

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

MICHEL DÉRY

"DISSIPATION D'ÉNERGIE PAR LES PIGMENTS VISUELS
LORS DE LA TRANSITION LUMI -> MÉTARHODOPSINE I:
MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE NUMÉRIQUE POUR L'ANALYSE
CINÉTIQUE ET ÉTUDE DE L'EFFET DE L'ENVIRONNEMENT
MOLÉCULAIRE SUR CETTE TRANSITION"

AOUT 1991

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

Résumé.

La rhodopsine est le pigment responsable de la vision scotopique chez les vertébrés. Elle est le siège de l'absorption et de la transformation de l'énergie lumineuse dans la cellule visuelle. Au cours de l'acte photochimique primaire de la vision, près de la moitié de l'énergie d'excitation est stockée par le pigment visuel. Dans l'intervalle de temps allant des picosecondes aux millisecondes, cette énergie est dissipée progressivement à travers des changements conformationnels de la rhodopsine qui génèrent les états transitoires de la séquence photolytique du pigment. A la fin de cette séquence, la rhodopsine active la cascade enzymatique responsable de la génération de l'excitation nerveuse. Les facteurs environnementaux influencent beaucoup la cinétique des derniers intermédiaires dans la photolyse de la rhodopsine, notamment l'établissement de l'équilibre entre les métarhodopsines I et II. Une des façons de voir l'effet de l'environnement sur la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II, est l'utilisation de détergents pour solubiliser la membrane native des disques. Ainsi, avec les détergents appropriés qui assouplissent ou rigidifient la structure autour de la protéine, nous pouvons accélérer ou diminuer considérablement la vitesse de cette transition, ce qui constitue un des arguments en faveur de changements conformationnels importants dans la protéine. Afin de vérifier l'existence de changements conformationnels antérieurs à l'étape métarhodopsine I \leftrightarrow II, nous avons mesuré l'effet de la solubilisation des membranes sur la transition entre la lumirhodopsine et la métarhodopsine I. Afin d'arriver à une interprétation fiable de ces résultats, il nous a d'abord fallu développer des méthodes de traitement de signaux afin d'extraire l'information qui nous intéressait des signaux bruts recueillis. En effet, les signaux de la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I sont de faible amplitude et comportent une large part de bruit (entre 50% et 100%). La méthode que nous avons finalement retenue procède par

approximation parabolique des signaux bruts puis minimise cette dernière par la méthode des gradients conjugués. Après ce traitement, nos résultats nous permettent d'affirmer que la cinétique de cette réaction (lumi \rightarrow métarhodopsine I) est également sensible aux modifications de l'environnement moléculaire du pigment, indiquant que la déformation structurale initiée lors de l'absorption et qui se propage à partir du centre de la protéine a déjà atteint sa périphérie dans la microseconde qui suit l'excitation lumineuse. L'influence des détergents lors de cette transition est beaucoup plus faible que pour la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II et son comportement diffère, ce qui laisse croire à des changements conformationnels différents. Finalement, nous avons observé une anomalie entre les cinétiques de lumi. et métarhodopsine I. Ces nouvelles cinétiques, qui sont également sensibles à la solubilisation, ne peuvent s'expliquer par la séquence traditionnelle de décoloration de la rhodopsine et nous obligent à introduire au moins un nouvel intermédiaire pour expliquer l'ensemble de nos résultats.

Remerciements.

Je désire tout d'abord remercier et dédier ce travail à mes parents pour l'aide et le support qu'il m'ont accordés depuis toujours.

Je remercie aussi mon directeur, François Boucher, pour son professionnalisme, son dévouement et son excellent travail. Je remercie aussi de façon particulière mon ami et confrère de travail Normand Beaudoin pour tout, et c'est peut dire.

Je remercie finalement toutes les personnes qui m'ont supporté à un moment ou un autre de ce travail, autant par leurs stimulations et conversations scientifiques que par leur support moral et intellectuel.

MERCI !!!

Table des matières.

Résumé	ii
Remerciements.....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
1- Introduction.....	1
1.1- L'empire des sens.....	2
1.2- Organisation cellulaire de la rétine.....	2
1.3- Anatomie d'une cellule photoréceptrice.....	4
1.4- Constituants majeurs des membranes discales: les lipides et la rhodopsine	7
1.5- Aspect moléculaire de la vision.....	12
1.5.1- Activité photochimique de la rhodopsine	12
1.5.1.1- La réaction primaire.....	14
1.5.1.2- La lumirhodopsine	16
1.5.1.3- Les métarhodopsines.....	16
1.5.1.4- L'hydrolyse du pigment	19
1.5.2- Mécanisme de transduction.....	21
1.6- Object du travail.....	24
2- Matériel et méthodes	26
2.1- Préparation de la rhodopsine bovine	27
2.1.1- Préparation des rétines.....	27
2.1.2- Flottation.....	28

2.1.3- Sédimentation.....	2 8
2.1.4- Préparation des disques (membranes discales des SEB)	2 9
2.2- Description de la photolyse éclair	3 0
2.2.1- Principe de la photolyse éclair.....	3 0
2.2.2- Description du matériel.....	3 3
2.2.3- Exemple de protocole utilisé et fonctionnement de l'ensemble ...	4 1
2.2.4- Vitesse du système	4 3
2.3- Choix de la longueur d'onde utilisée.....	4 7
2.4- Choix de la densité optique (D.O.).....	5 3
2.4.1- Détermination théorique de la D.O. optimum.....	5 3
2.4.1.1- Recherche de ϵ_R 450	6 0
2.4.1.2- Recherche de ϵ_M 450	6 0
2.4.2- Détermination expérimentale de la D.O. optimum.....	6 4
3- Méthodes numériques de traitement de signaux.....	6 7
3.1- Problématique	6 8
3.2- Ajustement d'une exponentielle par la méthode du moindre carré et sa série de Taylor	6 9
3.3- Méthodes numériques de raffinement des paramètres.....	8 2
3.3.1- Méthode du gradient simple	8 4
3.3.2- Méthode du gradient conjugué.....	9 3
3.3.2.1- Expression matricielle d'une parabole à "n" dimensions	9 6
3.3.2.2- Recherche du sommet d'une parabole par gradient conjugué	1 0 4
3.3.2.3- Idée derrière le gradient conjugué.....	1 2 2

3.3.2.4- Application du gradient conjugué à notre problème.....	125
3.3.2.5- Etude statistique de l'incertitude du gradient conjugué ..	129
4- Résultats et discussion	132
4.1- Mesure des absorptions transitoires suite à l'excitation d'un échantillon	135
4.2- Incertitude des résultats.....	140
4.3- La transition métarhodopsine I <-> II.....	144
4.4- La transition lumirhodopsine -> métarhodopsine I.....	152
4.5- Discussion	157
4.6- Mise en évidence d'un nouveau signal optique entre la lumirhodopsine et la métarhodopsine I.....	163
5- Conclusion.....	172
Bibliographie	175

Liste des tableaux.

1.2- Résumé des informations sur la rhodopsine	1 0
2.1- Résultats des quarante essais de photolyse à vide	4 4
2.2- Résultats de photolyse de rhodopsine à différentes longueurs d'onde.....	5 0
2.3- Tableau de l'intensité de lumière pour le passage de lumi -> métarhodopsine I pour différentes D.O.....	6 4
3.1- Résultats du traitement d'une exponentielle théorique avec 100% de bruit par la méthode du moindre carré et sa série de Taylor	8 1
3.2- Résultats du traitement d'une exponentielle théorique avec 100% de bruit par la méthode du gradient conjugué.....	12 7
3.3- Résultats de l'étude statistique de l'incertitude du gradient conjugué.....	13 0
4.1- Compilation des temps de vie (à 20 °C) obtenus lors de la photolyse, pour fin d'étude statistique, de membranes discales dissoutes dans 4.0% d'Ammonyx-LO	14 1
4.2- Tableau des temps de vie de la métarhodopsine I à différentes températures pour chaque conditions expérimentales.....	14 8
4.3- Comparaison des temps de vie observés pour la métarhodopsine I avec ceux disponible dans la littérature	14 9
4.4- Comparaison des énergies d'activation de la transition métarhodopsine I <-> II avec ceux de la littérature	15 1
4.5- Tableau des temps de vie de la lumirhodopsine à différentes températures pour chaque condition expérimentale	15 3
4.6- Comparaison des temps de vie de la lumirhodopsine avec ceux de la littérature	15 4

4.7- Comparaison des énergies d'activation de la transition entre la lumi. et la métarhodopsine I avec ceux de la littérature.....	156
4.8- Tableau comparatif des vitesses de transition de la métarhodopsine I <-> II et lumi -> métarhodopsine I dans différents détergents.....	160
4.9- Tableau des temps de vie (τ_a) à différentes températures dans différentes conditions expérimentales	165
4.10- Tableau des temps de vie (τ_b) à différentes températures dans différentes conditions expérimentales	166
4.11- Tableau comparatif des vitesses de transition de (τ_a) et (τ_b) dans différents détergents.....	167

Liste des figures.

1.1- Schéma représentant une section transversale de la rétine.....	3
1.2- Schéma de la structure d'une cellule photoréceptrice en bâtonnet	5
1.3- Structure présumée de la rhodopsine insérée dans la membrane discale	8
1.4- Séquence des acides aminés de la rhodopsine	9
1.5- Chromophore sous forme 11-cis.....	11
1.6- Chromophore passant de 11-cis à tout-trans rétinal.....	15
1.7- Séquence photolytique de la rhodopsine des vertébrés	20
1.8- Hypothèse du GMP cyclique	23
2.1- Principe de la photolyse éclair.....	30
2.2- Schéma du système de photolyse éclair.....	33
2.3- Porte échantillon.....	35
2.4- Schéma de blindage.....	39
2.5- Amplificateur rapide.....	40
2.6- Graphique de distribution des constantes de temps.....	45
2.7- Exemple de résultat de photolyse à vide.....	46
2.8- Spectre typique des intermédiaires lumi -> méta I <-> méta II	47
2.9- Graphique de deux cinétiques dans le même sens	48
2.10- Graphique de deux cinétiques en sens inverse.....	49
2.11- Extraits des graphiques ayant servi à la compilation du tableau 2.2	52
2.12- Exemple de courbe obtenue par photolyse éclair	54
2.13- Intensité de lumière transmise en fonction de la concentration	58
2.14- Spectre des différents échantillons utilisés	65
2.15- Graphique de l'intensité de lumière transmise en fonction de la D.O.....	66

3.1- Graphique du logarithme de la dérivée de l'approximation polynômiale de la courbe expérimentale	78
3.2- Ajustement d'une exponentielle par la méthode du moindre carré et sa série de Taylor	81
3.3- Représentation de minima locaux	86
3.4- Représentation de la recherche du minimum d'une parabole par gradient simple.....	91
3.5- Représentation de la recherche du minimum d'une vallée étroite	92
3.6- Exemple de recherche par gradient conjugué	95
3.7- Graphique comparatif entre la méthode par série de Taylor et la méthode du gradient conjugué	128
4.1- Spectre d'absorption non corrigé de membranes discales dissoutes dans 4% (p/v) d'Ammonyx-LO	133
4.2- Spectre typique de rhodopsine bovine obtenu après correction pour la diffusion	134
4.3- Exemple de cinétique de la transition méta I <-> méta II, (disque à 20 °C)....	135
4.4- Exemple de cinétique de la transition lumi -> méta I, (disques à 0 °C).....	136
4.5- Cinétique de la transition métarhodopsine I <-> II.....	138
4.6- Cinétique de la lumirhodopsine rapportée par Okada et al., 1991.....	139
4.7- Distribution des temps de vie pour la transition lumi -> métarhodopsine I...	142
4.8- Distribution des temps de vie pour la transition métarhodopsine I <-> II.....	142
4.9- Exemples d'effets de la solubilisation des membranes discales sur la vitesse de la transition métarhodopsine I <-> II à 20 °C et pH = 7.5.....	145
4.10- Apparition progressive de la transition métarhodopsine I <-> II entre 0 et 20 °C dans des disques dissous dans 2.0% de déoxycholate à pH = 7.5...	147

4.11- Graphique d'Arrhénius pour la transition métarhodopsine I <-> II.....	150
4.12- Type de courbe observée pour la transition lumi -> métarhodopsine I.....	152
4.13- Graphique d'Arrhénius pour la transition lumi -> métarhodopsine I	155
4.14- Modèle de changement conformationnel de la rhodopsine lors de la transition métarhodopsine I <-> II	158
4.15- Modèle de changement conformationnel de la rhodopsine pour la transition lumi -. métarhodopsine I.....	162
4.16- Signal optique observé entre les intermédiaires lumi. et métarhodopsine I	164
4.17- Représentation schématique de l'observation des nouvelles cinétiques pour différentes conditions expérimentales.....	168

1 - Introduction.

1.1 - L'empire des sens.

Chez toutes les espèces animales, des plus simples aux plus évoluées, la capacité de survivre et d'évoluer est surtout déterminée par la qualité et la quantité des informations sensorielles qu'il est possible d'obtenir sur l'environnement immédiat ou éloigné. Au cours de l'évolution, différents types de cellules réceptrices, sensibles à des stimuli de nature chimique ou physique, sont apparues. Parmi celles-ci, les cellules photoréceptrices sont probablement celles qui ont atteint le degré d'organisation le plus sophistiqué. En effet, chez les vertébrés supérieurs, la lumière qui contient l'information relative à l'intensité, la couleur, la forme, le déplacement est captée et codifiée dans la rétine de l'oeil, puis l'information est transmise aux aires visuelles du cortex cérébral pour un décodage final.

Dans notre travail, nous nous intéressons à la toute première étape du processus visuel, soit l'absorption et la transformation de l'énergie photonique par la rhodopsine, le pigment des photorécepteurs visuels. Dans ce contexte, il est opportun de rappeler tout d'abord certains éléments structuraux des tissus photorécepteurs.

1.2 - Organisation cellulaire de la rétine.

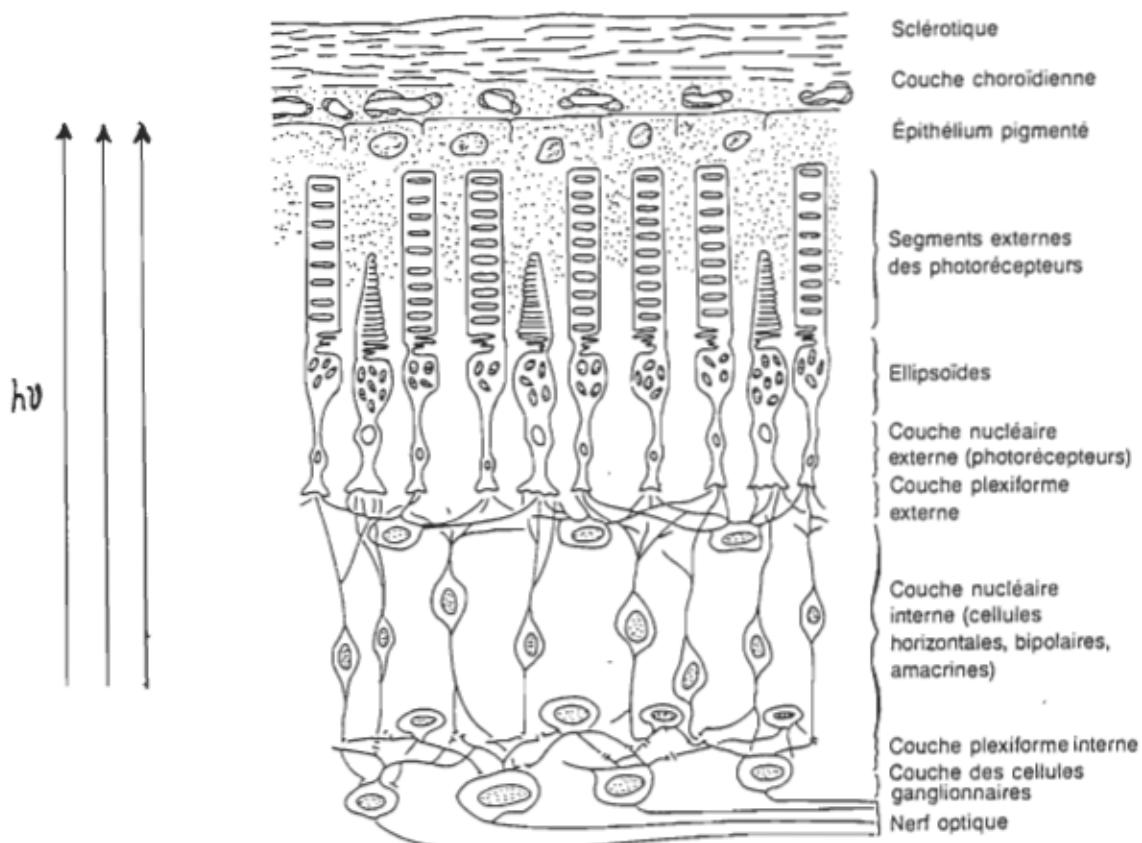
La rétine est le tissu rose (pigment visuel) vascularisé qui tapisse le fond du globe oculaire. On peut la séparer en deux parties: l'épithélium pigmentaire et la rétine neurale. L'épithélium pigmentaire est une monocouche de cellules très pigmentées par la mélanine. Cette monocouche de cellules peut avoir deux

fonctions chez les vertébrés: l'absorption de la lumière qui n'a pas été captée par la partie photosensible de la rétine neurale ou encore sa réflexion afin de donner au photon une seconde chance d'être absorbé.

Figure 1.1

Schéma représentant une section transversale de la rétine.

(Ali et Klyne, 1986, p.22)



La rétine neurale contient six types de cellules nerveuses en plus des cellules de Mueller (cellules gliales responsables du transport des métabolites du système sanguin vers les neurones). Ces neurones sont: les cônes, les bâtonnets, les cellules bipolaires, les cellules amacrines, les cellules horizontales et les cellules ganglionnaires. Les cellules photoréceptrices sont les cônes et les bâtonnets.

Les cônes sont de trois types contenant des pigments sensibles aux couleurs primaires et ils permettent la vision des couleurs. Les bâtonnets eux contiennent tous le même pigment: la rhodopsine. Ils sont plus sensibles que les cônes et sont responsables de la vision scotopique.

Comme on le voit sur la figure 1.1 précédente, les cellules photoréceptrices sont localisées au fond de la rétine, appuyées contre la couche de cellules épithéliales. Par conséquent, la lumière doit d'abord traverser les cellules nerveuses avant de parvenir aux cellules photosensibles pour être absorbée.

1.3 - Anatomie d'une cellule photoréceptrice.

Chez la plupart des espèces, les bâtonnets sont beaucoup plus abondants que les cônes. Plus spécifiquement, chez le bovin, le modèle expérimental que nous utilisons, on retrouve exclusivement des cellules en bâtonnets. Comme le montre la figure 1.2 de la page suivante, les bâtonnets sont morphologiquement et fonctionnellement divisés en deux parties ou segments.

La partie interne du bâtonnet renferme les organelles des cellules comme les mitochondries, le noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ce

segment est spécialisé dans la production d'énergie et le renouvellement des molécules de la cellule. Il comporte aussi une terminaison synaptique par laquelle le bâtonnet communique avec les autres cellules nerveuses. Nous nous intéresserons principalement au segment externe qui renferme l'essentiel du système de photodétection et de production des impulsions nerveuses. Le tableau 1.1 affiche quelques données physiques sur les segments externes des bâtonnets (S.E.B.):

Figure 1.2

Schéma de la structure d'une cellule photoréceptrice en bâtonnet.

(Stryer, 1987)

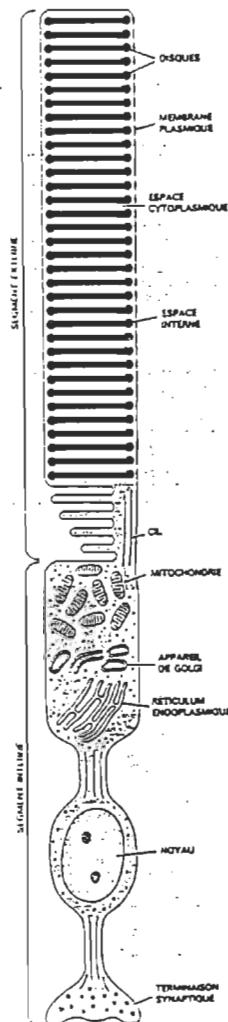


Tableau 1.1
Données sur S.E.B. de diverses espèces.

