradient, à la frontière du filtrat et du sucre. Elle consisterait en petits fragments membranaires et en vésicules dérivées de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique (De Grip et al., 1980). La seconde bande, la plus importante, se compose majoritairement de S.E.B. purs et morphologiquement intacts. Elle se situe près du milieu du gradient, légèrement décentrée vers le bas. Les S.E.B. fragmentés ont une densité à peine plus faible que les S.E.B. intacts, ils constituent la portion inférieure de la bande (Krebs et Kühn, 1977, Godchaux et Zimmerman, 1979). Une bande mineure, sous celle des S.E.B. purs, renferme une minorité de S.E.B. fortement contaminés et d'autres fragments d'origine golgiennne ou lysosomale. Le sédiment contient du matériel du réticulum endoplasmique, des lysosomes et des mitochondries, des granules de mélanine et des érythrocytes (De Grip et al., 1980).

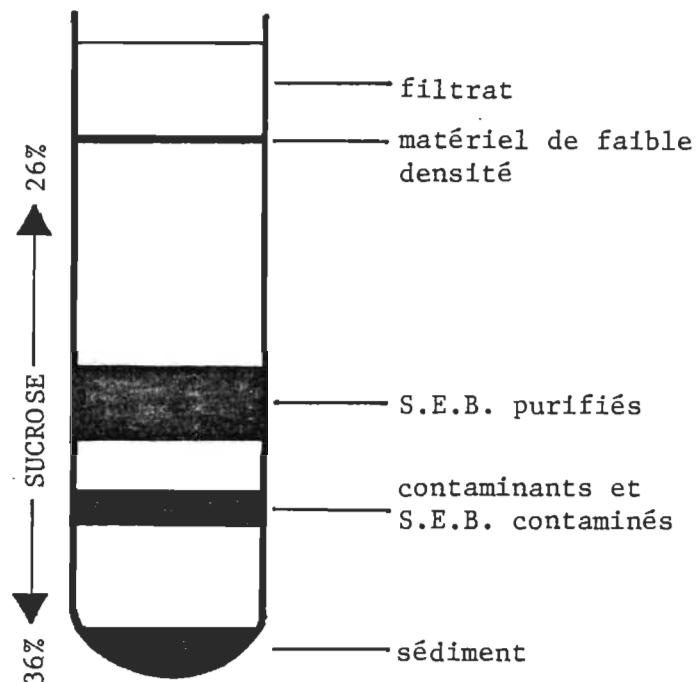


Figure III-1: Position des bandes séparées sur gradient continu de sucre.

L'utilisation de gradients de Ficoll-400, un co-polymère de sucre et d'épichlorhydrine, permet d'isoler plus facilement les S.E.B. mais sous une forme moins pure et considérablement agrégée (Lolley et Hess, 1969, Bownds et al., 1971, De Grip et al., 1980). La combinaison du sucre avec le Ficoll-400 donnerait de bons résultats, à condition d'utiliser des rétines fraîches (Schnetkamp et al., 1979). De fait, les S.E.B. purifiés à partir de rétines congelées sont toujours plus fortement contaminés (De Grip, non publié).

La purification des S.E.B. se termine avec l'éclatement de la membrane plasmique lors des lavages à l'eau distillée. On élimine ainsi le matériel intracellulaire hydro soluble pour conserver les membranes discoidales et des fragments membranaires. Les S.E.B. purifiés peuvent être conservés deux à trois mois au congélateur, sans aucune détérioration apparente.

b. Fractionnement au sulfate d'ammonium (Makino et al., 1977)

Cette méthode permet de séparer la rhodopsine de l'opsine, mais laisse la rhodopsine partiellement délipidée. En vue d'éviter une perte de rhodopsine lors du fractionnement au sulfate d'ammonium, il est avantageux

d'enlever les autres protéines petit à petit afin de minimiser le risque de co-précipitation avec la rhodopsine.

La rhodopsine se retrouve presque exclusivement dans le précipité des fractions saturées à 57% et 59% en sulfate d'ammonium. Makino et al.,(1977) recouvrent leur rhodopsine à 55%, 57% et 60% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

La pureté de la rhodopsine obtenue dépend fortement de la qualité du matériel de départ, de plus, le rendement est sérieusement affecté par la présence d'opsine. Pour ces raisons, les membranes discales sont lavées à l'hexane, avant le fractionnement, pour les débarrasser de la moitié des phospholipides. Beaucoup de matériel insoluble est éliminé lors de la solubilisation de la rhodopsine dans l'acide cholique. Les améliorations apportées à la purification des S.E.B. facilitent la réussite du fractionnement; il était déjà arrivé, par le passé, que la rhodopsine ne précipite pas à plus de 60% de saturation en sulfate d'ammonium. Les précipités de rhodopsine sont recueillis dans un volume minimal d'acide cholique, puis dialysés pour éliminer le sulfate d'ammonium.

c. Chromatographie d'affinité

La préparation de la rhodopsine purifiée se termine par une chromatographie d'affinité sur de la concanavaline A immobilisée dans un gel de Sépharose. Aucun glycolipide ne se trouve dans la membrane photoréceptrice (Anderson et al., 1975) et la rhodopsine y est la seule glycoprotéine. Ceci permet la purification du pigment visuel par liaison d'affinité à des lectines comme la Con A.

Tout détergent non dénaturant peut être employé lors de cette chromatographie; l'efficacité de la chromatographie dépend cependant du choix du détergent. La délipidation complète de la rhodopsine est aisément réalisée dans tous les détergents à l'exception de la digitonine (De Grip et al., 1980). L'opsine se lie plus fortement à la Con A que la rhodopsine (Renthal et al., 1973) ce qui permet de séparer la rhodopsine de l'opsine restante.

La chromatographie d'affinité est versatile, permettant l'échange de l'acide cholique pour du L-1690 ou de l'Ammonyx-L0. A l'élution, le sucre éluant se substitue à la rhodopsine sur le gel en raison de sa plus grande affinité pour la Con A. La rhodopsine éluée est très concentrée. Le sucre éluant est facilement éliminé des échantillons de rhodopsine par dialyse (Baron et Thompson, 1975).

Le seul désavantage vient d'une faible perte de Con A par la matrice. La lectine pourrait être éliminée des échantillons de rhodopsine par chromatographie sur du Séphadex G-50 (De Grip et al., 1980). L'affinité de la Con A pour la rhodopsine est plus grande à 25° C mais la chromatographie est réalisée à 4° C pour ne pas dénaturer la rhodopsine.

Le tableau III-1 résume la procédure de purification de la rhodopsine bovine et le résultat de chacune des manipulations.

B. Rendement de la purification de la rhodopsine

Souvent la quantité de rhodopsine est déterminée en mesurant la diminution d'absorbance à 500 nm suite à une illumination.

Dans certaines conditions, les photoproducts absorbent aussi à 500 nm (Hubbard et al., 1971, Futterman, 1974). L'addition d'hydroxylamine convertit le rétinal libre et lié en rétinoloxime ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$); ce dernier n'absorbe pas les longueurs d'onde supérieures à 450 nm (Hubbard et al., 1971). Dans certains détergents comme les oxydes d'amines, l'addition d'hydroxylamine n'est pas requise car le rétinal y est complètement libéré sous illumination et n'interfère pas avec l'absorbance mesurée à 500 nm. D'autre part, nous ne nous sommes pas servis de l'hydroxylamine avec la rhodopsine solubilisée

Tableau III -1

Purification de la rhodopsine bovine

Etapes	Matériel conservé	Matériel éliminé
Abattage	Yeux	
Dissection	Rétines	Autres parties
Agitation et filtration sur gaze	Fragments cellulaires	Cellules nerveuses, capillaires, segments internes
Sédimentation en milieu isotonique	Fragments cellulaires	Contaminants hydrosolubles (ex.: hémoglobine)
Flottations sur sucre	Segments externes des bâtonnets	Contaminants denses (ex.: mélanine)
Séparation sur gradient de sucre	Segments externes des bâtonnets	Impuretés et S.E.B. contaminés
Lavages à l'eau distillée	Segments externes lysés	Matériel intracellulaire hydrosoluble
Lyophilisation et lavages à l'hexane	Rhodopsine et fragments de disques	Rétinal libre et 50% des lipides
Solubilisation dans l'acide cholique	Rhodopsine, lipides et autres protéines	Matériel insoluble
Fractionnement au sulfate d'ammonium saturé	Rhodopsine, lipides et autres protéines	Opsine, protéines et lipides
Solubilisation dans l'acide cholique et dialyse	Rhodopsine, lipides et autres protéines	Matériel insoluble et sulfate d'ammonium
Chromatographie d'affinité	Rhodopsine purifiée, dé-Lipides, opsine et lipidée et solubilisée dans un détergent	protéines
Dialyse	Rhodopsine purifiée	Sucre éluant

dans le L-1690, la correction étant négligeable en regard de la quantité de pigment visuel présent.

Une rétine d'animal adulte contient 50 à 60 nanomoles de rhodopsine, soit environ 2 mg (De Grip et al., 1980). A partir de 100 yeux, on pourrait théoriquement recueillir 200 mg de rhodopsine. Toujours selon De Grip et al., (1980), le filtrat déposé sur gradient de sucre ne contient plus que 60 à 70% de la rhodopsine présente à l'origine dans les cellules photoréceptrices. On ne récupérerait finalement que 20 à 30 nanomoles de rhodopsine par rétine quand les S.E.B. sont purifiés sur gradient continu. Le rendement du fractionnement au sulfate d'ammonium se situerait entre 60 et 90% (Makino et al., 1977) et celui de la chromatographie d'affinité entre 90 et 100% (De Grip et al., 1980). Ce sont donc les premières étapes de la purification qui entraînent les plus grandes pertes.

Le tableau III.-2 présente nos rendements, calculés pour 100 rétines adultes. Notre rendement global, 60 mg, se situe avantageusement par rapport aux valeurs extrêmes de 40 et 100 mg prévues théoriquement. Nos préparations de S.E.B. sur gradient de sucre donnent le rendement escompté, soit environ 25 nanomoles de rhodopsine par rétine. Le fractionnement au sulfate d'ammonium permet de précipiter 95% de la rhodopsine, concentrée en deux fractions. On recouvre environ 90%

Tableau III-2

Rendement et pureté spectrale

Etape de purification	Rendement (mg de rhodopsine)	Pureté spectrale A_{278} / A_{498}
100 yeux de boeuf	200	
Gradient de sucre	91	2.48
Solubilisation dans l'acide chologique	72	2.19
Fractionnement au sulfate d'ammonium		
1. Surnageant 33% S.A.	72	2.15
2. Précipité 57% S.A.	58	1.78
Précipité 59% S.A.	12	1.78
3. Bilan global	70	1.78
Chromatographie d'affinité (1 ou 2)		
1. Rhodopsine - Ammonyx-LO		
A. Regroupement des fractions éluées	40 20	1.79 1.96
B. Meilleure fraction	13	1.47
C. Bilan global	63	
2. Rhodopsine - L-1690		
A. Regroupement des fractions éluées	46 9	1.95 2.12
B. Meilleure fraction	4.8	1.60
C. Bilan global	58	

de la rhodopsine déposée sur la concanavaline A. Une perte majeure survient cependant lors de la première solubilisation dans l'acide cholique, où il semble qu'une fraction de la rhodopsine demeure insoluble. Le choix du détergent ne semble pas déterminant pour le rendement de la chromatographie d'affinité bien que la rhodopsine soit légèrement plus soluble dans l'Ammonyx-LO.

Il demeure évident que notre méthode de purification de la rhodopsine comporte plusieurs étapes. Plus le nombre de manipulations est important, plus on risque de perdre du produit. Nous avons cependant obtenu de grandes quantités de rhodopsine à partir des rétines bovines. On doit se rappeler que l'adaptation des bovins à l'obscurité est impossible. Près de la moitié de la quantité totale de pigment visuel s'y retrouve blanchie. De Grip et al., (1972) suggèrent une procédure pouvant convertir l'opsine présente en rhodopsine par incubation *in vitro* avec un excès de 11-cis rétinal. L'excès de rétinal est enlevé par la suite. Nous avons essayé de régénérer la rhodopsine à partir de l'opsine et de 11-cis rétinal, mais nos rendements n'ont jamais été augmentés suite à cette étape supplémentaire.

C. Pureté spectrale de la rhodopsine

Le spectre d'absorption de la rhodopsine montre cinq bandes. Deux de ces bandes ne sont jamais utilisées pour

établir les rapports de pureté spectrale. Elles se situent dans l'ultraviolet à 191 et 227 nm et sont dues au squelette de la protéine, plus spécifiquement aux liens peptidiques (Rafferty et al., 1977). Par contre les rapports d'absorbance A_{278} / A_{498} et A_{400} / A_{498} offrent une indication de la pureté des préparations de rhodopsine. La rhodopsine purifiée par différentes méthodes présente des rapports A_{278} / A_{498} de 1.65 - 1.80 et des rapports A_{400} / A_{498} de 0.16 à 0.24 (Heller, 1968, Shichi et al., 1969, Hong et Hubbell, 1973, van Breugel et al., 1977). On ne doit pas accorder trop d'importance à ces rapports puisqu'ils sont affectés par la diffusion de lumière se produisant dans les solutions micellaires.

Nos rapports de pureté spectrale A_{278} / A_{498} sont présentés dans le tableau III-2. La valeur de 2.48 obtenue avec les S.E.B. en suspension dans l'eau distillée se compare avantageusement aux rapports supérieurs à 3.1 de Mc Connell et al. (1981) pour des S.E.B. solubilisés dans quatre détergents (Brij 96, CTAB, acide cholique et digitonine). Des travaux récents (Salesse et al., 1984) démontrent bien la possibilité d'obtenir des rapports de pureté spectrale inférieurs à 2.0, et même à 1.5, pour des S.E.B. solubilisés dans l'Ammonyx-L0. Compte tenu des protéines et des autres impuretés éliminées lors du fractionnement et de la chromatographie, notre rapport s'abaisse à environ 1.60 pour la rhodopsine purifiée et délipidée. La rhodopsine chromatographiée montre

une meilleure pureté spectrale dans l'Ammonyx-LO, et est éluée sous une forme plus concentrée dans ce détergent. Le rapport A_{400} / A_{498} est légèrement inférieur dans l'Ammonyx-LO à 0.21 comparativement à 0.24 dans le L-1690.

Les spectres d'absorption caractéristiques des S.E.B. purifiés, et de la rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-LO ou le L-1690 sont représentés aux figures III-2, 3 et 4. Le spectre de S.E.B. souffre du phénomène de diffusion de lumière par les fragments membranaires tandis que pour la rhodopsine purifiée, les bandes d'absorption α , β et γ sont très bien définies.

L'évaluation de la pureté spectrale doit être appuyée d'un dosage de phospholipides par rhodopsine et, si possible, de la détermination de la composition des chaînes d'acides gras. Le rapport A_{278} / A_{498} est sensible à l'entreposage sur de longues périodes de temps: une certaine quantité de rhodopsine se dénature et le rapport augmente. Suite à une élévation de la température, le rapport augmente à cause d'un effet hyperchrome des acides aminés. Le rapport de pureté spectrale est aussi dépendant de la nature et de la concentration du détergent, de même que de la méthode de purification utilisée.

D. Caractérisation des échantillons de rhodopsine

a. Nombre de phospholipides par rhodopsine

Le dosage du nombre de phospholipides par rhodopsine

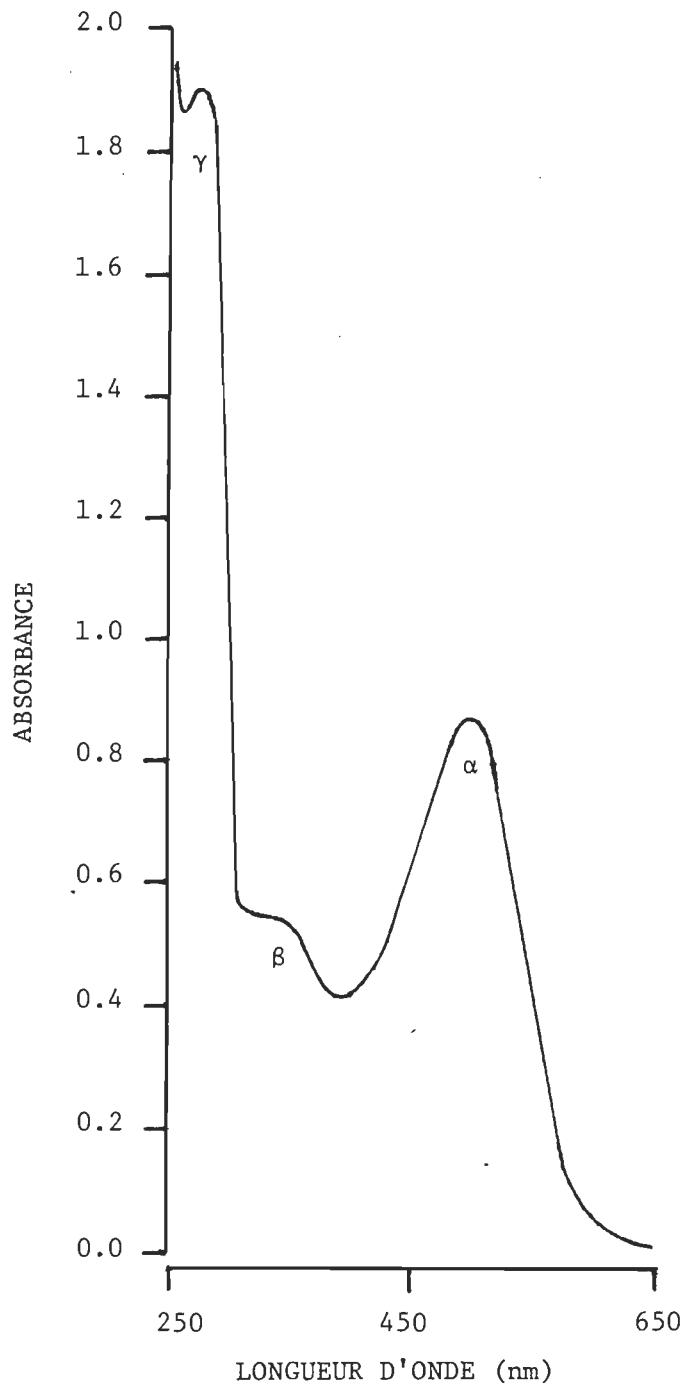


Figure III-2: Spectre d'absorption électronique de S.E.B. L'échantillon a été prélevé avant déposition sur le gradient continu de sucre. La référence est le tampon d'isolement. L'absorbance sur 2 mm est de 0.87 à 498 nm et de 1.88 à 278 nm. La pureté spectrale A_{278}/A_{498} est égale à 2.16. Le spectre montre les bandes α , β et γ de la rhodopsine.

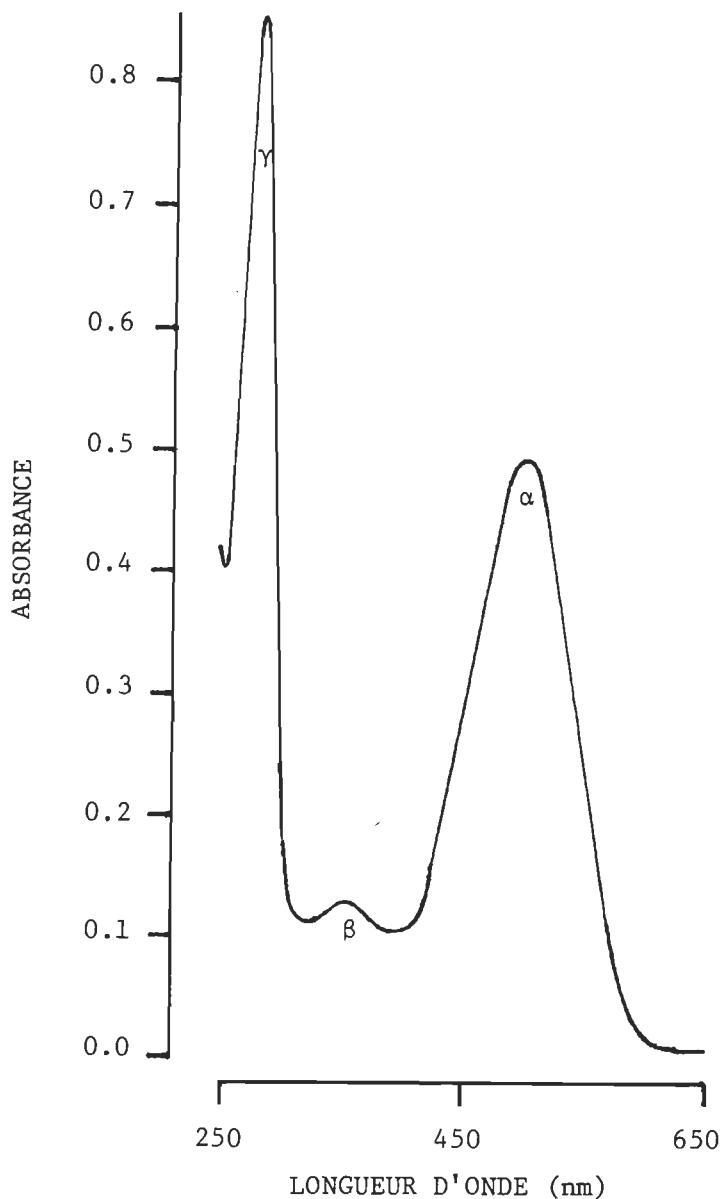


Figure III-3: Spectre d'absorption électronique de rhodopsine purifiée solubilisée dans l'Ammonyx-LO. L'échantillon a été dialysé après la chromatographie d'affinité. La référence est un tampon Tris-Cl 50 mM pH 7.5 ajusté à 0.2% d'Ammonyx-LO. L'absorbance sur 2 mm est de 0.48 à 498 nm et de 0.84 à 278 nm. La pureté spectrale A_{278}/A_{498} est égale à 1.75. Le spectre de la rhodopsine présente les bandes α , β et γ .

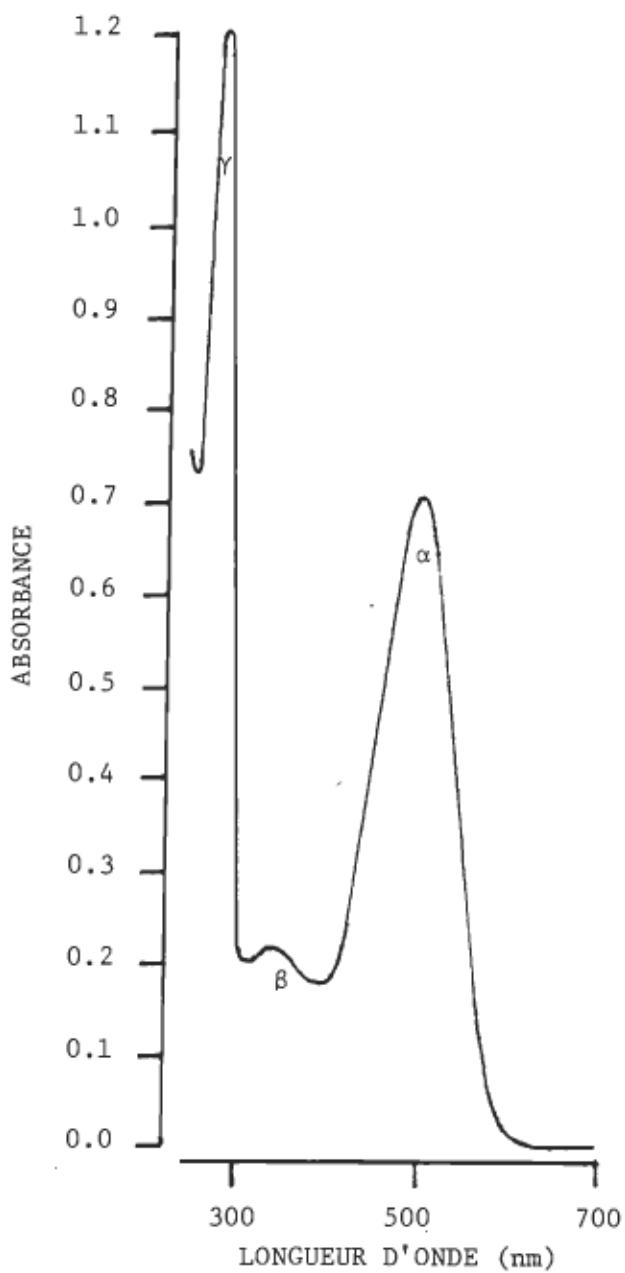


Figure III-4: Spectre d'absorption électronique de rhodopsine purifiée solubilisée dans le L-1690. L'échantillon a été dialysé après la chromatographie d'affinité. La référence est un tampon Tris-Cl 50 mM pH 7.5 ajusté à 0.2% de L-1690. L'absorbance sur 5 mm est de 0.71 à 498 nm et de 1.20 à 278 nm. La pureté spectrale A_{278}/A_{498} est de 1.70. Le spectre de la rhodopsine présente les bandes α , β et γ .

est un critère de pureté acceptable. Dans son environnement natif, la membrane discale, une molécule de rhodopsine serait entourée de 65 à 75 phospholipides (Miljanich 1978, Stubbs et Litman, 1978, Stone et al., 1979, Salesse et al., 1984). Dans les S.E.B., nous avons dosé en moyenne 112 phospholipides par rhodopsine probablement à cause de la présence de fragments de membrane plasmique ou de rhodopsine blanchie. Par contre la rhodopsine purifiée peut être considérée complètement délipidée; le dosage révèle un maximum de 2 phospholipides par molécule de rhodopsine, que ce soit dans le L-1690 ou dans L'Ammonyx-LO.

b. Présence de contaminants

Les électrophorèses ont été effectuées afin de visualiser l'élimination des impuretés pendant la purification. La rhodopsine chromatographiée présente un patron caractéristique sur gel de polyacrylamide: une seule bande bien délimitée et fortement colorée par le bleu de Coomassie. La mobilité relative de cette bande, attribuée à la rhodopsine, est de 0.82 par rapport à la bande correspondante chez les S.E.B. purifiés. D'autres bandes, beaucoup moins importantes, sont présentes dans les échantillons de S.E.B. soumis aux électrophorèses. Ces bandes indiquent la présence de protéines autres que la rhodopsine dans la membrane discale.

c. Etat d'agrégation de la rhodopsine

La rhodopsine non illuminée est sous forme de monomère dans la membrane discale (Chabre, 1975, Blaurock, 1977). Lorsqu'elle est purifiée et solubilisée dans l'Ammonyx-L0, on en retrouve plus de 90% sous forme de monomères (Appleybury et al., 1974). Nous avons chromatographié des échantillons de rhodopsine purifiée, délipidée et solubilisée dans l'Ammonyx-L0 ou dans le L-1690 sur un tamis moléculaire permettant de distinguer la rhodopsine monomérique de la forme agrégée. Le profil d'élution illustré à la figure III-5 indique que la rhodopsine serait aussi monomérique dans le L-1690. Dans les deux détergents, le recouvrement de la rhodopsine déposée sur la colonne est quantitatif.

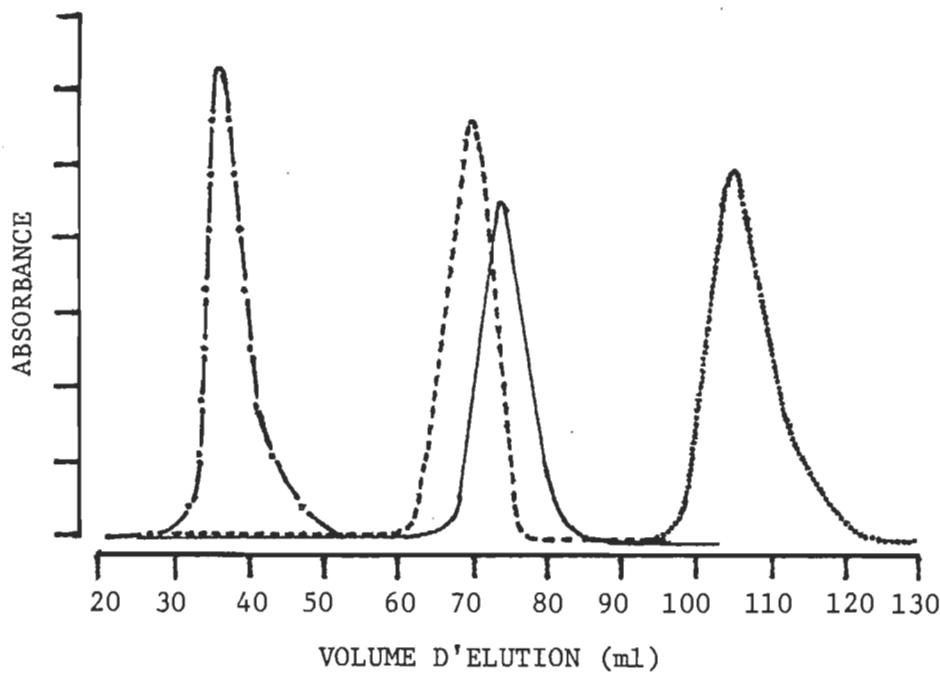


Figure III-5: Profil d'élution sur tamis moléculaire Biogel A5. Le Dextran bleu (·—·) est une macromolécule éluée très rapidement du gel. L'autre standard, la riboflavine (····), pénètre les billes de gel et traverse le gel beaucoup plus lentement en raison de son faible poids moléculaire. La rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-L0 (—) ou dans le L-1690 (----) est éluée sensiblement au même endroit, suggérant la présence majoritaire de monomères de pigment visuel dans les deux échantillons.

3. Caractérisation des détergents

A. Généralités - Solubilisation et stabilité thermique de la rhodopsine

La purification de la rhodopsine requiert sa séparation des autres protéines membranaires et aussi des lipides présents. Ceci nécessite l'emploi de détergents pour fragmenter l'infrastructure membranaire en petites unités micellaires et échanger les phospholipides associés à la protéine pour des molécules de détergent. La solubilisation des membranes implique la formation de micelles mixtes avec les lipides membranaires et de micelles mixtes lipides-protéines (Helenius et Simons, 1975).

Quand la concentration de détergent est plus grande que celle requise pour induire la transition de phase lamellaire-micellaire, les phospholipides se séparent de la rhodopsine. Le degré de dissociation des lipides est fonction de la concentration de détergent. Dans le cas des surfactants ioniques, une fois que les lipides ont été déplacés, une augmentation ultérieure de la concentration de détergent entraîne sa liaison à la protéine, donnant à cette dernière une configuration dépliée. Les détergents doux non-ioniques, en vertu de leur faible CMC, ne se lient pas aux protéines de façon coopérative. Le détergent interagit avec les portions hydrophobes exposées de la rhodopsine. Il se forme un complexe rhodopsine-détergent soluble contenant ou non des phospholipides, selon la concen-

tration du détergent. L'état de la rhodopsine après solubilisation dépend de la nature et de la concentration du détergent.

La stabilité thermique de la rhodopsine solubilisée dépend de deux facteurs: 1) le degré avec lequel les phospholipides associés au pigment visuel peuvent être dissociés par le détergent et 2) la capacité du détergent, une fois qu'il a déplacé les lipides, de se substituer à ces lipides sans induire de changements conformationnels de la rhodopsine. L'Ammonyx-L0 et le L-1690 stabilisent la rhodopsine délipidée et se substituent aux phospholipides de la membrane discale sans perturber la structure de la protéine. L'étendue des changements conformationnels provoqués par l'interaction protéine - détergent est dépendante de la longueur des chaînes hydrocarbonées (Reynolds et al., 1967). La majorité des molécules d'Ammonyx-L0 et de L-1690 ont des chaînes hydrophobes à douze carbones.

De très légères différences dans la photosensibilité de la rhodopsine sont fonction du choix de l'agent solvatant (Waddell et al., 1976). Ceci suggère que l'interaction du détergent avec la protéine entraîne une perturbation subtile des interactions électroniques chromophore - protéine, sans toutefois être assez forte pour déplacer le maximum d'absorption. Dans l'Ammonyx-L0 et dans le L-1690, le pic de rhodopsine se situe à 498 nm. De plus, la même quantité de pigment visuel est photolysée lors d'illuminations similaires dans les deux détergents.

B. Concentration micellaire critique

La détermination de la CMC nous donne un aperçu de la taille des micelles de détergents. Déjà lors de la préparation des échantillons, on peut s'apercevoir qu'une des solutions préparées est moins transparente et plus diffuse que les autres.

La CMC du détergent est voisine de la concentration de cet échantillon. Les mesures de tension superficielle à différentes concentrations de détergent permettent de tracer un graphique de la tension de surface en fonction de la concentration de détergent. La courbe obtenue avec le L-1690 est illustrée à la figure III-6. Le point de brisure dans la courbe correspond à la CMC du détergent. Les résultats obtenus dans l'eau déminéralisée et dans le tampon sont semblables pour les deux milieux. A 23°C , les valeurs de CMC (tableau III-3) du L-1690 (0.46 mM) et de l'Ammonyx-LO (0.27 mM) se comparent à celles obtenues par Nashima et al. (1978) pour le L-1690 (0.20 mM) et par Mukerjee et Mysels (1971) pour l'Ammonyx-LO (entre 0.27 et 2.1 mM) à la même température. De Grip (1980) établit la CMC du L-1690 à 0.18 mM ($50-57^{\circ}\text{C}$) et celle de l'Ammonyx-LO à 1 mM ($40-48^{\circ}\text{C}$). Nos mesures ont été prises à la température ambiante (23°C). La composition hétérogène des deux détergents représente un handicap pour une détermination précise de la CMC.

Cependant, tous nos échantillons de rhodopsine contiennent une concentration de détergent, 0.2% ou 3%, bien

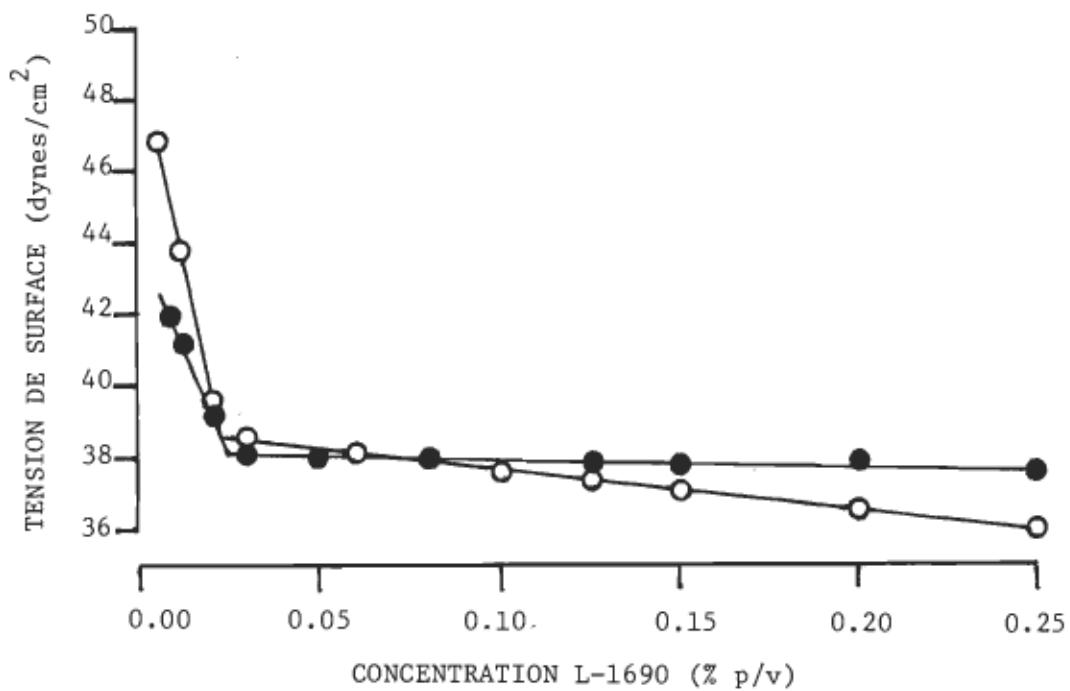


Figure III-6: Détermination de la CMC du L-1690. A concentration suffisamment élevée, les molécules de détergent forment des micelles en solution. Le point de brisure indique la CMC du détergent dans l'eau distillée déminéralisée (○—○) et dans le tampon Tris-Cl 50 mM pH 8.0 (●—●) à 23°C.

Tableau III-3

Propriétés des détergents

	Rigidité micellaire		
	CMC ₍₁₎	Spectroscopie ESR S ₍₂₎	Fluorescence 1/p ₀₍₃₎
L-1690	0.46mM	0.32	63°
Ammonyx-LO	0.27mM	0.12	78°

(1) Mesure par tension de surface dans un tampon Tris-Cl 50 mM pH 8.0

(2) Sonde utilisée: acide 12(4,4-diméthylloxazolidine - N -oxyl) stéarique
Rapport sonde/détergent: 1 pour 1500

(3) Sonde utilisée: acide 8 - anilino - 1 - naphthalène sulfonique
Rapport sonde/détergent: A saturation

supérieure aux CMC déterminées pour le L-1690 (0.022%) et pour l'Ammonyx-LO (0.007%). Il est nécessaire de travailler à des concentrations de détergent plus élevées que la CMC afin de s'assurer qu'il y a assez de monomères de détergents en solution. C'est la forme monomère, et non micellaire, du détergent qui interagit en premier avec la membrane ou la protéine à solubiliser (Helenius et Simons, 1975). La rhodopsine solubilisée dans le L-1690 ou dans l'Ammonyx-LO est contenue dans des micelles mixtes détergent - protéine.

C. Rigidité micellaire

a. Polarisation de fluorescence

Les valeurs de polarisation de fluorescence (p) à différentes viscosités sont présentées dans le tableau III-4.

En polarisation de fluorescence, une valeur de p égale à $-1/3$ est associée à un système micellaire très fluide tandis qu'une valeur de $\frac{1}{2}$ correspond à une rigidité micellaire maximale (Badley, 1976). A partir des valeurs de p , on peut donc présumer que la micelle de L-1690 est plus rigide que la micelle d'Ammonyx-LO.

Les viscosités absolues (tableau III-5) ont été calculées à partir de la viscosité de l'eau distillée à 23°C (0.9325 cp) multipliée par la viscosité relative des solutions de sucre.

Tableau III-4

Polarisation de fluorescence dans le L-1690

et dans l'Ammonyx-LO

Sucrose % p/v	L-1690 p	L-1690 1/p	Ammonyx-LO p	Ammonyx-LO 1/p
0	0.184	5.435	0.100	10.0
9.1	0.190	5.263	0.102	9.804
18.2	0.197	5.076	0.103	9.709
27.3	0.212	4.717	0.103	9.709
36.4	0.227	4.405	0.111	9.009

Tableau III-5

Viscosité (η) absolue des solutions de sucre

Sucrose % p/v	$\eta_{\text{abs}}^{23^{\circ}\text{C}}$ (cp)	1/ η
0	1.013	0.988
9.1	1.328	0.753
18.2	1.673	0.598
27.3	2.077	0.481
36.4	3.201	0.312

Le graphique des valeurs de $1/p$ en fonction de $1/n$ (figure III-7) montre deux droites parallèles pour le L-1690 et l'Ammonyx-LO. Extrapolée à viscosité infinie ($1/n = 0$), la plus grande valeur de p associée au L-1690 signifie une moins grande liberté de mouvement de l'ANS piégé dans les chaînes hydrocarbonées. Considérant la pente de chacune des droites et la valeur de p_0 de chacun des détergents, on peut estimer que les micelles d'Ammonyx-LO sont environ, en moyenne, deux fois plus grosses que les micelles de L-1690. En considérant aussi la structure chimique et la CMC de chacun des détergents, les micelles d'Ammonyx-LO ont un arrangement moléculaire plus lâche et moins restrictif que les micelles de L-1690.

b. Résonnance paramagnétique électronique

Les spectres RPE des détergents marqués avec l'acide 12 (4,4 diméthyloxazolidine - N - oxyl) stéarique sont présentés à la figure III-8. Dans le L-1690, la structure hyperfine en trois bandes du radical nitroxyl dénote un mouvement moléculaire plus lent et de moindre amplitude comparativement au mouvement du marqueur dans l'Ammonyx-LO. Les bandes observées sur les spectres sont moins hautes et plus étalées pour le L-1690.

La mesure des écarts hyperfins permet de calculer le paramètre d'ordre S . Plus la distance entre les bandes est grande, plus grande est la valeur de S , signifiant une liberté de mouvement restreinte du marqueur de spin. Le paramètre d'ordre associé au marqueur de spin dans les micelles de L-1690

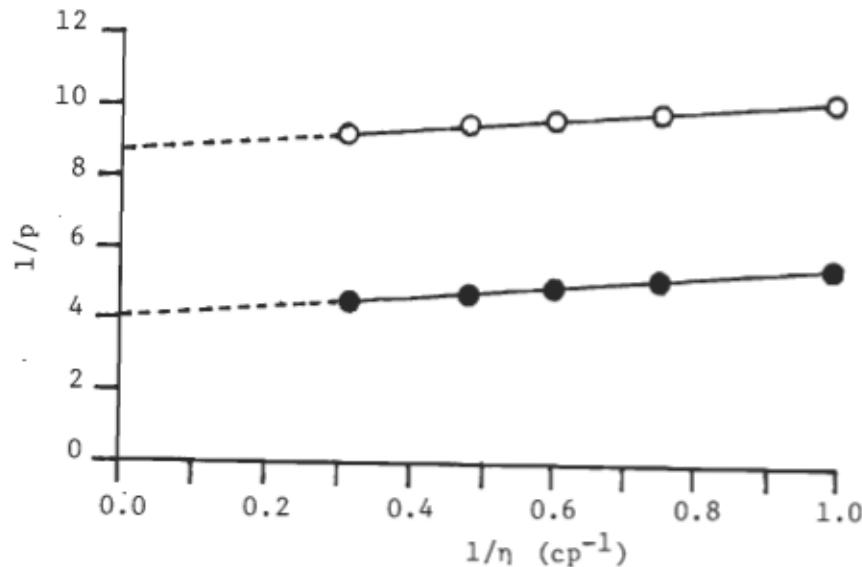


Figure III-7: Détermination de la rigidité micellaire par polarisation de fluorescence. Le tracé des valeurs inverses de polarisation de fluorescence ($1/p$) en fonction de l'inverse de la viscosité absolue ($1/\eta$) donne deux droites parallèles pour l'Ammonyx-L0 (○—○) et le L-1690 (●—●). L'extrapolation à viscosité infinie (----) indique une plus grande rigidité de la micelle de L-1690. La concentration des détergents est de 0.2% et la sonde utilisée est l'acide 8-anilino - 1 - naphthalène sulfonique à saturation.

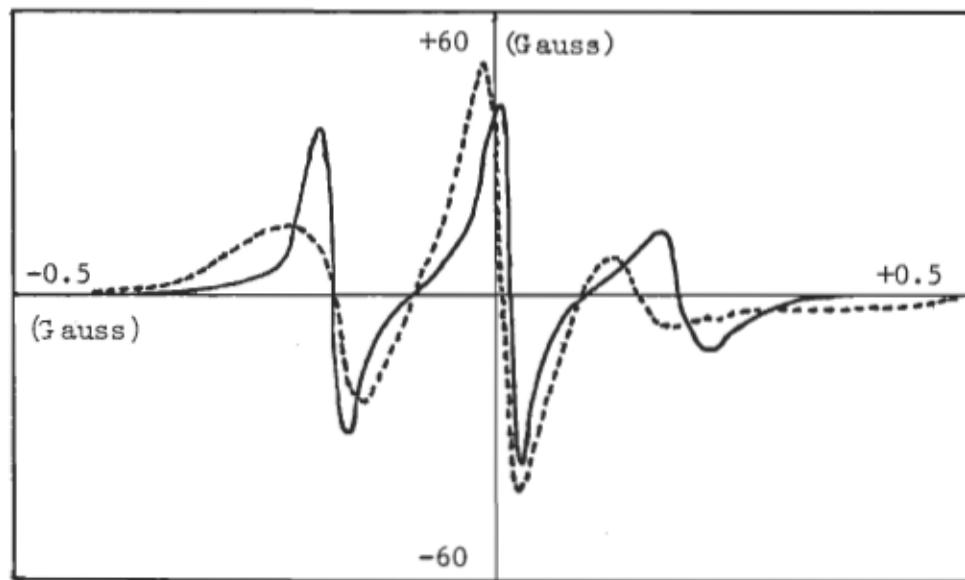


Figure III-8: Spectres RPE de l'Ammonyx-L0 (—) et du L-1690 (----). La concentration des détergents est de 1%. Le marqueur de chaînes hydrocarbonées est l'acide 12 (4,4 diméthylazolidine-N-oxyl) stéarique dans un rapport de 1 marqueur: 1500 molécules de détergent. Le spectre plus aplati et plus étalé indique une plus grande rigidité de la micelle de L-1690.

est de 0.32 comparativement à 0.12 dans les micelles d'Ammonyx-LO. L'angle de mouvement (γ) du marqueur est moins important dans le L-1690 (63°) comparativement à celui calculé dans l'Ammonyx-LO (78°).

Les micelles de L-1690 marquées au niveau des chaînes hydrocarbonées permettent moins de mouvement au marqueur de spin que les micelles d'Ammonyx-LO. Les conclusions en RPE sont identiques à celles obtenues en polarisation de fluorescence où nous avions déterminé que les micelles de L-1690 sont plus rigides que les micelles d'Ammonyx-LO. La séquence photolytique de la rhodopsine bovine est susceptible d'être ralenti dans l'environnement moléculaire fourni par le L-1690.

4. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine par spectroscopie électronique à basse température

A. Effet de la rigidité et de l'hydrophobicité sur la séquence photolytique

Les changements conformationnels de la rhodopsine lors de sa séquence photolytique dépendent fortement des facteurs environnementaux. Dans la membrane discale, la rhodopsine baigne dans une bicouche de phospholipides fluide. Nous avons déterminé, quand la rhodopsine est solubilisée dans le L-1690, que les micelles formées par ce détergent sont plus rigides que dans l'Ammonyx-LO. Pour les détergents ayant des sucres comme groupes polaires, les micelles sont aussi rigides que celles des phospholipides (Hong et Hubbell, 1973, Knudsen et Hubbell, 1978). Les interactions, en particulier les ponts hydrogènes, entre les sucres de surface augmentent la densité du core micellaire et augmentent ainsi la rigidité de la micelle.

L'équilibre des méta-intermédiaires dépend beaucoup de la fluidité et de l'hydrophobicité de l'environnement de la molécule de rhodopsine. En fait, la conversion des intermédiaires de la rhodopsine bloque à l'étape métarhodopsine I sur film anhydre (Wald et al., 1950). La transition métarhodopsine I → II est aussi bloquée en absence de phospholipides ou de détergent (Appleybury et al., 1974). Van Breugel et al. (1978) rapportent que la séquence est aussi interrompue en traitant les S.E.B. avec la phospholipase C. L'agrégation de la rhodopsine résulte en un blocage de la transition métarhodopsine I → II. L'augmentation de la rigidité micellaire est associée à un ralentissement de la transition (Motoyama et Kito, 1981).

Les résultats présentés dans cette section démontrent un effet de l'environnement moléculaire sur la séquence photolytique de la rhodopsine lorsque les photoproducts sont stabilisés à basse température.

B. Modifications des spectres d'absorption en fonction de la température

A la température ambiante, le maximum d'absorption de la rhodopsine est à 498 nm. A la température de l'azote liquide, le spectre d'absorption de la rhodopsine a son maximum décalé vers le rouge entre 502 et 505 nm et son amplitude est augmentée d'environ 15% au maximum d'absorption. L'irradiation de la rhodopsine par une lumière bleue ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) à -196°C permet de former un maximum de bathorhodopsine sans isorhodopsine présente.

La rhodopsine est par la suite réchauffée graduellement sur des intervalles de 5 ou 10 degrés, selon que les spectres d'absorption indiquent ou non une transition d'un intermédiaire à un autre.

Les modifications spectrales sont indicatives de l'évolution de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine. Le déplacement du maximum d'absorption et le changement d'amplitude du spectre permettent d'identifier les espèces intermédiaires. Dans tous nos échantillons (S.E.B., rhodopsine-L-1690 et rhodopsine - Ammonyx-LO), l'ordre d'apparition des intermédiaires est le même, soit 1) batho-, 2) lumi-, 3) métarhodopsine I et 4) métarhodopsine II. La figure III-9 donne un exemple des courbes d'absorption optique enregistrées lors des expériences en spectroscopie électronique à basse température.

Dans les deux détergents, la position des maxima d'absorption est identique. La bathorhodopsine est à 520 nm, quelquefois légèrement décalée vers 525 nm. Invariablement la lumirhodopsine a son maximum à 497 nm. La métarhodopsine I se situe entre 478 et 480 nm, tout comme la métarhodopsine II entre 378 et 380 nm. Dans l'Ammonyx-LO, la métarhodopsine II est instable et le produit résiduel吸 aux environs de 370 nm. Dans les S.E.B., dû à la diffusion de la lumière, les maxima d'absorption apparaissent déplacés par 2 ou 3 nm sous les valeurs mentionnées pour la rhodopsine solubilisée.

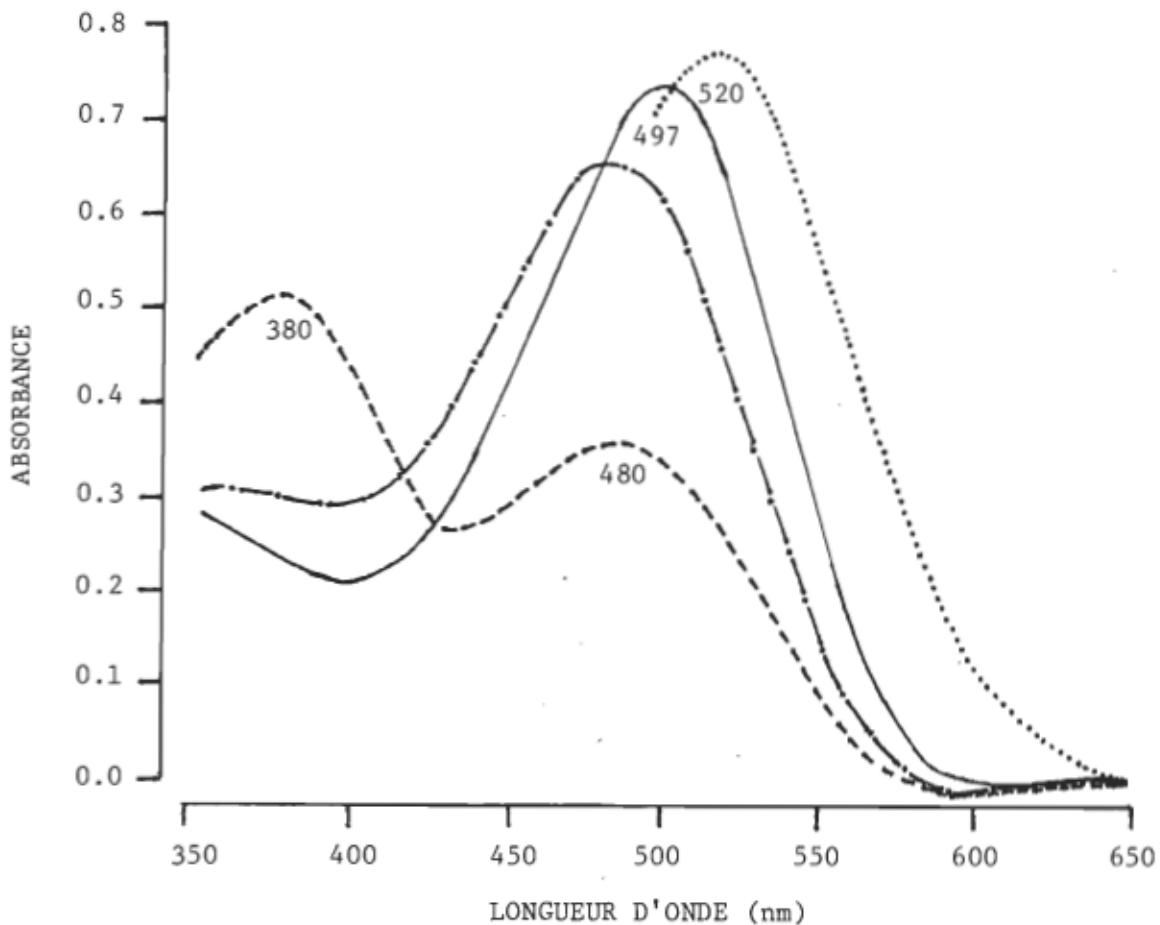


Figure III-9: Spectres d'absorption électronique des intermédiaires de la rhodopsine irradiée à 77 K. L'échantillon est de la rhodopsine purifiée solubilisée dans 0.2% de L-1690 et ajustée à 67% de glycérol. La référence est un tampon Tris-Cl 50 mM pH 7.5 0.2% L-1690 contenant 67% de glycérol.

Dans l'ordre où ils se succèdent en fonction de la température, les intermédiaires observés sont: la batho- (.....), la lumi- (—), la méta- I (·—·) et un mélange des métarhodopsines I et II (----).

En suivant le déplacement du maximum sur les spectres d'absorption, il est possible de déterminer la stabilité thermique de chacune des espèces intermédiaires de la rhodopsine excitée. A la figure III-10, on s'aperçoit que l'intermédiaire bathorhodopsine est stable sur une même plage de température, soit de 77 K à 120 K, dans tous les échantillons. La transition batho- \rightarrow lumirhodopsine n'est pas influencée par l'environnement moléculaire fourni par les phospholipides natifs ou par les détergents.

Le plateau suivant correspond à la lumirhodopsine. Cet intermédiaire apparaît beaucoup plus stable dans le L-1690, soit de 145 K à 225 K. Dans l'Ammonyx-LO et dans les S.E.B., la disparition de l'intermédiaire lumirhodopsine est déjà amorcée à 200 K.

La métarhodopsine I se forme à partir de la lumirhodopsine. Elle n'est pas très stable dans l'Ammonyx-LO et on l'isole seulement entre 205 K et 220 K. On la conserve cependant jusqu'à 250 K dans les S.E.B. pour observer ensuite l'apparition de la métarhodopsine II. De 260 K à 300 K, la métarhodopsine II est stable dans les S.E.B. et dans le L-1690. Dans l'Ammonyx-LO, elle est déjà formée à 230 K. Le fait le plus intéressant demeure cependant la présence de métarhodopsine I jusqu'à 300 K dans le L-1690, contrairement aux autres échantillons.

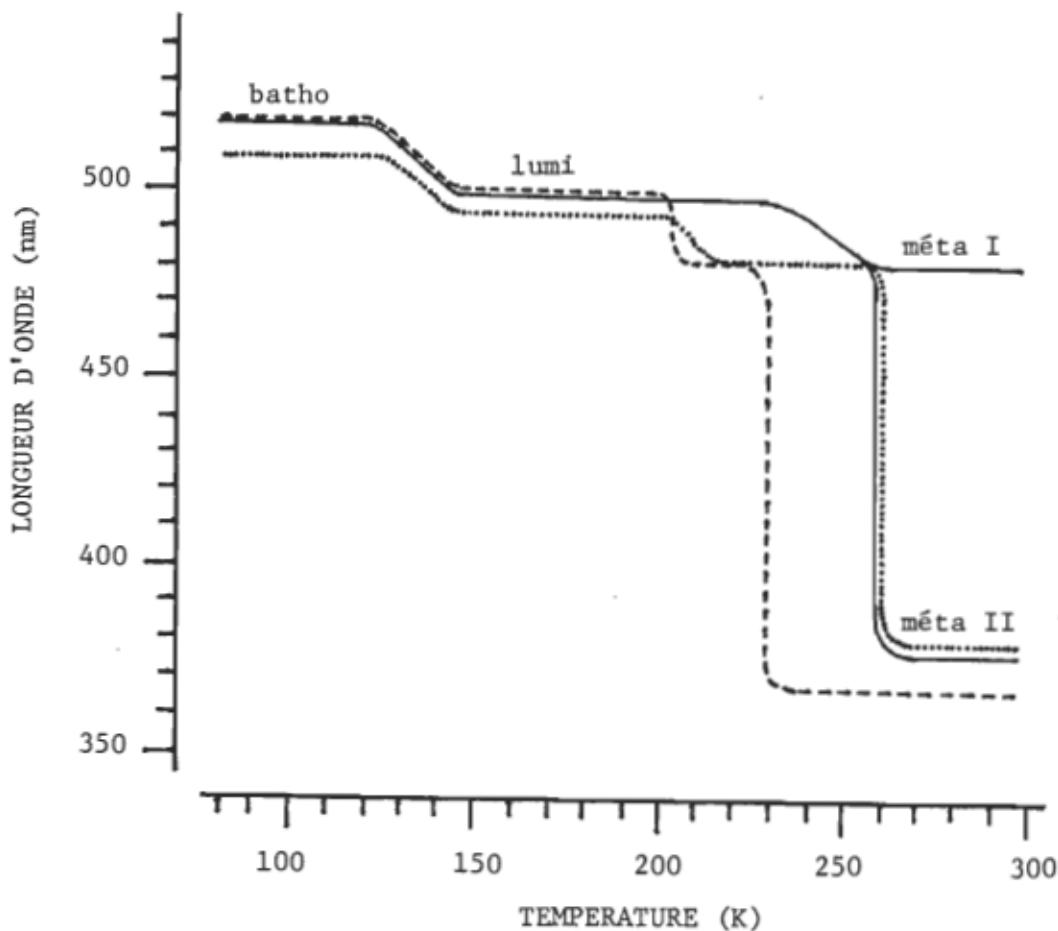


Figure III-10: Déplacement du maximum d'absorption de la rhodopsine irradiée en fonction de la température. Le déplacement du maximum d'absorption est différent selon que la rhodopsine est dans la membrane discale des S.E.B. (.....); ou purifiée et solubilisée dans l'Ammonyx-LO (----) ou dans le L-1690 (—). Les échantillons de rhodopsine ont été irradiés 45 minutes à 77 K à une longueur d'onde de 440 nm. Ils contiennent 67% de glycérol tout comme la référence.