	Grenouille	Bovin	Homme
Diamètre	5-7 μm	2 μm	2 μm
Longeur	25-50 μm	7-10 μm	40-60 μm
Nombre de disques	2000	500	1000
Volume (SEB)	10^{-9} ml	$3 \cdot 10^{-11}$ ml	$1.5 \cdot 10^{-10}$ ml
Nombre de molécule de rhodopsines	10^9	10^6	10^7

Le segment externe des bâtonnets est un tube étroit contenant entre 500 et 2000 minuscules disques empilés. Le tube et les disques sont limités par le même type de membrane: un feillet bilipidique de 60 à 70 Å d'épaisseur. La membrane cellulaire externe (ou plasmique) et la membrane des disques ont des fonctions différentes: la membrane des disques contient le pigment visuel rhodopsine qui absorbe et réagit aux stimulus lumineux tandis que la membrane délimitant le segment externe sert à transformer les signaux chimiques en signaux électriques.

Les disques contiennent environ 10^6 molécules de pigments visuels ou rhodopsine. Tous ces disques sont physiquement indépendants et séparés du milieu extracellulaire par la membrane plasmique qui les enveloppe. Les segments internes et externes des cellules photoréceptrices sont reliés par un cil connectif.

1.4 - Constituants majeurs des membranes discales: les lipides et la rhodopsine.

La membrane discale se caractérise par un faible rapport protéine/lipide, soit 35% du poids sec (Olive, 1980). Sa partie lipidique est constituée à 80% de phospholipides, dont les espèces majeures sont la phosphatidyl éthanolamine (PE) à 44%, la phosphatidyl choline (PC) à 36% et la phosphatidyl sérine (PS) à 15%. Il y a très peu de sphingomyéline et 40 à 50% des chaînes d'acides gras sont de l'acide docosahexanoïque (22:6 ω 3). On remarque aussi que la composition en acide gras de ces membranes a une forte concentration, d'environ 50%, de chaînes polyinsaturées (Salesse et al., 1983; Stone et al., 1979 et Olive, 1980). Le rôle de ce fort taux de polyinsaturation est probablement relié au fait qu'une membrane composée de beaucoup de lipides polyinsaturés jouit d'une plus grande fluidité et permet une plus grande mobilité moléculaire. Ainsi, cette propriété physique des acides gras polyinsaturés et le faible taux de cholestérol dans les membranes des disques laisse croire que la fluidité membranaire est importante dans le maintien de la fonction de la rhodopsine qui y est contenue.

Cette rhodopsine constitue la très grande majorité (>85%) des protéines intrinsèques de la membrane discale. C'est une glycoprotéine transmembranaire. Elle existe sous forme monomérique dans la membrane discale. Cette molécule a la possibilité de bouger dans sa membrane par diffusion rotationnelle et latérale (Brown, 1972 et Cone, 1972). Elle est aussi la principale protéine membranaire des disques. Ce pigment est formé d'une partie protéique, l'opsine, à laquelle est lié un chromophore, le rétinal.

L'opsine est une chaîne polypeptidique simple constituée de 348 résidus d'acides aminés (Ovchinnikov et al., 1982 et Hargrave et al., 1983) dont la séquence est illustrée ci-après, (figure 1.4). Le tableau 1.2 et la figure 1.3 montrent la forme de la protéine et donnent quelques informations structurales.

Figure 1.3

Structure présumée de la rhodopsine insérée dans la membrane discale.

(Stryer, 1987)

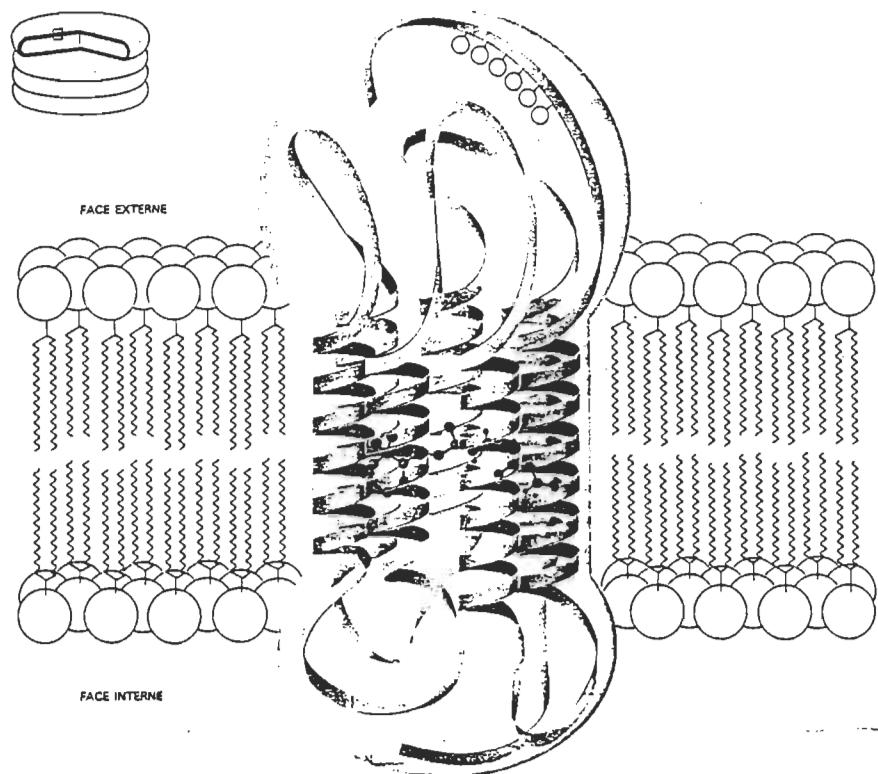
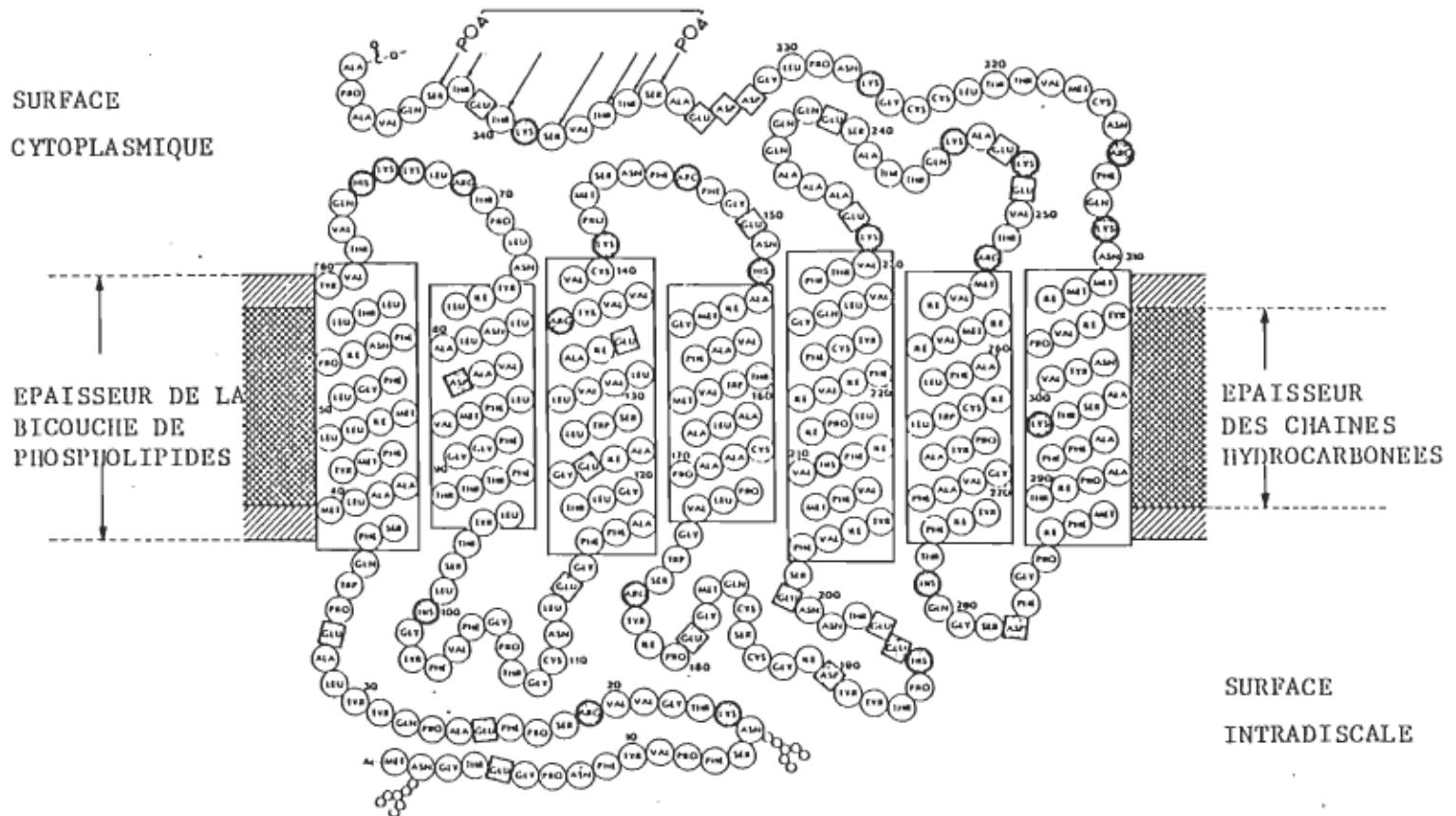


Figure 1.4

Séquence des acides aminés de la rhodopsine.



Séquence des acides aminés de la rhodopsine bovine (Dratz et Margrave, 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.

Tableau 1.2

Résumé des informations sur la rhodopsine.

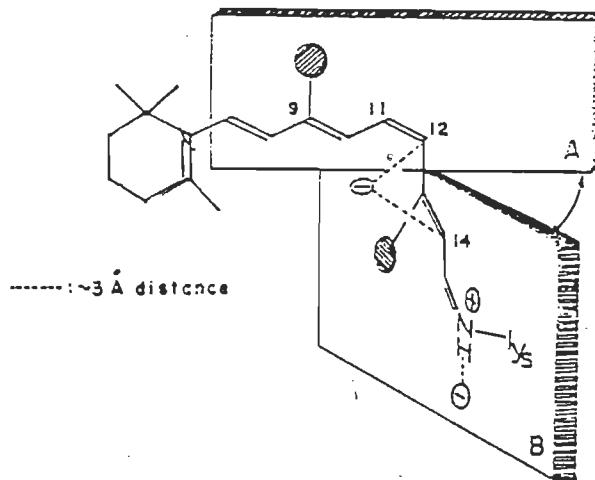
No. Total d'AA:	348
Composition :	5 Asp; 15 Asn; 27 Thr; 15 Ser; 17 Glu; 12 Gln; 20 Pro; 23 Gly; 29 Ala; 10 Cys; 31 Val; 15 Met; 1 Ac-met; 22 Ile; 28 Leu; 18 Tyr; 31 Phe; 11 Lys; 6 His; 7 Arg; 5 Trp.
Rapport axial :	3:1 / 4:1
Coefficient d'extinction molaire :	42000 à 500 nm 11200 à 350 nm 74000 à 280 nm
Poids moléculaire :	41399

La structure tridimensionnelle de la rhodopsine montre que la chaîne de l'opsine est repliée et enroulée sur elle-même, en sept hélices alpha perpendiculaires au plan de la membrane et reliées les unes aux autres par des segments recourbés.

Au centre de cette structure se trouve le rétinal. Le chromophore associé au pigment visuel intact est presque parallèle au plan de la membrane discale, situé au centre de la bicouche et contenu dans un environnement hydrophobe. Tous les rétinals dans la membrane discale sont orientés dans le même quasi-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 et Liebman, 1972). Le rétinal possède quatre doubles liaisons C=C sur sa chaîne latérale. Chacun de ces doubles liens peut potentiellement être cis ou trans. Cependant, chez tous les vertébrés, c'est la forme 11-cis du rétinal qui est fixée sur l'opsine. Chez les bovins, cette fixation se fait par l'établissement d'une base de Schiff (C=N) entre le dernier carbone du rétinal et la fonction ε-aminée de la lysine 296 de l'opsine. Cette liaison est protonée. De plus, pour rendre

compte de la délocalisation particulière des électrons dans la chaîne polyénique du rétinal, conférant au pigment ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) une absorption très déplacée vers le rouge par rapport au chromophore libre, on invoque la présence de groupements chargés dans la cavité protéique contenant le rétinal (Nakanishi et al., 1979). La figure 1.5 donne la structure du 11-cis rétinal ainsi que la position probable de ce groupement chargé par rapport à la chaîne polyénique.

Figure 1.5
Chromophore sous forme 11-cis.
(Nakanishi, K. et al., 1979)



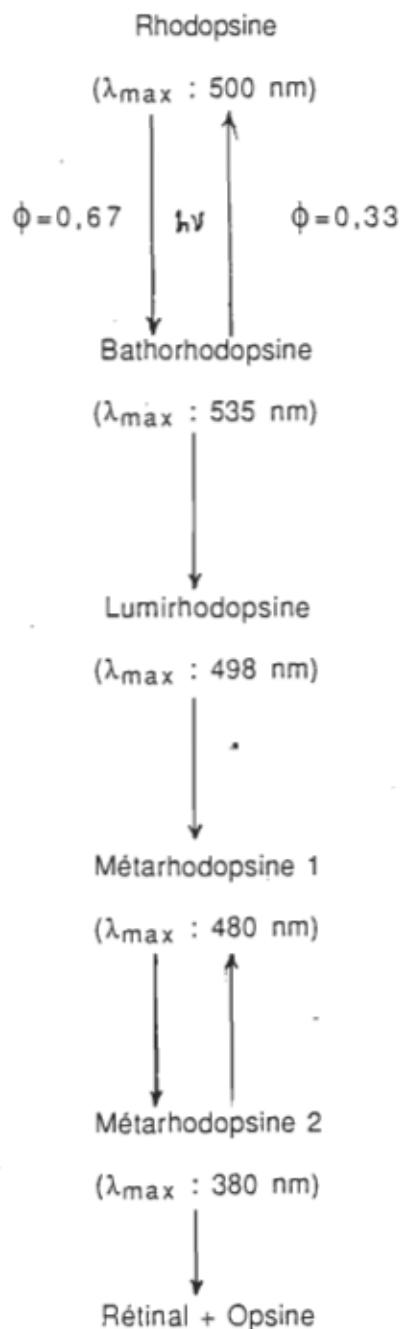
1.5 - Aspect moléculaire de la vision.

Le mécanisme moléculaire de la vision est la séquence des événements qui se produisent entre l'absorption de la lumière par la rhodopsine dans la membrane discale et l'apparition d'un potentiel d'action ou, à tout le moins, d'une modification des propriétés électriques de la membrane plasmique transmissible via la jonction synaptique de la cellule photoréceptrice. Cette transduction du stimulus lumineux peut se diviser en deux étapes: i) la transformation par la rhodopsine, du signal photonique en signal chimique et ii) la reconnaissance de ce signal chimique par un système de contrôle des propriétés électriques de la membrane plasmique. D'un point de vue biologique, la transduction visuelle constitue une séquence intégrée. Toutefois, on réalise aisément que l'analyse des premières étapes du processus relève surtout de la photophysique et de la photochimie tandis que les étapes ultérieures relèvent, elles, de la biochimie et de l'électrophysiologie. Ces différents justifient probablement que l'on résume séparément les notions relatives à la photochimie et la physiologie de la vision.

1.5.1- Activité photochimique de la rhodopsine.

On sait depuis au moins 111 ans que la rhodopsine est un pigment sensible à la lumière. En effet, dès 1879, Kuhne décrivait les étapes de la photodécoloration du pigment rouge contenu dans la rétine du lapin. Cependant, ce n'est qu'à partir des travaux de Yoshizawa et Wald en 1963 que l'on a pu comprendre beaucoup mieux la photoréactivité de la rhodopsine. Ces auteurs ont été les premiers à démontrer, par spectroscopie à basse température, que

l'illumination de la rhodopsine provoquait une modification séquentielle de son spectre d'absorption, et ils ont identifié les différentes espèces spectrales générées lors de l'irradiation du pigment:



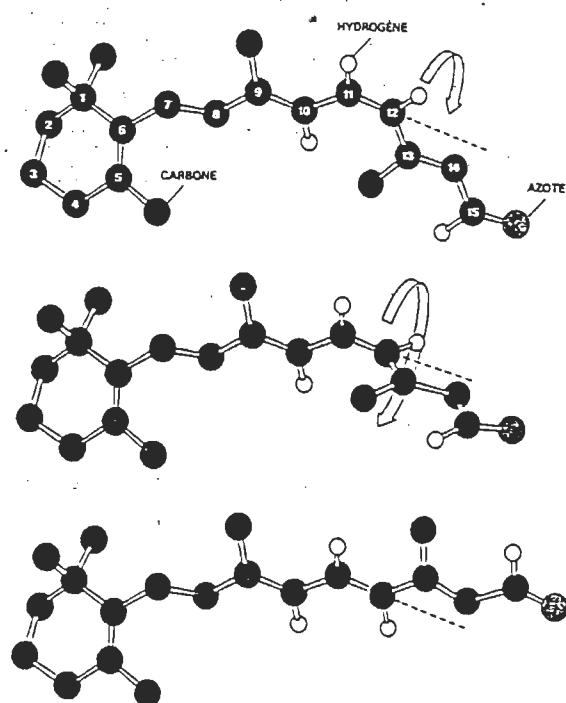
1.5.1.1- La réaction primaire.

A la suite de ces premiers travaux, l'avènement de techniques spectroscopiques de plus en plus rapides a permis de vérifier si les espèces transitoires observées à basse température existaient également au voisinage de la température physiologique. Une des controverses importantes que ces techniques ont permis de résoudre est celle de l'étape primaire de la séquence des réactions: la formation de la bathorhodopsine. Les premiers travaux en ce sens (Busch et al., 1972 ; Green et al., 1977 et Sundstrom et al., 1977) montrèrent que l'excitation de la rhodopsine par un pulse lumineux de 6 à 8 picosecondes produisait instantanément la bathorhodopsine. La vitesse de cette réaction et le fait qu'elle soit sensible à la deutérialisation (Peters et al., 1977) ont laissé croire pendant quelques années que la formation de la bathorhodopsine ne correspondait pas à l'isomérisation 11-cis-> tout-trans du chromophore, comme l'avaient proposé Yoshizawa et Wald (1963), mais plutôt à une translocation de proton. Aujourd'hui, il est admis que l'isomérisation du rétinal puisse être aussi rapide (Birge, 1981). Des mesures de temps de vie de fluorescence indiquent que l'isomérisation du chromophore survient en moins d'une picoseconde (Doukas et al., 1981, 1984). De plus, le fait que la rhodopsine et l'isorhodopsine, un pigment artificiel contenant un isomère 9-cis du rétinal, forment, à l'excitation, des batho-intermédiaires identiques (Rudzki et Peters, 1984; Klier et al., 1984) suggère fortement que cette réaction correspond à l'isomérisation. D'autre part, la formation de rhodopsines artificielles par incorporation d'un 11-cis rétinal impossible à isomériser (la forme 11-cis y étant stabilisée par cyclisation de la molécule) a permis de démontrer l'absence de batho-

intermédiaire dans ces pigments (Mao et al., 1980; Fukada et al., 1984; Buchert et al., 1983 et Kaudori et al., 1989a) et d'identifier définitivement la formation de la bathorhodopsine à l'isomérisation 11-cis -> tout-trans du rétinal.

Néanmoins, il semble bien exister une espèce transitoire entre la rhodopsine et la bathorhodopsine. En effet, aux faibles intensités d'excitation, la première espèce observable absorbe vers 570 nm, on l'appelle la photorhodopsine. Cet intermédiaire relaxe en environ 45 picosecondes vers la bathorhodopsine (λ_{max} : 535 nm) (Shichida et al., 1984; Kandori et al., 1989b). Ces deux états pourraient correspondre à des formes plus ou moins distordues du tout-trans rétinal.

Figure 1.6



1.5.1.2 - La lumirhodopsine.