C. Températures de transition

En poursuivant l'interprétation des spectres d'absorption, nous avons établi des rapports de l'absorbance d'un photoproduit de la rhodopsine en fonction d'un autre, à chacune des températures. Par exemple, en analysant la formation de la lumirhodopsine par rapport à la disparition de la bathorhodopsine, le rapport des absorbances permet de situer exactement le moment de la transition, entre les deux plateaux correspondant aux intermédiaires stabilisés. Chacune des transitions observées est représentée sur un graphique qui lui est spécifique, tel qu'illustré à la figure III-11. La température de transition caractéristique du passage d'un intermédiaire à un autre intermédiaire, est déterminée sur la courbe à mi-hauteur entre les deux plateaux. Les températures de transition sont présentées dans le tableau III-6.

On remarque que le passage de la batho- à la lumirhodopsine s'effectue sensiblement à la même température dans les différents échantillons. Cette réaction n'implique pas de changements conformationnels majeurs et nous apparaît indépendante de l'environnement lipidique de la protéine. Dans les S.E.B. et dans l'Ammonyx-L0, la transition lumi- \rightarrow métarhodopsine I a lieu vers 200 K alors qu'elle se produit beaucoup plus tard dans le L-1690 en raison de la plus grande stabilité thermique de la lumirhodopsine.

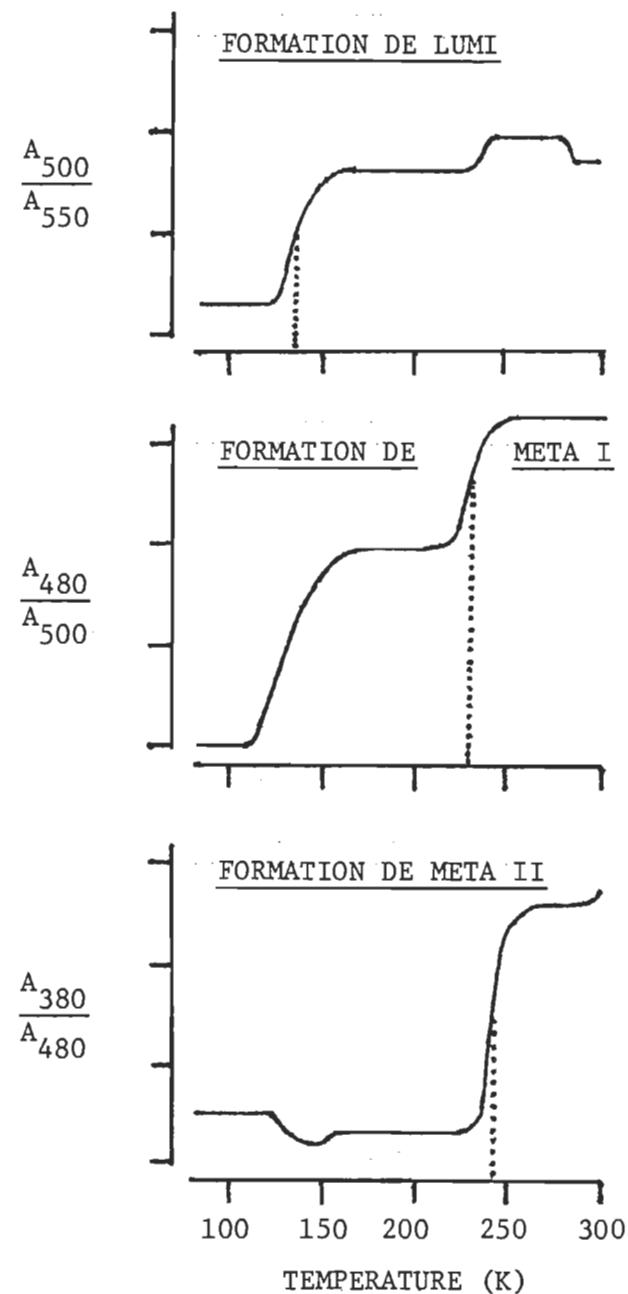


Figure III-11: Détermination des températures de transition. Le rapport des absorbances de l'intermédiaire qui se forme sur celui qui disparaît permet d'obtenir un tracé où les plateaux indiquent un intermédiaire stable; et les portions abruptes, une transition. Les températures de transition sont déterminées à mi-hauteur entre deux plateaux successifs (····).

Tableau III-6

Températures de transition entre les intermédiaires

	Rhodopsine S.E.B.	Rhodopsine purifiée L-1690	Rhodopsine purifiée L-1690 et LDAO	LDAO
Batho- → Lumirhodopsine	137 K	134 K	140 K	- - -
Lumi- → Métarhodopsine I	205 K	227 K	200 K	200 K
Méta- I → Métarhodopsine II	258 K	250 K	230 K	235 K

La température de la transition entre les métarhodopsines I et II dans les S.E.B. (258 K) ressemble à celle obtenue dans le L-1690 (250 K). On doit cependant se rappeler que la métarhodopsine I demeure présente jusqu'à 300 K dans le L-1690, ce qui n'est pas le cas dans les autres échantillons. Comme dans beaucoup de détergents, la disparition de la métarhodopsine I est accélérée dans l'Ammonyx-LO. La plus grande stabilité thermique des espèces lumi- et métarhodopsine I dans le L-1690 est spécifiquement due à l'action du détergent puisque dans les échantillons dopés les températures de transition sont les mêmes que dans l'Ammonyx-LO seul.

D. Evolution de la réaction métarhodopsine I → II en fonction du temps

Les figures III-12 et III-13 illustrent la modification des spectres d'absorption en fonction du temps, lors d'un saut de température. Nous nous en tenons aux modifications spectrales survenues sur la gamme de températures correspondant à la transition métarhodopsine I → II.

Dans les S.E.B., la transition nécessite environ 80 minutes en passant de 250 K à 260 K. Par contre la réaction s'amorce plus tôt dans l'Ammonyx-LO (220 - 230 K) et se complète en plus de 100 minutes. Les modifications spectrales observées de 230 K à 250 K dans l'Ammonyx-LO sont très rapides et sont aussi associées à la disparition de la métarhodopsine I.

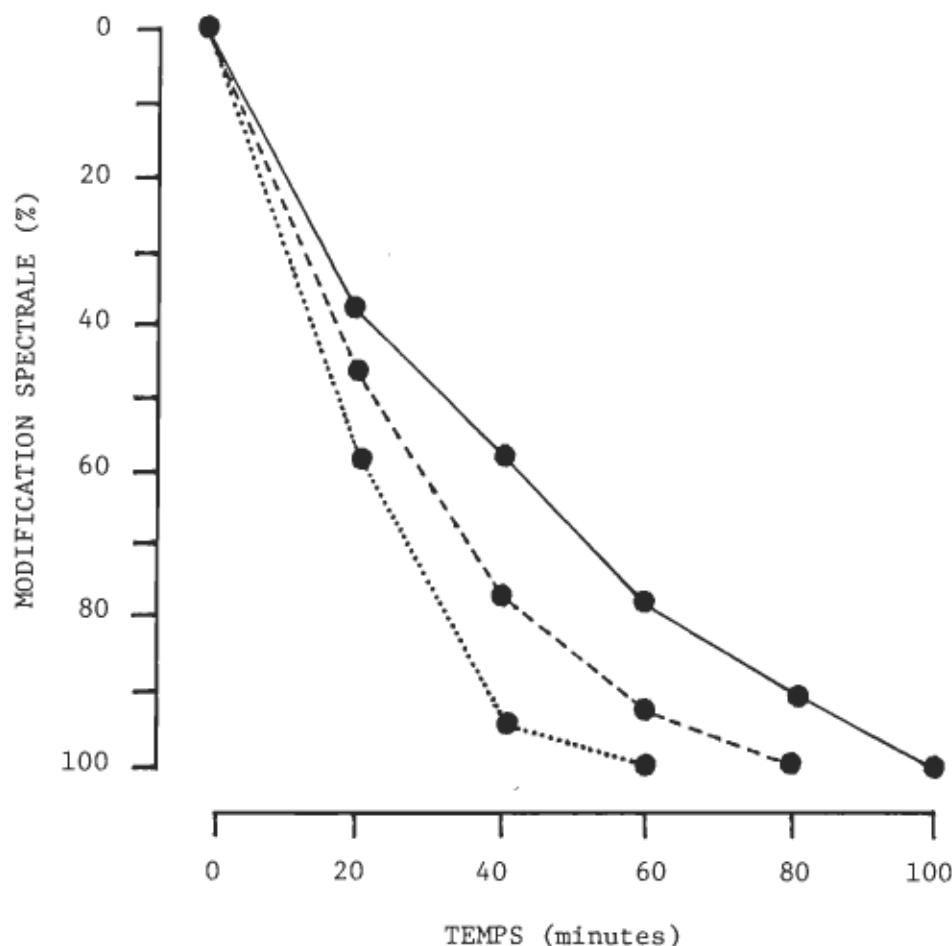


Figure III-12: Modification du spectre d'absorption en fonction du temps - Partie A. Les modifications spectrales enregistrées de 220 à 230K correspondent à la transition métarhodopsine I → II pour la rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-L0 (—); dans le L-1690 (....) la transition observée est l'étape lumière → métarhodopsine I. La transition métarhodopsine I → II se produit de 250 à 260K dans les membranes discales des S.E.B. (---). Le 100% de modification spectrale correspond au spectre d'absorption qui ne se modifie plus à une température donnée.

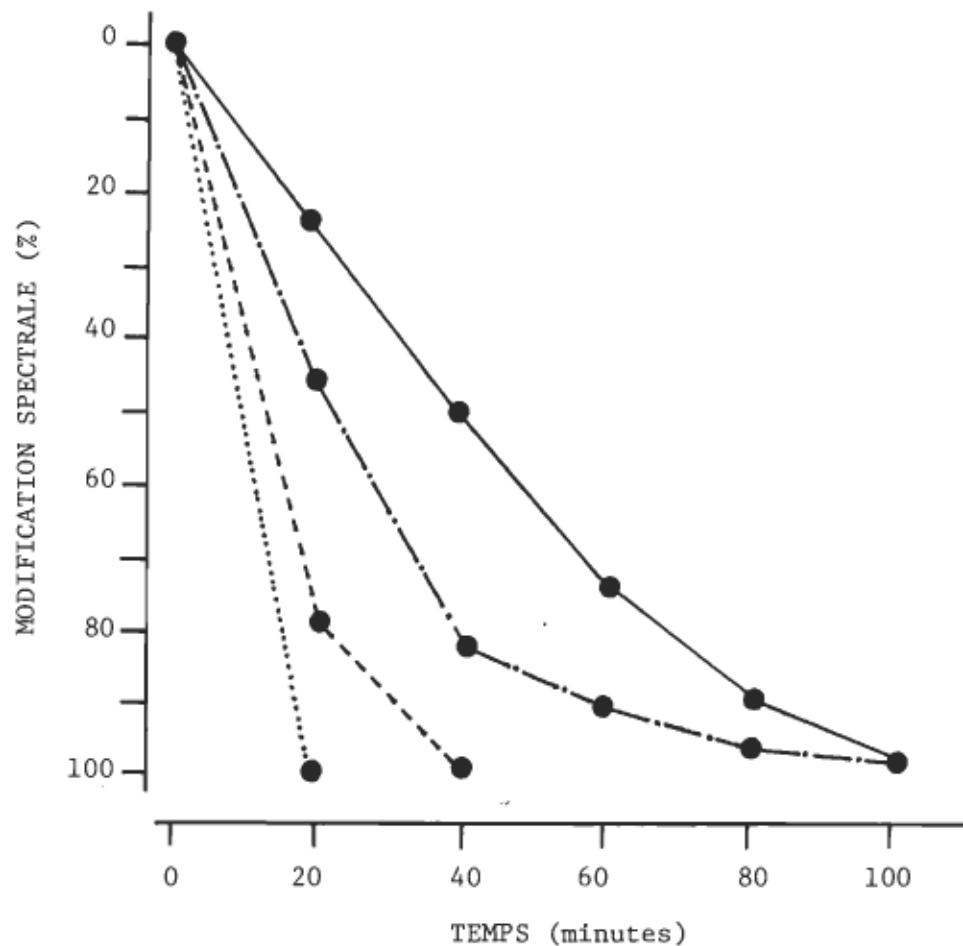


Figure III-13: Modification du spectre d'absorption en fonction du temps - Partie B. Les modifications spectrales enregistrées de 230 à 235K (—) et de 240 à 250K (— · —) indiquent que la transition métarhodopsine I → II est très ralentie dans le L-1690. Cependant, à ces températures, 230 à 235K (---) et 240 à 250K (···), la transition est déjà complétée dans l'Ammonyx-L0. Le 100% de modification spectrale correspond au spectre d'absorption qui ne se modifie plus à une température donnée.

De 220 K à 230 K, la transition observée dans le L-1690 est la réaction lumi- \rightarrow métarhodopsine I. Dans ce détergent, la métarhodopsine I commence à disparaître, très lentement et en très faible quantité, dès qu'elle est formée. La transition se complète vers 250 K, plus de trois heures après les premiers changements des spectres d'absorption. Le L-1690 induit donc un ralentissement considérable de la réaction métarhodopsine I \rightarrow II comparativement à ce qui est observé dans les S.E.B. ou dans l'Ammonyx-LO.

E. Evolution de la réaction métarhodopsine I \rightarrow II en fonction de la température

En examinant plus à fond la nature de la transition dans le L-1690, nous avons déterminé l'amplitude des modifications spectrales en fonction de la température. Nous avons calculé le pourcentage relatif de métarhodopsine I présente sur la gamme de températures de 200 K à 300 K. Ce pourcentage est établi en normalisant la quantité de métarhodopsine I formée par rapport à la quantité de bathorhodopsine formée lors de l'irradiation à 77 K. La concentration des espèces intermédiaires est directement proportionnelle à la concentration initiale de bathorhodopsine.

La figure III-14 démarque très clairement l'effet du L-1690 sur la réaction métarhodopsine I \rightarrow II. La moitié de la métarhodopsine I est déjà disparue avant 240 K dans l'Ammonyx-LO, cette valeur n'est atteinte qu'à 260 K dans le L-1690. A cette

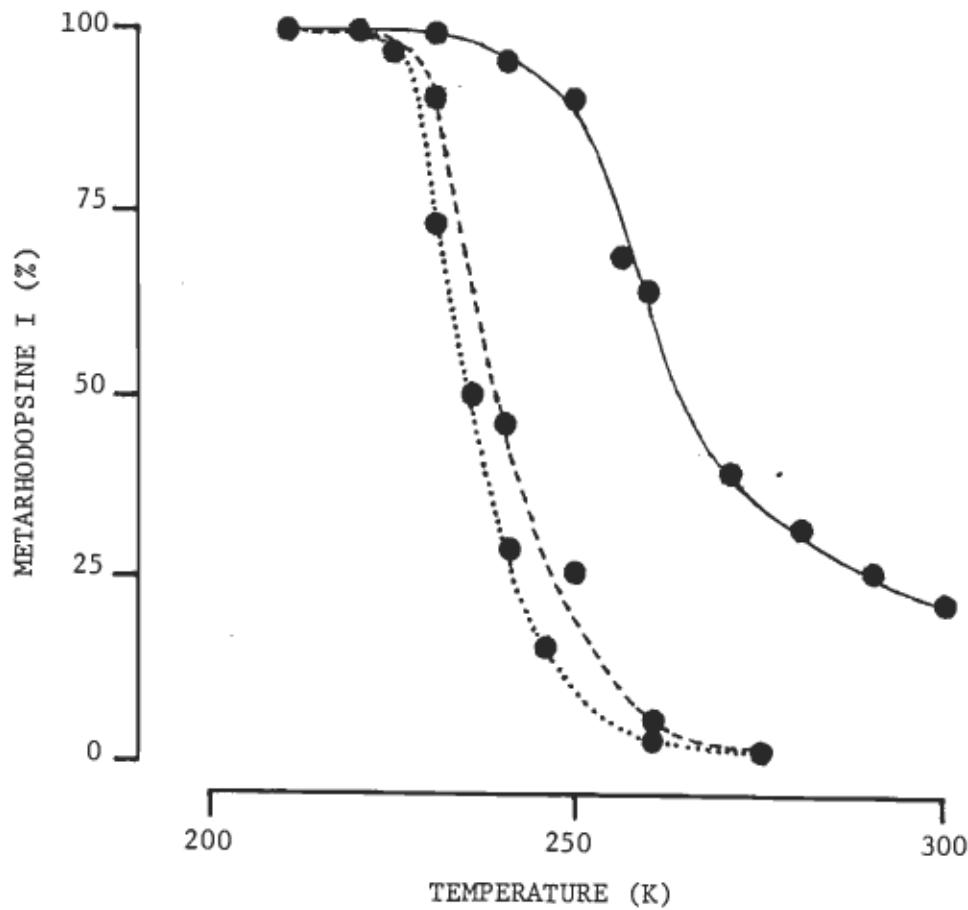


Figure III-14: Effet de la température sur l'équilibre métarhodopsine I \rightarrow II. Une fraction importante de métarhodopsine I ne transitionne pas à la forme métarhodopsine II lorsque la rhodopsine est solubilisée dans le L-1690 (—). Par contre si la rhodopsine est solubilisée dans l'Ammonyx-LO (---) ou dans le L-1690 puis dopée à l'Ammonyx-LO (....) la métarhodopsine I disparaît complètement. La quantité de métarhodopsine I présente est déterminée en normalisant les courbes par rapport à la quantité de batorhodopsine formée lors de l'irradiation à 77K.

température, il ne reste déjà plus de métarhodopsine I dans les échantillons contenant de l'Ammonyx-L0. Pourtant dans le L-1690, environ 25% de cet intermédiaire ne transitionne pas à la forme métarhodopsine II. En plus d'être ralentie, la séquence photolytique de la rhodopsine est aussi incomplète dans le L-1690.

F. Origine de la métarhodopsine II

Les spectres différentiels nous en apprennent encore plus sur les différences observées entre le L-1690 et l'Ammonyx-L0. Le tableau III-7 dresse le bilan des espèces formées et de celles qui disparaissent lors de la transition métarhodopsine I → II. Dans l'Ammonyx-L0, la réaction entière procède de la même façon: la disparition de métarhodopsine I à 480 nm entraîne l'apparition simultanée de métarhodopsine II. Cette dernière est instable et la position du maximum d'absorption reflète la présence d'un produit résiduel. Dans le L-1690, la réaction se déroule en deux temps. En premier lieu, on assiste à la formation de la métarhodopsine II à partir de la métarhodopsine I. Cependant lors du dernier tiers de la transition, l'espèce qui disparaît pour donner la métarhodopsine II absorbe à 496 nm, soit sensiblement au maximum d'absorption de la lumirhodopsine.

Les spectres différentiels sont illustrés à la figure III-15. Il convient de signaler l'évolution normale de la

Tableau III-7

Origine des intermédiaires déterminée
par les spectres de différence

	Ammonyx-LO	L-1690		
	Minimum (nm)	Maximum (nm)	Minimum (nm)	Maximum (nm)
Transition complète	481	366	484	377
Premier tiers	481	373	480	378
Dernier tiers	480	370	496	380

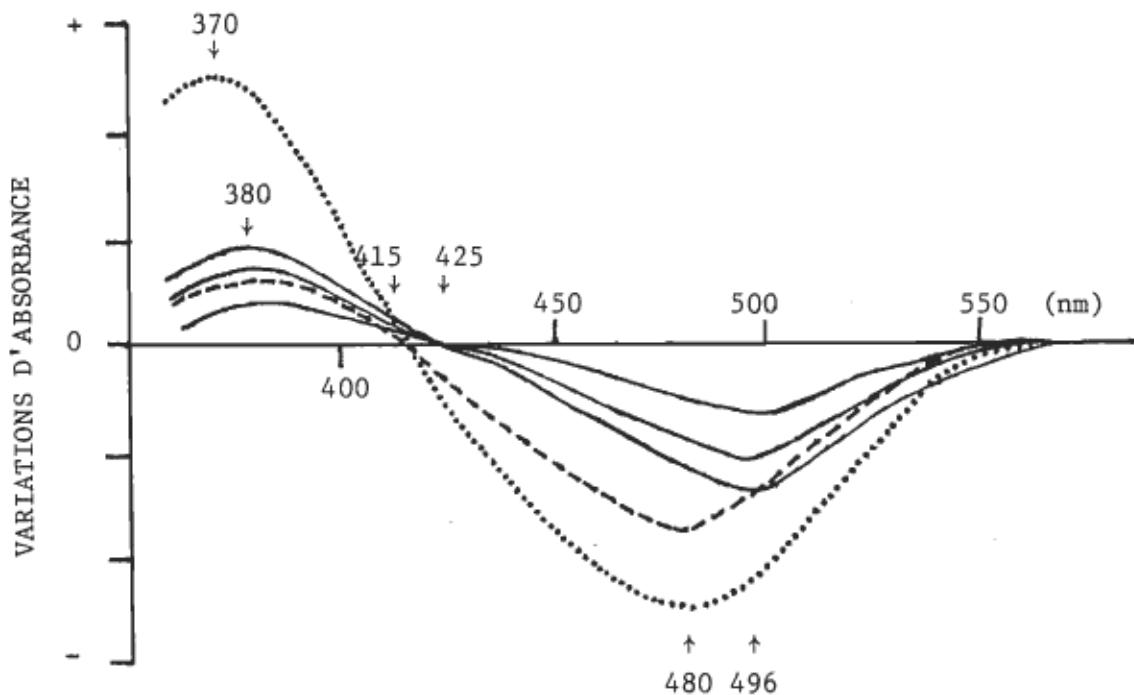


Figure III-15: Spectres de différence associés à la formation de la métarhodopsine II. Le spectre en trait discontinu (----) est pour la rhodopsine de la membrane discale des S.E.B. à 260K. A cette température, la rhodopsine solubilisée dans le L-1690 (—) montre des changements spectraux lents et de faible amplitude. Par contre, dans l'Ammonyx-LO à 240K (---), la transition métarhodopsine I → II est de forte amplitude. Les flèches indiquent la position des maxima d'absorption des espèces et les points isobestes.

réaction métarhodopsine I₄₈₀ + II₃₈₀ dans les S.E.B. La position du point isobeste se situe aussi près de la valeur attendue à 417 nm, tout comme dans l'Ammonyx-LO. Dans ce détergent, la transition a lieu sur une très étroite plage de températures, ce qui donne un spectre différentiel de plus forte amplitude. Le premier tiers de la transition dans le L-1690 a été omis en raison de sa similitude avec la transition complète dans les S.E.B. Par contre la phase terminale de la formation de métarhodopsine II s'accompagne de changements spectraux lents et de faible amplitude. L'espèce-mère absorbe à 496 nm et le point isobeste est décalé de 10 nm vers les plus grandes longueurs d'onde.

G. Discussion des résultats

Malgré des différences de stabilité thermique, et parfois même d'origine, nous avons observé les mêmes espèces intermédiaires dans tous les échantillons. Même si ces intermédiaires de la rhodopsine sont observés à basse température, il n'y a pas lieu de croire que la séquence photolytique se déroule différemment dans la rétine aux températures physiologiques (Hubbard et al., 1965). D'ailleurs la présence des photoproducts attendus dans tous les échantillons est indicative de l'intégrité fonctionnelle du pigment visuel.

De plus, il est confirmé que les spectres d'absorption d'extraits de rhodopsine contenant entre 66% (Yoshizawa et

Wald, 1963) et 75% (Tokunaga et al., 1976) de glycérol ne souffrent d'aucune distorsion à basse température. La concentration du glycérol ajouté à nos échantillons se situe entre ces limites.

Lorsque nous irradions la rhodopsine à la température de l'azote liquide, la bathorhodopsine est formée. La photoisomérisation 11-cis → tout-trans du rétinal est une étape essentielle de la chaîne d'événements impliqués dans la photolyse de la rhodopsine (Mao et al., 1981). Nous avons stabilisé la bathorhodopsine de 77 K à 120 K et observé sa conversion en lumirhodopsine vers 135 K dans tous les échantillons. Avec des S.E.B. ou un extrait solubilisé dans la digitonine, ajustés à 75% de glycérol, la température de la transition batho- → lumirhodopsine est identique à celle que nous avons déterminée (Yoshizawa et Wald, 1963, Yoshizawa, 1972, Motoyama et Kito, 1981). Lorsque la rhodopsine est solubilisée dans l'Ammonyx-LO et ajustée à 50% en éthylène glycol, la transition est complétée à 123 K (Applebury et al., 1974). Dans le L-1690, avec 67% de glycérol, la température de la transition se situe vers 115 K (Motoyama et Kito, 1981). Pour des raisons obscures, ces auteurs éprouvent des difficultés avec leurs échantillons contenant du glycérol. Dans plusieurs cas, les températures de transition dans 67% de glycérol sont plus basses que dans 20% de sucre. Leurs spectres d'absorption sont tous enregistrés à 80 K dans le sucre mais à 180 K dans le glycérol. Leurs

températures de transition sont définies par des élévations de cinq degrés qui déplacent le maximum d'absorption de plus de deux nanomètres. Pour une transition abrupte comme celle de la bathorhodopsine, il est surprenant d'observer une différence de 20 K entre nos résultats et ceux de Motoyama et Kito (1981), dans le L-1690. La différence pourrait être attribuée au mode expérimental. Beaucoup de chercheurs stabilisent leurs échantillons quinze à vingt minutes à une température puis retournent à 80 K pour enregistrer le spectre d'absorption. Le fait de prendre tous les spectres à la même température permet une excellente comparaison des spectres, en terme d'amplitude. Cependant, il nous apparaît beaucoup plus adéquat de visualiser une transition en bloquant la température jusqu'à ce que le spectre cesse de se modifier. Les variations d'amplitudes dues à la température ne sont pas significatives sur de faibles écarts de température.

Nous n'avons pas noté de dépendance de l'environnement moléculaire sur la transition batho- \rightarrow lumirhodopsine. D'ailleurs cette étape de la séquence photolytique n'implique aucun changement conformationnel majeur de la rhodopsine (Grellmann et al., 1962, Pratt et al., 1964).

La seconde transition, lumi- \rightarrow métarhodopsine I, s'effectue à 205 K dans les suspensions de membranes discales et à 227 K pour la rhodopsine solubilisée dans le L-1690, soit des

températures de transition similaires à celles déterminées par Motoyama et Kito (1981). La transition nous semble dépendante du type de lipides entourant la molécule de rhodopsine. Pour la rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-LO, nous ne pouvons pas comparer nos résultats à ceux de Applebury et al. (1974). Selon eux, la lumirhodopsine est stable au moins jusqu'à 160 K, malheureusement l'échantillon devient opaque entre 180 K et 230 K et aucune variation spectrale ne peut être enregistrée.