Aux températures supérieures à 130 K, la bathorhodopsine relaxe en lumirhodopsine qui a un maximum d'absorption à 497 nm. Ce passage se réalise en quelques nanosecondes à la température de la pièce. On connaît peu de choses sur la lumirhodopsine. On présume que rendue à cette étape, l'isomérisation du rétinal est complétée (tout-trans), que sa conformation est stable et que la conformation de l'opsine commence à changer (Maeda et al., 1978; Ganter et al., 1988). On sait aussi que dans l'état lumirhodopsine, le chromophore peut subir des torsions considérables et ainsi former par irradiation les formes 13-cis, 11-cis et 7-cis du rétinal (Maeda, 1979). Néanmoins, à cette étape, le chromophore conserve ses propriétés de dichroïsme circulaire, indiquant qu'il maintient des interactions avec le milieu protéique (Ebrey, 1973).

1.5.1.3 - Les métarhodopsines.

La lumirhodopsine se transforme en métarhodopsine I en quelques microsecondes avec absorption maximum à 480 nm. Cet intermédiaire se transforme à son tour en métarhodopsine II en quelques millisecondes, son absorption maximum est à 380 nm. Cette réaction a été de loin la plus étudiée de la séquence photolytique. Il nous faut dire que ces deux derniers intermédiaires sont deux espèces en équilibre et que cet équilibre est fonction d'une quantité considérable de facteurs.

Le déplacement du maximum d'absorption de 480 à 380 nm lors de la transition entre les métarhodopsines I et II est le plus important de ceux qui sont

observés lors de la séquence photolytique de la rhodopsine. Hubbard et Kropf (1958) et Matthews et al., (1963) présumaient déjà que cette réaction correspondait à la déprotonation du chromophore. Cette présomption a depuis lors été confirmée à l'aide de la spectroscopie vibrationnelle (Doukas et al., 1978).

Par ailleurs, il est clair que cette transition correspond à une modification importante de la structure de l'opsine. Il existe une quantité importante d'évidences expérimentales de ce fait. Parmi les plus directes, il faut rappeler le fait que la pression module réversiblement l'équilibre entre les métarhodopsines I et II (Lamola et al., 1974; Attwood et Guffreud, 1980) dans le sens d'une augmentation de volume lors de la formation de la métarhodopsine II. D'autre part, on sait que cet intermédiaire expose, par rapport à la rhodopsine, de nouveaux résidus attaquables par des enzymes protéolytiques ou du bromure de cyanogène (Pellicone et al., 1985). De plus, la spectroscopie FTIR a mis en évidence des changements structuraux de quelques groupements au cours de cette transition (Rothschild et al., 1983; DeGrip et al., 1985; Siebert et al., 1983 et Bagley et al., 1985). Enfin, il ne faudrait pas oublier, on le verra plus loin, que dans l'état métarhodopsine II, le pigment peut activer la cascade enzymatique de l'excitation visuelle, ce qu'il est incapable de faire dans sa forme native.

Parallèlement, il existe une somme considérable d'évidences expérimentales indirectes du changement conformationnel associé à cette transition. On pense ici à l'effet qu'ont les différents détergents sur la vitesse de la transition métarhodopsine I -> II et sur leur équilibre (Litman et al., 1981; Applebury et al., 1974; Motoyama et al., 1985) et à l'effet de la recombinaison de la rhodopsine avec différents phospholipides sur cette même transition (Mitchell et al., 1990 et 1991; Baldwin et Hubbell, 1985 a et b; O'Brien et al.,

1977). D'une façon générale, ces travaux montrent que la transition métarhodopsine I -> II est d'autant plus rapide et complète que l'environnement moléculaire qui solubilise le pigment est plus mobile. C'est pourquoi on observe son bloquage dans des membranes reconstituées rigides, sous la température de transition, ou dans des micelles rigides de dérivées de sel biliaire.

Cette transition est également accompagnée de la protonation d'un groupement dans l'opsine (Matthews et al., 1963; Parkers et Liebman, 1984). Ainsi, les pH acides favorisent l'apparition de la métarhodopsine II. Ceci est également une indication d'un changement conformationnel qui expose un résidu titrable. Enfin, bien qu'il soit vraisemblable que tous ces effets environnementaux soient réversibles, seulement la réversibilité de l'effet de la pression (Lamolo et al., 1974 et Attwood et Gutfrend, 1980) et d'un détergent (la digitonine) (Motoyama et al., 1985) ont vraiment été démontrée avec satisfaction.

D'un point de vue cinétique, cette réaction soulève quelques problèmes. D'une façon générale, on estime que la cinétique de formation de la métarhodopsine II est du premier ordre et correspond à la décroissance d'une seule exponentielle pour le pigment purifié solubilisé dans un détergent et sous forme monomérique (Abran, 1987; Applebury et al., 1974; Litman et al., 1981). Par contre, dans les membranes discales, différents auteurs ont rapporté cette vitesse de réaction comme correspondant à la décroissance d'une (Parker et Liebman, 1984) deux (Straume et al., 1990) ou trois exponentielles (Lewis et al., 1981). Evidemment, ces différences peuvent être dues à des qualités différentes des préparations ou à des méthodes d'analyse différentes ou encore à des conditions expérimentales différentes. Néanmoins, ces vitesses de réaction,

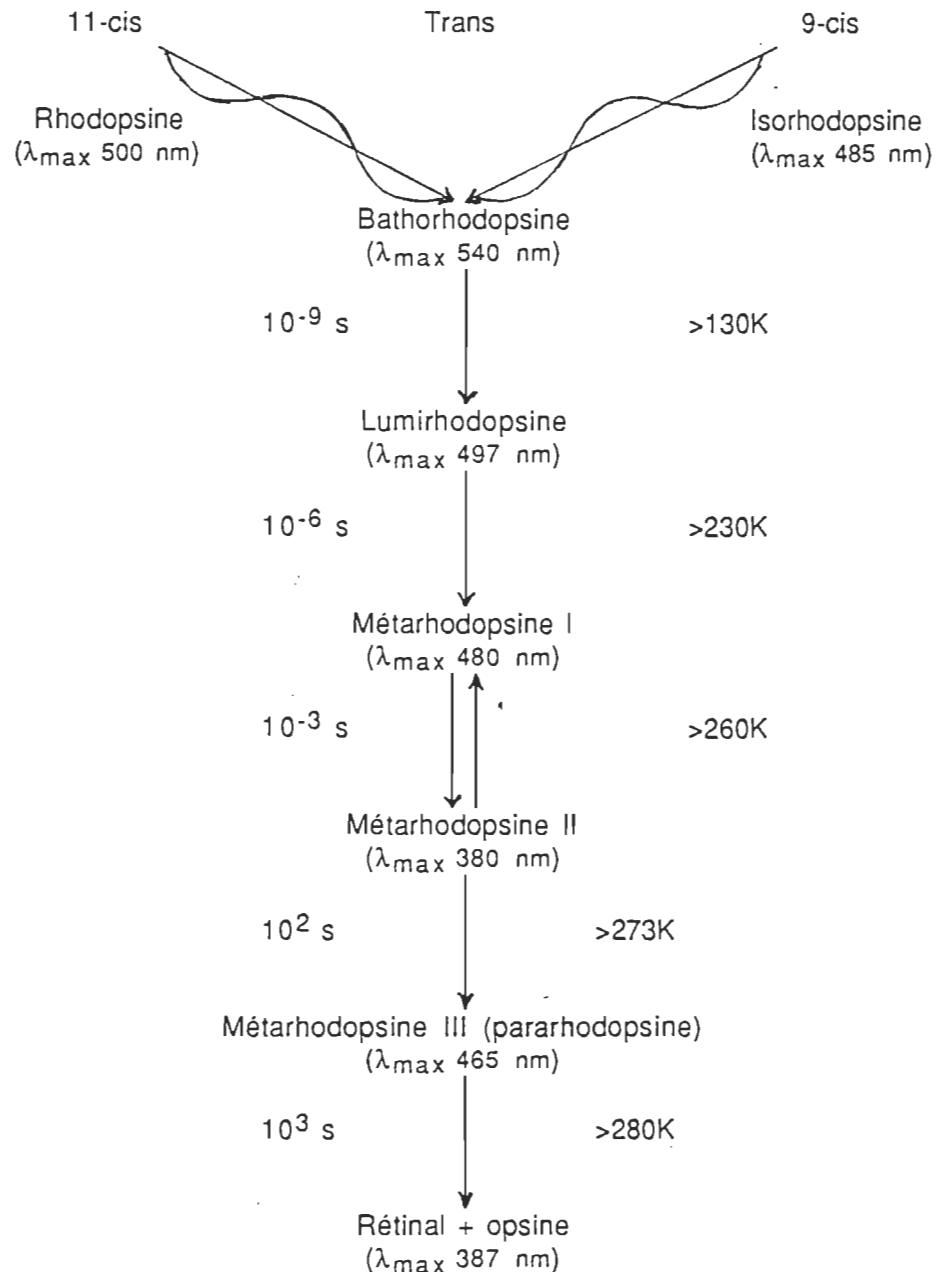
qui s'échelonnent de la centaine de microsecondes à la dizaine de millisecondes obéissent aux mêmes paramètres que ceux qui modulent le niveau de l'équilibre entre les deux métarhodopsines.

1.5.1.4 - L'hydrolyse du pigment.

Dans les préparations de rhodopsine purifiée, la métarhodopsine II, lorsque sa formation n'est pas bloquée, est une espèce relativement instable, sa demi-vie n'est que de quelques secondes. Dans les membranes discales, elle est stable pour quelques minutes. Elle se transforme, soit en métarhodopsine III, avec une absorption maximale à 465 nm, ou en rétinal plus opsine. Le pH du milieu détermine quelle voie sera suivie. En milieu acide (pH 6.5 et moins), l'hydrolyse directe est privilégiée, tandis que les milieux alcalins favorisent la formation de métarhodopsine III.

La figure de la page suivante montre sous forme synoptique la séquence photolytique complète.

Figure 1.7
Séquence photolytique de la rhodopsine des vertébrés.



1.5.2 - Mécanisme de transduction.

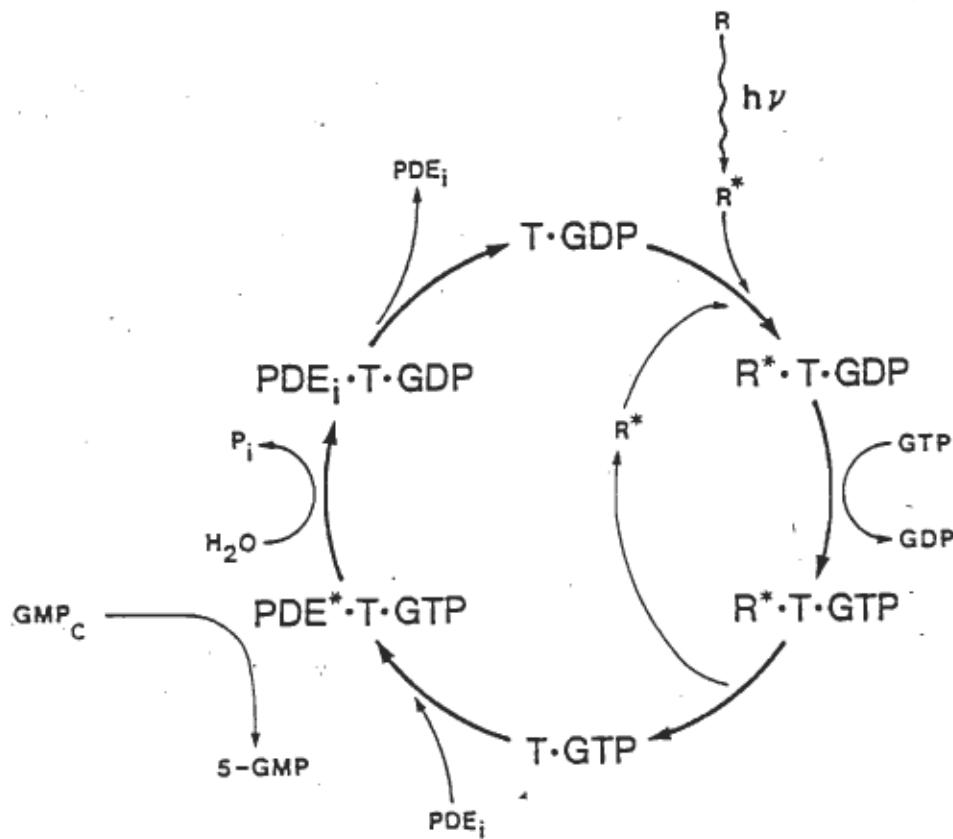
La transduction visuelle est l'acte par lequel une cellule photoréceptrice convertit l'absorption d'énergie lumineuse en potentiel d'action. Le résultat de l'absorption de photons par la rhodopsine, qui cause le potentiel d'action, est la diminution du flux d'ions Na^+ à travers la membrane plasmique du S.E.B. engendrant une onde d'hyperpolarisation. Presque toutes les molécules de rhodopsine sont localisées dans les membranes des disques isolées de la membrane plasmique. Ceci implique donc que le signal entraînant l'hyperpolarisation doit être transporté des disques vers la membrane plasmique. Un messager interne doit donc être modulé pour coupler la réaction de la rhodopsine qui absorbe de la lumière, à la fermeture des canaux sodiques qui diminue le flux d'ions sodium et qui engendre l'hyperpolarisation. Une seule photoisomérisation peut bloquer le flux de 10^6 ions Na^+ vers l'intérieur du S.E.B.; il y a donc un mécanisme d'amplification important.

Parmi les hypothèses qui permettent d'expliquer le mécanisme de transduction et son amplification, la plus récente et la plus retenue à ce jour est celle du GMP-cyclique (GMP-c, guanosine 3',5'-monophosphate cyclique), (Stryer et al., 1981). Cette hypothèse est basée sur l'observation que les S.E.B. renferment une très forte concentration de GMP-c ($70 \mu\text{M}$), que cette concentration de GMP-c diminue à la lumière et que les S.E.B. contiennent une activité phosphodiesterasique (PDEase, hydrolyse GMP-c en GMP) activée par la lumière. Selon cette hypothèse, le GMP-c garde les canaux sodiques ouverts et l'illumination entraîne la fermeture de ces derniers suite à la diminution du

GMP-c, ce qui provoque l'hyperpolarisation de la cellule photoréceptrice. La concentration de GMP-c serait modulée par l'excitation de la rhodopsine.

En plus de la rhodopsine, deux protéines membranaires périphériques sont nécessaires à l'explication du mécanisme: la phosphodiestérase (PDE) et une protéine GTP-liante (aussi appelée protéine G ou transducine, "T"). A l'obscurité, presque toutes les protéines G sont associées à du GDP (guanosine diphosphate); c'est la forme inactive. La lumière active la rhodopsine (R^* , la métarhodopsine II selon toute vraisemblance) qui se lie à une transducine qui est déjà associée à une GDP pour former un complexe transitoire ($R^*.T.GDP$). La rhodopsine photoexcitée catalyse l'échange de GDP pour du GTP (guanosine triphosphate) sur la transducine. Puisque (R^*) possède une plus grande affinité pour le groupe (T.GDP) que pour (T.GTP), alors en présence de (T.GDP), la rhodopsine active se dissocie de (T.GTP) pour se lier de préférence avec le précédent. De cette façon, une seule molécule de rhodopsine est en mesure d'activer 500 molécules de protéines GTP-liantes. La forme activée de transducine liée au GTP (T.GTP), active une PDE pour former ainsi la forme active de la phosphodiestérase (PDE.T.GTP) qui hydrolyse la GMP-c. Une rhodopsine photolysée pourrait ainsi activer plus de 500 molécules de PDE, chacune hydrolysant des milliers de GMP-c. La conductance au Na^+ de la membrane plasmique est diminuée, ce qui provoque le potentiel d'action. La restitution de l'état d'obscurité se produit au moyen de l'hydrolyse lente du GTP lié à T qui ramène le complexe à sa forme inactive associée au GDP. On sait également qu'il existe une rhodopsine kinase qui peut phosphoryler R^* . Dans son état phosphorylé, R^* ne peut activer la transducine. Le schéma synoptique de la page suivante montre l'hypothèse du GMP cyclique.

Figure 1.8
Hypothèse du GMP cyclique.



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).

1.6 - Objet du travail.

Une des visions biophysiques du processus de l'excitation visuelle est de considérer la photochimie primaire du phénomène comme l'absorption et le stockage de l'énergie électromagnétique et les réactions thermiques subséquentes comme des processus de dissipation de cette énergie. On sait que près de 50% de l'énergie du photon (35 Kcal/mol) est stockée par le pigment lors de la formation de la bathorhodopsine (Cooper, 1979; Boucher et Leblanc, 1985). L'origine moléculaire de ce stockage d'énergie pourrait aussi bien être électrostatique, par séparation de charges entre l'azote du chromophore et son contre-ion, que conformationnel, par génération de contraintes mécaniques dans la cavité protéique du chromophore, lors de son isomérisation (Warshel et Barboy, 1982). Par ailleurs, au cours des réactions subséquentes qui doivent ultérieurement amener un changement conformationnel important, on peut imaginer que les formes électrostatiques et conformationnelles de l'énergie puissent être interconvertibles selon un mécanisme qui s'apparente au couplage piézoélectrique (Clapp, 1987). Dans ce contexte, il apparaît tous à fait vraisemblable que des changements conformationnels de la rhodopsine se produisent bien avant l'apparition de la métarhodopsine II. Nous avons donc examiné cette question sous son aspect cinétique.

En 1975, Stewart et al. suggéraient l'existence d'un changement conformationnel important à partir de l'effet environnemental sur la cinétique de la transition métarhodopsine I -> II. Dans le cadre de ce travail, nous tenterons de vérifier si le même type d'argument peut être utilisé pour démontrer

l'existence d'un changement conformationnel lors de la transition lumirhodopsine -> métarhodopsine I.

Pour ce faire, nous procéderons d'abord par la construction d'un système de détection optique possédant une résolution de l'ordre du dizième de microseconde afin de pouvoir analyser précisément la cinétique de la réaction qui nous intéresse. Nous élaborerons par la suite une méthode de calcul permettant de déterminer les paramètres cinétiques de cette réaction avec la plus grande précision possible. Enfin, l'effet de la solubilisation de la rhodopsine par différents détergents sur la vitesse de la réaction lumirhodopsine -> métarhodopsine I sera analysé, comparativement au même effet sur la transition métarhodopsine I -> métarhodopsine II, afin d'établir la probabilité et l'amplitude relative des changements conformationnels lors de ces deux étapes de la photolyse du pigment.

2. - Matériel et méthodes.

2.1. - Préparation de la rhodopsine bovine:

Nous avons réalisé la plupart de nos mesures avec la rhodopsine contenue dans des membranes discales intactes ou solubilisées dans différents détergents. La procédure utilisée pour obtenir ces échantillons est une adaptation de la méthode initialement mise au point par Smith et Litman.¹

Note: Toutes les manipulations ont été faites sous illumination rouge tamisée (longueur d'onde > 650 nm) pour ne pas affecter les pigments visuels qui n'absorbent pas à ces longueurs d'ondes.

2.1.1. - Préparation des rétines:

On obtient la rhodopsine à partir d'yeux de bovins recueillis à l'abattoir, lequel dans notre cas est l'Abattoir Morissette de St-Grégoire. Les yeux sont prélevés aussitôt que possible des bêtes abattues, puis placés immédiatement à l'obscurité dans un contenant, pour ne pas que la lumière du jour atteigne la rétine des yeux prélevés, et ce jusqu'au laboratoire en lumière rouge.

Arrivé au laboratoire, on dissecte les yeux en pratiquant une hémisection transverse, qui permet d'éviter le contenu des yeux et de les inverser pour avoir la rétine à l'extérieur. On récupère la rétine en frottant doucement cette dernière en allant du bord vers le centre de l'oeil, puis on doit la couper autour du nerf optique puisqu'elle demeure attachée à ce dernier.

¹ Smith, G.H. et Litman, B.J. (1981). Preparation of osmotically intact rod outer segment disks by Ficoll flotation. Dans Math. in Enzymology, 81, p.57. (ed. L. Packer, Academic Press)

Ensuite on ajoute environ 0,5 ml de tampon d'isolement par rétine (Hepes, 10 mM, pH 7,5 contenant 0,15 mM CaCl₂, 0,1 mM EDTA et 1% NaCl). La suspension est agitée manuellement 2 à 3 minutes pour détacher les segments externes des bâtonnets (SEB ou ROS, Rod Outer Segment).