En raison de la rigidité micellaire du L-1690 et de la stabilité de la lumirhodopsine dans ce détergent, un changement conformationnel substantiel de l'opsine pourrait être associé à la disparition de cet intermédiaire, tel que suggéré par Matthews et Wald (non publié).

Pour la réaction métarhodopsine I → II, les températures de transition déterminées pour la rhodopsine dans la membrane discale (258 K) ou solubilisée dans l'Ammonyx-LO (235 K) sont identiques à celles de Motoyama et Kito (1981) et de Applebury et al. (1974). Comme eux, nous observons que toute la métarhodopsine I est convertie en métarhodopsine II à 270 K dans les S.E.B. et à 260 K dans l'Ammonyx-LO. Les spectres de différence permettant de retracer l'origine de la métarhodopsine II sont identiques à ceux obtenus par Kimbel et al. (1970). La diminution d'absorbance à 480 nm entraîne une augmentation concomitante à 380 nm.

Dans le L-1690, nos résultats entrent en contradiction avec ceux de Motayama et Kito (1981). Selon eux, la transition métarhodopsine I → II se produit à de plus basses températures dans les solutions de L-1690 en raison d'une moins grande hydrophobicité des micelles. La transition serait presque complétée à 250 K alors que nous en observons seulement le début à cette température. Nos résultats s'apparentent plus à ceux obtenus avec de la rhodopsine solubilisée dans la digitonine, où la conversion thermique métarhodopsine I → II a lieu à 258 K (Matthews et al., 1963, Yoshizawa, 1972).

Deux faits demeurent uniques dans le L-1690. La transition lumi- → métarhodopsine I est retardée significativement et une fraction importante (25%) de la métarhodopsine I demeure stable à la température ambiante. La rigidité de la micelle de L-1690 pourrait être responsable du retard des transitions impliquant des modifications conformationnelles de l'opsine. La stabilité de la métarhodopsine I pourrait être due à la plus grande hydrophobicité de la micelle de L-1690. On pourrait aussi penser que l'ester de sucre, moins polaire que l'Ammonyx-L0, entrave un transfert de charge associé à la formation de la métarhodopsine II.

Quoi qu'il en soit, ce ralentissement dans la photodécoloration du pigment visuel, s'il est corroboré par les expériences de photolyse éclair, pourrait permettre une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire de la vision.

5. Etude de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine en photolyse éclair

L'analyse de la séquence photolytique de la rhodopsine en photolyse éclair a pour but de corroborer les résultats obtenus à basse température et surtout d'apporter des éléments nouveaux nécessaires à l'interprétation en termes moléculaires de la transition métarhodopsine I → II.

A. Performance du système de photolyse éclair

Les échantillons de rhodopsine soumis aux expériences de photolyse éclair sont tous solubilisés dans l'Ammonyx-LO ou dans le L-1690. Un échantillon-type a une pureté spectrale de 1.8-1.9, une absorbance à 500 nm de 0.5 et contient 15 nanomoles de rhodopsine. Pour la rhodopsine purifiée dans l'Ammonyx-LO, le rapport rhodopsine/détergent est de 1:750 alors qu'il est de 1:300 dans le L-1690. Pour les membranes discates solubilisées, ce rapport est quinze fois plus élevé.

Entre 15 et 25% de la rhodopsine est blanchie sur un premier éclair de lumière à 499 nm, soit 2.5 à 3.8 nanomoles. Cette valeur chute à environ 8% sur un deuxième éclair. Les résultats présentés dans cette section proviennent tous de cinétiques enregistrées sur un premier éclair.

Nous analysons la photodécoloration de la rhodopsine à quatre longueurs d'onde: 385, 450, 500 et 520 nm. La figure III-16 montre un spectre de rhodopsine avant et après photolyse,

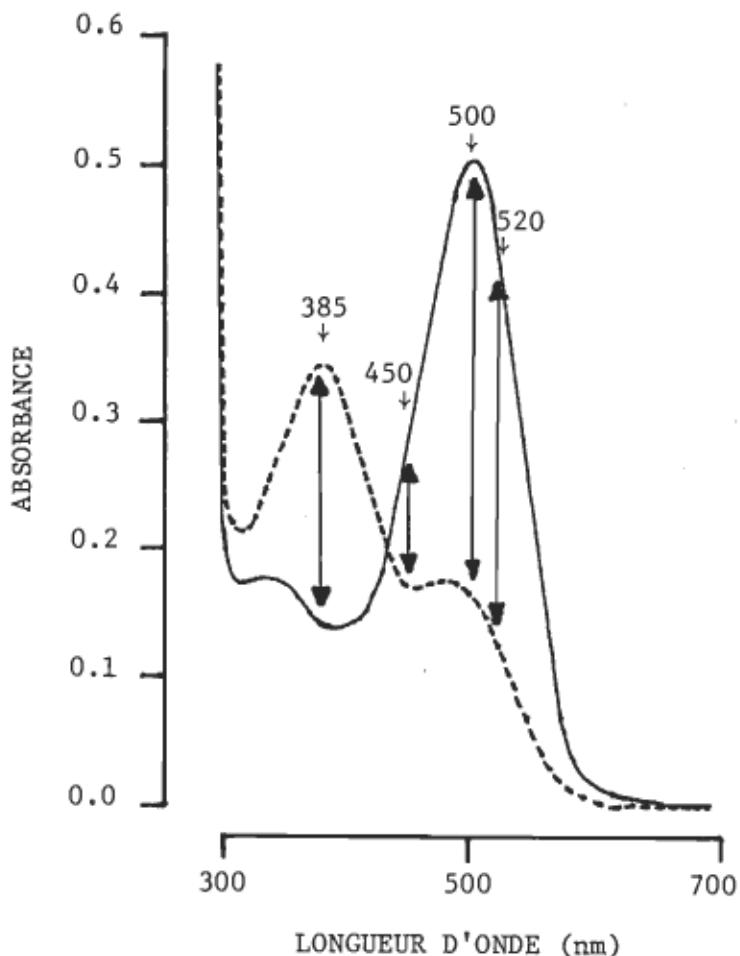


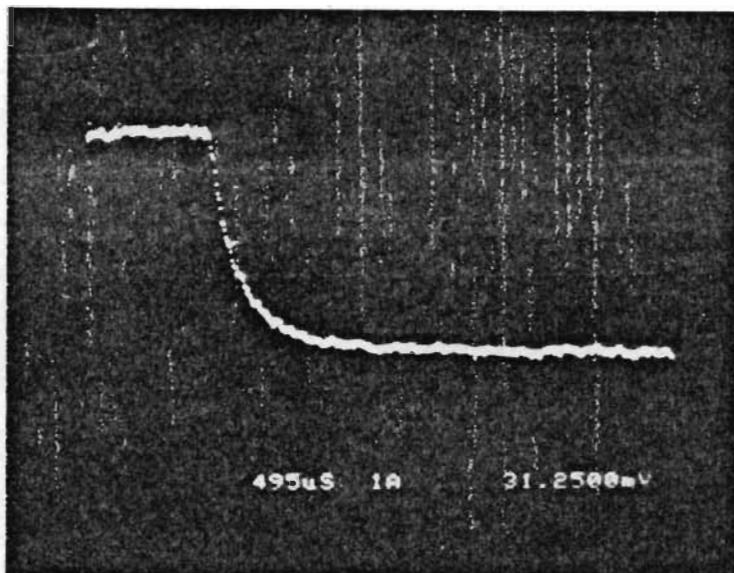
Figure III-16: Variations d'absorbance associées à la formation de la métarhodopsine II. Le spectre d'absorption en trait plein est celui de la rhodopsine intacte (—). Le spectre de la rhodopsine photolysée par trois éclairs à 499 nm (----) est en trait discontinu. Les flèches indiquent les variations d'absorbance aux longueurs d'onde d'analyse utilisées pour étudier la transition métarhodopsine I → II.

de même que les variations d'absorbance à chacune des longueurs d'onde d'analyse. On remarque à 450, 500 et 520 nm une diminution substantielle de l'absorbance alors qu'à 385 nm on observe la situation inverse. Tous ces changements se produisent simultanément dans les échantillons.

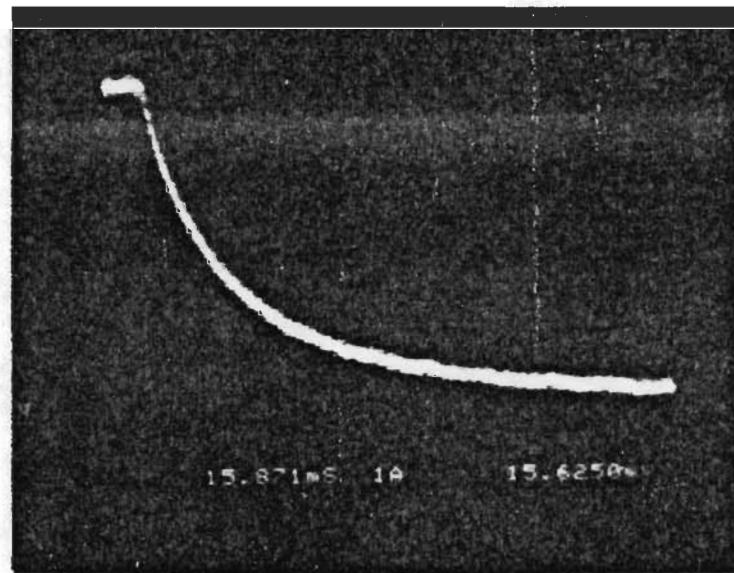
La collection des données, à chacune des longueurs d'onde d'analyse, à 25°C et à 0°C, est illustrée sur les photographies III-1, 2, 3 et 4. La réponse du système de photolyse éclair est exprimée en millivolts, et ce sont des variations de transmittance qui sont enregistrées en fonction du temps. Par exemple, la formation de l'espèce métarhodopsine II entraîne une diminution de transmittance à 385 nm (photographie III-1). On peut remarquer sur les photos la netteté de la transition, la qualité et l'amplitude du signal, et le faible bruit de fond (<1.5%) sur l'échelle de temps correspondant à la transition métarhodopsine I → II. A 500 nm, on note une interférence du faisceau actinique (499 nm) qui empêche l'analyse du premier cinquième de la cinétique mesurée. La chute initiale de transmittance observée à 450 nm est attribuée à la transition lumi- → métarhodopsine I.

A toutes les longueurs d'onde et toutes les températures, les résultats sont reproductibles, avec environ 10% de variation. Les différences d'absorbance observées en photolyse éclair ($\bar{x}=0.096$) correspondent exactement à celles déterminées sur les spectres d'absorption. Les variations de signal

A.



B.

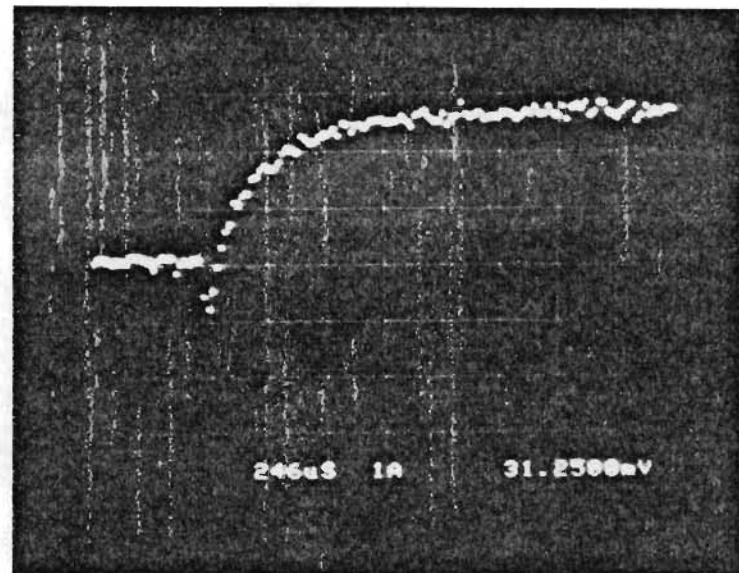


Photographies III-1: Variation de signal (mV) enregistrée à 385 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm.

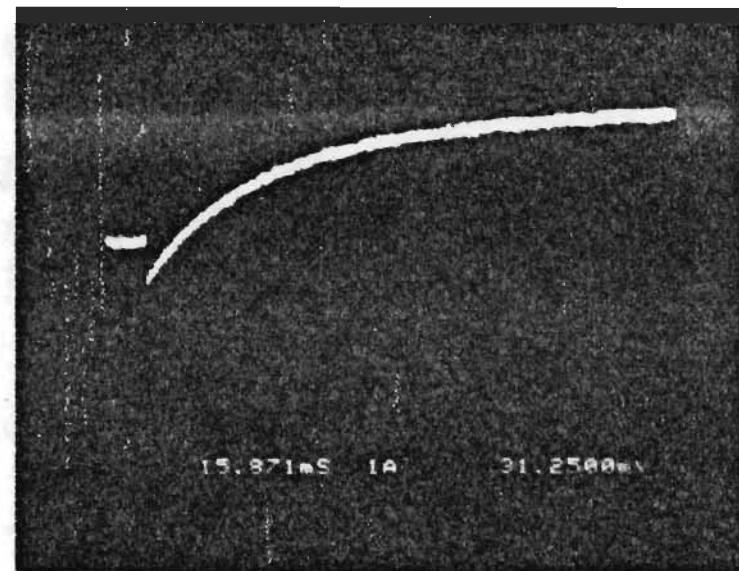
A. A 25° C

B. A 0° C

A.



B.

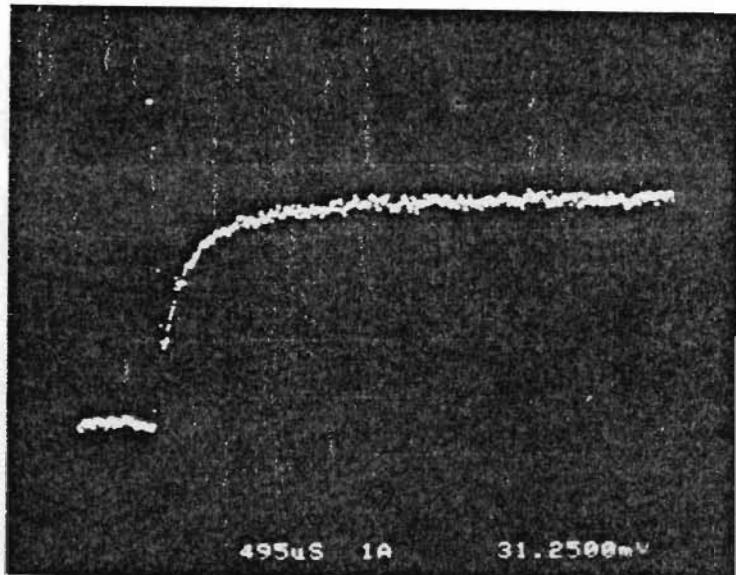


Photographies III-2: Variation de signal (mV) enregistrée à 450 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm.

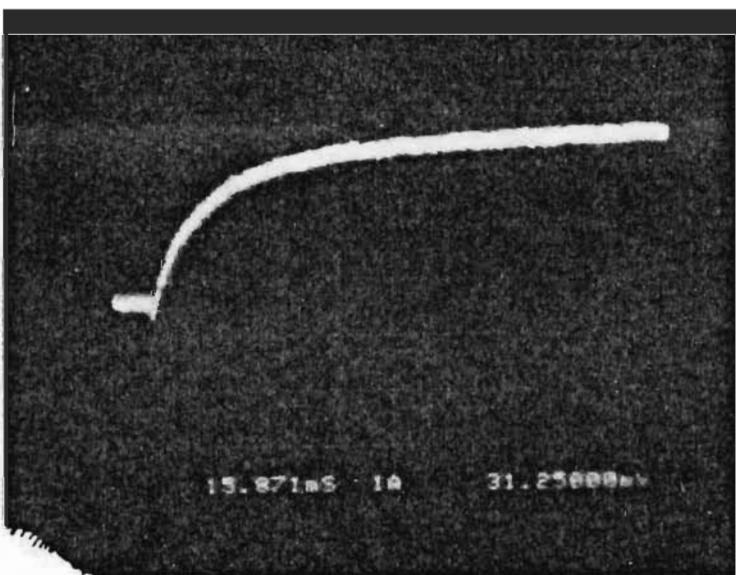
A. A 25° C

B. A 0° C

A.



B.

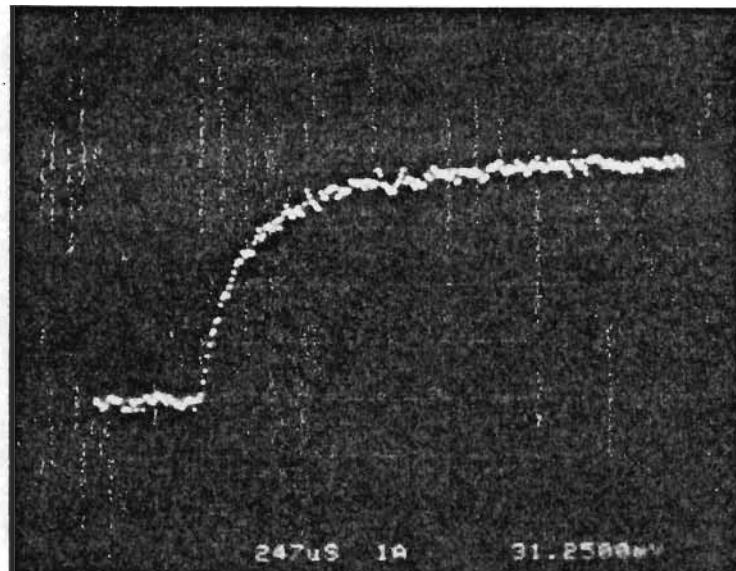


Photographies III-3: Variation de signal (mV) enregistrée à 497 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm.

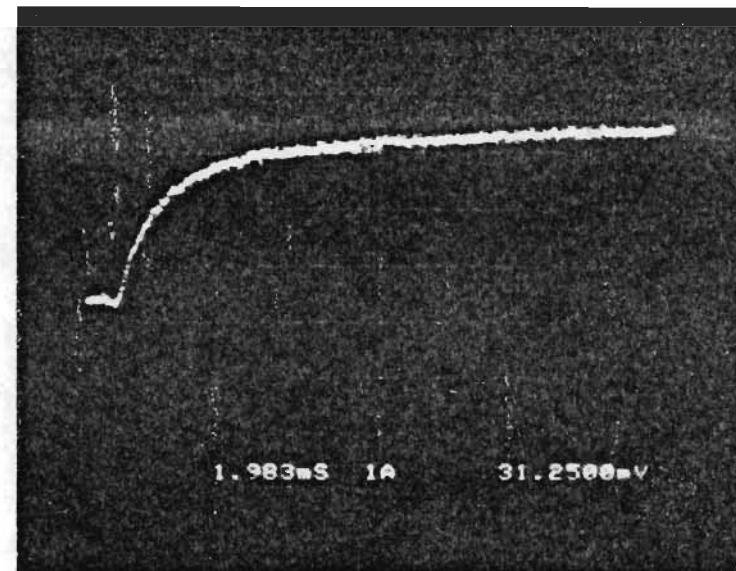
A. A 25° C

B. A 0° C

A.



B.



Photographies III-4: Variation de signal (mV) enregistrée à 520 nm en fonction du temps, après un éclair de lumière à 499 nm.

- A. A 25° C
- B. A 0° C

mesurées en photolyse éclair sont transformées en variations d'absorbance selon l'équation:

$$\Delta A = \log \frac{mV \text{ après éclair}}{mV \text{ avant éclair}}$$

La valeur du signal après éclair est déterminée après l'arrêt de la réaction analysée. Les phénomènes mesurés en photolyse éclair ne peuvent donc pas être interprétés en terme d'artefact. Le tableau III-8 nous indique que la quantité de rhodopsine blanchie et la quantité de métarhodopsine II formée sont identiques dans les deux détergents, pour des échantillons contenant le même nombre de moles de rhodopsine. Les différences observées devront être attribuées aux interactions protéine-détergent.

Les cinétiques mesurées sont aussi reproduites sur du papier quadrillé. Les annexes a, b, c et d présentent des tracés à partir desquels la réaction est analysée. A la température ambiante, la réaction est plus rapide, ce qui explique le moins grand nombre de points apparaissant sur les graphiques en raison de la limite de résolution de l'oscilloscope.

B. Cinétique chimique

Pour une réaction chimique d'ordre 1, la constante de vitesse k peut être calculée avec l'équation suivante:

$$k = \frac{2.303 \Delta \log (r_i - r'_i)}{\Delta t_i} \quad (\text{Livingston, 1961})$$

où r est un paramètre proportionnel à la concentration de

Tableau III-8

Variation d'absorbance

	Ammonyx-LO	L-1690
Disparition de		
rhodopsine	0.136	0.126
ΔA à 500		
Apparition de		
métarhodopsine II	0.088	0.083
ΔA à 385		
Δ Rhodopsine	1.54	1.52
Δ Métarhodopsine II		

l'espèce i , $(r_i - r_i')$ la variation de r sur l'intervalle de temps Δt_i . Afin de déterminer les constantes de vitesse, tous les tracés ont été reproduits sur échelle logarithmique. Le temps 0 correspond à l'éclair de lumière, la valeur de a_∞ est l'amplitude relative du signal après au moins dix temps de vie et a_t l'amplitude du signal au temps t (Applebury et al., 1974).

Si la transition métarhodopsine I \rightarrow II obéit à un processus de premier ordre, le graphique du $\log(a_\infty - a_t)$ ou du $\log(a_t - a_\infty)$, selon la longueur d'onde d'analyse, en fonction du temps est une droite (Applebury et al., 1974, Rapp, 1979, Litman et al., 1981). La constante de vitesse est le produit de 2.303 par la pente du graphique. Afin d'éviter toute confusion, les pentes ont été calculées en valeur absolue pour obtenir des constantes de vitesse positives.

Le temps de vie (τ) d'un processus de premier ordre est donné par l'inverse de la constante de vitesse

$$\tau = \frac{1}{k}$$

La demi-vie, temps nécessaire pour compléter la moitié de la réaction, est définie selon l'équation

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{k}$$

Tous les tracés ont été traités selon un programme de régression linéaire permettant d'établir la droite la plus fidèle aux points expérimentaux.

C. Cinétique en fonction de la longueur d'onde d'analyse,
mesurée à la température ambiante

La figure III-17 présente la cinétique de formation de la métarhodopsine II dans l'Ammonyx-LO, analysée à 385 nm et à 25°C. Tous les points sont alignés sur une droite simple, signifiant une réaction d'ordre 1 pour la transition métarhodopsine I → II dans ce détergent. En d'autres termes, la métarhodopsine II provient d'une espèce unique, la métarhodopsine I. La constante de vitesse k ne montre pas de dépendance de la longueur d'onde d'analyse (tableau III-9).

Dans l'Ammonyx-LO, la transition métarhodopsine I → II est une réaction obéissant à une seule exponentielle sur plus de 95% de son amplitude. A 25°C, la constante de vitesse a une valeur moyenne de $1.68 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Le temps de vie de la réaction est de 60 μs. Les coefficients de corrélation sur les régressions linéaires varient de 0.994 à 0.999 pour toutes les courbes étudiées, comparativement à une valeur idéale de 1.

Dans le L-1690, l'apparition de la métarhodopsine II se produit différemment. La figure III-18 présente la cinétique analysée à 385 nm et à 25°C. Ici les points ne sont pas alignés sur une seule droite.

En premier lieu, nous avons identifié la présence d'un processus lent d'ordre 1. Les deux derniers tiers de la

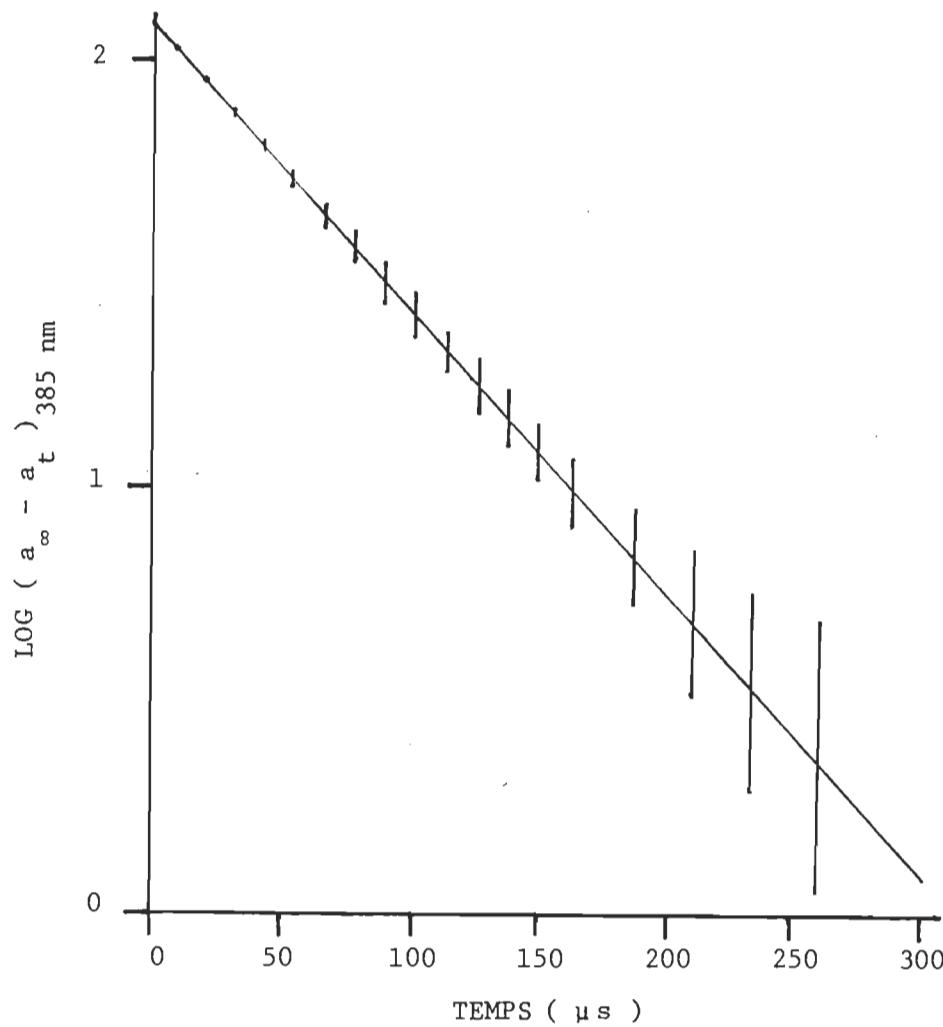


Figure III-17: Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans l'Ammonyx-LO à 25°C. La rhodopsine est solubilisée dans un tampon Tris-Cl 50 mM pH 8.0 ajusté à 0.2% d'Ammonyx-LO. La réaction est d'ordre 1 et la constante de vitesse k est égale à $1.52 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (pente X 2.303). Le bruit, représenté par les barres d'erreur, est inférieur à 10% de la variation de signal enregistrée. Le coefficient de corrélation est de 0.9980.

Tableau III - 9

Rhodopsine purifiée dans l'Ammonyx-LO

Cinétique en fonction de la longueur d'onde d'analyse

λ d'analyse (nm)	Constante de vitesse k (s^{-1})	Demi-vie $T = 25^{\circ}C$	τ (μs)
385.0	1.77×10^4	40	56
450.0	1.64×10^4	42	61
500.0	1.63×10^4	43	61
520.0	1.69×10^4	41	59

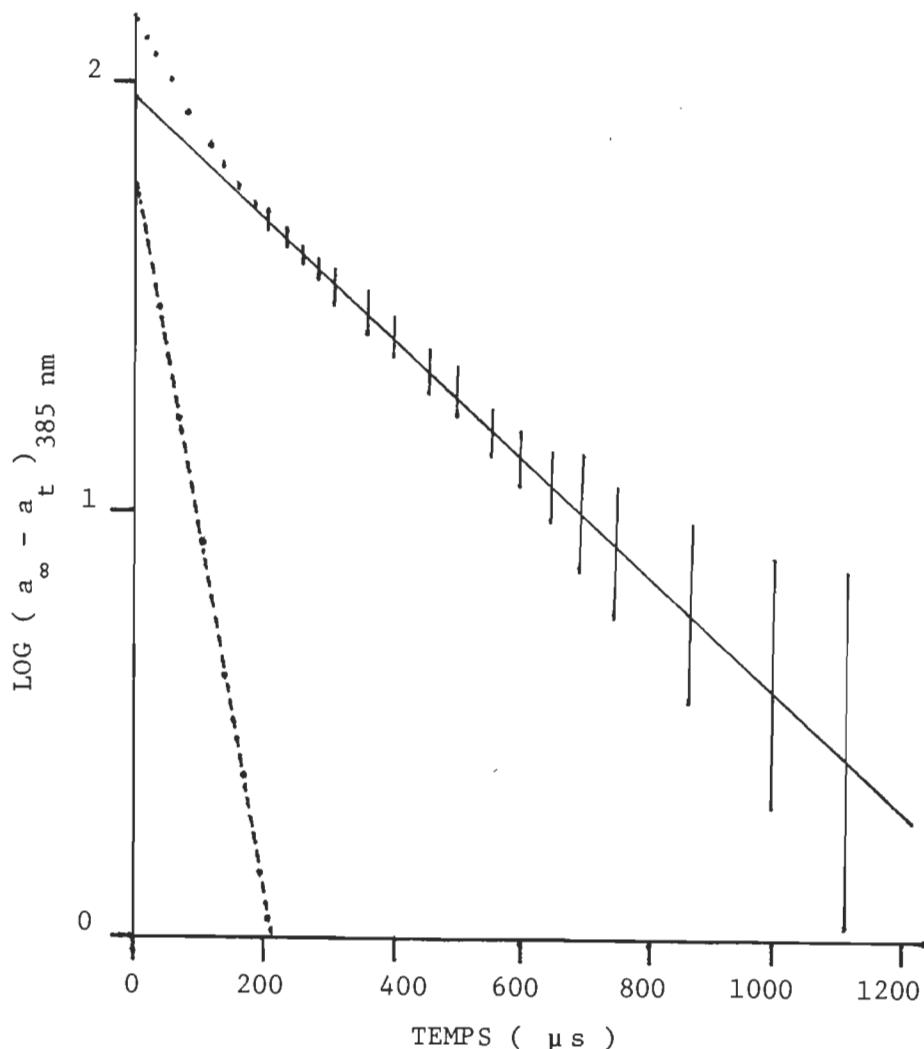


Figure III-18: Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans le L-1690 à 25°C. La rhodopsine est solubilisée dans un tampon Tris-Cl 50 mM pH 8.0 ajusté à 0.2% de L-1690. La réaction est une combinaison de deux processus de premier ordre. La réaction rapide (----) a une constante de vitesse k_1 égale à $1.80 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ et correspond à 38% de l'amplitude totale observée. Le coefficient de corrélation est de 0.9965. La réaction lente (—) a une constante de vitesse k_2 égale à $3.20 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ et correspond à 62% de l'amplitude totale observée. Le coefficient de corrélation est de 0.9980. Le bruit est inférieur à 10% de la variation de signal enregistrée.

transition correspondent à ce processus lent. Par contre les premiers points divergent significativement de la droite tracée pour la réaction lente. Cette déviation est d'autant plus importante que sur une échelle logarithmique, ces points possèdent la plus faible marge d'erreur. La première fraction de la transition métarhodopsine I \rightarrow II est donc la combinaison d'au moins deux phénomènes simultanés.

L'extrapolation de la première droite obtenue jusqu'au temps zéro permet de la soustraire des points du début de la transition. Les différences d'amplitude ainsi calculées sont reportées en fonction du temps, sur le même graphique. L'existence d'une seconde réaction d'ordre 1, plus rapide, est dévoilée par une droite simple. Ce processus rapide représente près de 40% de l'amplitude de la transition. La décomposition des cinétiques observées dans le L-1690 a été réalisée de manière à obtenir les meilleurs coefficients de corrélation pour les deux droites. L'amplitude de chacune des réactions est déterminée par son intercept. Ni la constante de vitesse lente, ni la constante de vitesse rapide, n'est dépendante de la longueur d'onde d'analyse (tableau III-10). A 25°C, la réaction rapide a une constante de vitesse (k_1) de $1.65 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ tandis que l'autre réaction, environ cinq fois plus lente, a une constante de vitesse (k_2) de $3.23 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$. La décomposition en deux réactions de premier ordre est permise en raison des coefficients de corrélation variant de 0.992 à 0.999 sur 95% de l'amplitude de la transition.

Tableau III-10

Rhodopsine purifiée dans le L-1690

Cinétique en fonction de la longueur d'onde d'analyse

λ Analyse (nm)	Constante de vitesse à 25°C k (s^{-1})	amplitude (%)	Demi-vie (μs)	τ (μs)
A - Réaction rapide				
385.0	1.77×10^4	37%	40	56
450.0	1.63×10^4	38%	43	61
500.0	1.67×10^4	38%	42	60
520.0	1.54×10^4	34%	45	65
B - Réaction lente				
385.0	3.07×10^3	63%	225	326
450.0	3.60×10^3	62%	193	278
500.0	3.15×10^3	62%	220	317
520.0	3.08×10^3	66%	225	325

L'amplitude moyenne de la réaction lente est de 63% et ne peut donc pas être attribuée au blanchiment de l'échantillon par le faisceau d'analyse (< 1%). La réaction rapide représente 37% de l'amplitude du signal observé lors de la formation de la métarhodopsine II.

Le tableau III-11 résume les résultats présentés ci-dessus. Le fait d'observer une réaction lente dans le L-1690 était prévisible en raison de la plus grande rigidité des micelles de ce détergent et aussi de la stabilité thermique des espèces lumi- et métarhodopsine I observée à basse température. La double origine de la métarhodopsine II dans le L-1690 est confirmée par les expériences de photolyse éclair.

D. Effet de la concentration sur la vitesse de réaction

Jusqu'à maintenant nous avons photolysé des échantillons de rhodopsine purifiée dans 0.2% de détergent, et analysé la réaction à plusieurs longueurs d'onde. A présent nous allons varier la composition des échantillons, notamment les concentrations de rhodopsine et de détergent (tableau III-12). La réaction de formation de la métarhodopsine II est principalement analysée à 385 nm.

Dans l'Ammonyx-LO, la constante de vitesse n'est pas affectée significativement lorsque l'absorbance à 498 nm des échantillons est réduite à 0.2. Par contre la variation de signal perçue lors de la formation de la métarhodopsine II

Tableau III-11

Cinétique de formation de la métarhodopsine II à 25°C

Constante de vitesse (s ⁻¹)	Amplitude (%)	Demi-vie (μ s)	Temps de vie (μ s)
<hr/>			
A - Rhodopsine - Ammonyx-LO $k = 1.68 \times 10^4$	100	41	60
<hr/>			
B - Rhodopsine - L-1690 $k_1 = 1.65 \times 10^4$ $k_2 = 3.23 \times 10^3$	37 63	42 215	61 310
<hr/>			

Tableau III-12

Effet de la concentration sur la cinétique de formation
de la métarhodopsine II à 25°C

Echantillon	Détergent	$A_{498\text{nm}}$	$k (\text{s}^{-1})$
A - Rhodopsine - Ammonyx-LO			
Rhodopsine purifiée	0.2%	0.50	1.68×10^4
Rhodopsine purifiée	0.2%	0.20	1.50×10^4
Rhodopsine purifiée	3.0%	0.50	1.66×10^4
Rhodopsine S.E.B.	3.0%	0.80	1.72×10^4
B - Rhodopsine -L-1690			
Rhodopsine purifiée	0.2%	0.50	1.65×10^4
			3.23×10^3
Rhodopsine purifiée	0.2%	0.20	1.68×10^4
			3.00×10^3
Rhodopsine purifiée	3.0%	0.50	1.75×10^4
			3.30×10^3
Rhodopsine S.E.B.	3.0%	0.80	1.53×10^4
			3.55×10^3

est moins grande (en fait, 40% de celle observée lorsque $A_{498} = 0.5$), ce qui rend le bruit de fond plus évident. Si on augmente la concentration du détergent à 3%, la vitesse de la réaction ne change pas non plus. Les membranes discales solubilisées dans 3% de détergent montrent aussi la même cinétique que la rhodopsine purifiée. Ceci était prévisible puisque la contribution des phospholipides natifs est masquée par un rapport rhodopsine-détergent d'environ 1:10 000.

Dans le L-1690, la même absence d'effet de concentration de rhodopsine ou de détergent est observée. Dans tous les cas, on retrouve la réaction rapide et la réaction lente avec des constantes de vitesse similaires à celles déterminées pour la rhodopsine purifiée dans 0.2% de détergent avec une absorbance de 0.5 à 498 nm. La proportion relative des deux réactions demeure aussi inchangée.

Les cinétiques ne sont donc pas dépendantes des interactions rhodopsine-rhodopsine puisque la diminution ou l'augmentation de la concentration de rhodopsine ne modifie pas la vitesse de la réaction. Les cinétiques ne sont pas non plus faussées par les détergents. Des échantillons des deux détergents, à 0.2% et 3%, soumis à un éclair de lumière ne démontrent absolument aucune variation de signal. Cependant l'augmentation de la concentration de détergent dans les échantillons de rhodopsine permet de s'assurer de l'homogénéité des solutions. Ceci est particulièrement crucial pour la réaction

lente dans le L-1690 qui aurait pu être assimilée à des agrégats de rhodopsine. L'évolution différente de la formation de la métarhodopsine II, dans le L-1690 et dans l'Ammonyx-LO, est due aux interactions rhodopsine-détergent.

E. Effet de la température sur la vitesse de réaction

La réaction métarhodopsine I → II est la première transition de la séquence photolytique à être drastiquement influencée par des interactions intermoléculaires impliquant la molécule de rhodopsine. La réaction se produit seulement en présence d'eau, et la rhodopsine devient protonée (Emrich, 1971). Les détergents ont aussi un effet marqué sur les cinétiques observées. A 3°C, on retrouve des quantités égales de métarhodopsines I et II (à pH 7), une variation de température déplace l'équilibre (Cieslik et Rüppel, 1981). Dans nos deux détergents, nous avons étudié l'effet de la température sur l'apparition de la métarhodopsine II (tableau III-13).

Dans l'Ammonyx-LO, la réaction est ralentie par un facteur de 13 lorsque la température diminue de 298 K à 273 K. Les cinétiques mesurées à des intervalles de 5 ou 3 degrés, de 278 K à 301 K, mettent en évidence l'accélération de la réaction avec l'augmentation de la température (tableau III-14). Cette dépendance de la constante de vitesse face à la température permet de tracer un graphique d'Arrhenius (figure III-19) sur lequel on note la relation linéaire entre le log de la constante de vitesse k et la réciproque de la température en degrés Kelvin.

Tableau III-13

Effet de la température sur la cinétique de formation
de la métarhodopsine II

Température (K)	298	273	k_{298} / k_{273}
<hr/>			
Rhodopsine - Ammonyx-LO			
k (s^{-1})	1.70×10^4	1.28×10^3	13
<hr/>			
Rhodopsine- L-1690			
k_1 (s^{-1})	1.77×10^4	1.27×10^2	139
k_2 (s^{-1})	3.07×10^3	3.05×10^1	101
k_1 / k_2	5.8	4.2	
<hr/>			

Tableau III-1⁴

Effet de la température sur la cinétique de formation
de la métarhodopsine II dans l'AMMONYX-LO

Température (K)	273	278	283	288	293	298	301
1/T (10 ⁻³ K)	3.663	3.597	3.534	3.472	3.413	3.356	3.322
k (s ⁻¹)	1280	1750	3700	6000	9400	17000	25800
log k (s ⁻¹)	3.1072	3.2430	3.5682	3.7782	3.9731	4.2480	4.4116
demi-vie (μs)	541	396	187	115	74	40	27
τ (μs)	781	571	270	167	106	59	39

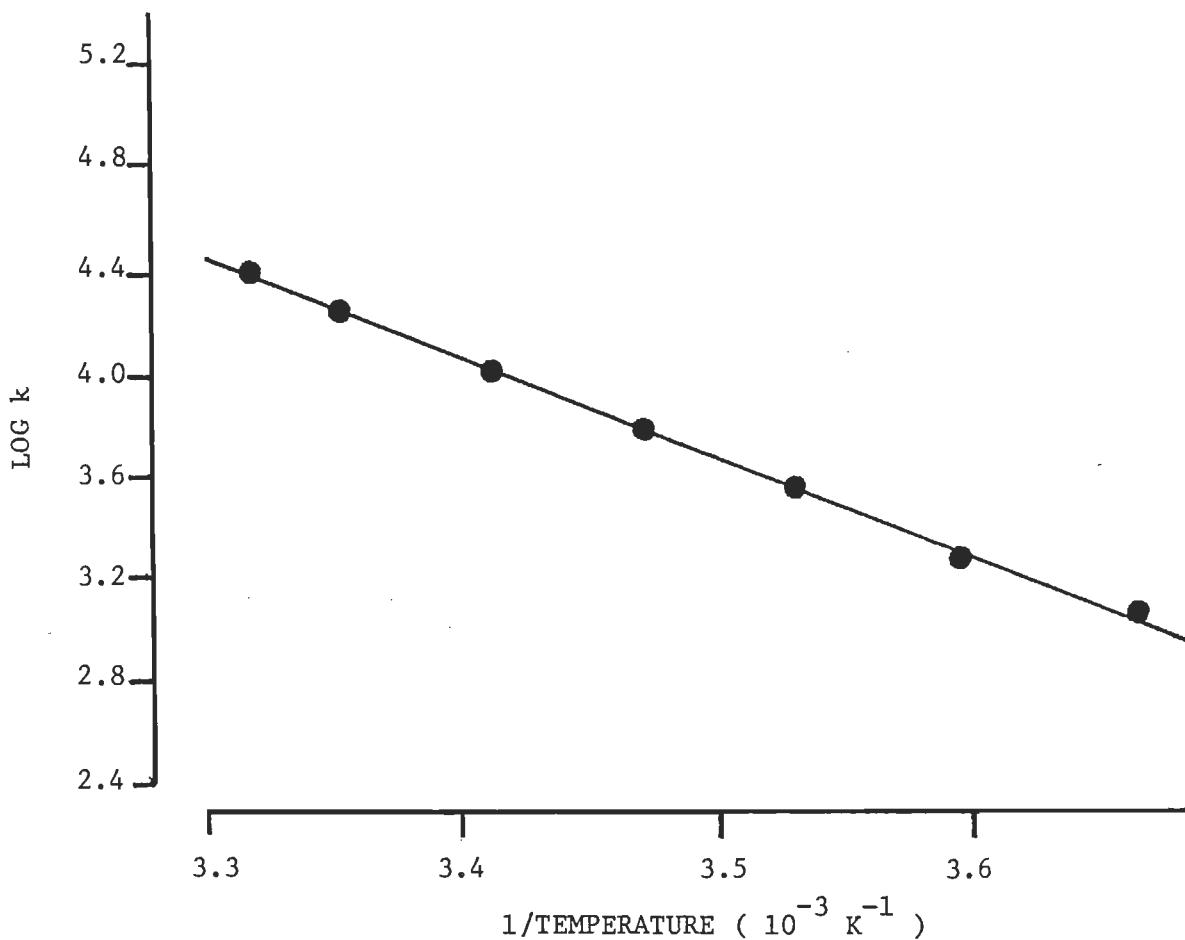


Figure III-19: Graphique d'Arrhénius - Rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-L0. L'énergie d'activation associée à la formation de la métarhodopsine II est de 17.7 Kcal/mole. La valeur du coefficient de corrélation est de 0.9960.

Dans le L-1690, la chute des températures a un effet dramatique sur la formation de la métarhodopsine II. De 301 K à 273 K, on observe toujours une réaction rapide et une réaction lente, mais pour les deux processus, le facteur de ralentissement est de l'ordre de 100. La rigidité micellaire est dépendante de la température. En augmentant la température, la micelle de détergent recouvre de sa fluidité pour permettre les changements conformationnels de la protéine, nécessaires à la conversion d'un intermédiaire en un autre (Motoyama et Kito, 1981). La micelle de L-1690, déjà plus rigide à la température ambiante, durcit de façon très prononcée en diminuant la température. L'apparition de la métarhodopsine II a été analysée à plusieurs températures (tableau III-15) afin de tracer le graphique d'Arrhénius (figure III-20). Sur ce graphique, on observe deux droites parallèles ce qui suggère déjà des paramètres thermodynamiques semblables pour les deux processus de formation de la métarhodopsine II.

F. Paramètres thermodynamiques d'activation

Le tableau III-16 présente les paramètres thermodynamiques calculés à partir des cinétiques de formation de la métarhodopsine II dans l'Ammonyx-LO et dans le L-1690.

L'énergie d'activation (E_a) est déterminée par la pente du graphique d'Arrhénius. Elle est définie par l'équation:

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.303 RT} \quad (\text{Laidler, 1965})$$

Tableau III-15
Effet de la température sur la cinétique de formation
de la métarhodopsine II dans le L-1690

Température (K)	273	278	283	288	293	298	301
1/T (10 ⁻³ K)	3.663	3.597	3.534	3.472	3.413	3.356	3.322
A - Réaction rapide (k_1)							
k_1 (s ⁻¹)	127	174	423	1480	3380	17700	19800
log k_1 (s ⁻¹)	2.1038	2.2405	2.6263	3.1703	3.5289	4.2405	4.2967
demi-vie (μs)	5457	3983	1638	468	205	40	35
τ (μs)	7874	5747	2364	676	296	56	51
% réaction k_1	35	64	71	67	62	37	48
B - Réaction lente (k_2)							
k_2 (s ⁻¹)	30.5	45.0	76.2	347	843	3070	4960
log k_2 (s ⁻¹)	1.4843	1.6532	1.8820	2.5403	2.9258	3.4871	3.6955
demi-vie (μs)	22721	15400	9095	1997	822	225	140
τ (μs)	32787	22222	13123	2882	1186	326	202
% réaction k_2	65	36	29	33	38	63	52

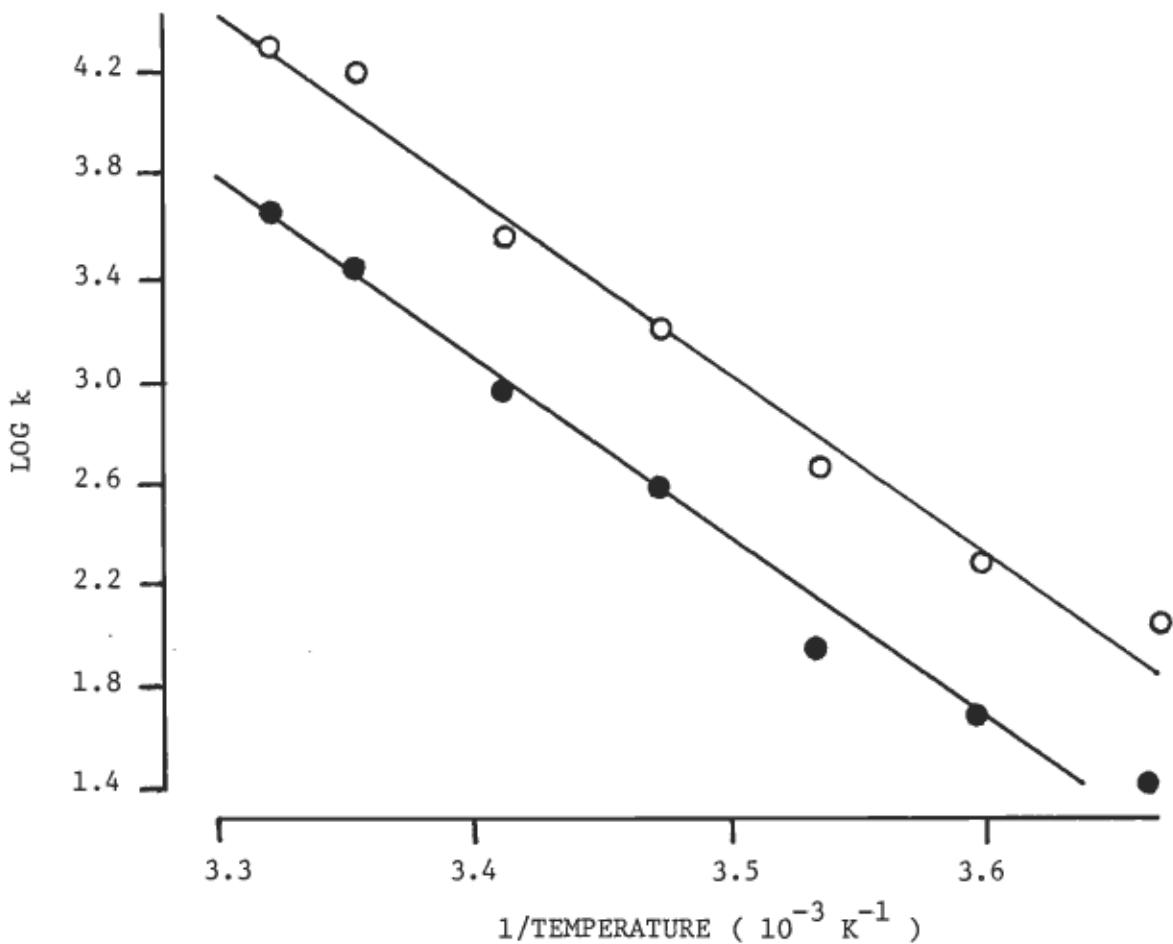


Figure III-20: Graphique d'Arrhénius - Rhodopsine solubilisée dans le L-1690. L'énergie d'activation associée à la formation de la métarhodopsine II est de 32.1 Kcal/mole pour la réaction rapide (O—O) et de 31.7 Kcal/mole pour la réaction lente (●—●). Les coefficients de corrélation sont respectivement de 0.9852 et 0.9840.

Tableau III-16

Paramètres thermodynamiques associés

à la formation de la métarhodopsine II à 293 K

Réaction et environnement	E _a (Kcal/mole)	ΔG [‡] (Kcal/mole)	ΔH [‡] (Kcal/mole)	ΔS [‡] (u.e.)
k (rhodopsine- Ammonyx-LO)	17.7	11.8	17.2	18.0
k ₁ (rhodopsine-L-1690) réaction rapide	32.1	12.3	31.5	65.9
k ₂ (rhodopsine-L-1690) réaction lente	31.7	13.1	31.1	61.4

où k est la constante de vitesse, T la température, A l'intercept et R une constante ($1.986 \text{ cal K}^{-1} \text{ mole}^{-1}$). La majorité des études de la réaction métarhodopsine I \rightarrow II montrent un graphique d'Arrhénius linéaire pour la formation de la métarhodopsine II (Abrahamson et Wiesenfeld, 1972). Pour une réaction d'équilibre, la vitesse observée est la somme des vitesses des réactions métarhodopsine I \rightarrow II (R_1) et métarhodopsine II \rightarrow I (R_2). Sur une vaste gamme de températures, la constante d'équilibre R_1/R_2 varie considérablement et le graphique d'Arrhénius devrait exhiber une variation de pente. Ce fait n'est pas observé. Suite à une augmentation de la température, l'énergie d'activation de la réaction diminue car l'interaction rhodopsine-lipide est modifiée (Uhl et Abrahamson, 1981). Sur de faibles écarts de température, l'énergie d'activation varie de façon négligeable.

A cause des différences non significatives des paramètres d'activation pour les réactions observées dans le L-1690, les comparaisons sont établies globalement entre les détergents. L'énergie d'activation pour la formation de la métarhodopsine II dans le L-1690 double presque celle calculée pour la même réaction dans l'Ammonyx-L0, soit respectivement 32 et 17.7 Kcal/mole. La différence des énergies d'activation est très grande mais beaucoup plus d'interprétations, en termes moléculaires, sont permises par la comparaison des autres paramètres.

L'enthalpie d'activation, ΔH^\ddagger , peut être considérée

comme l'énergie gagnée ou perdue lors de la formation ou du bris de liens chimiques. Elle est reliée à l'énergie d'activation par l'équation:

$$\Delta H^{\ddagger} = E_a - RT$$

La variation d'enthalpie accompagnant la transition métarhodopsine I \rightarrow II est caractérisée par de grandes valeurs positives (Abrahamson et al., 1960). Etant une fonction de l'énergie d'activation, on observe les mêmes différences en comparant les ΔH^{\ddagger} pour la rhodopsine solubilisée dans le L-1690 (≈ 31 Kcal/mole) ou dans l'Ammonyx-LO (17.2 Kcal/mole).

Par contre si on calcule l'énergie minimale à fournir pour que la réaction se produise (on parle alors d'énergie libre d'activation de Gibbs symbolisée par ΔG^{\ddagger}), on devrait s'attendre à un écart beaucoup moins considérable. La valeur du ΔG^{\ddagger} est de 11.8 Kcal/mole pour la formation de métarhodopsine II dans l'Ammonyx-LO. La différence avec le L-1690 est de l'ordre de 1 Kcal/mole comparativement à 15 Kcal/mole entre les valeurs de ΔH^{\ddagger} . On calcule le ΔG^{\ddagger} selon l'équation:

$$\log k = \log \frac{kT}{h} - \frac{\Delta G^{\ddagger}}{2.303 RT}$$

où K est la constante de Boltzmann (1.381×10^{-16} erg K $^{-1}$) et h la constante de Planck (6.626×10^{-27} erg s).

Connaissant les ΔH^{\ddagger} et ΔG^{\ddagger} , il est possible de déterminer

l'entropie d'activation, ΔS^\ddagger , par la relation

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Le ΔS^\ddagger est une mesure du changement de degré d'ordre moléculaire accompagnant la formation d'un état de transition. Une valeur positive est associée à la formation d'un état moins ordonné. L'entropie est exprimée en unité entropique (u.e.) équivalente à une caloricie $K^{-1} \text{ mole}^{-1}$. Les valeurs de ΔS^\ddagger pour la formation de métarhodopsine II dans le L-1690 (≈ 65 u.e.) sont plus de trois fois supérieures à celles calculées dans l'Ammonyx-L0 (18 u.e.).

Une attention toute particulière doit être accordée aux grandes valeurs positives d'enthalpie et d'entropie d'activation associées à la formation de la métarhodopsine II, puisqu'elles sont indicatives de changements conformationnels substantiels de la rhodopsine (Abrahamson et al., 1960). Plus spécifiquement le ΔS^\ddagger positif correspond à un dépliage significatif de la protéine lorsqu'elle a atteint l'étape métarhodopsine II. La valeur de ΔS^\ddagger indique que la métarhodopsine II est produite moins facilement dans le L-1690 ce qui confirme encore la présence d'un environnement moléculaire plus rigide pour la molécule de rhodopsine dans ce détergent.

G. Discussion des résultats

Pour bien comprendre la réaction métarhodopsine I \rightarrow II

dans la membrane discale, la photolyse éclair constitue le principal mode d'exploration. Idéalement des suspensions de membranes disciales sont utilisées. Dans ce type d'expérience, les conditions de température et l'extraction de la rhodopsine par les détergents favorisent généralement la formation de métarhodopsine II.

Les cinétiques de la réaction ont été mesurées par plusieurs chercheurs. Des cinétiques simples de premier ordre sont prévues en raison de la stoechiométrie de la réaction. Lorsque la transition est analysée au niveau des membranes disciales, il est souvent difficile d'obtenir des résultats en raison de la diffusion de lumière par les fragments membranaires. L'équipement doit être très sophistiqué pour aller chercher les variations d'absorbance dans un signal dont 90% de l'amplitude peut être due à la lumière diffusée (Lewis et al., 1981). Pour atténuer ce problème, les S.E.B. peuvent être soniqués ou suspendus dans du glycérol pour augmenter l'indice de réfraction.

Pratt et al. (1964) ont photolysé la rhodopsine dans son environnement membranaire. Ils ont étudié la diminution d'absorbance à 476 nm et expliqué la transition métarhodopsine I → II par la somme de deux processus de premier ordre. Un milieu 2:1 glycérol/tampon a été utilisé pour suspendre les fragments de S.E.B. En travaillant à deux longueurs d'onde d'analyse (380 nm pour la métarhodopsine II et 480 nm pour la métarhodopsine I),

Von Sengbusch et Stieve (1971), et Rapp (1971) concluent que la réaction est un processus de premier ordre dans les membranes discales. L'étude de Applebury et al., (1974) avec des S.E.B. soniqués, effectuée en contrôlant l'apparition de métarhodopsine II à 380 nm, est décrite par un processus simple d'ordre 1. Rapp (1971, 1979) obtient des résultats similaires à Applebury et al. avec des échantillons de membranes discales soniquées. Ces deux études montrent des paramètres cinétiques identiques. Selon Litman et al., (1982), la formation de métarhodopsine II dans les disques soniqués obéit à une seule exponentielle. Les vitesses observées sont similaires à celles mesurées *in vivo*. À 37°C, *in vivo*, la constante de vitesse de la réaction est de $0.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ chez le lapin et de $3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ chez le rat (Hagins, 1972, Penn et Hagins, 1972). Par exemple, Applebury et al., (1974), à la même température mais *in vitro*, ont déterminé la constante de vitesse égale à $2.4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$.