2.1.2. - Flottation:

Nous additionnons à la suspension une solution de 80% de sucre pour obtenir une concentration finale en sucre d'environ 40%. On sépare la solution dans des tubes à centrifugation et on dépose en surface une couche de tampon d'isolement.

Les tubes sont centrifugés dans un rotor HB-4 pendant 40 minutes à 10000 rpm. Après la centrifugation, les SEB flottent à l'interface sucre/tampon tandis que les débris rétiniens sont déposés au fond de la solution de sucre. Les SEB sont recueillis par aspiration au moyen d'une pipette KOMA et lavés par sédimentation.

Note: Toutes les centrifugations, à moins d'avis contraire, se font dans une centrifugeuse Sorval RC-5B.

2.1.3. - Sédimentation:

Les SEB sont homogénéisés par agitation, et dilués dans un rapport 1:1 avec du tampon d'isolement afin de diluer le sucre. La sédimentation est ensuite faite par centrifugation dans un rotor SS-34 à 17000 rpm pour 30 minutes.

On décante et jette le surnageant.

N.B. Les étapes (2.1.2. et 2.1.3.) sont répétées jusqu'à ce que la suspension ne laisse plus voir de bande d'absorption significative à 420 nm, indice de contamination par du sang ou des mitochondries.

2.1.4. - Préparation des disques (membranes discales des SEB):

On resuspend le culot de SEB dans de l'eau distillée et on centrifuge 40 minutes à 17000 rpm dans un rotor SS-34 afin d'éliminer les sels.

On décante et jette le surnageant.

On répète cette étape une seconde fois.

Note: Lors de la décantation, il faut être prudent car le culot est plus floconneux et se détache plus facilement.

Le culot est suspendu dans une solution de Ficoll 5% et réfrigéré 2 heures avec agitation aux 15 minutes.

Après avoir séparé la suspension dans des tubes à centrifugation on dépose en surface une mince couche d'eau puis on centrifuge 2 heures à 10000 rpm dans un rotor HB-4.

On recueille la couche à l'interface laquelle contient les disques de rhodopsine originellement contenus dans les SEB.

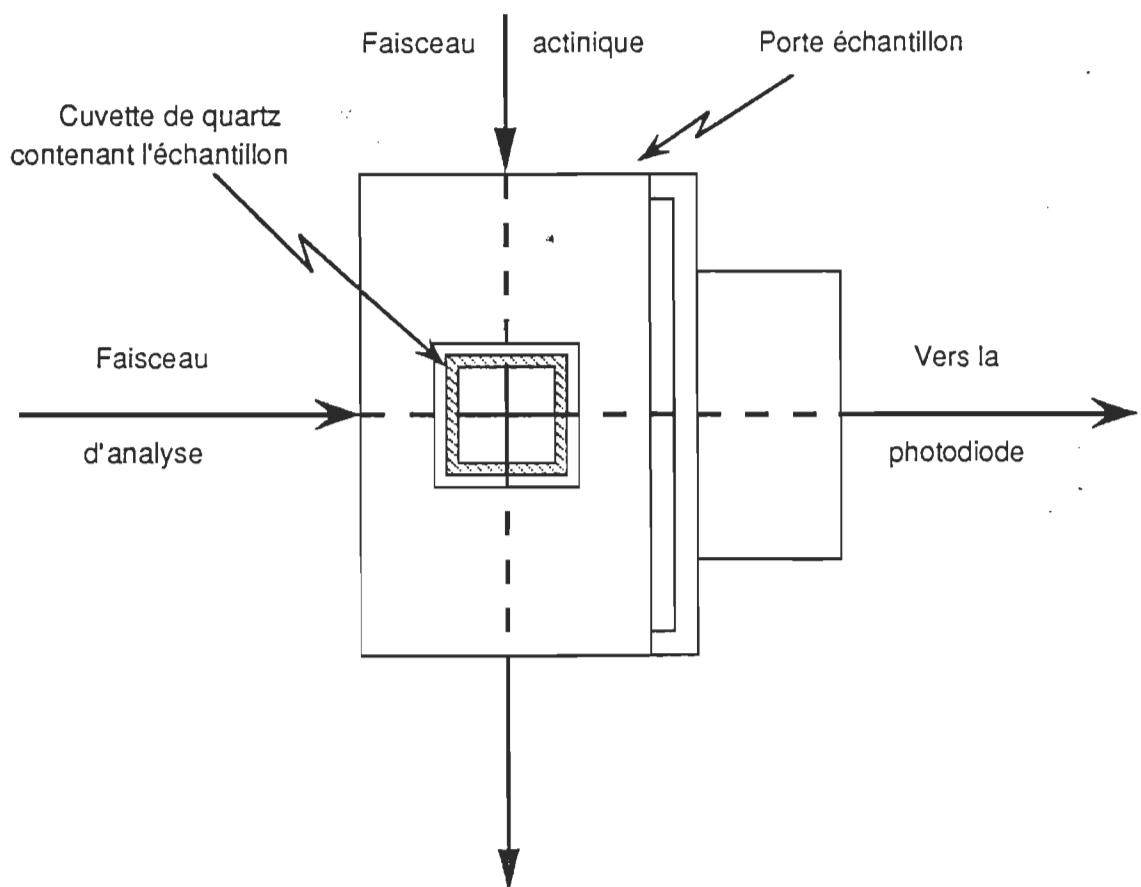
2.2. - Description de la photolyse éclair.

2.2.1. - Principe de la photolyse éclair.

La photolyse éclair est une méthode physique très puissante pour étudier la réaction d'une molécule à un éclair de lumière très bref et ce en temps réel. La photolyse éclair consiste essentiellement à placer un échantillon quelconque à la croisée de deux faisceaux de lumière faisant un angle de 90° degré entre eux.

Figure 2.1

Principe de la photolyse éclair.



L'un de ces deux faisceaux est le faisceau actinique de la réaction. Ce dernier se doit d'être suffisamment intense pour que notre échantillon soit saturé en photons et de plus il doit être d'autant plus bref que la réaction que l'on veut observer est rapide. Il y a trois raisons pour avoir le faisceau actinique le plus bref possible :

- 1- Plus l'excitation semblera instantanée par rapport à notre vitesse d'observation, alors meilleure sera notre estimation du temps zéro initial c'est-à-dire le moment où notre réaction débute.
- 2 - Plus l'excitation sera rapide, moins son intensité aura le temps de chevaucher le signal de la molécule, c'est-à-dire que la photodiode ne sera pas aveuglée pendant que le phénomène observé a lieu.
- 3 - Notre traitement numérique n'aura pas besoin de déconvolution puisque notre signal sera directement discernable de l'excitation.

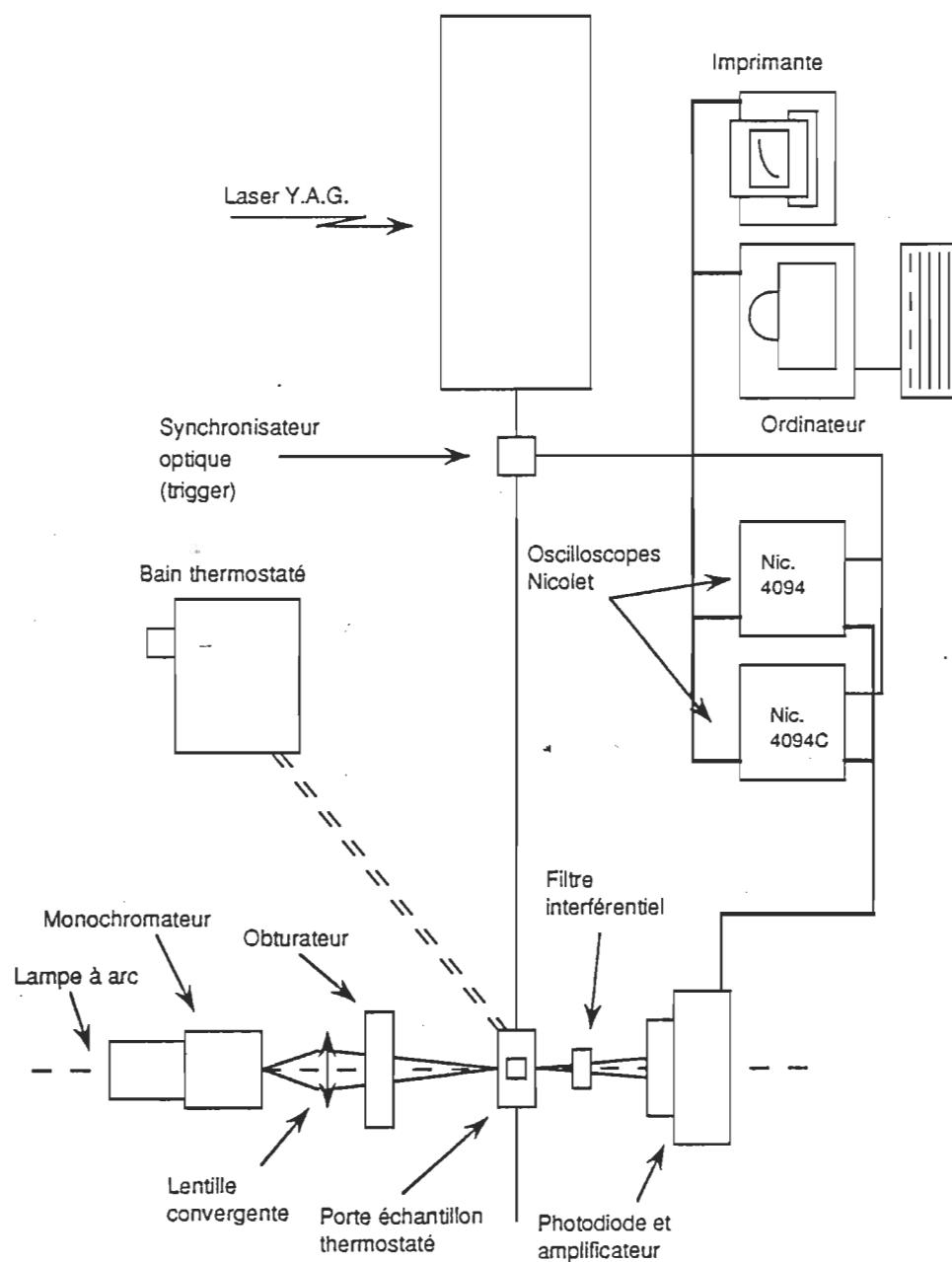
Pour ces raisons nous en sommes venus à utiliser un laser à impulsion de type Y.A.G..

Le deuxième faisceau, le faisceau d'analyse, nous informe sur la réaction de l'échantillon à la lumière par l'intermédiaire d'une photodiode. Ainsi, avant l'éclair fait par le laser, la partie du faisceau d'analyse traversant l'échantillon sera vue par la photodiode avec une certaine intensité. Après l'éclair laser, cette intensité vue par la photodiode variera dans le temps selon la nature et la vitesse des variations d'absorbance engendrées dans l'échantillon par le faisceau actinique. Bien sûr, s'il n'y a pas de réaction il n'y aura pas de variation de la mesure du faisceau d'analyse (la réciproque n'étant pas nécessairement vraie). Ces variations d'intensité du faisceau d'analyse vues par la photodiode seront lues

et traduites en tension par un amplificateur et recueillies sur un oscilloscope. Le tout s'effectue et s'enregistre en temps réel, ce qui finalement sera vu et interprété comme une cinétique de la réaction étudiée. Les résultats bruts ainsi obtenus seront subséquemment traités de façon numérique sur ordinateur afin d'en extraire leurs paramètres descriptifs.

2.2.2. - Description du matériel:

Figure 2.2
Schéma du système de photolyse éclair.



1 - Laser:

Nous utilisons un laser pulsé (Q. switched) de la compagnie JK Laser System 2000 de type Nd(néodyme)YAG. Il génère une longueur d'onde de base de 1064 nm, laquelle est convertie par optique non linéaire en d'autres harmoniques. Nous utilisons la deuxième, soit celle à 532 nm. A cette dernière longueur d'onde, notre laser développe une énergie approximative de 70 mJ et l'impulsion a une durée de 10 ns à mi-hauteur. Le diamètre approximatif du faisceau est de 3 mm.

2 - Lampe à arc:

La lampe à arc utilisée est de la compagnie PTI (Photon Technology Inc.). Elle fonctionne au Xénon et développe une puissance de 150 Watts.

3 - Monochromateur:

Le monochromateur est du modèle N°. 01-002 de la compagnie PTI.

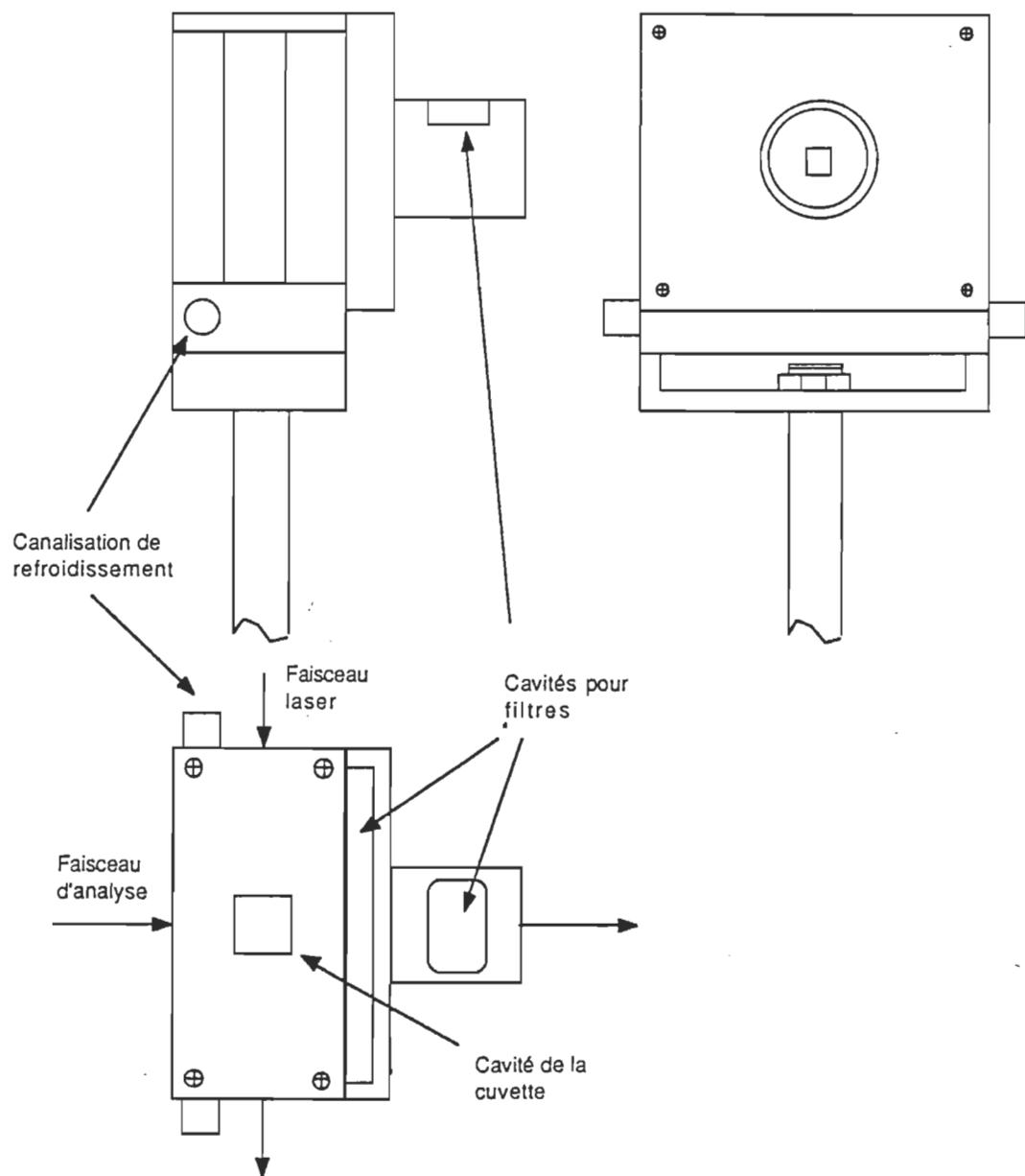
4 - Porte-échantillon:

Le porte-échantillon a été dessiné et fabriqué à l'U.Q.T.R. même. Il a été construit pour accueillir une cuvette de 1 cm^2 à la croisée de deux faisceaux lumineux. Il peut également recevoir jusqu'à deux filtres interférentiels qui sont utilisés pour prévenir l'aveuglement de la photodiode tout en transmettant le faisceau d'analyse. Il est finalement monté sur banc optique et traversé par une canalisation servant à contrôler sa température.

En voici un schéma:

Figure 2.3

Porte-échantillon



5 - Obturateur:

Pour éviter le blanchiment prématué de la rhodopsine par le faisceau d'analyse avant l'éclair laser, nous utilisons un obturateur synchronisé avec le déclenchement laser. Il s'agit d'un obturateur Uniblitz modèle 225L et son déclencheur électronique est aussi de marque Uniblitz modèle 100-2B/B.

6 - Cuvette:

La cuvette utilisée est en quartz et à double paroi pour permettre la circulation du liquide réfrigérant provenant du bain thermostaté, ceci afin de maintenir une température constante fixée au préalable. Il est important de noter que la cuvette en question possède deux de ses faces dépolies dans le sens du faisceau actinique. Ceci a pour but de diffuser le faisceau laser, afin de s'assurer que toute la solution dans la région où passe le faisceau d'analyse, est bien saturée en photons par l'éclair laser.

7 - Filtres interférentiels:

Dans la plupart des cas, nous avons analysé les cinétiques à 450 nm. Pour ce faire, deux filtres interférentiels ayant un pourcentage de transmittance de 56% à cette longueur d'onde étaient disposés devant la photodiode. Ils étaient de marque Oriel Corporation et Ealing Electro-Optics, Inc.

8 - Bain thermostaté:

Nous utilisons un bain thermostaté de marque Brinkmann Lauda RC3 modèle T2. Cet appareil assure la circulation d'un liquide réfrigérant à travers le porte-échantillon et la cuvette afin de les maintenir à une température constante pour les fins de nos protocoles expérimentaux. La température choisie est maintenue stable avec une incertitude de +/- 0.2 C°.

9 - Composé amplificateur-photodiode:

L'amplificateur utilisé a été conçu et réalisé par (mon grand copain, collègue de travail et de recherche), Normand Beaudoin. Initialement, il n'était pas chose facile de concevoir un composé photodiode amplificateur qui pourrait de façon régulière, mesurer des signaux d'une amplitude de quelques dizaines de millivolts et ce à des vitesses allant jusqu'à quelques nanosecondes.

Pour réussir nos mesures, il est apparu nécessaire de blinder l'amplificateur et ce de la photodiode jusqu'aux oscilloscopes. Cela devait nous permettre de recueillir le moins de bruit possible sur nos signaux provenant de perturbations électromagnétiques de la pièce.

Pour avoir un blindage efficace, il faut que l'amplificateur, les oscilloscopes et la cage métallique qui sert de blindage soient mis à la terre en un seul et même point. Il faut aussi qu'il y ait le moins d'orifices possible à travers le blindage et de fils provenant de l'extérieur, qui pourraient apporter des fluctuations électromagnétiques. C'est pourquoi, nous avons décidé de faire fonctionner l'amplificateur sur piles à

l'intérieur du blindage, ce qui par surcroît, évite d'avoir des bruits de lignes d'alimentation et permet d'incorporer la photodiode à l'amplificateur. De ce fait, elle aussi est à l'intérieur du blindage.

Les deux figures qui suivent, montrent respectivement un schéma de l'amplificateur par rapport au blindage et un plan détaillé de l'amplificateur.

Note: La photodiode utilisée est de la compagnie Hamamatsu et de numéro de modèle S1722-01.

10 - Oscilloscopes:

Les deux oscilloscopes, utilisés pour l'aquisition de données sont de marque Nicolet et de modèles 4094 et 4094C, tous deux numériques et équipés d'interfaces GPIB IEE-488 pour les transferts de données vers l'ordinateur. Ces deux appareils ont des vitesses d'échantillonnage maximum de 500 et de 5 nanosecondes par point respectivement.

11- Ordinateur:

L'ordinateur utilisé, est du type IBM compatible de marque Epson Equity II+ et l'imprimante est aussi de marque Epson du modèle FX-850. Ils servent surtout à l'emmagasinage des données sous forme numérique provenant des deux oscilloscopes Nicolet, à l'impression et finalement à l'acheminement en vue de traitements numériques approfondis, vers l'ordinateur central de l'établissement qui est un Cyber 830 D de CDC (Control Data Corporation)

Figure 2.4

Schéma de blindage.

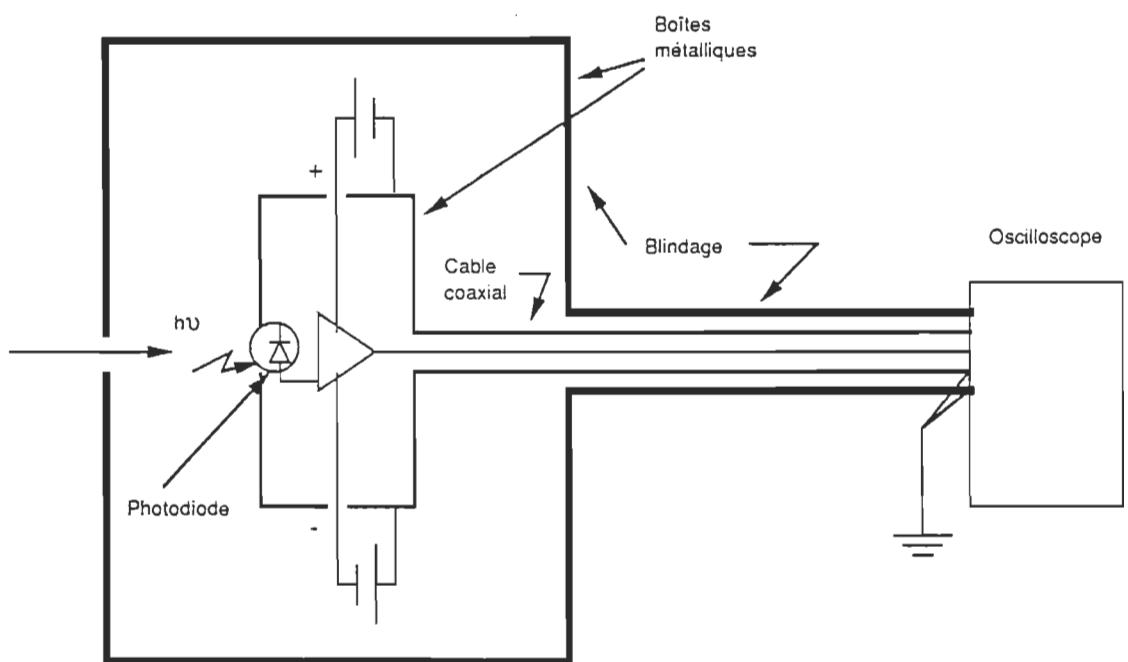
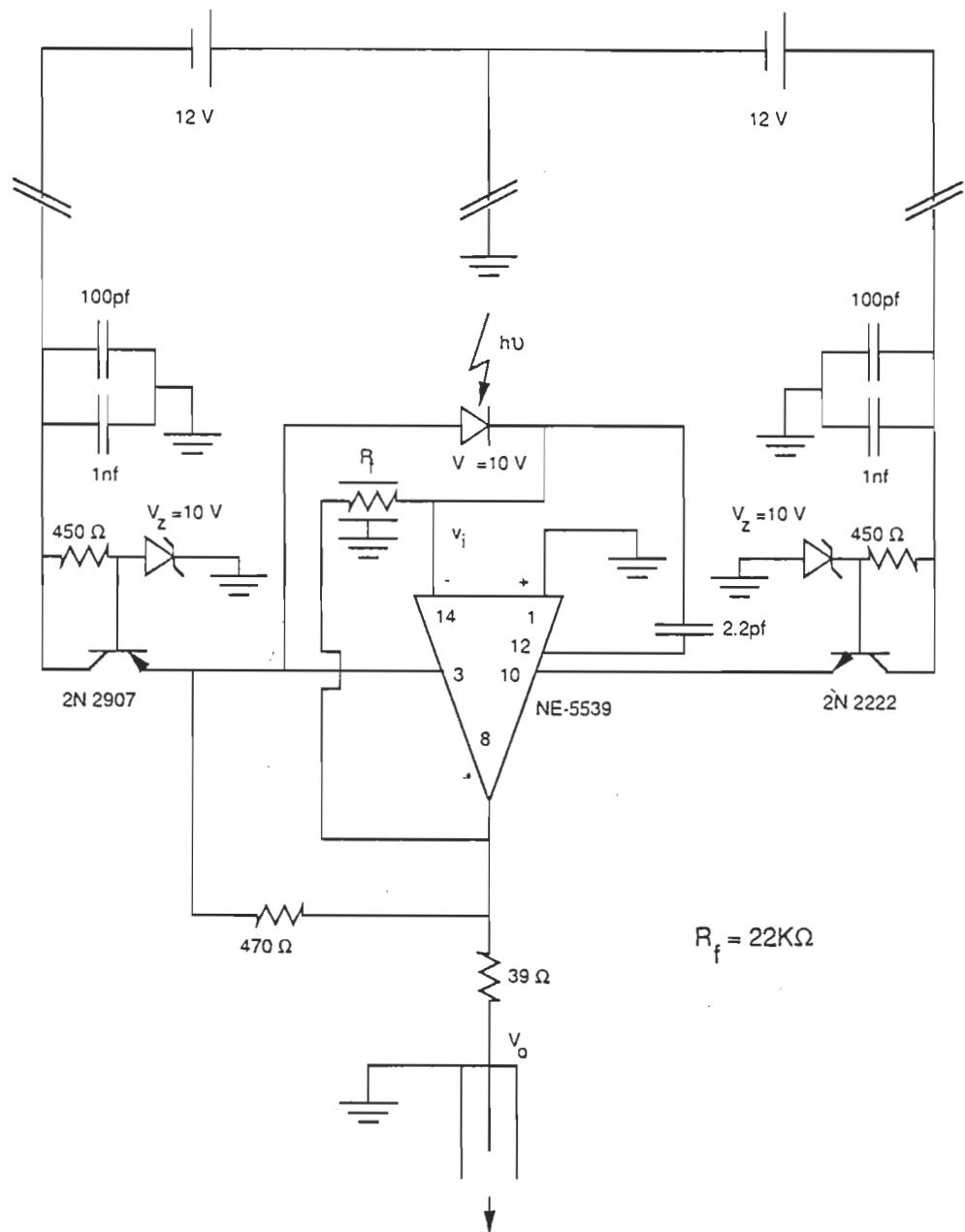


Figure 2.5

Amplificateur rapide. Réalisation et conception de Normand Beaudoin.



2.2.3. - Exemple de protocole utilisé et fonctionnement de l'ensemble.

La première étape avant la photolyse des échantillons est une vérification des alignements optiques du montage. Il est bien important, pour augmenter au maximum le rapport signal sur bruit, que l'alignement selon l'axe du faisceau d'analyse soit bien précis et que le faisceau laser passe bien au centre de la cuvette à la même hauteur que le faisceau d'analyse.

Après ces vérifications, l'on peut mettre en marche notre appareillage et ajuster la température désirée, pour notre expérience, sur le bain thermostaté. Puis l'on choisit sur le monochromateur de la lampe-à-arc la longueur d'onde désirée pour notre manipulation. L'on prend soin aussi de placer un filtre interférentiel, de même longueur d'onde que celle choisie sur le monochromateur, à l'endroit réservé à cette fin sur le porte-échantillon, c'est-à-dire entre la cuvette et la photodiode de l'amplificateur. Cette précaution est nécessaire pour éviter que la lumière du laser diffusée par la cuvette et l'échantillon n'aille aveugler la photodiode. Notons qu'il est préférable que le faisceau d'analyse soit de longueur d'onde suffisamment éloignée de celle du laser pour que le filtre différencie bien les deux. Finalement lorsque la température de notre bain est stabilisée et par conséquent celle de notre porte-échantillon, nous plaçons le local en lumière rouge pour éviter le blanchiment de la rhodopsine et nous pouvons commencer l'expérience proprement dite.

Tout d'abord, l'échantillon est placé dans la cuvette d'analyse et on le laisse s'équilibrer à la température de la cuvette. Après ce temps d'attente, l'on appuie sur la commande de déclenchement de la photolyse éclair qui elle à son

tour fera ouvrir l'obturateur quelques fractions de secondes avant l'éclair laser. Comme il a été mentionné plus haut dans la description du matériel, l'obturateur empêche le blanchiment prématûr de la rhodopsine en bloquant le faisceau d'analyse. Puis vient le tir laser qui du même coup initie la réaction photochimique et déclenche de façon optique le début de l'enregistrement des deux oscilloscopes. Il est à noter que les deux oscilloscopes ont un prédéclenchement ajusté de telle sorte que l'on puisse connaître l'intensité lumineuse transmise par l'échantillon avant le tir laser. Le point de déclenchement des deux oscilloscopes est considéré comme le temps zéro de la réaction.

Ainsi, après l'impulsion laser et le début des enregistrements des deux oscilloscopes, ces deux derniers finissent leur enregistrement et la manipulation est terminé. Il suffit maintenant de transférer les données recueillies sur oscilloscope vers l'ordinateur.

2.2.4. - Vitesse du système.

Il est fort important de savoir, lorsque l'on mesure des cinétiques, si ce que l'on voit représente bien la vitesse de notre réaction, ou bien la vitesse à laquelle notre système revient à l'équilibre après une perturbation. C'est-à-dire, est-ce que le système est plus lent ou plus rapide que la réaction chimique que l'on veut observer? Pour trancher la question il faut faire fonctionner notre système à vide.

De façon plus détaillée, nous entendons tous simplement par fonctionnement à vide, l'utilisation de notre appareillage de photolyse éclair sans le faisceau d'analyse et en substituant l'échantillon par un diffuseur qui dirige une partie du rayon laser vers la photodiode. Ainsi lorsque nous actionnons la photolyse, il n'y a que la lumière du laser qui crée une impulsion lumineuse très brève, de l'ordre de dix nanosecondes, que notre combiné photodiode-amplificateur doit traduire en tension. Ce que nous observerons sur oscilloscope sera une montée rapide qui correspond à l'excitation du système de détection par le laser et une descente rapide qui représente le temps qu'il prend pour revenir à l'équilibre.

Il est à noter que dans la réalisation de cette expérience, il faut prendre garde à ce que notre diffuseur ne dévie pas trop de lumière par rapport à la quantité de lumière diffusée par un échantillon lors d'une expérience réelle, car plus il y aura de lumière, plus la photodiode risquera d'être saturée et ceci ralentira la vitesse de notre système. Mais, par souci de sécurité, nous avons utilisé une intensité du double par rapport à la quantité de lumière diffusée lors d'expériences réelles et ceci pour nous assurer que la vitesse de détection du

système avec des échantillons normaux serait inférieure ou au pire égale à la vitesse de la photolyse à vide.

Nous avons répété cette expérience de la photolyse éclair à vide quarante fois pour établir une moyenne statistique ainsi qu'une incertitude. Pour chaque tir nous avons traité de façon numérique la descente rapide vers l'équilibre pour en tirer les quarante constantes de temps du tableau 2.1 qui suit:

Note: L'incertitude qui est rattachée à la moyenne est de un écart type.

Tableau 2.1

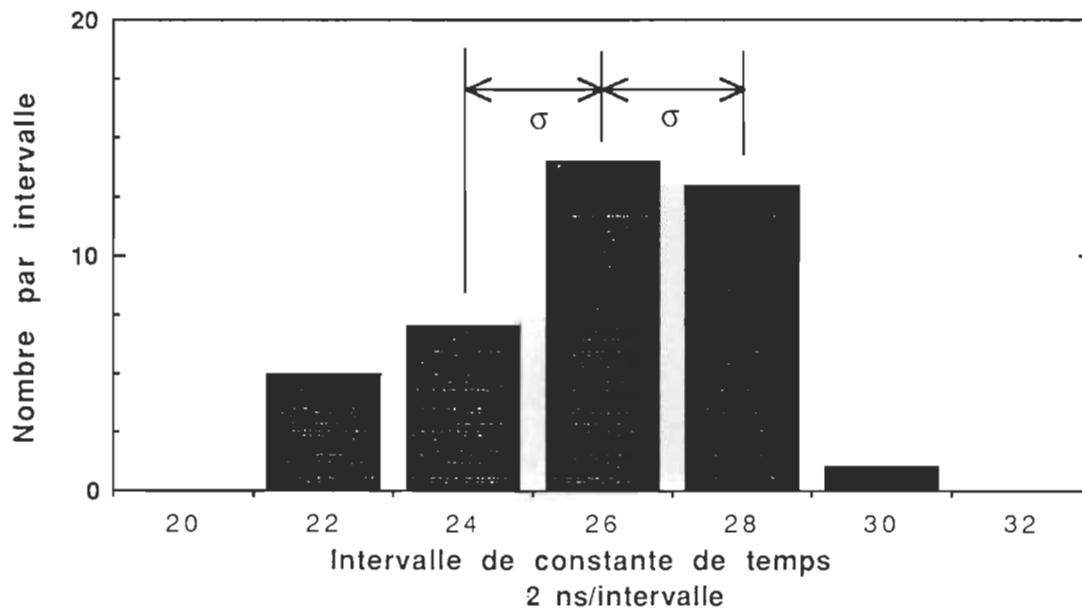
Résultats des quarante essais de photolyse à vide.

Constantes de temps (ns).

2 6	2 5	2 8	2 9	2 7
2 4	2 7	2 9	2 4	2 9
2 9	2 8	2 3	2 6	2 9
2 8	2 3	2 1	2 3	2 7
2 5	2 7	2 4	2 9	2 3
2 8	2 6	2 8	2 8	2 7
2 8	2 7	2 5	2 6	2 6
2 7	2 5	2 6	2 6	3 1

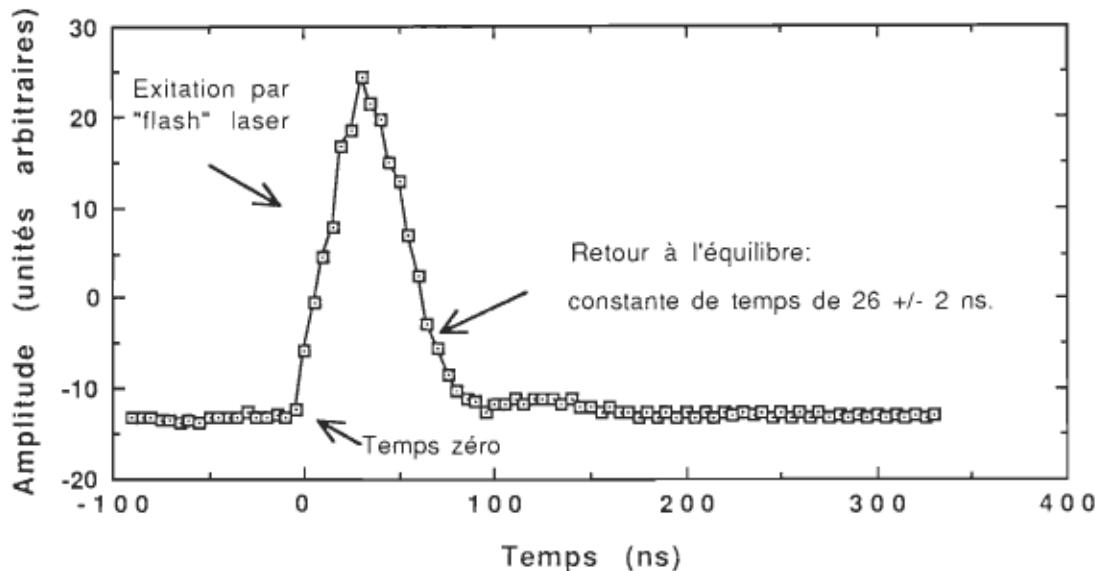
Constante de temps moyenne =	26 +/- 2
Ecart type =	2

Figure 2.6
Graphique de distribution des constantes de temps.



Le graphique suivant montre un exemple typique des quarante résultats obtenus sur oscilloscope avant traitement^{*} mathématique avec la photolyse éclair à vide:

Figure 2.7
Exemple de résultat de photolyse à vide

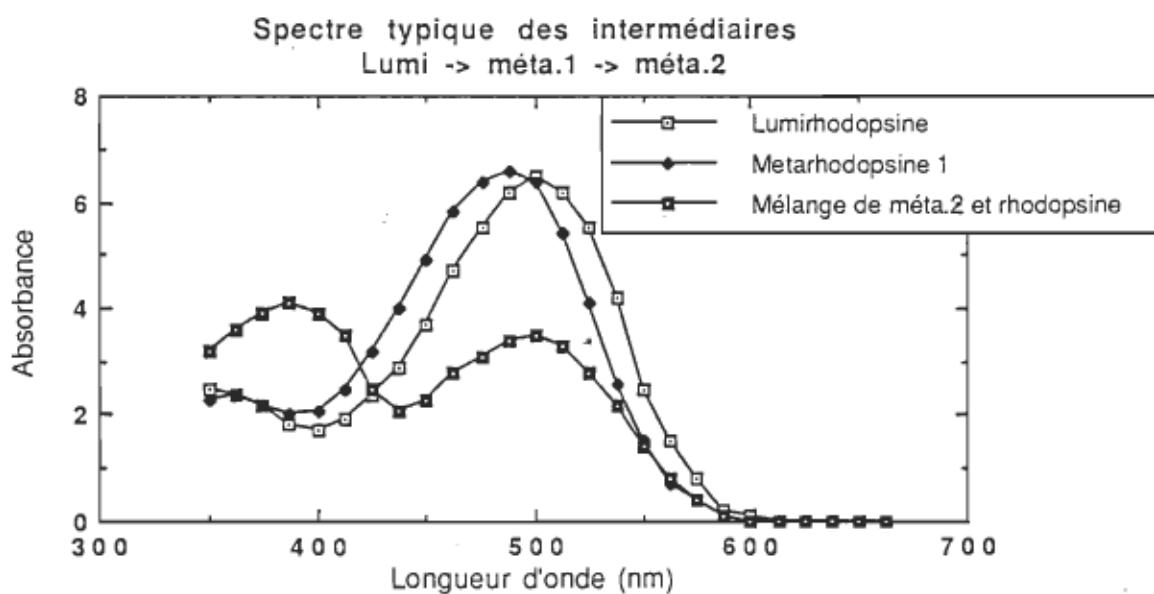


Ces résultats montrent que le système a un temps de montée plus rapide que celui de la descente, et que la constante de temps de notre système pour revenir à l'équilibre est de vingt-six nanosecondes. Or, si l'on se donne une sécurité de dix fois supérieure pour la recherche de constantes de temps avec notre système, on pourra mesurer des constantes de temps de réactions photochimiques de l'ordre environ de 260 ns. On remarque aussi que notre système est revenu à l'équilibre en cent nanosecondes.

2.3. - Choix de la longueur d'onde utilisée:

Le choix de la longueur d'onde pour notre faisceau d'analyse dépend bien sûr de ce que nous voulons regarder. Dans notre cas, ce qui nous intéresse, c'est le passage de la rhodopsine par les intermédiaires lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I \rightarrow métarhodopsine II. Mais ces trois étapes ne se discernent pas à toutes les longueurs d'ondes, comme nous pouvons le voir sur le graphique suivant:

Figure 2.8



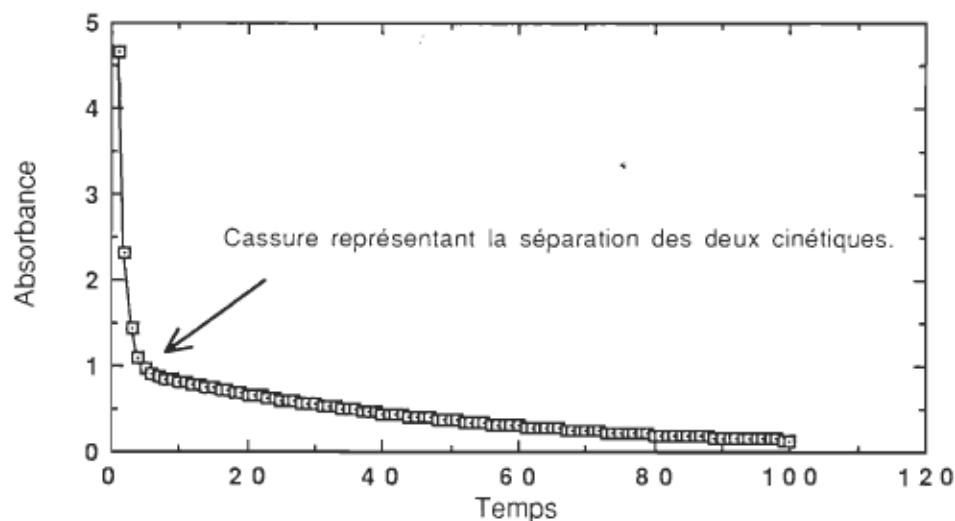
Ainsi, l'on voit bien par exemple qu'à partir de 550 nm et plus nous avons des courbes qui se confondent. Le même problème se pose pour 375 nm et moins, l'on ne peut bien discerner lumirhodopsine de métarhodopsine I. Ainsi, de ces

simples considérations, nous pouvons déterminer une plage d'observation potentielle entre environ 375 nm et 550 nm, mais dans les fait quelle longueur d'onde choisira-t-on dans ce domaine? Pour nous aider dans cette sélection, nous tiendrons compte de la facilité de l'analyse de nos résultats.