D'autres travaux récents ont décrit l'apparition de métarhodopsine II à 380 nm, dans les fragments de S.E.B., selon deux processus de premier ordre (Hoffmann et al., 1978). Stewart et al. (1977) étaient arrivés aux mêmes conclusions avec des S.E.B. soniqués. Lewis et al. (1981) ont isolé une combinaison de trois exponentielles sur l'échelle de temps de la transition métarhodopsine I → II, deux de celles-ci sont associées à la formation de métarhodopsine II. Hagins

(1956, 1957), dans un oeil de lapin intact, a décrit la réaction selon une double exponentielle.

Dans les détergents, l'étude cinétique de l'étape métarhodopsine I → II est facilitée par la solubilisation des membranes, ce qui diminue la diffusion de la lumière. Dès 1958, la photolyse d'extraits de rhodopsine solubilisée dans la digitonine montre une diminution initiale de la transmission à 480 nm, suivie d'une augmentation (Wulf et al., 1958). La disparition de la métarhodopsine I est alors interprétée comme étant la somme de trois processus. Abrahamson et al. (1960) ont obtenu des résultats semblables avec des échantillons de même nature. Cependant la solubilisation des membranes avec la digitonine entraîne une diminution de la vitesse de réaction et de plus, ce détergent brise la membrane en fragments non homogènes (Von Sengbusch et Stieve, 1971). Lorsque les extraits de rhodopsine solubilisée dans la digitonine sont rendus homogènes, la formation de la métarhodopsine II est une réaction simple d'ordre 1 (Von Sengbusch et Stieve, 1971). Toujours dans le même détergent, Pratt et al. (1964) interprètent la cinétique par deux processus simultanés de premier ordre.

Cependant la conversion métarhodopsine I → II se produit généralement plus vite dans les détergents que dans la membrane discale. En ce sens, Baker et al. (1977) ont déterminé

les vitesses d'apparition de la métarhodopsine II, citées par ordre croissant, dans les S.E.B., la digitonine 1%, le triton X-100 1%, le CTAB 1%, l'Ammonyx-LO 1.5% et l'Emulphogène BC-720 1%. Fait à noter, dans tous ces environnements moléculaires différents, la réaction obéit à une simple exponentielle.

Des S.E.B. combinés à de la PC d'oeuf montrent une cinétique à une seule exponentielle et une constante de vitesse identique à ce qui est observé dans les S.E.B. seuls (O'Brien, 1982). Pour la rhodopsine purifiée et délipidée, les recombinants avec de la PC d'oeuf forment la métarhodopsine II selon deux réactions simultanées d'ordre 1 (Applebury et al., 1974).

L'interprétation et la rationalisation de tous ces résultats doivent être considérées. Les échantillons de rhodopsine soumis aux expériences de photolyse éclair doivent être homogènes, cet état semble difficile à obtenir dans la digitonine et avec les fragments de membrane discale. Une meilleure solubilisation ou la sonication semblent éliminer ce problème.

Auparavant les cinétiques étaient mesurées à une ou deux longueurs d'onde. A la plupart des longueurs d'onde incluant 380 nm, la réaction lumi- \rightarrow métarhodopsine I contribue au signal métarhodopsine I \rightarrow II. Près de la température physiologique, le rapport des vitesses des deux transitions est de 3:1 et des quantités importantes de lumirhodopsine sont présentes lors de la disparition de la métarhodopsine I (Lewis et al.,

1981). Selon Rapp (1979), les deux réactions sont indépendantes. Une autre source de difficulté réside dans la séparation de contributions exponentielles successives observées lors de la formation de la métarhodopsine II. La décomposition informatisée des cinétiques se présente comme la solution de l'avoir (Lewis et al., 1981).

En regard de la rétrospective des résultats présentés ci-dessus et des considérations à envisager, la question qui se pose est la suivante: y a-t-il ou non deux processus de formation de la métarhodopsine II ? Dans l'Ammonyx-LO, la transition est une réaction simple d'ordre 1. Par contre dans le L-1690, à toutes les températures, nous avons décrit le passage métarhodopsine I → II selon deux exponentielles.

Nous n'avons pas noté d'interférence de la réaction lumière → métarhodopsine I sur l'échelle de temps de nos expériences. Aux quatre longueurs d'onde d'analyse sélectionnées, nous avons obtenu des résultats identiques. Lewis et al. (1981) arrivent à la même conclusion en utilisant huit longueurs d'onde d'analyse.

Nous sommes assurés de la solubilisation homogène des échantillons. Les cinétiques composées observées dans le L-1690 ne sont pas dues à de la rhodopsine agrégée et pourraient refléter le comportement *in vivo* de la rhodopsine. Nos deux détergents doux, l'Ammonyx-LO et le L-1690, solubilisent très

bien la rhodopsine puisque les mêmes vitesses sont observées pour la rhodopsine purifiée, délipidée ou les membranes discates solubilisées. La similitude des cinétiques mesurées avec la rhodopsine purifiée délipidée et les disques solubilisés dans l'Ammonyx-L0, de même que l'absence d'effet de concentration de détergent, ont aussi été observés par Applebury et al. (1974). Mieux encore, tous nos résultats obtenus en photolyse éclair sont entièrement supportés par les études de la séquence photolytique à basse température.

Dans l'Ammonyx-L0, la réaction est d'ordre 1. A 20°C, la constante de vitesse associée à la formation de la métarhodopsine II est de $10\ 000\ s^{-1}$ comparativement à $11\ 000\ s^{-1}$ pour Applebury et al. (1974) et $9\ 750\ s^{-1}$ pour Baker et al. (1977). La légère différence entre nos travaux et ceux de Applebury et al. pourrait être due au fait qu'ils ont purifié l'Ammonyx-L0, ne conservant que la fraction DDAO. D'autre part, nous avons travaillé à pH 8.0, Applebury et al. à pH 7.0 et Baker et al. à pH 6.5.

En ce qui a trait aux cinétiques mesurées dans le L-1690, nous sommes les premiers à avoir photolysé la rhodopsine bovine dans ce détergent.

Plusieurs chercheurs, cités ci-dessous, ont observé que la formation de la métarhodopsine II n'est pas une cinétique simple d'ordre 1. Souvent la vitesse de la réaction correspond exactement

à la somme de deux exponentielles, telle que nous l'observons pour la rhodopsine solubilisée dans le L-1690. Il semble qu'une fraction de la rhodopsine qui absorbe la lumière et produit la métarhodopsine II, se convertisse plus rapidement. Selon Williams et Baker (1982), le rapport des constantes de vitesse est toujours environ de 5:1, alors que les quantités relatives des formes rapide et lente dépendent de plusieurs paramètres (température, environnement moléculaire, pH et force ionique). Par exemple, Pratt et al. (1964), pour des S.E.B. en suspension dans le glycérol, ont des cinétiques obéissant à la somme de deux exponentielles avec des constantes de temps dans un rapport 4.6:1 à 10°C et 4.2:1 à 20°C. Les amplitudes n'ont pas été mentionnées. Applebury et al. (1974), avec de la rhodopsine purifiée recombinée à la PC, observent deux processus de formation de métarhodopsine II, avec des constantes de temps dans un rapport 4.5:1 et des amplitudes relatives de 70%:30% pour les réactions lente et rapide respectivement. Hagins (1956), avec la rhodopsine de lapin, constate un rapport de 3.5:1 et des amplitudes relatives de 60 (lente) : 40 (rapide) lors de la formation de métarhodopsine II. Stewart et al. (1976) obtiennent des résultats similaires avec de la rhodopsine purifiée, délipidée et solubilisée dans la digitonine. L'homogénéité de tous ces résultats pour des cinétiques mesurées dans des environnements moléculaires très différents permet d'exclure tout artefact de

mesure. Nos résultats présentent un rapport de constantes de vitesse de 5.8:1 à 25°C et de 4.2:1 à 0°C. La contribution de la réaction lente est de 63% à 25°C comparativement à 37% pour la réaction rapide.

Il est cependant nécessaire de soulever certains problèmes rencontrés dans l'analyse de cinétiques composées. La qualité de la mesure est déterminante. En photolyse éclair, certains enregistrent des variations d'absorbance aussi petites que 0.003 (O'Brien, 1982). Au cours de nos expériences, nous avons observé des variations plus de dix fois supérieures, ce qui minimise les possibilités d'erreur. D'autres ont photolysé la même quantité de rhodopsine que nous, mais avec une forte interférence de l'éclair de lumière sur les cinétiques (Baumann et Zeppenfeld, 1981). Sauf à 500 nm, nous n'avons aucune interférence de ce type sur nos mesures.

Le temps d'enregistrement du système de photolyse doit être court ($\sim 10 \mu s$), surtout lorsqu'on s'approche des conditions physiologiques ou avec certains détergents. Ceci introduit le problème des bruits haute-fréquence sur les tracés d'oscilloscope, et les difficultés usuelles associées à la séparation des résultats et du bruit. Le problème devient encore plus évident quand des doubles exponentielles sont extraites des données car il est nécessaire d'analyser le tracé de l'oscilloscope sur plus de 90% de l'amplitude de la réaction.

La réaction métarhodopsine I + II est associée à l'étalement de la structure tertiaire de l'opsine. Les valeurs de ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger sont caractéristiques de celles correspondant aux réactions de dénaturation de protéines (Glasstone et al., 1941). Bien qu'il existe des variations importantes des ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger selon l'environnement moléculaire, les valeurs de ΔG^\ddagger associées à la formation de métarhodopsine II sont remarquablement constantes (≈ 12 à 15 Kcal/mole). Dans nos deux détergents, les ΔG^\ddagger ne sont pas significativement différents: 11.8 Kcal/mole dans l'Ammonyx-LO, 12.3 et 13.1 Kcal/mole pour les réactions rapide et lente dans le L-1690. Tous les paramètres d'activation calculés pour la rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-LO s'accordent avec ceux déterminés par Applebury et al. (1974) et Baker et al. (1977). Dans le L-1690, les valeurs de ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger ressemblent à celles mesurées dans la membrane discale (référer au tableau I-2). Le L-1690 pourrait être un détergent qui mime bien l'effet des phospholipides membranaires d'origine (Nashima et al., 1978).

La réaction de formation de la métarhodopsine II nous apparaît fortement dépendante de l'interaction protéine-lipide. Cependant l'interprétation pourrait être plus complexe et dépasser le cadre de l'environnement moléculaire du pigment visuel. La quantité de rhodopsine photolysée (Emeis et Hofmann, 1981) ou la manière de purifier les échantillons (Bargoot et Williams, 1977) auraient un effet sur les cinétiques observées.

IV- CONCLUSION

Afin d'étudier la nature des interactions rhodopsine-lipide, il est prioritaire dans les études *in vitro* de s'assurer de l'intégrité fonctionnelle du pigment visuel. Même si on ne sait pas exactement comment la rhodopsine est impliquée dans la transduction visuelle, une séquence primaire d'événements suivant l'absorption de photons a été établie et étudiée *in vitro* (Yoshizawa et Wald, 1963, Matthews et al., 1963, Abrahamson et Wiesenfeld, 1972, Yoshizawa, 1972, Applebury et al., 1974) et *in vivo* (Cone et Cobbs, 1969, Hagins, 1972). La séquence d'intermédiaires spectraux de la rhodopsine est bien définie et elle peut être utilisée phénoménologiquement comme activité connue de la rhodopsine.

Dans la membrane discale et dans l'Ammonyx-L0, la séquence photolytique de la rhodopsine se présente de façon classique. En spectroscopie d'absorption électronique à basse température, nous avons déterminé les températures de transition et la stabilité thermique des espèces intermédiaires. Nos résultats sont résumés aux figures IV-1 et 2, et sont en accord avec ceux publiés par d'autres chercheurs.

Nous nous sommes attardés à l'étude de la transition métarhodopsine I → II puisqu'elle est très sensible à l'environnement moléculaire de la rhodopsine. En photolyse éclair, la formation de métarhodopsine II dans l'Ammonyx-L0 est entièrement due à la disparition de la métarhodopsine I, ce que nous avions déjà observé à basse température. La constante de vitesse et les paramètres thermodynamiques sont constants

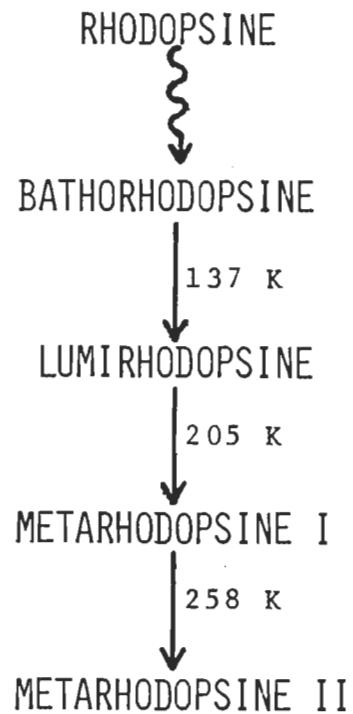


Figure IV-1: Séquence photolytique de la rhodopsine de la membrane discale des S.E.B. Les températures de transition sont indiquées à la droite des flèches entre les intermédiaires. La photoréaction est représentée par une flèche ondulée et les réactions thermiques par une flèche droite.

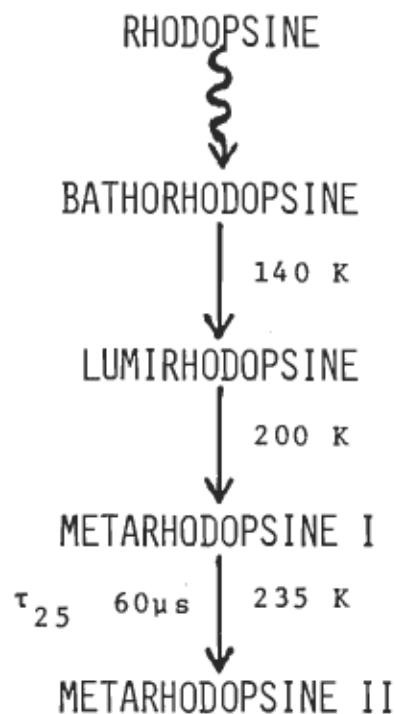


Figure IV-2: Séquence photolytique de la rhodopsine solubilisée dans l'Ammonyx-LO. Les températures de transition sont indiquées à la droite des flèches entre les intermédiaires. Le temps de vie (τ) associé à la transition métarhodopsine I \rightarrow II à 25° C est à la gauche de la flèche. La photoréaction est représentée par une flèche ondulée et les réactions thermiques par une flèche droite.

avec une réaction chimique d'ordre 1 impliquant des modifications conformationnelles de l'opsine.

Dans le L-1690, la photolyse de la rhodopsine présente des particularités. Déjà en spectroscopie d'absorption électronique à basse température, nous observons une plus grande stabilité thermique des espèces lumi- et métarhodopsine I. Plus encore, la métarhodopsine II semble avoir une double origine, possiblement à partir de la lumi- et de la métarhodopsine I. Nous avons par la suite étudié la formation de métarhodopsine II en photolyse éclair. Les cinétiques composées ont confirmé la double origine de cet intermédiaire dans le L-1690. D'autres chercheurs ont aussi mesuré des cinétiques composées lors de la formation de la métarhodopsine II, dans la membrane discale native ou dans des détergents différents.

Dans l'environnement moléculaire fourni par le L-1690, les paramètres thermodynamiques associés à la formation de métarhodopsine II indiquent que ce détergent favorise moins les changements conformationnels de la protéine. Nous avions préalablement évalué la rigidité micellaire du L-1690 comparativement à l'Ammonyx-L0. La micelle de L-1690 est plus rigide et cet effet serait plus accentué en présence de rhodopsine. La rhodopsine réduit la fluidité des chaînes aliphatiques quand celles-ci viennent en contact avec sa surface hydrophobe (Kusumi et al., 1980).

Dans le L-1690, les deux processus de formation de métarhodopsine II sont favorisés presque également en raison des paramètres thermodynamiques quasi identiques. Pour ce détergent, trois hypothèses sont

envisagées pour expliquer la formation de la métarhodopsine II (figure IV-3).

En premier lieu, il serait possible d'expliquer la transition par une réaction en deux étapes impliquant trois espèces moléculaires: 1) une étape métarhodopsine I \rightarrow I' où se produiraient des changements conformationnels significatifs, suivie 2) d'une étape métarhodopsine I' \rightarrow II où il y aurait déprotonation de la base de Schiff, suggérée par le déplacement spectral vers le bleu accompagnant la formation de la métarhodopsine II (Baker et al., 1977). Les valeurs d'enthalpie et d'entropie d'activation associées à la déprotonation de la base de Schiff sont cependant très petites, $\Delta H^\ddagger = 1.8 \text{ Kcal/mole}$ et $\Delta S^\ddagger = 7.3 \text{ u.e.}$. Elles ne sont pas comparables aux paramètres thermodynamiques calculés pour la réaction lente produisant la métarhodopsine II, $\Delta H^\ddagger = 31.1 \text{ Kcal/mole}$ et $\Delta S^\ddagger = 61.4 \text{ u.e.}$

En second lieu, on pourrait penser que la lumirhodopsine donne naissance à deux espèces, les métarhodopsines I et I'. Une forme se transformerait alors plus rapidement que l'autre en métarhodopsine II. Baker et Williams (1971) ont identifié deux formes de métarhodopsine I; une qui peut régénérer de la rhodopsine et une qui ne peut pas. Cependant nos spectres de différence obtenus à basse température montrent une diminution d'absorbance beaucoup plus près de 500 nm que de 480 nm lors du dernier tiers de la réaction. Selon Lewis et al. (1981), les deux processus de formation de métarhodopsine II dans la membrane discalé ne sont pas isochromiques. La réaction lente est due à la disparition d'une espèce absorbant plus à 480 nm.

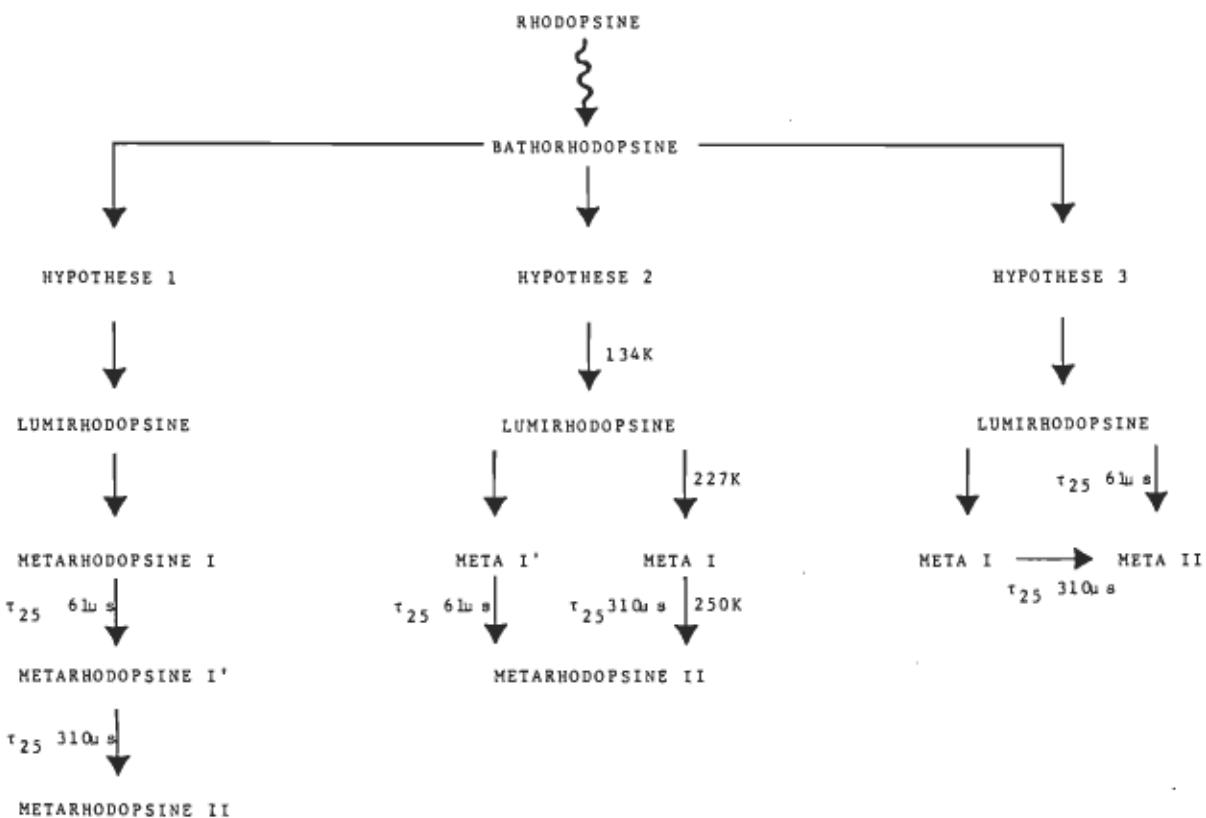


Figure IV-3: Séquence photolytique de la rhodopsine solubilisée dans le L-1690. Trois hypothèses sont envisagées pour expliquer la formation de la métarhodopsine II dans le L-1690. Les températures de transition sont indiquées à la droite des flèches entre les intermédiaires. Le temps de vie associé aux processus de formation de la métarhodopsine II à 25°C est symbolisé par τ . La photoréaction est représentée par une flèche ondulée et les réactions thermiques par une flèche droite.

Ceci nous amène à considérer une troisième hypothèse, selon laquelle le pigment visuel pourrait être photodécoloré sans passer par l'étape métarhodopsine I. Les résultats obtenus à basse température suggèrent la formation de métarhodopsine II directement à partir de la lumirhodopsine. En photolyse éclair, la réaction lente est assignée à la transition métarhodopsine I → II classique. La transition est beaucoup plus lente que dans l'Ammonyx-L0 en raison de la plus grande rigidité micellaire. De plus, la lumirhodopsine est stabilisée dans le L-1690, ce qui rend observable la transition lumi- → métarhodopsine II. Les paramètres thermodynamiques associés à cette transition indiquent un changement conformationnel sensible lors de la disparition de la lumirhodopsine.

Ce nouvel élément pourrait avoir des retombées importantes dans l'explication du phénomène de la transduction visuelle. Il existe une forte controverse au sujet des cinétiques de la transitions métarhodopsine I → II. Beaucoup de recherches ont été effectuées dans les détergents plutôt qu'avec une suspension de membranes discales. L'ester de sucre est un détergent doux qui semble s'apparenter à l'environnement phospholipidique original de la rhodopsine. Comme beaucoup de détergents, il permet d'obtenir d'excellents rapports signal/bruit en éliminant la diffusion de lumière. Cependant la solubilisation enlève aussi la rhodopsine de son environnement lipidique natif. Les cinétiques dans les détergents sont souvent des ordres de grandeur plus rapides que dans la membrane discale. D'ailleurs on s'en rend compte en comparant le temps de vie, à 37°C, de la métarhodopsine I dans la membrane discale, soit 420 μs (Applebury et al., 1974) ou 650 μs (Rapp, 1979) avec celui

de cet intermédiaire soit dans l'Ammonyx-L0 ($18\mu s$), soit dans le L-1690 ($52\mu s$ pour la réaction lente).

Une supposition implicite dans la plupart des études concernant la rhodopsine est que cette molécule est homogène et de structure uniforme. Récemment plusieurs chercheurs ont démontré une hétérogénéité de plusieurs types dans les préparations de rhodopsine:

- 3 formes réagissant de façon différente, *in vivo*, avec l'hydroxylamine (Bowmaker et Loew, 1976),
- 3 formes isochromiques différencierées par des quantités différentes de phospholipides (Shichi et al., 1977),
- des formes multiples selon le degré de phosphorylation (Kühn et Mc Dowell, 1977),
- 2 formes de conformation différente dans la membrane discale (Stewart et al., 1977, Hoffmann et al., 1978),
- 3 formes différant par les chaînes d'hydrates de carbone (Fukuda et al., 1979, Liang et al., 1979),
- 3 formes de poids moléculaire différent (Molday et Molday, 1979),
- et 3 formes différant par leur structure tertiaire et par leur point isoélectrique (Muccio et al., 1983).

Il ne faut cependant pas déduire que, suite à l'absorption de photons, chacune des formes de rhodopsine suit une voie de désactivation qui lui est particulière. On doit se rappeler que c'est le site de liaison hydrophobe du rétinal qui est l'image des propriétés dynamiques de la rhodopsine, tel que reflété par les cinétiques de transition métarhodopsine I \rightarrow II. Par exemple, Litman et al. (1982) ont montré que des disques protéolysés sont perturbés dans leur capacité à activer la phosphodiesterase, alors que la transition métarhodopsine I \rightarrow II

est très peu affectée. L'environnement hydrophobe du rétinal est en grande partie structuralement indépendant des modifications à la surface hydrophile de la protéine.

Néanmoins il existe une forte dépendance de l'environnement moléculaire sur la transition métarhodopsine I → II. C'est la nature de l'interaction rhodopsine-phospholipide ou rhodopsine-détergent qui détermine la stabilité thermique et la vitesse de formation des espèces intermédiaires. Par exemple, Litman et al. (1981) ont observé, pour des membranes discales solubilisées dans l'octyl glucoside, que les constantes de vitesse associées à la formation de métarhodopsine II augmentent de $6.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ à $19.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ quand le nombre de phospholipides par rhodopsine passe de 35 à 5.

La continuité essentielle de la présente recherche réside dans l'étude de la transition lumi- → métarhodopsine I en photolyse éclair. L'évaluation quantitative de la disparition de la lumirhodopsine pourrait permettre d'établir si une fraction importante de cet intermédiaire est convertie directement en métarhodopsine II dans le L-1690. La mise au point d'un système pouvant mesurer les cinétiques de formation de métarhodopsine II dans la membrane discale permettrait sûrement des points de comparaison très intéressants.

A un autre niveau, il est connu qu'un minimum de fluidité est nécessaire pour que la rhodopsine subisse le changement conformationnel associé à la formation de la métarhodopsine II (O'Brien et al., 1977, O'Brien, 1982). Il serait intéressant de vérifier l'effet de la longueur et du niveau d'insaturation des chaînes hydrocarbonées. La

recombinaison de la rhodopsine purifiée, délipidée, avec des phospholipides de la membrane discale contribuerait énormément à la compréhension de l'interaction protéine-lipide dans cette membrane. Déjà certaines recherches ont été orientées en ce sens. En particulier, la PC et la PS ont été utilisées lors de la photolyse de recombinants de rhodopsine (Applebury et al., 1974, O'Brien et al., 1977, De Grip et al., 1983).

La purification du L-1690 pourrait aussi s'inscrire dans la poursuite de notre recherche. En chromatographie sur couche mince, ce détergent montre une composition hétérogène à cause de la présence de mono- et de diester liés majoritairement à des chaînes de douze carbones (Tessier, 1981).

La conclusion pratique de notre travail, est que la métarhodopsine II a une double origine lorsque la rhodopsine est solubilisée dans le L-1690. Considérant ce fait, une plus grande importance devrait être accordée au lumi-intermédiaire dans l'explication du phénomène de la transduction visuelle.

BIBLIOGRAPHIE

Abdulaev, N.G., Artamonov, I.D., Bogachuk, A.S., Feigina, M.Y., Kostina, M.B., Kudelin, A.B., Martynov, V.I., Mirosknikov, A.I., Zolotarev, A.S. et Ovchinnikov, Y.A. Structure of light-activated proteins: visual rhodopsin. Biochemistry International, 1982, 5, 693-703.

Abrahamson, E.W. New model for visual transduction. Communication présentée au Centre de Recherche en Photobiophysique, Trois-Rivières, 1982.

Abrahamson, E.W., Marquizee, J., Gavuzzi, P. et Roubie, J. Flash photolysis of visual pigments. Z. Elektrochem., 1960, 64, 177-180.

Abrahamson, E.W. et Ostroy, S.E. The photochemical and macromolecular aspects of vision. Prog. Biophys. Mol. Biol., 1967, 17, 179-215.