Ainsi ces derniers, qui sont sous forme graphique se doivent d'être tels que leur courbes soient le moins confondues possibles. Pour ce faire, nous devons éviter autant que possible d'avoir des cinétiques différentes qui vont dans le même sens. Pour mieux comprendre, voyons par un exemple ce que nous entendons par deux cinétiques dans le même sens:

Figure 2.9

Graphique de deux cinétiques évoluant dans le même sens.



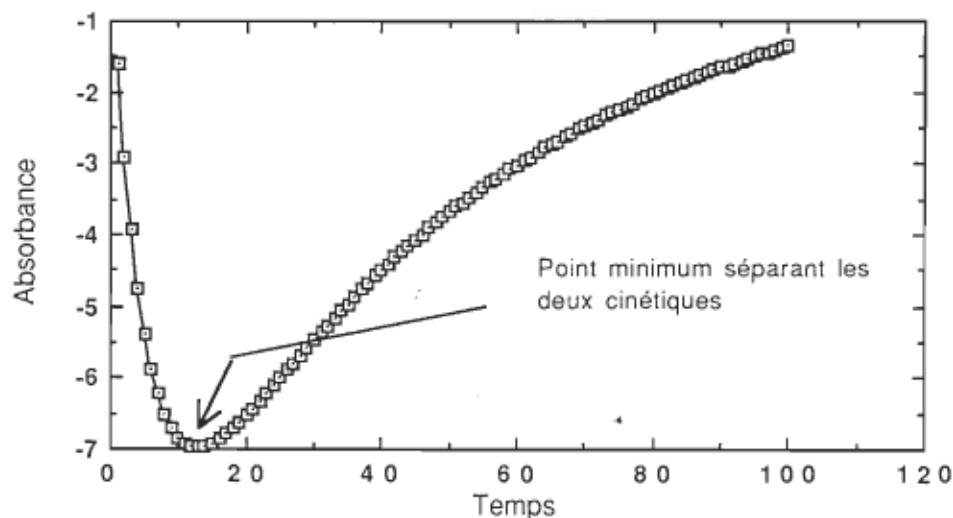
L'on voit que l'on aura du mal à bien discerner la fin de la première exponentielle du début de la seconde, ce qui peut être très navrant lors de traitements numériques où nous voulons savoir la constante de temps de chaque

exponentielle de façon individuelle. Bien sûr le problème sera d'autant plus sérieux que les constantes de temps des deux exponentielles seront près l'une de l'autre.

Mais supposons que nous avons des cinétiques qui vont en sens inverses, comme le montre le graphique suivant:

Figure 2.10

Graphique de deux cinétiques évoluant en sens inverse



Nous pouvons alors très facilement séparer les deux exponentielles l'une de l'autre, ce qui facilite de beaucoup notre traitement numérique.

Or pour arriver à obtenir des cinétiques inverses il nous suffit de regarder notre figure 2.8 sur le spectre typique des intermédiaires lumi. \rightarrow méta I \leftrightarrow méta II. On y remarquera rapidement qu'entre 425 nm et 550 nm l'on aura une transition lumi \rightarrow méta I qui apportera une augmentation de l'absorbance et ensuite une transition méta. I \leftrightarrow méta. II qui amènera une diminution de

l'absorbance. Donc entre ces deux longueurs d'ondes, nous aurons des cinétiques inverses, ce qui nous permettra facilement de différencier les transitions lumi->méta I de méta I<->méta II.

Mais, notre sélection est loin d'être finie car nous avons encore un vaste choix entre 425 nm et 550 nm. Pour trancher la question nous avons analysé la photolyse d'échantillons de rhodopsine entre 425 nm et 550 nm. Le but de ces manipulations étant d'identifier la longueur d'onde qui procurera le maximum de signal, ou encore le maximum d'écart d'absorbance entre nos intermédiaires.

Voici le tableau des résultats de cette expérience:

Note: Cette expérience fut réalisée à 24°C et avec de la rhodopsine dissoute dans un tampon Tris (10 mM, pH=8) contenant 0,5% d'Ammonyx-LO. Les raisons de l'utilisation de l'Ammonyx sont entre autres, la limpidité de la solution (très bon détergent) et l'assurance, due à l'expérience acquise, qu'il ne bloque pas les transitions entre les intermédiaires lumi.-> méta. I et méta. I<-> méta. II.

Tableau 2.2

Résultats de photolyse de rhodopsine à différentes longueurs d'onde.

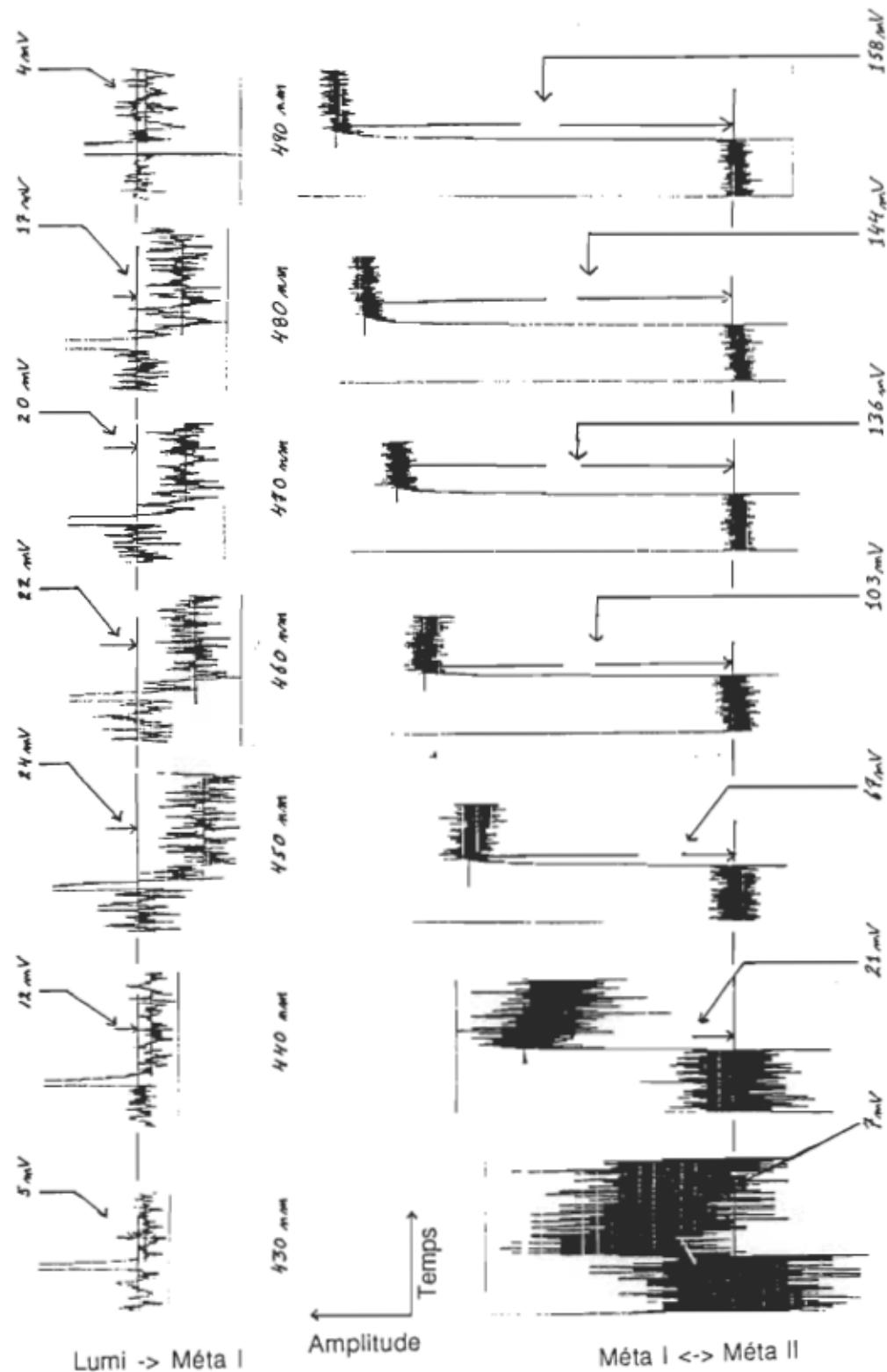
Longueur d'onde (nm)	Amplitude du signal (mV)	
	Lumi. -> méta. I	Méta. I <-> méta. II
	+/- 2 mV	+/- 5 mV
430	5	7
440	12	21
450	24	67
460	22	103
470	20	136
480	17	144
490	4	158

A la lecture de ce tableau de résultats, nous voilà vite fixé sur la longueur d'onde à utiliser pour nos expériences. Nous observons un maximum de signal à 450 nm pour le passage de lumi.-> méta.I et nous n'avons pas à nous soucier du signal pour le passage de méta.I <-> méta.II puisqu'il est largement suffisant par rapport au passage lumi. -> méta.I.

Les extraits de graphiques qui suivent ont servi à la mesure de l'intensité des signaux pour les fins du tableau précédent. Les sept paires de signaux ont été obtenues à l'aide des oscilloscopes Nicolet 4094 C et 4094 avec un échantillonnage de 5 microsecondes et de 5 millisecondes par point. Ils représentent l'intensité de lumière en fonction du temps pour des échantillons de rhodopsine à 24°C dissous dans un tampon Tris (10 mM, pH=8) contenant 0.5% d'Ammonyx. La longueur d'onde à laquelle ils ont été enregistrés est indiquée entre chaque paire de signaux. Les signaux du haut sont enregistrés avec le Nicolet 4094 C et ceux du bas avec le Nicolet 4094.

Figure 2.11

Extraits des graphiques ayant servi à la compilation du tableau 2.2.



2.4. - Choix de la densité optique (D.O.).

Puisqu'en photolyse éclair, l'axe d'analyse utilise la lecture de l'intensité lumineuse transmise par un échantillon, pour ensuite enregistrer ces variations dans le temps, il est nécessaire de prêter attention à la D.O., ou en d'autres termes à la concentration de nos échantillons, pour maximiser les changements d'intensité du faisceau de lumière qui les traverse.

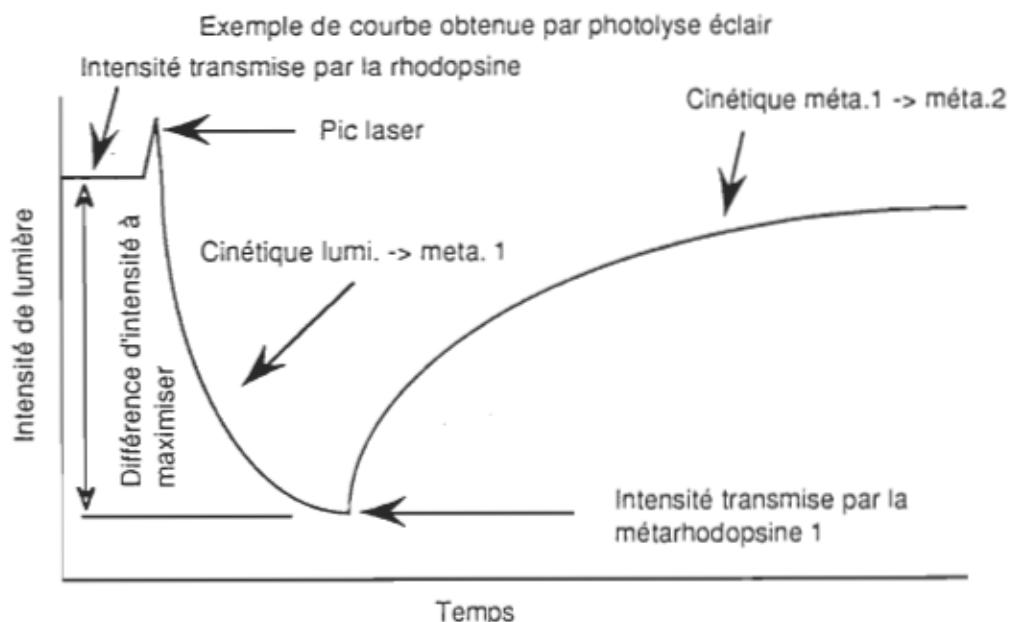
Pour trouver la D.O. de nos échantillons qui optimisera notre signal, on procède simplement par expérimentation en essayant plusieurs concentrations différentes de solutions de rhodopsine. Mais, avant de voir plus à fond ces manipulations et leurs résultats, nous avons tenté de voir si de façon théorique nous ne pourrions pas trouver une densité optique qui nous servirait de point de départ pour nos recherches.

2.4.1.- Détermination théorique de la D.O. optimum.

Il s'agit ici de trouver un maximum de signal pour la cinétique qui représente le passage de lumi. \rightarrow méta. I, car par expérience nous savons que c'est la plus difficile à mesurer à cause de sa grande vitesse et de son rapport signal sur bruit très faible. Par contre on ne se souciera pas de la deuxième transition que nous observerons (méta. I \leftrightarrow méta. II), qui est beaucoup plus simple à mesurer et a un meilleur rapport signal sur bruit.

Pour mieux comprendre ce que nous avons à optimiser, voyons l'exemple suivant qui montre schématiquement ce à quoi ressemble la cinétique de la photolyse d'un échantillon:

Figure 2.12



La première partie du graphique représente la transition lumi. \rightarrow méta. I, et c'est cette partie que nous voulons amplifier au maximum pour les raisons dites plus haut. Comme il est montré dans ce graphique, c'est la différence entre l'intensité de lumière transmise par l'échantillon de rhodopsine avant l'éclair laser, et l'intensité transmise par la métarhodopsine I, (qui est le point le plus bas du graphique), qu'il faut maximiser.

En possédant les équations, en fonction de la concentration de rhodopsine, qui représentent les deux intensités mentionnées ci-haut, on pourrait tenter de les différencier pour trouver une concentration maximisant cette différence.

Considérons d'abord la loi de Beer's Lambert:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon c L$$

où: A = absorbance ou D.O.

I_0 = intensité de lumière incidente

I = intensité de lumière transmise

ϵ = coefficient d'extinction

c = concentration

L = parcours optique

Il est à noter que le coefficient d'extinction est fonction de la longueur d'onde et est spécifique à chaque substance. Par exemple, pour la rhodopsine, " ϵ " égale 40600^{-1} [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] à 500 nm.

Il serait intéressant d'isoler le I de l'équation (1) puisque c'est la quantité mesurée par la photodiode. Afin d'y arriver il est plus pratique de transformer le logarithme en base 10 de l'équation (1) en logarithme népérien comme suit:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \frac{\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)}{\ln(10)} = \epsilon c L \quad :2$$

puisque :

$$\ln(10) = 2.3 \quad :3$$

et que :

$$\ln\left(\frac{a}{b}\right) = -\ln\left(\frac{b}{a}\right) \quad :4$$

alors :

¹ Handbook of Sensory Physiology, volume 1. Edité par W.R. Loewenstein, New York, 1971.

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -2.3 \epsilon c L$$

:5

Prenons l'exponentielle de chaque côté de l'équation (5):

$$\exp\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \exp(-2.3 \epsilon c L)$$

:6

En isolant on arrive à:

$$I = I_0 \exp(-2.3 \epsilon c L)$$

:7

Cette forme de la loi de Beer's Lambert répond bien à nos besoins, puisqu'elle exprime directement, comme nous le souhaitions plus haut, l'intensité lumineuse transmise par un échantillon en fonction de "c" et "ε", ce qui nous servira à interpréter notre graphique précédent de façon théorique.

Ainsi, la quantité de lumière mesurée par la photodiode à travers la rhodopsine avant le tir laser, sera exprimée par l'équation suivante:

$$I_R = I_0 \exp(-2.3 \epsilon_{R \text{ 450}} c_R L)$$

:8

Et l'intensité transmise au point où notre rhodopsine est transformée au maximum en métarhodopsine I sera exprimée par:

$$I_M = I_0 \exp(-2.3 \epsilon_{M \text{ 450}} c_M L)$$

:9

De ces dernières équations, on remarque que " ϵ " est constant, puisque nous avons fixé la longueur d'onde de notre faisceau d'analyse à 450 nm pour nos expériences de photolyse. Il est bien entendu que l'intensité du faisceau d'analyse incident " I_0 " est constante, ainsi que le parcours optique "L". Il est important de remarquer que nous avons employé deux symboles de concentration différents, car la rhodopsine comprise initialement dans l'échantillon, ne se transforme pas entièrement en métarhodopsine I après un éclair laser. Ceci a été vérifié expérimentalement et environ 85% de la rhodopsine se transforme en métarhodopsine I après un tir laser. On aura donc comme valeur de " c_M ":

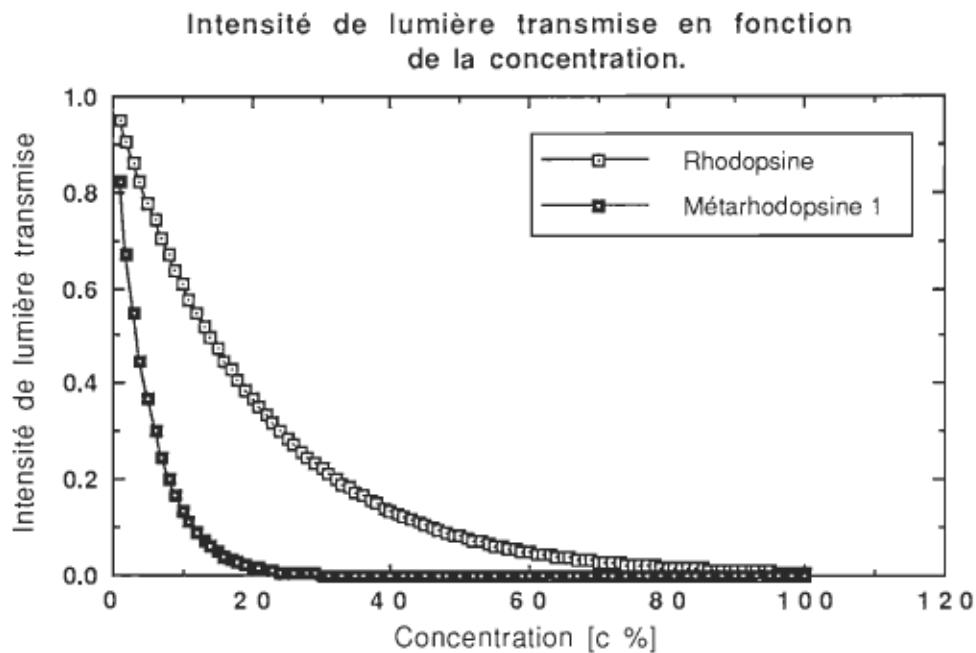
$$c_M = 0.85 c_F$$

:10

Il est nécessaire de signaler que l'équation (9) est une approximation, car pour être exact il nous faudrait additionner une autre exponentielle pour tenir compte de l'intensité transmise par le 15% de rhodopsine qui reste dans l'échantillon. Mais puisqu'une somme d'exponentielles ne trouverait aucune solution analytique dans notre traitement ultérieur, nous garderons l'approximation.

Voyons maintenant ce à quoi ressemblerait la mise en graphique des équations (8) et (9), de I en fonction de la concentration "c", pour la rhodopsine et la métarhodopsine I:

Figure 2.13



En observant le graphique précédent, on voit qu'il y a une concentration qui maximise l'écart entre les deux courbes, c'est-à-dire une concentration qui engendre un maximum de variation de l'intensité de lumière transmise, donc par conséquent un maximum de signal.

Maintenant, pour trouver l'écart maximum entre les deux courbes, il va de soi qu'il faut soustraire les deux équations qui ont servi au graphique ci-haut, et donc on soustraira (8) de (9) comme suit:

$$I_R - I_M = I_0 \exp(-2.3 \epsilon_{R450} c_R L) - I_0 \exp(-2.3 \epsilon_{M450} c_M L) \quad ;11$$

En substituant (10) dans (11), c'est-à-dire en remplaçant c_M par sa valeur, puis en dérivant l'équation (11) par rapport à c_R et en la portant à zéro pour trouver son point maximum, on obtient:

$$\frac{d(I_R - I_L)}{dc} = 0$$

$$= -2.3 I_o L \left[\epsilon_{R450} \exp(-2.3 \epsilon_{R450} c_R L) - (0.85) \epsilon_{M450} \exp(-2.3 \epsilon_{M450} (0.85) c_R L) \right]$$

:12

Il suffit maintenant d'isoler le " c_R " de l'équation (9) pour trouver la concentration que nous cherchons:

$$0 = \epsilon_{R450} \exp(-2.3 \epsilon_{R450} c_R L) - (0.85) \epsilon_{M450} \exp(-2.3 \epsilon_{M450} (0.85) c_R L)$$

:13

$$\epsilon_{R450} \exp(-2.3 \epsilon_{R450} c_R L) = (0.85) \epsilon_{M450} \exp(-2.3 \epsilon_{M450} (0.85) c_R L)$$

:14

$$\ln(\epsilon_{R450}) - 2.3 \epsilon_{R450} c_R L = \ln((0.85) \epsilon_{M450}) - 2.3 \epsilon_{M450} (0.85) c_R L$$

:15

$$\ln \epsilon_{R450} - \ln(0.85) \epsilon_{M450} = 2.3 L c_R (\epsilon_{R450} - \epsilon_{M450} (0.85))$$

:16

$$\frac{\ln\left(\frac{\varepsilon_{R450}}{(0.85)\varepsilon_{M450}}\right)}{2.3 L \left(\varepsilon_{R450} - \varepsilon_{M450}(0.85)\right)} = c_R$$

:17

Maintenant, pour résoudre l'équation (17), nous devons rechercher les valeurs de ε_{R450} et de ε_{M450} .

2.4.1.1 - Recherche de ε_{R450} :

Cette valeur est facilement obtenue à partir du spectre d'absorption de la rhodopsine et elle est égale à 24900 [$\text{l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$].

2.4.1.2 - Recherche de ε_{M450} :

Rappelons ici que ε_{M450} est la valeur de ε pour un mélange de métarhodopsine I (obtenue par photolyse) et de rhodopsine (non photolysée par l'éclair). ε_{M450} est donc plus facilement déterminable expérimentalement.

Mais avant, revenons aux équations (8) et (9) et divisons l'équation (8) par (9), ce qui donnera:

$$\frac{I_R}{I_M} = \frac{I_o \exp(-2.3 \varepsilon_{R450} c_R L)}{I_o \exp(-2.3 \varepsilon_{M450} c_M L)}$$

:18

Substituons c_M par l'équation (10) et réarrangeons de sorte que:

$$\frac{I_R}{I_M} = \exp(-2.3 \epsilon_{R450} c_R L) \exp(2.3 \epsilon_{M450} (0.85) c_R L) \quad : 19$$

$$\frac{I_R}{I_M} = \exp(-2.3 \epsilon_{R450} c_R L + 2.3 \epsilon_{M450} (0.85) c_R L) \quad : 20$$

Ou encore:

$$\ln\left(\frac{I_R}{I_M}\right) = 2.3 c_R L (\epsilon_{M450} (0.85) - \epsilon_{R450}) \quad : 21$$

Isolons maintenant ϵ_{M450} de l'équation (21):

$$\frac{\left[\frac{\ln\left(\frac{I_R}{I_M}\right)}{2.3 c_R L} + \epsilon_{R450} \right]}{0.85} = \epsilon_{M450} \quad : 22$$

Nous voyons qu'à la gauche de l'équation (22) nous connaissons tous les termes à l'exception de deux, I_R et I_M qui sont simples à trouver par photolyse éclair. Ainsi il suffit de prendre un échantillon de rhodopsine, comme à la partie précédente, et de la photolyser en analysant à 450 nm. Le résultat de cette photolyse nous donnera l'intensité de lumière traversant l'échantillon avant le tir laser (I_R), car à ce temps notre échantillon ne contient que de la rhodopsine. I_M nous sera donné par le point le plus bas de la cinétique, lequel représente l'intensité de lumière transmise lorsque la rhodopsine est devenue, à 85%, de la métarhodopsine I.

Ainsi nous aurons:

$$\left| \begin{array}{l} I_R = 412 \text{ mV} \\ I_M = 384 \text{ mV} \end{array} \right| \quad \text{lectures prises directement sur oscilloscope.}$$

$$c = 1.02 * 10^{-5} \text{ [mol/l]}$$

$$\epsilon_{R\ 450} = 24946.98 \text{ [l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{]}$$

$$L = 1 \text{ cm}$$

En substituant ces valeurs dans l'équation (22) on obtiendra:

$$\epsilon_{M\ 450} = 32871.37 \text{ [l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{]} \quad :23$$

Maintenant, nous pouvons revenir à l'équation (17):

$$\frac{\ln\left(\frac{\epsilon_{R\ 450}}{(0.85)\epsilon_{M\ 450}}\right)}{2.3 L \left(\epsilon_{R\ 450} - \epsilon_{M\ 450}(0.85)\right)} = c_R$$

:17

et y substituer les valeurs suivantes:

$$\epsilon_{R\ 450} = 24946.99 \text{ [l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{]}$$

$$\epsilon_{M\ 450} = 32871.37 \text{ [l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{]}$$

$$L = 1 \text{ cm}$$

Après calcul, on trouve:

$$c_R = 1.646 \times 10^{-5} [\text{mol / l}] \quad :24$$

Nous connaissons maintenant la concentration de rhodopsine que doit contenir une solution pour avoir un maximum de signal lors de nos manipulations de photolyse éclair. Cette concentration correspond à un échantillon ayant 0.66 d'absorbance à 500 nm et un parcours optique de un centimètre.

$$D.O. R 500 = 0.66 \quad :25$$

2.4.2. - Détermination expérimentale de la D.O. optimum:

Le démarche expérimentale utilisée fut très simple. Nous avons préparé plusieurs échantillons de rhodopsine à différentes densités optiques que nous avons ensuite photolysés . La solution mère de rhodopsine, avant dilution pour obtenir les D.O. souhaitées, était constituée de rhodopsine dissoute dans un tampon Tris (10 mM, pH=7,5) contenant 50 mM d'octylglucoside. Voici les résultats obtenus:

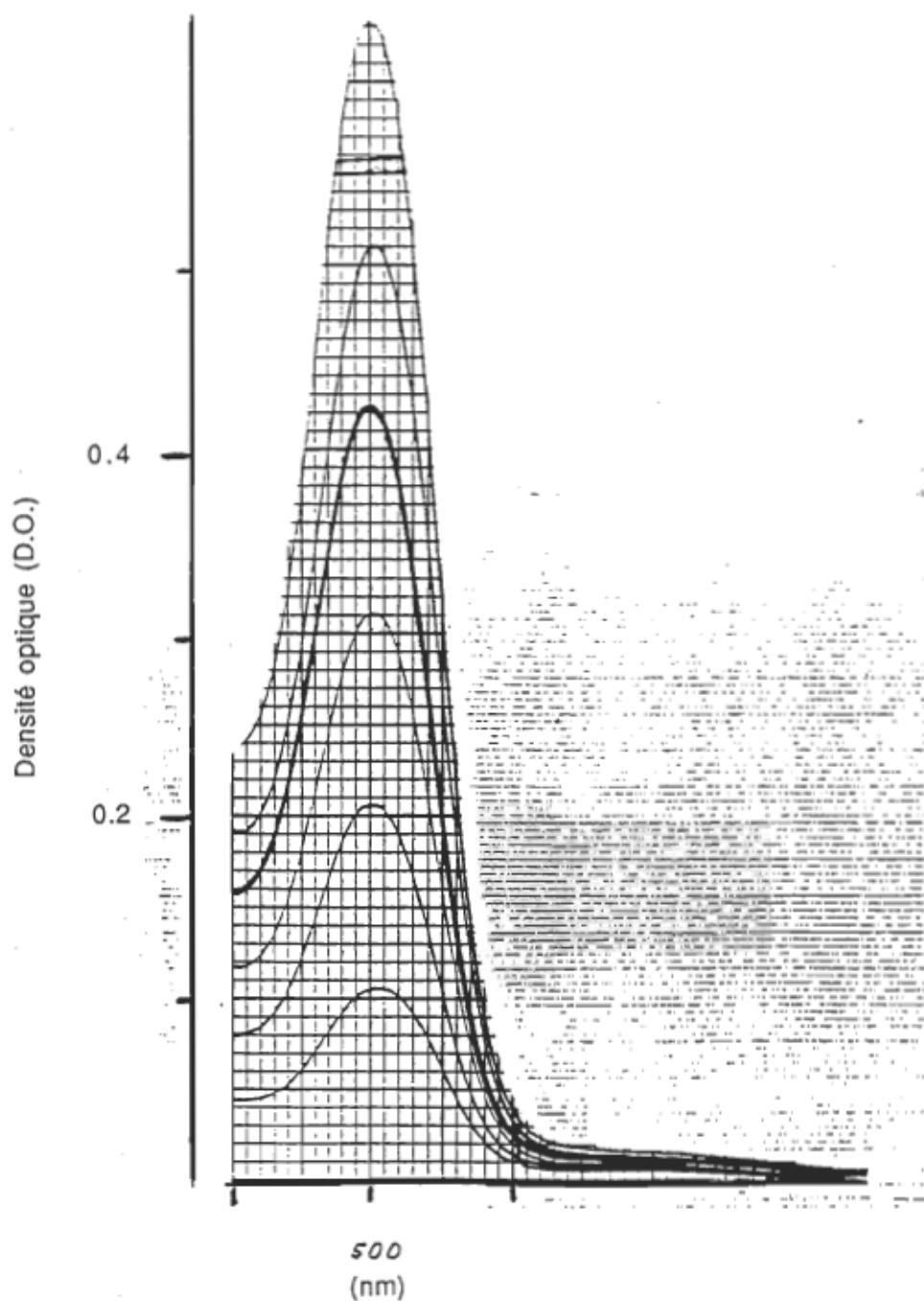
Tableau 2.3

Tableau de l'intensité de lumière transmise pour le passage de lumi. -> méta I pour différentes D.O.

Densité optique [D.O.] +/- 0.005	Amplitude de la transition lumi. -> méta I +/- 0.5 [mV]
0.105	20.0
0.205	32.0
0.310	44.0
0.420	50.0
0.510	55.0
0.630	55.0
0.680	55.0

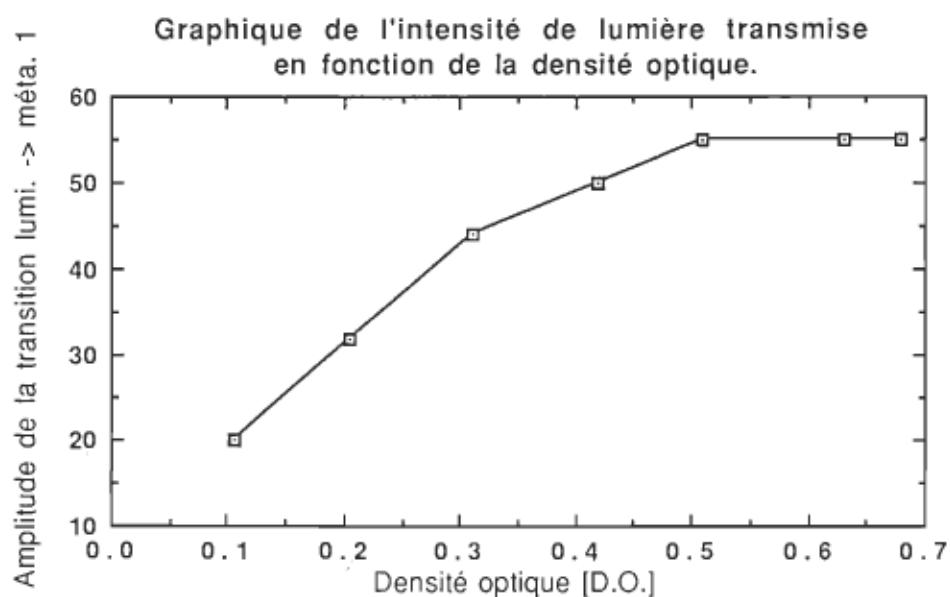
Notes: - Les mesures de l'amplitude de nos signaux sont lues directement sur oscilloscope, ce qui explique leur unités en millivolts.

Figure 2.14
Spectre des différents échantillons utilisés



Portons maintenant les valeurs du tableau 2.3 précédent en graphique, ce qui est fait à la figure suivante:

Figure 2.15



Nous constatons qu'un plateau est atteint à partir d'environ 0.5 D.O.. Il est dommage que nous n'ayons eu une solution mère de rhodopsine plus concentrée pour observer la descente de notre signal de l'autre côté de ce plateau. Il est néanmoins vraisemblable que le maximum se trouve aux alentours de 0.6 D.O., ce qui correspond bien avec nos calculs .

Mais, pour des raisons d'économie du matériel primaire (yeux), nous avons généralement utilisé des échantillons de densité optique de 0.4 à 0.5, puisque l'on constate à partir du graphique précédent, que cette région de travail est près du maximum de signal obtenu expérimentalement.

3 - Méthodes numériques de traitement de signaux.

3.1 - Problématique.

Nos signaux, comme nous avons pu le constater dans le chapitre précédent, consistent en des décroissances exponentielles et doivent donc être approximés et traités par des exponentielles. La forme générale d'une exponentielle est simple et facilement traitable par logarithme pour en tirer une forme linéaire afin d'en extraire les paramètres qui nous intéressent. Il suffit de connaître le niveau de base de notre courbe, qui représente le niveau constant que notre exponentielle atteint, et de soustraire ce dernier aux données expérimentales. Par cette manoeuvre, on se débarrassera du niveau constant de la forme générale d'une exponentielle, qui nous empêcherait d'obtenir une forme linéaire par logarithme. Ainsi le logarithme des données est une droite dont nous pourrons estimer la valeur de la pente et de l'intercepte par une méthode de régression linéaire et ainsi obtenir respectivement la valeur du temps de vie du signal de même que son amplitude.

Jusqu'ici en principe tout est beau,⁴ mais il se pose un problème dans la détermination du niveau de base des courbes expérimentales. Dans la réalité qui nous est infligée, nous avons des résultats qui ont des rapports signal sur bruit qui vont jusqu'à cent pour cent. Or pour pallier à ce problème, il nous faut prendre beaucoup plus de points sur le niveau de base des courbes pour en faire une moyenne valable afin d'en faire une bonne estimation. Ceci implique donc, que l'on échantillonne avec les oscilloscopes avec des temps assez longs pour avoir suffisamment de points à recueillir sur le niveau de base après que la décroissance a eu lieu, ce qui nous amène à avoir beaucoup moins de résolution dans la partie la plus intéressante et la plus importante de notre signal, c'est-à-

dire la descente. Il est d'autant plus important d'avoir beaucoup de résolution dans la descente du fait que notre signal est faible et bruyant. Or c'est l'impasse, car plus le signal est bruyant, plus il nous faut échantillonner longtemps pour avoir un bon estimé du niveau de base, et par conséquent plus nous perdons de la résolution à l'endroit où nous en avons le plus besoin, précisément à cause du fait que le signal est bruyant.

Baignant dans l'impasse, il nous fallait prendre une décision. C'est-à-dire faire un compromis entre l'estimé du niveau de base et la densité d'échantillonnage de notre courbe, ou bien trouver une autre façon de mieux faire les choses, en excluant tous compromis. Notre équipe étant d'âme entière et sans compromis nous optâmes pour la deuxième alternative!

3.2 - Ajustement d'une exponentielle par la méthode du moindre carré et sa série de Taylor.

Comme nous venons de le voir, à la section précédente (3.1), nous cherchons une méthode pour l'approximation de nos courbes expérimentales qui n'implique pas la connaissance préalable du niveau constant. Il nous faut donc trouver une façon de faire, qui nous donne le temps de vie des courbes, leurs amplitudes, ainsi que leur niveau de base et ce en traitant la courbe de façon entière, sans devoir échantillonner une courbe expérimentale jusqu'à ce qu'elle atteigne son niveau de base. Ainsi, avec une telle méthode, nous pourrons augmenter la densité de l'échantillonnage dans la partie la plus cruciale des courbes, c'est-à-dire la descente et ce sans nous soucier si la courbe a atteint son niveau de base, i.e. temps total d'échantillonnage plus petit que cinq temps de vie.

Avant de commencer à voir la méthode, voyons l'équation générale d'une exponentielle et regardons en guise de rappel mathématique ce que nous avons décrit à la section précédente (3.1).

Tout d'abord l'équation générale d'une exponentielle s'écrit comme suit:

$$f(t) = C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) \quad :1$$

$f(t)$ = approximation théorique ou modèle mathématique.

C = niveau constant ou niveau de base de l'exponentielle.

B = facteur ou amplitude de l'exponentielle.

A = temps de vie de l'exponentielle.

t = temps.

Si nous considérons que nos données expérimentales pour une courbe évoluent de façon exponentielle, alors nous pouvons les représenter approximativement par la forme mathématique suivante:

$$D_{\text{exp.}} \equiv f(t) = C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) \quad :2$$

$D_{\text{exp.}}$ = données expérimentales.

Comme nous l'avons vu précédemment, une façon de faire lorsque nous connaissons au préalable le niveau constant "C" pour déterminer les paramètres de l'équation (2), (paramètres qui représenteront nos données expérimentales), c'est de soustraire ce paramètre "C" à cette même équation et d'appliquer le logarithme de chaque côté, ce qui donnera:

$$D_{\text{exp.}} - C \equiv C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) - C \quad :3$$

$$D_{\text{exp.}} - C \equiv B \exp\left(\frac{t}{A}\right) \quad :4$$

$$\ln(D_{\text{exp.}} - C) \equiv \ln\left[B \exp\left(\frac{t}{A}\right)\right] \quad :5$$

$$\ln(D_{\text{exp.}} - C) \equiv \ln B + \ln \exp\left(\frac{t}{A}\right) \quad :6$$

$$\ln(D_{\text{exp.}} - C) \equiv \ln B + \left(\frac{t}{A}\right) \quad :7$$

Nous voyons que cette dernière équation a une forme linéaire et que la mise en graphique de l'équation (7), nous donnera une droite de pente "1/A" dont l'intercepte sera "ln(B)". Notons que l'équation (7) représente le logarithme de nos données expérimentales soustraites du niveau constant "C" et que le graphique que nous en tirons est en fait la mise en graphique du logarithme des données expérimentales soustraites de leur niveau constant. Comme nous venons de le voir tout va bien quand on connaît le niveau constant d'une exponentielle, mais c'est une autre histoire lorsqu'il nous est inconnu. Ainsi, si nous prenons le logarithme de notre équation (2) tout en gardant le niveau constant, nous aurons ceci:

$$\ln(D_{\text{exp}}) \equiv \ln\left[C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right)\right] \quad :8$$

Nous voyons immédiatement l'impasse. Nous ne pouvons tirer aucune forme linéaire de cette équation qui correspondrait au logarithme de nos données. On ne peut donc traiter de façon directe par logarithme nos données pour en tirer graphiquement de l'information sur leur représentation exponentielle.