Abrahamson, E.W. et Wiesenfeld, J.R. The structure, spectra and reactivity of visual pigments. In H.J.A. Dartnall (Ed.), Handbook of Sensory Physiology, vol. VII, Photochemistry of Vision. New York: Springer-Verlag, 1972, pp. 69-121.

Albrecht, A.C. Polarizations and assignments of transitions: The method of photoselection. J. Mol. Spec., 1961, 6, 84-108.

American Society for testing and materials (ASTM) Method A-colorimetric ascorbic acid reduction method. Annual book of ASTM standards. Philadelphia: ASTM, 1977, pp. 449-451.

Anderson, R.E. et Maude, M.B. Lipids of ocular tissues-VIII. The effects of essential fatty acid deficiency on the phospholipids of the photoreceptor membranes of rat retina. Arch. Biochem. Biophys., 1972, 151, 270-276.

Anderson, R.E., Maude, M.B. et Zimmerman, W.F. Lipids of ocular tissues-X. Lipid composition of subcellular fractions of bovine retina. Vision Res., 1975, 15, 1087-1090.

Applebury, M.L., Zuckerman, D.M., Lamola, A.A. et Jovin, T.M. Rhodopsin. Purification and recombination with phospholipids assayed by the metarhodopsin I → metarhodopsin II transition. Biochemistry, 1974, 17, 3448-3458.

Applebury, M.L. et Rentzepis, P.M. Picosecond spectroscopy of visual pigments. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H1, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, 354-373.

Atherton, N.M. Electron Spin Resonance Theory and Applications. New York: John Wiley et Sons Inc., 1973.

Badley, R.A. Fluorescent probing of dynamic and molecular organization of biological membranes. In E.L. Wehry (Ed.), Modern fluorescence spectroscopy, vol. 2. New York: Plenum Press, 1976, pp. 91-168.

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

Baker, B.N. et Williams, T.P. Photolysis of metarhodopsin I and extent of conversion to rhodopsin. Vision Res., 1971, 11, 449-458.

Bargoot, F.G. et Williams, T.P. Flash photolysis of visual pigments in solution.II. The effect of preparation on the observed kinetics. Vision Res., 1977, 17, 165-168.

Baron, C. et Thompson, T.E. Solubilization of bacterial membrane proteins using alkylglucosides and dioctanoyl phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 382, 276-285.

Basinger, S., Bok, D. et Hall, M. Rhodopsin in the rod outer segment plasma membrane. J. Cell. Biol., 1976, 69, 29-42.

Baumann, C. et Zeppenfed, W. Effect of pH on the formation and decay of the metarhodopsins of the frog. J. Physiol., 1981, 317, 347-364.

Bennett, N. Evidence for differently protonated forms of metarhodopsin II as intermediates in the decay of membrane-bound cattle rhodopsin. Biochem. Biophys.Res.Commun, 1978, 83, 457-465.

Bennett, N. Optical study of the light-induced protonation changes associated with the metarhodopsin II intermediate in rod-outer-segments membranes. Eur. J. Biochem., 1980, 111, 99-103.

Bennett, N. Light-induced interactions between rhodopsin and the GTP-binding protein. Relation with phosphodiesterase activation. Eur. J. Biochem., 1982, 123, 133-139.

Bennett, N., Michel-Villaz, M. et Kühn, H. Light-induced interaction between rhodopsin and the GTP-binding protein. Metarhodopsin II is the major photoproduct involved. Eur. J. Biochem., 1982, 127, 97-103.

Bensasson, R., Land, E.J. et Truscott, T.G. Laser flash photolysis of rhodopsin at room temperature. Photochem. Photobiol., 1977, 26, 601-605.

Bitensky, M.W., Wheeler, G.L., Aloni, B., Vetur, S. et Matsuo, Y. Light- and GTP- activated photoreceptor phosphodiesterase: regulation by a light-activated GTPase and identification of rhodopsin as the phosphodiesterase binding site. Adv. Cyclic Nucleotide Res., 1978, 9, 553-573,

Blaurock, A.E. What X-ray and neutron diffraction contribute to understanding the structure of the disc membrane. In H.B. Barlow et P. Fatt (Eds.), Vertebrate photoreception, New York: Academic Press, 1977, pp. 61-76.

Bonting, S.L., Van Breugel, P.J.G.M. et Daemen, F.J.M. Influence of the lipid environment on the properties of rhodopsin in the photoreceptor membrane. In N.G. Bazan, R.R. Brenner et N.M. Giusto (Eds.), Experimental Medicine and Biology, vol. 83, Function and Biosynthesis of Lipids, New York: Plenum Pub. Co., 1977, pp. 175-189.

Borochov-Neori, H., Fortes, P.A.G. et Montal, M. Rhodopsin in reconstituted phospholipid vesicles. 2. Rhodopsin-rhodopsin interactions detected by resonance energy transfer. Biochemistry, 1983, 22, 206-213.

Bowmaker, J.K. et Loew, E.R. The action of hydroxylamine in the intact retina of the frog (*Rana temporaria*). Vision Res., 1976, 16, 811-818.

Bownds, D. Site of attachment of retinal in rhodopsin. Nature (London), 1967, 216, 1178-1181.

Bownds, D. Molecular mechanisms of visual transduction. TINS, 1981, 4, 214-217.

Bownds, D. et Brodie, A.E. Light-sensitive swelling of isolated frog outer segments as *in vitro* assay for visual transduction and dark adaptation. J. Gen. Physiol., 1975, 66, 407-425.

Bownds, M.D., Gordon-Walker, A., Gaide-Huguenin, A.-C. et Robinson, W. Characterization and analysis of frog photoreceptor membranes. J. Gen. Physiol., 1971, 58, 225-237.

Bowness, J.M. Purification of rhodopsin using columns containing calcium triphosphate. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 305-310.

Broda, E.E. et Goodeve, C.F. The behavior of visual purple at low temperature. Proc. Roy. Soc. A, 1941, 179, 151-159.

Brown, J.L. The structure of the visual system. In C.H. Graham (ed.), Vision and visual Perception. New York: John Wiley et Sons Inc., 1965, pp. 39-59.

Brown, P.K. Rhodopsin rotates in the visual receptor membrane, Nature New Biology, 1972, 236, 35-39.

Busch, G.E., Applebury, M.L., Lamola, A.A. et Rentzepis, P.M. Formation and decay of prelumirhodopsin at room temperatures. Natl. Acad. Sci. (USA) Proc., 1972, 69, 2802-2806.

Chabre, M. X-ray diffraction studies of retinal rods.I. Structure of the disc membrane, effect of illumination. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 382, 322-335.

Chen, Y.S. et Hubbell, W.L. Temperature- and light-dependent structural changes in rhodopsin-lipid membrane. Expl. Eye Res., 1973, 17, 517-532.

Cheung, W.Y. Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Evidence for the properties of a protein activator. J. Biol. Chem., 1971, 246, 2859-2869.

Cieslik, J. et Rüppel, H. Comparison between light pulse and temperature jump induced meta transitions in the rhodopsin photolysis sequence. Biophys. Struct. Mech., 1981, 7, 292.

Cone, R.A. Rotationnal diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. Nature New Biology, 1972, 236(63), 39-43.

Cone, R. et Cobbs, W.H. Rhodopsin cycle in the living eye of the rat. Nature (London), 1969, 221, 820-822.

Daemen, F.J.M. Vertebrate rod outer segments membranes, Biochim. Biophys. Acta, 1973, 300, 255-288.

- Daemen, F.J.M., De Grip, W.J. et Jansen, P.A.A. Biochemical aspects of the visual process.XX. The molecular weight of rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 271, 419-428.
- Dartnall, H.J.A. (Ed.). Handbook of sensory physiology, vol. VII/l. Photochemistry of vision. New York: Springer-Verlag, 1972.
- De Grip, W.J. Thermal stability of rhodopsin and opsin in some novel detergents. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 256-265.
- De Grip, W.J., Daemen, F.J.M. et Bonting, S.L. Biochemical aspects of the visual process.XVIII. Enrichment of rhodopsin in rod outer segment membrane preparations. Vision Res., 1972, 12, 1697-1707.
- De Grip, W.J., Daemen, F.J.M. et Bonting, S.L. Isolation and purification of bovine rhodopsin. In D.B. McCormick et L.D. Wright (Eds.), Methods in Enzymology, vol. 67, Vitamins and coenzymes, part F. New York: Academic Press, 1980, pp. 301-320.
- De Grip, W.J., Olive, J. et Bovee-Geurts, P.H.M. Reversible photolysis of rhodopsin in pure PS membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 734, 168-179.
- Denton, E.J. The contributions of the oriented photosensitive and other molecules to the absorption of whole retina. Proc. Roy. Soc. B., 1959, 150, 78-94.

De Robertis, E. et Lasansky, A. Ultrastructure and chemical organization of photoreceptors. In G.K. Smelser (Ed.), Structure of the eye. New York: Academic Press, 1961, pp. 29-49.

Downer, N.W. et Engländer, S.W. Hydrogen exchange study of membrane-bound rhodopsin. II. Light-induced protein structure change. J. Biol. Chem., 1977, 252(22), 8801-8804.

Dratz, E.A. et Hargrave, P.A. The structure of rhodopsin and the rod outer segment disk membrane, TIBS, 1983, April 1983, 128-131.

Dratz, E.A., Miljanich, G.P., Nemes, P.P., Graw, J.E. et Schwatz, S. The structure of rhodopsin and its disposition in the rod outer segment disk membrane, Photochem. Photobiol., 1979, 29, 661-670.

Ebrey, T.G. et Honig, B. Molecular aspects of photoreceptor function. Q. Rev. Biophys., 1975, 8, 129-184.

Emeis, D. et Hofmann, K.P. Shift in the relation between flash-induced metarhodopsin I and metarhodopsin II within the first 10% rhodopsin bleaching in bovine disc membranes. FEBS Letters, 1981, 136, 201-207.

Emeis, D., Kühn, H., Reichert, J. et Hofmann, K.P. Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium. FEBS Letters, 1982, 143, 29-34.

Emrich, H.M. Optical measurements of the rapid pH-change in the visual process during the metarhodopsin I-II reaction. Z. Naturforsch., 1971, 26b, 352-356.

Emrich, H.M. et Reich, R. Primary reactions in the visual process.

Thermodynamic and kinetic influence of pH on the metarhodopsin I-II transition. Proton consumption as an effect of conformational changes. Z. Naturforsch, 1974, 29c, 577-591.

Engländer, J.J. et Engländer, S.W. Comparison of bacterial and animal rhodopsins by hydrogen exchange studies. Nature (London), 1977, 265, 658-659.

Eyring, G., Curry, B., Mathies, R., Fransen, R., Palings, I. et Lugtenburg, J. Interpretation of the Resonance Raman Spectrum and Bathorhodopsin Based on Visual Pigment Analogues. Biochemistry, 1980, 19, 2410-2418.

Eyring, G. et Mathies, R. Resonance Raman Studies of bathorhodopsin: Evidence for a protonated Schiff base linkage. Natl. Acad. Sci. (USA) Proc., 1979, 76, 33-37.

Fager, R.S., Gentilcore, P.C. et Abrahamson, E.W. Kinetics of cyano-borohydride reduction of bovine rhodopsin. Vision Res., 1978, 18, 483-488.

Fain, G.L. Le fonctionnement de la rétine. La Recherche, 1979, 10, 355-362.

Falk, G. et Fatt, P. Rapid hydrogen ion uptake of rod outer segments and rhodopsin solutions on illumination. J. Physiol. (London), 1966, 183, 211-224.

Fatt, P. Decline of the calcium hypothesis of visual transduction. Nature, 1979, 280, 355-356.

Fatt, P. Proteins of vertebrate rod outer segments: a possible role for multiple forms of rhodopsin. Expl. Eye Res., 1981, 33, 31-45.

Favrot, J., Leclercq, J.M., Roberge, R., Sandorfy, C. et Vocelle, D. The photochemical step of vision: the hydrogen bond and other associations. Chem. Phys. Letters, 1978, 53, 433-435.

Fleischman, D. et Denisevich, M. Guanylate cyclase of isolated bovine retinal rod axonemes. Biochemistry, 1979, 18, 5060-5066.

Fong, S.L., Tsin, A.T.C., Bridges, C.D.B. et Liow, G.I. Detergents for extraction of visual pigments: types, solubilization and stability. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 133-140.

Fukuda, M. N., Papermaster, D.P. et Hargrave, P.A. Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH₂ terminus. J. Biol. Chem., 1979, 254, 8201-8207.

Fung, B.K.-K. et Stryer, L. Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments. Proc. Natl. Sci. USA, 1980, 77, 2500-2504.

Futterman, S. Rhodopsin from bovine retinas. In S. Fleischer et L. Packer (Eds.), Methods in Enzymology, vol. 32, Biomembranes, part B. New York: Academic Press, 1974, pp. 306-309.

Glasstone, S., Laidler, K. et Eyring, H. Theory of rate processes. New York: McGraw-Hill, 1941.

Godchaux III, W. et Zimmerman, W.F. Soluble proteins of intact bovine rod cell outer segments. Expl. Eye Res., 1979, 28, pp. 483-500.

Gordon, M.S. Animal Physiology: Principles and adaptations, (4th ed.). New York: Mac Millan Publishing Co. Inc., 1982.

Grellmann, K.-H., Livingston, R. et Pratt, D. A flash-photolytic investigation of rhodopsin at low temperatures. Nature, 1962, 193, 1258-1260.

Hagins, W.A. Flash photolysis of rhodopsin in the retina. Nature, 1956, 177, 989-990.

Hagins, W.A. Rhodopsin in the mammalian retina. Thesis, University of Cambridge, 1957.

Hagins, W.A. The visual process: excitatory mechanisms in the primary receptor cells. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1972, 1, 131-158.

Hagins, W.A., Penn, R.D. et Yoshikami, S. Dark current and photocurrent in retinal rods. Biophys. J., 1970, 10, 380-412.

Hargrave, P.A. The large scale preparation of rhodopsin. Vision Res., 1976, 16, 1013-1014.

Hargrave, P.A. Rhodopsin chemistry, structure and topography. In N. Osborne, G. Chader (Ed.), Progress in retinal research. New York: Pergamon Press, 1982, pp. 1-51.

Hargrave, P.A. et Fong, S.L. The amino-and carboxyl-terminal sequence of bovine rhodopsin. J. Supramol. Struct., 1977, 6, 559-570.

Hargrave, P.A., Fong, S.L., McDowell, J.H., Mas, M.T., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E. et Smith, D.P. The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane. Neurochem. Int., 1980, 1, 231-244.

Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Siemiatkowski-Juszczak, E.C., Fong, S.L., Kühn, H., Wang, J.K., Curtis, D.R., Rao, J.K.M., Argos, P. et Feldmann, R.J. The carboxyl-terminal one-third of bovine rhodopsin: its structure and function. Vision Res., 1982, 22, 1429-1438.

Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Fong, S.-L., Mohana Rao, J.K. et Argos, P. The structure of bovine rhodopsin. Biophys. Struct. Mech., 1983, 9, 235-244.

Helenius, A. et Simons, K. Solubilization of membranes by detergents.

Biochim. Biophys. Acta, 1975, 415, 29-79

Heller, J. Structure of visual pigments.I. Purification, molecular weight and composition of bovine visual pigment₅₀₀. Biochemistry, 1968, 7, 2906-2913.

Hoffmann,W., Siebert, F., Hofmann , K.P. et Kreutz, W. Two distinct rhodopsin molecules within the disc membrane of vertebrate rod outer segments. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 503, 450-461.

Hong, K. et Hubbell, W.L. Lipid requirements for rhodopsin regenerability. Biochemistry, 1973, 12, 4517-4523.

Hong, K., Knudsen, P.J. et Hubbell, W.L. Purification of rhodopsin on hydroxylapatite columns, detergent exchange, and recombination with phospholipids. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 144-150.

Honig, B. et Ebrey, T.G. The structure and spectra of the chromophore of the visual pigments. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1974, 3, 151-177.

Hubbard, R., Bownds, D. et Yoshizawa, T. The chemistry of visual photo-reception. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1965, 30, 301-315.

Hubbard, R., Brown, P.K. et Bownds, D. Methodology of vitamin A and visual pigments. In D.B. Mc Cormick et L.D. Wright (Eds.), Methods in Enzymology, vol. 18. Vitamins and coenzymes, part C. New York: Academic Press, 1971, pp. 615-653.

- Hubbard, R. et Kropf, A. The action of light on rhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci., 1958, 44, 130-139.
- Hubbard, R. et Kropf, A. Molecular aspects of visual excitation. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 81, 388-398.
- Hubbard, R. et Wald, G. Cis-trans isomers of vitamin A and retinene in the rhodopsin system. J. Gen. Physiol., 1952, 36, 269-315.
- Hubbell, W. L. et Bownds, M.D. Visual transduction in vertebrate photorectors. Ann. Rev. Neurosci., 1979, 2, 17-34.
- Hubbell, W.L. et Mc Connell, H. M. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. J. Am. Chem. Soc., 1971, 93, 314-326.
- Hurley, J.B. Isolation and assay of a phosphodiesterase inhibitor from retinal rod outer segments. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H1, Visual Pigments and Purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 542-547.
- Hurley, J., Ebrey, T.G., Honig, B. et Ottolenghi, M. Temperature and wavelength effects on the photochemistry of rhodopsin, isorhodopsin, bacteriorhodopsin, and their photoproducts. Nature (London), 1977, 270, 540-542.
- Irving, C.S., Byers, G.W. et Leermakers, P.A. Spectroscopic model for the visual pigments. Influence of microenvironmental polarizability. Biochemistry, 1970, 9, 858-864.

Jan, L.Y. et Revel, J.-P. Ultrastructural localization of rhodopsin in the vertebrate retina. J. Cell Biol., 1974, 62, 257-273.

Jordan, P.C. Chemical kinetics and transport. New York: Plenum Press, 1979.

Kakitani, T. et Kakitani, H. Self-consistent HMD theory for the excited state of conjugated molecules. Molecular geometry, molecular vibration, and optical spectra. J. Phys. Soc. JPN., 1977, 42, 1287-1295.

Kaupp, U.B., Schnetkamp, P.P.M. et Junge, W. Light-induced calcium release in isolated intact cattle rod outer segments upon photoexcitation of rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1979a, 552, 390-403.

Kaupp, U.B., Schnetkamp, P.P.M. et Junge, W. Flash-spectrophotometry with arsenazo III in vertebrate photoreceptor cells. In C.C. Ashley et A.K. Campbell, (Eds.), Detection and measurement of free Ca²⁺ in cells. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979b, pp. 287-308.

Kaupp, U.B., Schnetkamp, P.P.M. et Junge, W. Metarhodopsin I/metarhodopsin II transition triggers light-induced change in calcium binding at rod disk membranes. Nature (London), 1980, 286, 638-640.

Kaupp, U.B., Schnetkamp, P.P.M. et Junge, W. Rapid calcium release and proton uptake at the disk membrane of isolated cattle rod outer segments. I. Stoichiometry of light-stimulated calcium release and proton uptake. Biochemistry, 1981, 20, 5500-5510.

Kawamura, S., Tokunaga, F. et Yoshizawa, T. Absorption spectra of rhodopsin and its intermediates and orientational change of the chromophore. Vision Res., 1977, 17, 991-999.

Kimbel, R.L., Poincelot, R.P. et Abrahamson, E.W. Chromophore transfer from lipid to protein in bovine rhodopsin. Biochemistry, 1970, 9, 1817-1820.

Kimble, E.A. et Ostroy, S.E. Kinetics of reaction of sulphydryl groups of rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 325, 323-331.

Knudsen, P. et Hubbell, W.L. Stability of rhodopsin in detergent solutions. Membrane Biochemistry, 1978, 1, 297-322.

Kobayashi, T. Hypsorhodopsin: the first intermediate of the photochemical process in vision. FEBS Letters, 1979, 106, 313-316.

Kobayashi, T. Existence of hypsorhodopsin as the first intermediate in the primary photochemical process of cattle rhodopsin. Photochem. Photobiol., 1980, 32, 207-215.

Kohnken, R.E., Chafouleas, J.G., Eadie, D.M., Means, A.R. et Mc Connell, D.G. Calmodulin in bovine rod outer segments. J. Biol. Chem., 1981, 256, 12517-12522.

Korenbrot, J.I., Brown, D.T. et Cone, R.A. Membrane characteristics and osmotic behavior of isolated rod outer segments. J. Cell. Biol., 1973, 56, 389-398.

Krebs, W. et Kühn, H. Structure of isolated bovine rod outer segment membranes. Expl. Eye Res., 1977, 25, 511-526.

Kropf, A. et Hubbard, R. The mechanism of bleaching rhodopsin. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, 74, 266-280.

Kühn, H. Interactions of rod cell proteins with the disk membrane: Influence of light, ionic strength and nucleotides. In W.H. Miller (Ed.), Molecular mechanisms of photoreceptor transduction. New York: Academic Press, 1981, pp. 171-201.

Kühn, H., Bennett, N., Michel-Villaz, M. et Chabre, M. Interactions between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: Kinetic and stoichiometric analyses from light-scattering changes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 6873-6877.

Kühn, H. et Mc Dowell, J.H. Isoelectric focusing of phosphorylated cattle rhodopsin. Biophys. Struct. Mech., 1977, 3, 199-203.

Kühne, W. Über den Sehpurpur. Untersuchungen aus dem Physiologischen Institut der Univ. Heidelberg, 1877, 1, 15-103.

Kusumi, A., Sakaki, T., Yoshizawa, T. et Ohnishi, S. Protein-lipid interaction in rhodopsin recombinant membranes as studied by protein rotational mobility and lipid alkyl chain flexibility measurements. J. Biochem., 1980, 88, 1103-1111.

Kusumi, A., Tsuda, M., Akino, T., Ohnishi, S.-I. et Terayama, Y.
Protein-phospholipid-cholesterol interaction in the photolysis of
Invertebrate rhodopsin. Biochemistry, 1983, 22, 1165-1170.

Laidler, K.J. Chemical kinetics (2nd ed.). New York: Mc Graw-Hill
Book Company, 1965.

Lewis, J.W., Winterle, J.S., Powers, M.A., Kliger, D.S. et Dratz, E.A.
Kinetics of rhodopsin photolysis intermediates in retinal rod disk
membranes.I. Temperature dependence of lumirhodopsin and metarhodop-
sin I kinetics. Photochem. Photobiol., 1981, 34, 375-384.

Liang, C.-J., Yamashita, K., Muellenberg, C.G., Shichi, H. et Kobata, A.
Structure of the carbohydrate moieties of bovine rhodopsin. J. Biol.
Chem., 1979, 254, 6414-6418.

Liebman, P.A. Microspectrophotometry of photoreceptors. In H.J.A.
Dartnall (Ed.), Handbook of Sensory Physiology, vol. VII/I. New York:
Springer-Verlag, 1972, pp. 481-528.

Liebman, P.A. et Entine, G. Lateral diffusion of visual pigment in pho-
toreceptor disk membranes. Science, 1974, 185, 457-459.

Liebman, P.A., Jagger, W.S., Kaplan, M.W. et Bargoot, F.G. Membrane
structure changes in rod outer segment associated with rhodopsin.
Nature, 1974, 251, 31-36.

Liebman, P.A. et Pugh, E.N. Jr. The control of phosphodiesterase in
rod disk membranes: kinetics, possible mechanisms and significance
for vision. Vision Res., 1979, 19, 375-380.

Liebman, P.A. et Pugh, E.N. ATP mediates rapid light activation cycles of GTP-dependent rod membrane cyclic GMP phosphodiesterase. Nature (London), 1980, 287, 734-736.

Liebman, P.A. et Pugh, E.N. Jr. Control of rod disk membrane phosphodiesterase and its controller enzymes. In W.H. Miller (Ed.), Molecular mechanisms of photoreceptor transduction. New York: Academic Press, 1981, pp. 157-170.

Litman, B.J. Purification of rhodopsin by concanavalin A affinity chromatography. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 150-153.

Litman, B.J., Aton, B. et Hartley, J.B. Functional domains of rhodopsin. Vision Res., 1982, 22, 1439-1442.

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

Livingston, R. Evaluation and interpretation of rate data. In S.L. Friess, E.S. Lewis et A. Weissberger (Eds.), Investigation of rates and mechanisms of reactions (2nd ed.). New York: Interscience Publishers Inc., 1961, pp. 100-175.

Lolley, R.N. et Hess, H.H. The retinal rod outer segment of the frog: Detachment, isolation, phosphorus fractions and enzyme activity. J. Cell. Physiol., 1969, 73, 9-24.

- Makino, M., Hamanaka, Y., Orii, Y. et Kito, Y. Fractionation of rhodopsin and other components in the rod outer segment membrane by ammonium sulfate salting-out. Biochim. Biophys. Acta, 1977, 495, 299-311.
- Mao, B., Tsuda, M., Ebrey, T.G., Akita, H., Balogh-Nair, V. et Nakanishi, K. Flash photolysis and low temperature photochemistry of bovine rhodopsin with a fixed 11-ene. Biophys. J., 1981, 35, 543-546.
- Matthews, R.G., Hubbard, R., Brown, P.K. et Wald, G. Tautomeric forms of metarhodopsin. J. Gen. Physiol., 1963, 47, 215-240.
- Maeda, A. et Yoshizawa, T. Molecular transducing system in visual cells. Photochem. Photobiol., 1982, 35, 891-898.
- Marsh, D. Electron Spin Resonance: Spin Labels. In E. Grell (Ed.), Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics (tome 31). Membrane Spectroscopy, New York: Springer-Verlag, 1981, pp. 51-142.
- Mc Connell, D.G., Dangler, C.A., Eadie, D.M. et Litman, B.J. The effect of detergent selection on retinal outer segment A_{280}/A_{500} ratios. J. Biol. Chem., 1981, 256, 4913-4918.
- Miljanich, G.P. Studies of the molecular organisation of the vertebrate photoreceptor membrane. PH.D. Dissertation, University of California, Santa Cruz, 1978.
- Miller, W.H. Molecular mechanisms of photoreceptor transduction. Current topics in membranes and transport, vol. 15, New York: Academic press, 1981.

Miller, W.H. et Laughlin, S.B. Light-mediated cyclic GMP hydrolysis controls important aspects of kinetics of retinal rod voltage response. Biophys. Struct. Mech., 1983, 9, 271-278.

Molday, R.S. et Molday, L.L. Identification and characterization of multiple forms of rhodopsin and minor proteins in frog and bovine rod outer segments disc membranes. J. Biol. Chem., 1979, 254, 4653-4660.

Motoyama, H. et Kito, Y. Significance of hydrophobicity in detergent micelles: Effects of phospholipids and detergents on the photoreaction of bovine rhodopsin. Article non publié, Osaka University, 1981.

Muccio, D.D., Plantner, J.J. et Kean, E.L. Multiple isoelectric forms of detergent-solubilized bovine rhodopsin.II. Spectral analysis. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 744, 320-327.

Mukerjee, P. et Mysels, K.J. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems (vol.36). Washington: National Bureau of Standards Publication NSRDS, 1971.

Nashima, K., Mitsudo, M. et Kito, Y. Studies on Cephalopod rhodopsin. Fatty acid esters of sucrose as effective detergents. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 536, 78-87.

Nemes, P.P., Miljanich, G.P., White, D.L. et Dratz, E.A. Covalent modification of rhodopsin with imidoesters: evidence for transmembrane arrangement of rhodopsin in rod outer segment disk membranes. Biochemistry, 1980, 19, 2067-2074.

O'Brien, P.J. Purification of rhodopsin on agarose. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 141-144.

O'Brien, D.F. Lipid dependence of rhodopsin kinetics. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 378-384

O'Brien, D.F., Costa, L.F. et Ott, R.A. Photochemical functionality of rhodopsin-phospholipid recombinant membranes. Biochemistry, 1977, 16, 1295-1303.

Olive, J. The structural organization of mammalian retinal disc membrane. International Review of Cytology, 1980, 64, 107-164.

Osborne, H.B. Hydrogen-tritium exchange of rhodopsin: Effect of solvent on the incorporation of slowly exchanging tritium atoms. FEBS Letters, 1976, 67, 23-27.

Ostroy, S.E. Rhodopsin and the visual process. Biochim. Biophys. Acta, 1977, 463, 91-125.

Ostroy, S.E., Erhardt, F. et Abrahamson, E.W. Protein configuration changes in the photolysis of rhodopsin.II. The sequence of intermediates in the thermal decay of cattle rhodopsin *in vitro*. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 112, 265-277.

- Ostroy, S.E., Meyertholen, E.P., Stein, P.J., Svoboda, R.A. et Wilson, M.J. Limits on the role of rhodopsin and cGMP in the functioning of the vertebrate photoreceptor. In W.H. Miller (Ed.), Molecular mechanisms of photoreceptor transduction. Current topics in membranes and transport, vol. 15, New York: Academic Press, 1981, pp. 393-404.
- Ovchinnikov, Y.A. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: Structure - function relationships. FEBS Letters, 1982, 148, 179-191.
- Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Artamanov, I.D., Zolotarev, A.S., Kostina, M.B., Bogachuk, A.S., Moroshnikov, A.I., Martinov, V.I. et Kudelin, A.B. The complete amino acid sequence of visual rhodopsin. Bioorg. Khim., 1982, 8, 1011-1014.
- Papermaster, D.S. et Dreyer, W.J. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. Biochemistry, 1974, 13, 2438-2444.
- Parkes, J.H., Liebman, P.A. et Pugh, E.N. Jr. Comparison of delay in hydrolysis of cGMP in ROS suspensions with rate of formation metarhodopsin II. Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 1979, 18, suppl.22.
- Penn, R.D. et Hagins, W.A. Kinetics of the photocurrent of retinal rods. Biophys. J., 1972, 12, 1073-1094.
- Pirenne, M.H. et Crouzy, R. L'oeil et la vision, Paris: Gauthier-Villars éditeur, 1972.

Plantner, J.J. et Kean, E.L. Multiple isoelectric forms of detergent-solubilized bovine rhodopsin.I. Identity, composition and properties. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 744, 312-319

Pober, J.S. et Stryer, L. Light dissociates enzymatically-cleaved rhodopsin into two different fragments. J. Molec. Biol., 1975, 95, 477-481.

Pontus, M. et Delmelle, M. Effect of detergents on the conformation of spin-labeled rhodopsin. Expl. Eye Res., 1975, 20, 559-603.

Pratt, D.C., Livingston, R. et Grellmann, K.-H. Flash photolysis of rod particle suspensions. Photochem. Photobiol., 1964, 3, 121-127.

Rafferty, C.N., Cassim, J.Y. et Mc Connell, D.G. Circular dichroism, optical rotatory dispersion, and absorption studies on the conformation of bovine rhodopsin *in situ* and solubilized with detergent. Biophys. Struct. Mech., 1977, 2, 277-320.

Ralph, C.L. Introductory Animal Physiology, New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1978.

Rapp, J. The kinetics of intermediate processes in the photolysis of bovine rhodopsin. Ph. D. Thesis, Case Western Reserve University, Cleveland, 1971.

Rapp, J. The kinetics of intermediate processes in the photolysis of bovine rhodopsin.II. The intermediate decay sequence from lumirhodopsin₄₉₇ to metarhodopsin II. Vision Res., 1979, 19, 137-141.

Rapp, J., Wiesenfield, J.R. et Abrahamson, E.W. The kinetics of intermediate processes in the photolysis of rhodopsin.I.A re-examination of the decay of bovine lumirhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1970, 201, 119-130.

Raubach, R.A., Nemes, P.P. et Dratz, E.A. Chemical labeling and freeze-fracture studies on the localization of rhodopsin in the rod outer segment disk membrane. Expl. Eye Res., 1974, 18, 1-12.

Renthal, R., Steinemann, A. et Stryer, L. The carbohydrate moiety of rhodopsin: lectin-binding, chemical modification and fluorescence studies. Expl. Eye Res., 1973, 17, 511-515.

Reynolds, J.A., Herbert, S., Polet, H. et Steinhardt, J. The binding of diverse detergent anions to bovine serum albumin. Biochemistry, 1967, 6, 937-947.

Robinson, W.E. et Hagins, W.A. A light-activated GTPase in retinal rod outer segments. Biophys. J., 1977, 17, 196a.

Robinson, W.E. et Hagins, W.A. GTP hydrolysis in intact rod outer segments and the transmitter cycle in visual excitation. Nature (London), 1979, 280, 398-400.

Rodieck, R.W. The vertebrate retina, principles of structure and function. San Francisco: W.H. Freeman (Ed.), 1973.

Röhlich, P. Photoreceptor membrane carbohydrate on the intradiscal surface of retinal rod disks. Nature, 1976, 263, 789-791.

Rosenfeld, T., Alchalel, A. et Ottolenghi, M. Nanosecond laser photolysis of rhodopsin in solution. Nature, 1972, 240, 482-483.

Rosenfeld, T., Honig, B., Ottolenghi, M., Hurley, J. et Ebrey, T. Cis-trans isomerization in the photochemistry of vision. Pure Appl. Chem., 1977, 49, 341-351.

Ruppel, H. et Hagins, W.A. Fast photoelectric effects and the properties of vertebrate photoreceptors as electric cables. Federation Proc., 1971, 30, 64-78.

Salesse, C., Boucher, F. et Leblanc, R.M. An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes. Analytical Biochemistry, 1984, 142, 258-266.

Schnetkamp, P.P.M., Kaupp, U.B. et Junge, W. Interfacial potentials at the disk membranes of isolated intact cattle rod outer segments as a function of the occupation state of the intradiscal cation-exchange binding sites. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 642, 213-230.

Schnetkamp, P.P.M., Klompmakers, A.A. et Daemen, F.J.M. The isolation of stable cattle rod outer segments with an intact plasma membrane. Biochem. Biophys. Acta, 1979, 552, 379-389.

Shichi, H. Spectrum and purity of bovine rhodopsin. Biochemistry, 1970, 9, 1973-1977

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

Shichi, H., Lewis, M., Irrevere, F. et Stone, A.L. Biochemistry of visual pigments.I. Purification and properties of bovine rhodopsin. J. Biol. Chem., 1969, 244, 529-536.

Shichi, H., Muellenberg, C.G., Harosi, F.I. et Somers,, R.L. Isolation of three isochromic forms of rhodopsin in digitonin. Vision Res., 1977, 17, 633-636.

Shinitzky, M. et Yuli, I. Lipid fluidity at the submacroscopic level: Determination by fluorescence polarization. Chemistry and Physics of Lipids, 1982, 30, 261-282.

Siebert, F., Schmid, H. et Mull, R.H. Proteins of bovine rod outer segments characterized by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 75, 1071-1077.

Smith, H.G., Fager, R.S. et Litman, B.J. Light-activated Calcium release from sonicated bovine retinal rod outer segment disks. Biochemistry, 1977, 16, 1399-1405.

Smith, H.G. Jr, Stubbs, G.W. et Litman, B.J. The isolation and purification of osmotically intact disks from retinal rod outer segments. Expl. Eye Res., 1975, 20, 211-217.

Stavenga, D.G. et De Grip, W.J. Progress in Phototransduction. Biophys. Struct. Mech., 1983, 9, 225-230.

Steinemann, A. et Stryer, L. Accessibility of the carbohydrate moiety of rhodopsin. Biochemistry, 1973, 12, 1499-1502.

- Stewart, J.G., Baker, B.N., Plante, E.O. et Williams, T.P. Effect of phospholipid removal on the kinetics of the metarhodopsin I to metarhodopsin II reaction. Arch. Biochem. Biophys., 1976, 172, 246-251.
- Stewart, J.G., Baker, B.N. et Williams, T.P. Evidence for conformeric states of rhodopsin. Biophys. Struct. Mech., 1977, 3, 19-29.
- Stieve, H., Wilms, M. et Nöll, G. Measurements on the pH dependence of metarhodopsin reactions in sonicated rod outer segments. Z. Naturforsch. 1973, 28c, 600-602.
- Stone, W.L., Farnsworth, C.C. et Dratz, E.A. A reinvestigation of the fatty acid content of bovine rat and frog retinal rod outer segments. Expl. Eye Res., 1979, 28, 387-397.
- Stryer, L., Hurley, J.B. et Fung, B.K.-K. Transducin: an amplifier protein in vision. TIBS, 1981, 81, 245-247.
- Stubbs, G.W. et Litman, B.J. Effects of alterations in the amphipatic microenvironment on the conformational stability of bovine opsin.I. Mechanism of solubilization of disk membranes by the nonionic detergent, octyl glucoside. Biochemistry, 1978, 17, 215-219.
- Szuts, E.Z. Calcium flux across disk membranes. Studies with intact rod photoreceptors and purified disks. J. Gen. Physiol., 1980, 76, 253-286.
- Takezoe, H. et Yu, H. Lateral diffusion of photopigments in photoreceptor disk membrane vesicles by the dynamic Kerr effect. Biochemistry 1981, 20, 5275-5281.

Tessier, M. Photochimie et biochimie de la rhodopsine. Rapport de stage en biologie médicale. U.Q.T.R., 1981.

Thomas, D.D. et Stryer, L. Transverse location of the retinal chromophore of rhodopsin in rod outer segment disc membranes. J. Mol. Biol., 1982, 154, 145-157.

Tokunaga, F., Kawamura, S. et Yoshizawa, T. Analysis by spectral difference of the orientational change of the rhodopsin chromophore during bleaching. Vision Res., 1976, 16, 633-641.

Tyminski, P.N., Klingbiel, R.T., Ott, R.A. et O'Brien, D.F. Photoinduced calcium release from rhodopsin-phospholipid membrane vesicles. Biochemistry, 1982, 21, 1197-1204.

Uhl, R. et Abrahamson, E.W. Dynamic Processes in Visual Transduction. Chem. Rev., 1981, 81, 291-312.

Uhl, R., Borys, T., Semple, N., Pasternak, J. et Abrahamson, E.W. The presence of two major protein components in the bovine photoreceptor disc membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, 90, 58-64.

Van Breugel, P.J.G.M., Daemen, F.J.M. et Bonting, S.L. Biochemical aspects of the visual process. XXXIII. A convenient purification procedure of rhodopsin by means of affinity chromatography. Expl. Eye Res., 1977, 24, 581-585.

- Van Breugel, P.J.G.M., Geurts, P.H.M., Daemen, F.J.M. et Bonting, S.L. Biochemical aspects of the visual process.XXXVIII. Effects of lateral aggregation on rhodopsin in phospholipase C-treated photoreceptor membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 509, 136-147.
- Van Der Meer, K., Mulder, J. et Lugtenburg, J. A new facet in rhodopsin photochemistry. Photochem. Photobiol., 1976, 24, 363-367.
- Von Sengbusch, G.V. et Stieve, H. Flash photolysis of rhodopsin II. Measurements on rhodopsin digitonin solutions and fragments of rod outer segments. Z. Naturforsch. 1971, 266, 861-862.
- Waddell, W.H., Yudd, A.P. et Nakanishi, K. Micellar effects on the photochemistry of rhodopsin. J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 238-239.
- Wald, G. Carotenoids and the visual cycle. J. Gen. Physiol., 1935, 19, 351-371.
- Wald, G. The Molecular Basis of Visual Excitation. Science, 1968, 162, 230-239.
- Wald, G. et Brown, P.K. The molar extinction of rhodopsin. J. Gen. Physiol., 1953, 37, 189-200.
- Wald, G., Durell, J. et St-George, R.C.C. The light reaction in the bleaching of rhodopsin. Science, 1950, 111, 179-181.
- Weber, K. et Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 1969, 244, 4406-4412.

Wheeler, G.L. et Bitensky, M.W. A light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors: Regulation of light-activated phosphodiesterase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 4238-4242.

Williams, T.P. et Baker, B.N. Bleaching Intermediate Kinetics of Rhodopsin, Metarhodopsin I, and Metarhodopsin II. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 374-377.

Woodruff, M.L. et Bownds, M.D. Amplitude, kinetics and reversibility of a light-induced decrease in guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in frog photoreceptor membranes. J. Gen. Physiol., 1979, 73, 629-653.

Wormington, C.M. et Cone, R.A. Ionic blockage of the light-regulated sodium channels in isolated rod outer segments. J. Gen. Physiol., 1978, 71, 657-681.

Wülf, V.J., Adams, R.G., Linschitz, H. et Abrahamson, E.W. Effect of flash illumination on rhodopsin in solution. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, 74, 281-290.

Yamamoto, K. et Shichi, H. Rhodopsin phosphorylation occurs at meta-rhodopsin II level. Biophys. Struct. Mech., 1983, 9, 261-269.

Yee, R. et Lieberman, P.A. Light-activated phosphodiesterase of the rod outer segment: Kinetics and parameters of activation and deactivation. J. Biol. Chem., 1978, 253, 8902-8909.

Yguerabide, J. et Foster, M.C. Fluorescence Spectroscopy of Biological Membranes. In E. Grell (Ed.), Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics (Tome 31). Membrane Spectroscopy, New York: Springer-Verlag, 1981, pp. 199-269.

Yoshizawa, T. The behaviour of visual pigments at low temperatures. In H.J.A. Dartnall (Ed.), Handbook of Sensory Physiology, vol. VII/1, Photochemistry of Vision. New York: Springer-Verlag, 1972, 146-179.

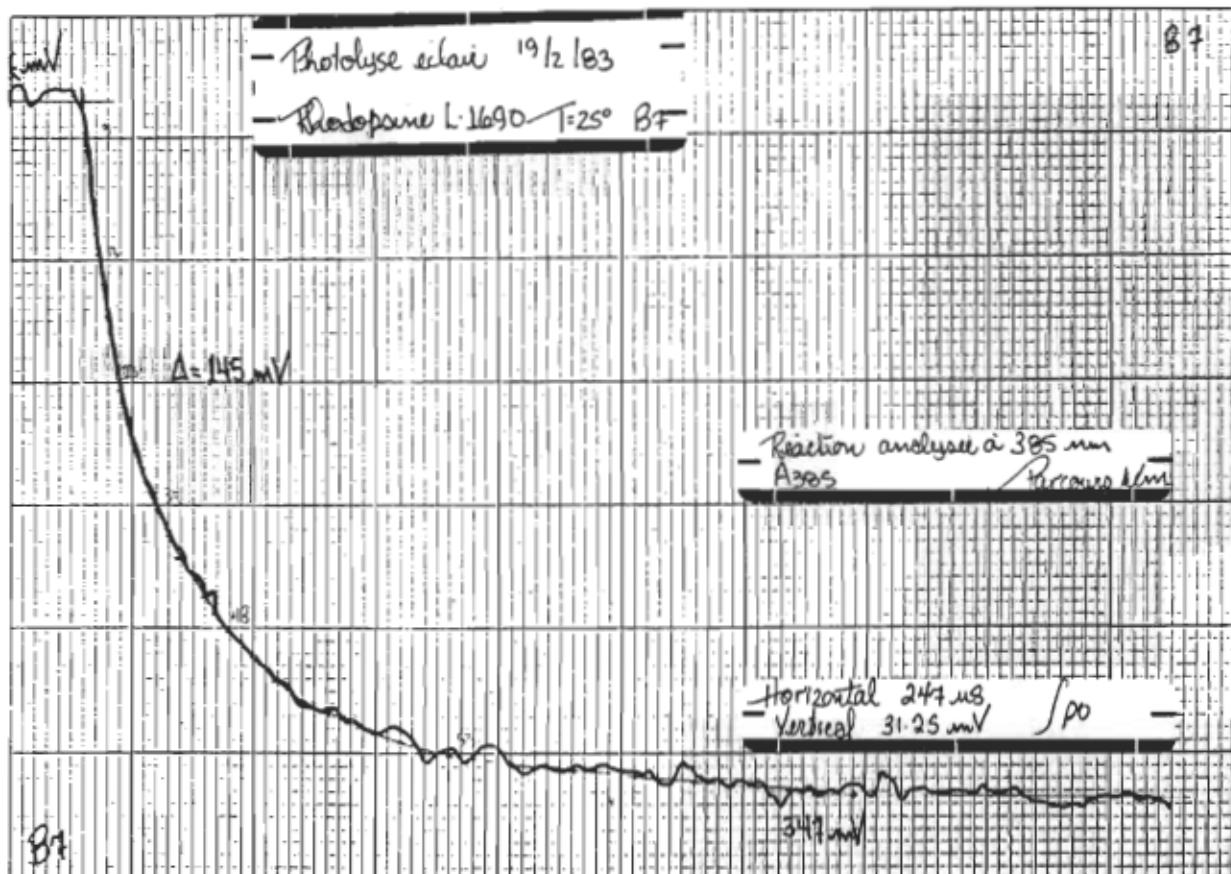
Yoshizawa, T. et Shichida, T. Low-temperature spectrophotometry of intermediates of rhodopsin. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology, vol. 81, Biomembranes, part H, Visual pigments and purple membranes. New York: Academic Press, 1982, pp. 333-354.

Yoshizawa, T. et Wald, G. Pre-lumirhodopsin and the bleaching of visual pigments. Nature, 1963, 197, 1279-1286.

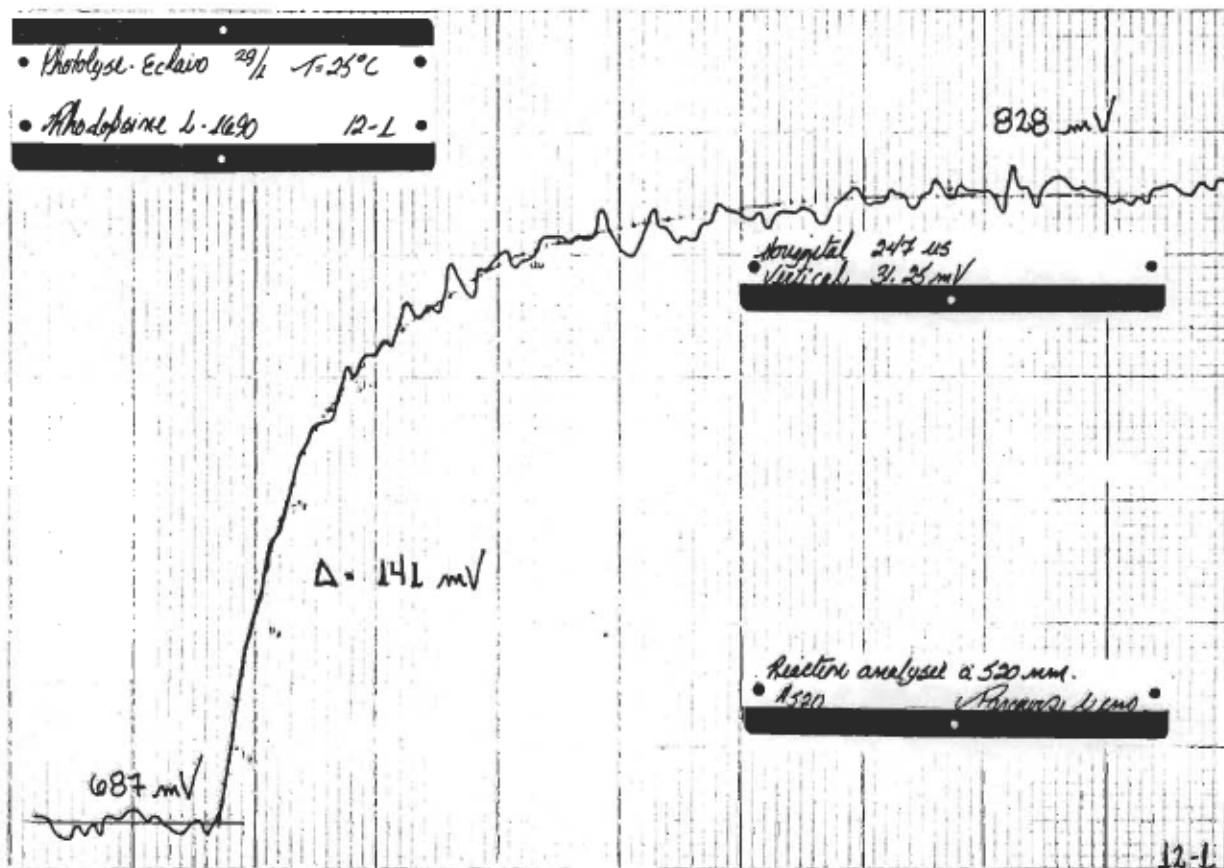
Zuckerman, R. Ionic analysis of photoreceptor membrane currents. J. Physiol. (London), 1973, 235, 333-354.

Zuckerman, R., Schmidt, G.J. et Dacko, S.M. Rhodopsin-to-metarhodopsin II transition triggers amplified changes in cytosol ATP and ADP in intact retinal rod outer segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 6414-6418.

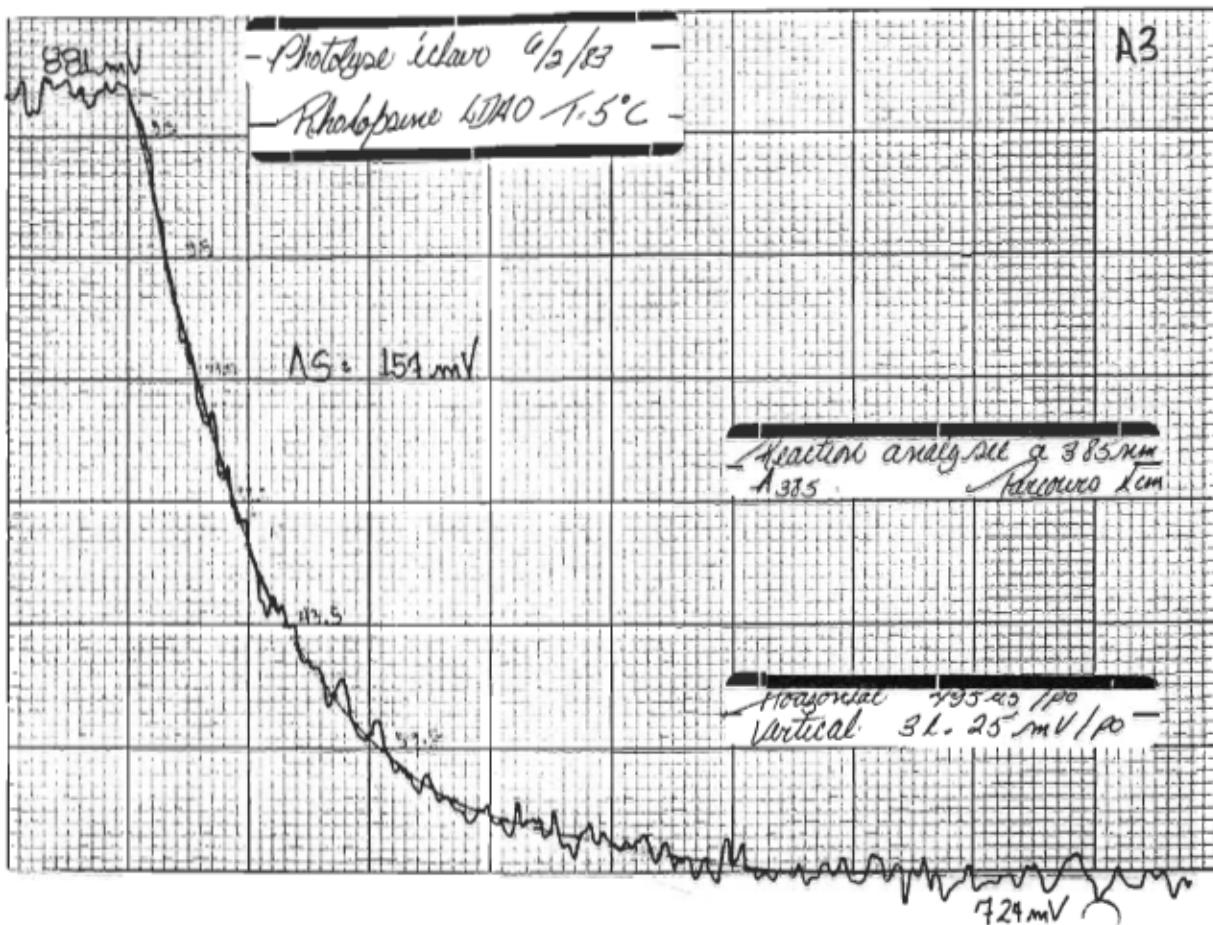
Zuckerman, R. et Weiter, J.J. Photoreversible uptake of nucleotide triphosphates directly linked to the rhodopsin-meta II transition. Invest. Ophthal. Visual Sci., 1980, 19(suppl.), 181-182.

ANNEXE a

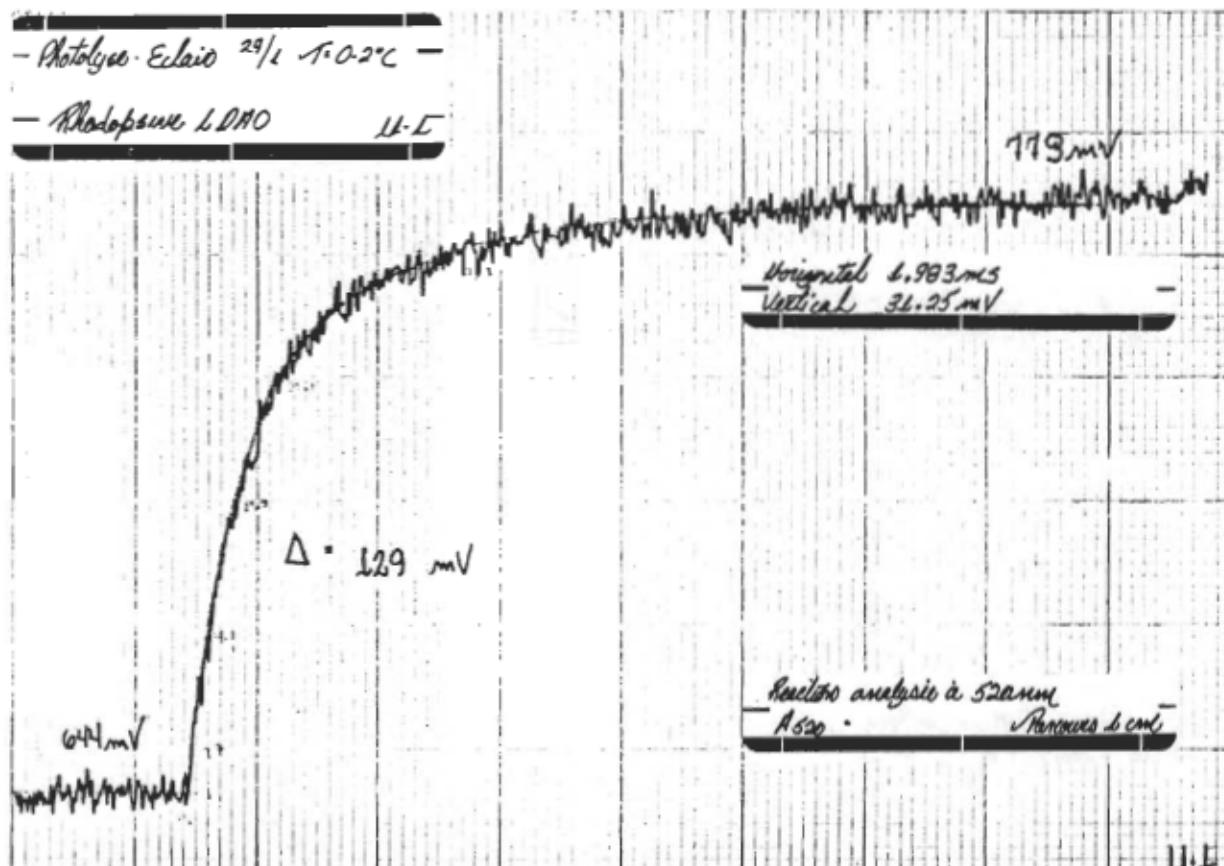
Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans le L-1690 à 25° C (λ analyse : 385 nm). Variation de signal (mV) en fonction du temps (μs). Les dimensions du tracé ont été réduites à 62% des dimensions originales.

ANNEXE b

Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans le L-1690 à 25° C (λ analyse : 520 nm). Variation de signal (mV) en fonction du temps (μ s). Les dimensions du tracé ont été réduites à 62% des dimensions originales.

ANNEXE c

Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans l'Ammonyx-LO à 5° C (λ analyse : 385 nm). Variation de signal (mV) en fonction du temps (μs). Les dimensions du tracé ont été réduites à 62% des dimensions originales.

ANNEXE d

Cinétique de formation de la métarhodopsine II dans l'Ammonyx-LO à 0° C (λ analyse : 520 nm). Variation de signal (mV) en fonction du temps (μs). Les dimensions du tracé ont été réduites à 62% des dimensions originales.