Or, si notre problème vient de notre méconnaissance du niveau de base de nos signaux, alors il nous faut chercher un moyen de l'éliminer et de ne garder que la partie exponentielle de nos données. Puisque cette partie constante de nos cinétiques ne peut être éliminée expérimentalement, nous le ferons de façon théorique et numérique, et lorsque l'on parle d'éliminer une constante numériquement, on pense à la dérivée. Ainsi, si nous dérivons par rapport au temps l'équation (2) nous obtenons:

$$D_{\text{exp.}} \equiv \frac{B}{A} \exp\left(\frac{t}{A}\right)$$

:9

Nous remarquons qu'avec cette manœuvre nous avons gardé notre exponentielle intacte à un facteur près tout en nous débarassant du fâcheux niveau constant. Nous pouvons maintenant prendre le logarithme de cette dernière équation pour obtenir une forme linéaire:

$$\ln(D_{\text{exp.}}) \equiv \ln\left[\frac{B}{A} \exp\left(\frac{t}{A}\right)\right]$$

:10

$$\ln(D_{\text{exp.}}) \equiv \ln\left(\frac{B}{A}\right) + \ln \exp\left(\frac{t}{A}\right)$$

:11

$$\ln(D_{\text{exp.}}) \equiv \ln\left(\frac{B}{A}\right) + \left(\frac{t}{A}\right)$$

:12

Ainsi nous avons une forme linéaire qui exprime nos données expérimentales d'une façon simple avec les paramètres qui nous intéressent. Mais, même avec cette forme linéaire nous ne pouvons mettre en graphique le logarithme de la dérivée de nos points expérimentaux à cause du bruit. Ainsi, la dérivée d'un point à l'autre sera tantôt positive tantôt négative et nous savons tous, que le logarithme réel d'un nombre négatif est impossible. Il est à noter que le logarithme complexe ne nous serait d'aucune utilité dans ce cas, puisque la partie réelle est égale au logarithme réel du nombre positif dont on fait le logarithme et que la partie imaginaire est une constante, ce qui reviendrait à prendre le logarithme en valeur absolue.

Pour résoudre le problème de bruit, il nous faut trouver une façon de lisser nos données expérimentales. Cependant, il nous faut trouver une forme de lissage qui gardera la forme exponentielle des résultats. De plus, si cette forme de lissage était connue de façon analytique nous pourrions la dériver analytiquement ce qui serait beaucoup plus rapide et beaucoup plus précis que la dérivée numérique. Voyons ce qui s'offre à nous comme possibilités .

Premièrement, nous connaissons bien la méthode de lissage par polynôme de degré "n" au sens des moindres carrés. Cette méthode nous permet d'ajuster un polynôme de degré "n" à une courbe quelconque en minimisant la somme des écarts aux carrés entre chaque point de la courbe et ceux du polynôme.

Deuxièmement, nous savons que l'on peut représenter une exponentielle par une série de Taylor infinie qui a la forme suivante:

$$\exp(t) = 1 + t + \frac{t^2}{2!} + \frac{t^3}{3!} + \frac{t^4}{4!} + \dots$$

On peut se servir de l'équation précédente pour exprimer notre forme générale d'exponentielle (équation (1)) sous la forme d'une série de Taylor comme suit:

$$\exp\left(\frac{t}{A}\right) = 1 + \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^2}{2!} + \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^3}{3!} + \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^4}{4!} + \dots \quad :14$$

$$B \exp\left(\frac{t}{A}\right) = B + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^2}{2!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^3}{3!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^4}{4!} + \dots \quad :15$$

$$C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) = C + B + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^2}{2!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^3}{3!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^4}{4!} + \dots$$

:16

Pour simplifier posons:

$$E = C + B \quad :17$$

$$C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) = E + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^2}{2!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^3}{3!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^4}{4!} + \dots \quad :18$$

Récapitulons. Nous avons d'une part une méthode par moindre carré puissante pour représenter nos données expérimentales sous forme de polynôme, et d'autre part une représentation polynomiale d'une exponentielle. De là il n'y a qu'un pas à faire pour combiner ces deux représentations d'une façon avantageuse. La démarche que nous pourrions utiliser serait la suivante:

Tout d'abord nous avons une courbe de données expérimentales que nous assumons être décrite de façon analytique par une exponentielle de forme générale qui a été décrite à l'équation (2):

$$D_{\text{exp.}} \equiv f(t) = C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) \quad :2$$

Or, $D_{\text{exp.}}$ étant les données expérimentales il nous intéresse d'extraire les paramètres de l'équation (2) qui décrivent cette courbe de données. Maintenant procérons à l'ajustement d'un polynôme d'un ordre approprié à nos données expérimentales par la méthode des moindres carrés. Nous voulons signifier par ordre approprié, qu'il faut environ au moins cent fois plus de points que l'ordre du polynôme que nous utilisons. Nous appellerons ce polynôme " $h(t)$ " et il sera décrit mathématiquement comme suit:

$$h(t) = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + a_3 t^3 + a_4 t^4 + \dots \quad :19$$

Puisque le résultat (19) est une représentation polynomiale de notre courbe expérimentale lissée, nous pouvons donc dire que ce polynôme est une approximation de nos données " $D_{\text{exp.}}$ ":

$$D_{\text{exp.}} \equiv h(t) = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + a_3 t^3 + a_4 t^4 + \dots \quad :20$$

On peut alors combiner les équations (2) et (20) comme suit:

$$D_{\text{exp.}} \equiv C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) \equiv a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + a_3 t^3 + a_4 t^4 + \dots \quad :21$$

On se rappelle que nous avons vu plus haut qu'il était inutile de dériver l'équation (2), (ce qui correspond au deuxième terme de l'équation (21)), pour éliminer le niveau constant car lorsque nous prenions le logarithme pour résoudre notre équation, la dérivée de nos données expérimentales nous causait de sérieux problèmes. Mais maintenant avec la venue de l'équation (21) nous pouvons retenter l'expérience, car le terme de droite nous offre une alternative au problème relié aux données expérimentales. Ainsi dérivons l'équation (21) par rapport au temps pour en éliminer le niveau constant et voyons ce qui en résulte:

$$D'_{\text{exp.}} \equiv \frac{B}{A} \exp\left(\frac{t}{A}\right) \equiv a_1 + 2 a_2 t^1 + 3 a_3 t^2 + 4 a_4 t^3 + \dots \quad :22$$

Examinons maintenant le logarithme de cette équation:

$$\ln(D'_{\text{exp.}}) \equiv \ln\left(\frac{B}{A} \exp\left(\frac{t}{A}\right)\right) \equiv \ln\left(a_1 + 2 a_2 t^1 + 3 a_3 t^2 + 4 a_4 t^3 + \dots\right)$$

$$\ln(D'_{\text{exp.}}) \equiv \ln\left(\frac{B}{A}\right) + \left(\frac{t}{A}\right) \equiv \ln\left(a_1 + 2 a_2 t^1 + 3 a_3 t^2 + 4 a_4 t^3 + \dots\right) \quad :23$$

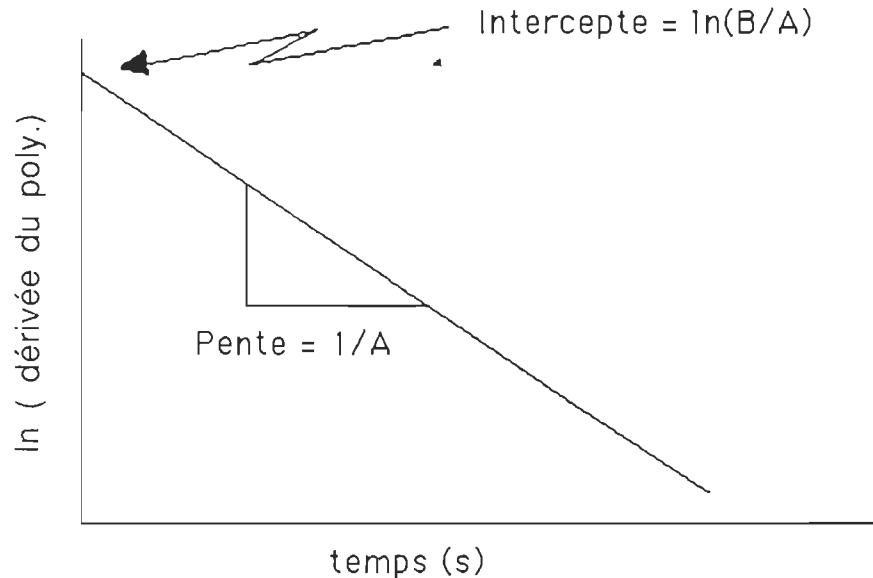
:24

On s'aperçoit avec cette équation, que l'embûche dressée avec les dérivées de nos données expérimentales tantôt positives, tantôt négatives, peut être palliée par la partie droite de l'équation (24). Ainsi, notre courbe expérimentale est bruyante et irrégulière, ce qui cause l'oscillation entre des valeurs positives et négatives de la dérivée d'un point à l'autre de la courbe. Mais notre approximation polynomiale est lisse et représente une courbe que nous

considérons comme une exponentielle décroissante, alors la dérivée de notre polynôme devrait garder le même signe. Ainsi, puisque la dérivée de notre polynôme est de signe constant, il suffit d'en faire le logarithme pour en tirer un graphique linéaire, puisque le terme central de l'équation (24) est de forme linéaire, et le graphique du logarithme aura l'allure suivante:

Note: Nous ne faisons le logarithme de la valeur absolue de la dérivée du polynôme que si elle est négative, car comme nous l'avons déjà cité, le logarithme réel d'un nombre négatif ne se fait pas.

Figure 3.1
Graphique du logarithme de la dérivé de l'approximation polynomiale
de la courbe expérimentale.



Il est bien évident que le polynôme que nous mettons en graphique n'est qu'une approximation d'une forme exponentielle et de ce fait, nous n'aurons pas une droite aussi parfaite que le graphique ci-haut. Nous obtiendrons plutôt une courbe que nous devrons approximer par une droite avec la méthode du moindre carré linéaire de premier ordre. De la droite que nous aurons ajustée nous tirerons les valeur de la pente et de l'intercepte qui sont respectivement "1/A" et "In(B/A)".

Comme nous le voyons, du graphique précédent nous tirons deux paramètres de l'équation (2) , c'est-à-dire le temps de vie de l'inverse de la pente:

$$A = 1/\text{pente} \quad :25$$

et le facteur de l'exponentielle "B" de la façon suivante:

$$B = A * \exp(\text{intercepte}) \quad :26$$

Mais il nous manque le paramètre "C" et pour le trouver c'est ici qu'entrera en jeux l'expression polynomiale d'une exponentielle c'est-à-dire l'équation (18):

$$C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) = E + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^2}{2!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^3}{3!} + B \frac{\left(\frac{t}{A}\right)^4}{4!} + \dots \quad :18$$

Dans cette équation nous avons le terme "E" qui contient le paramètre "C":

$$E = C + B$$

:17

Or si nous prenons notre équation (21):

$$D_{\text{exp.}} \approx C + B \exp\left(\frac{t}{A}\right) \approx a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + a_3 t^3 + a_4 t^4 + \dots$$

:21

Alors nous voyons que nous pouvons associer terme à terme les deux séries des équations (18) et (21) et ainsi associer le terme "E" de l'équation (18) au terme "a₀" de l'équation (21), d'où:

$$a_0 = E = C + B$$

:27

Et ainsi:

$$C = a_0 - B$$

:28

Nous avons donc surmonté nos problèmes du niveau constant de nos courbes expérimentales et trouvé tous les paramètres qui expriment nos données sous forme exponentielle, grâce à l'ajustement de courbe par moindre carré allié à l'expression polynomiale d'une exponentielle par série de Taylor.

Pour montrer un exemple du travail que cette méthode peut effectuer, nous avons procédé au traitement d'une courbe théorique, à laquelle nous avons ajouté cent pour cent de bruit. La courbe avait pour paramètres une amplitude de 100, un niveau de base de 50 et un temps de vie de 500. Si nous avions utilisé

comme méthode de traitement le logarithme des points, en leur soustrayant au préalable le niveau de base de la courbe trouvé de façon manuelle, alors il nous aurait fallu utiliser une courbe théorique s'étalant sur au moins dix temps de vie. C'est-à-dire que nous aurions eu besoin de cinq temps de vie pour nous assurer que la décroissance est à toutes fins pratiques terminée, et cinq autres pour avoir une idée raisonnable du niveau de base à travers tout ce bruit. Par contre avec la méthode décrite dans cette section, nous n'avons utilisé la courbe théorique que sur une longueur de deux temps de vie et évidemment sans nous soucier si la courbe avait atteint son niveau de base. Les résultats obtenus sont très bons, mais à vous d'en juger par le tableau et la figure qui suivent:

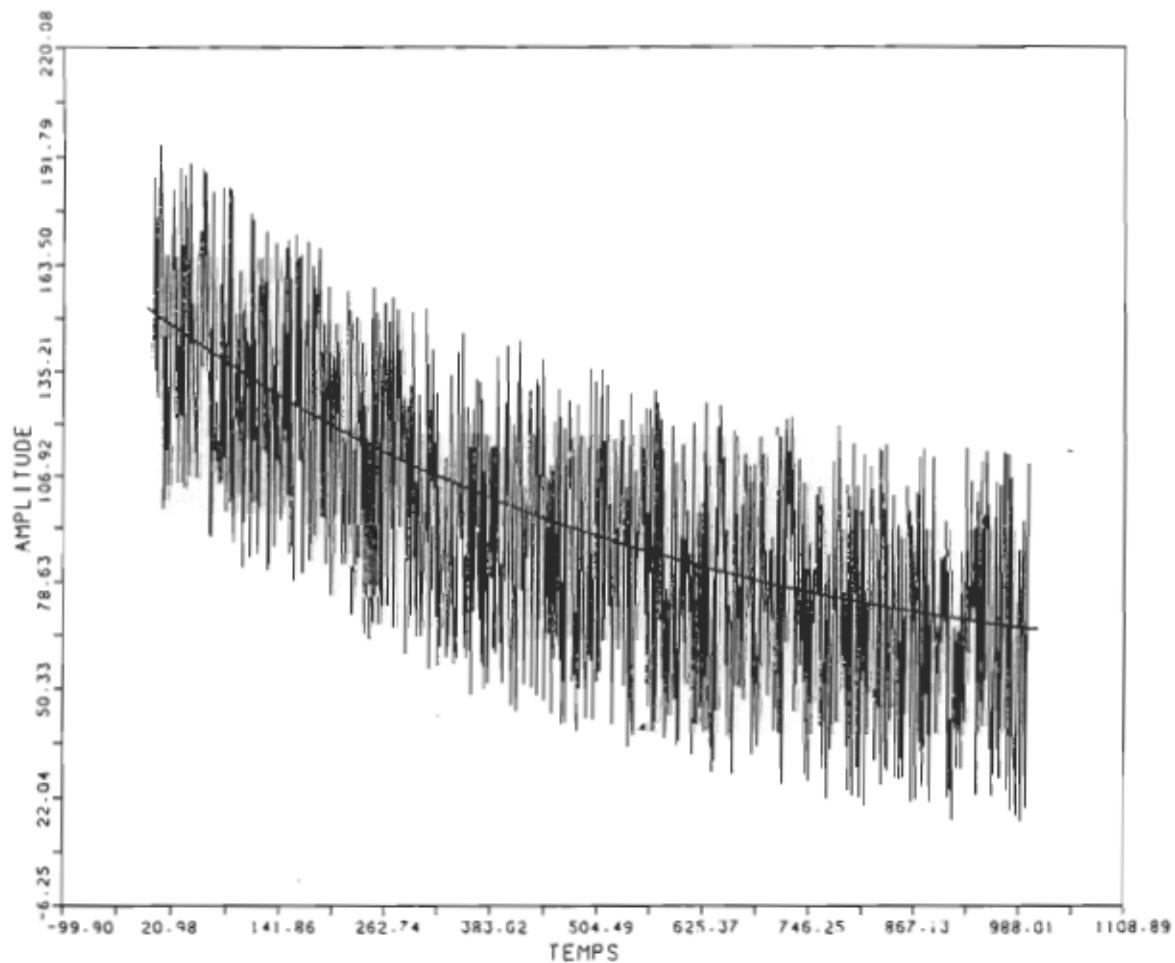
Tableau 3.1

Résultats du traitement d'une exponentielle théorique avec 100% de bruit
par la méthode du moindre carré et sa série de Taylor

	Théorique	Numérique
Temps de vie	500	562
Amplitude	100	102
Niveau constant	50	49

Figure 3.2

Ajustement d'une exponentielle par la méthode du moindre carré et sa série de Taylor.



3.3 - Méthodes numériques de raffinement des paramètres.

La section précédente nous enseigne une belle méthode pour déterminer les paramètres des exponentielles qui décrivent les courbes expérimentales que nous recueillons. Les résultats obtenus sont très bons et nous prenons soins de vérifier leur allure en traçant la courbe trouvée de façon numérique superposée à la courbe expérimentale, afin de constater que les deux courbes se ressemblent suffisamment et que l'approximation est bonne.

Mais c'est précisément avec cette dernière manoeuvre de vérification que l'on constate qu'il y a place à l'amélioration. C'est ainsi que nous avons cherché des méthodes numériques qui, à partir des paramètres obtenus par la méthode précédente, pourraient raffiner ces derniers, selon un critère choisi, pour en tirer des courbes d'ajustements encore meilleures.

Pour ce faire nous avons opté pour la méthode du moindre carré comme critère de raffinement de nos paramètres afin que notre approximation numérique s'approche au mieux de la courbe expérimentale. Nous appliquerons le critère des moindres carrés comme suit:

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (f(t_i) - D_{exp,i})^2}{N} :29$$

χ^2 = chi carré

$D_{exp,i}$ = données expérimentales

$f(t)$ = approximation théorique ou modèle expérimental

N = nombre de données expérimentales

L'équation (29) représente donc la somme des écarts au carré entre la courbe expérimentale et l'approximation théorique. Réécrivons l'équation (29) en substituant $f(t)$ par le modèle que nous utilisons (voir équation (1) section (3.2)):

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \left[(C + B \exp(t_i/A)) - D_{\text{exp},i} \right]^2}{N} : 30$$

Maintenant pour répondre au critère du moindre carré, il nous faut ajuster les paramètres "C", "B" et "A" de telle sorte que le χ^2 soit le plus petit possible. Pour ce faire, nous dériverons l'équation (30) par rapport aux trois variables mentionnées ci-haut:

$$d(\chi^2) = \frac{\partial(\chi^2)}{\partial C} dC + \frac{\partial(\chi^2)}{\partial B} dB + \frac{\partial(\chi^2)}{\partial A} dA : 31$$

$$\begin{aligned} d(\chi^2) &= \frac{2}{N} \sum_{i=1}^N \left[(C + B \exp(t_i/A)) - D_{\text{exp},i} \right] dC \\ &\quad + \frac{2}{N} \sum_{i=1}^N \left[(C + B \exp(t_i/A)) - D_{\text{exp},i} \right] \exp(t_i/A) dB \\ &\quad - \frac{2}{N} \sum_{i=1}^N \left[(C + B \exp(t_i/A)) - D_{\text{exp},i} \right] \frac{t_i}{A^2} B \exp(t_i/A) dA \end{aligned} : 32$$

Ainsi pour minimiser l'équation (30) et par conséquent avoir la dérivée du χ^2 (équation (32)) égale à zéro, nous devons trouver les valeurs des paramètres qui feront que les trois termes de l'équation (32) seront à zéro simultanément car les variables "A", "B" et "C" sont linéairement indépendantes.

Nous pouvons donc représenter l'équation (32) sous la forme d'un système de trois équations comme suit:

$$\frac{2}{N} \sum_{i=1}^N [(C + B \exp(t_i/A)) - D_{\text{exp.}, i}] dC = 0 \quad :33$$

$$\frac{2}{N} \sum_{i=1}^N [(C + B \exp(t_i/A)) - D_{\text{exp.}, i}] \exp(t_i/A) dB = 0 \quad :34$$

$$- \frac{2}{N} \sum_{i=1}^N [(C + B \exp(t_i/A)) - D_{\text{exp.}, i}] \frac{t_i}{A^2} B \exp(t_i/A) dA = 0 \quad :35$$

Mais ce système de trois équations n'est pas linéaire et ne peut se résoudre de façon analytique. Il nous faudra donc une méthode numérique pour localiser le minimum de notre équation (30). Les deux sous-sections qui suivent présentent chacune une méthode numérique de recherche de maximum ou de minimum d'une fonction. La première méthode illustrée (section 3.3.1) n'est pas très utile pratiquement mais importante, autant pour rendre compte de notre démarche historique, que pour la compréhension de la deuxième méthode (section 3.3.2).

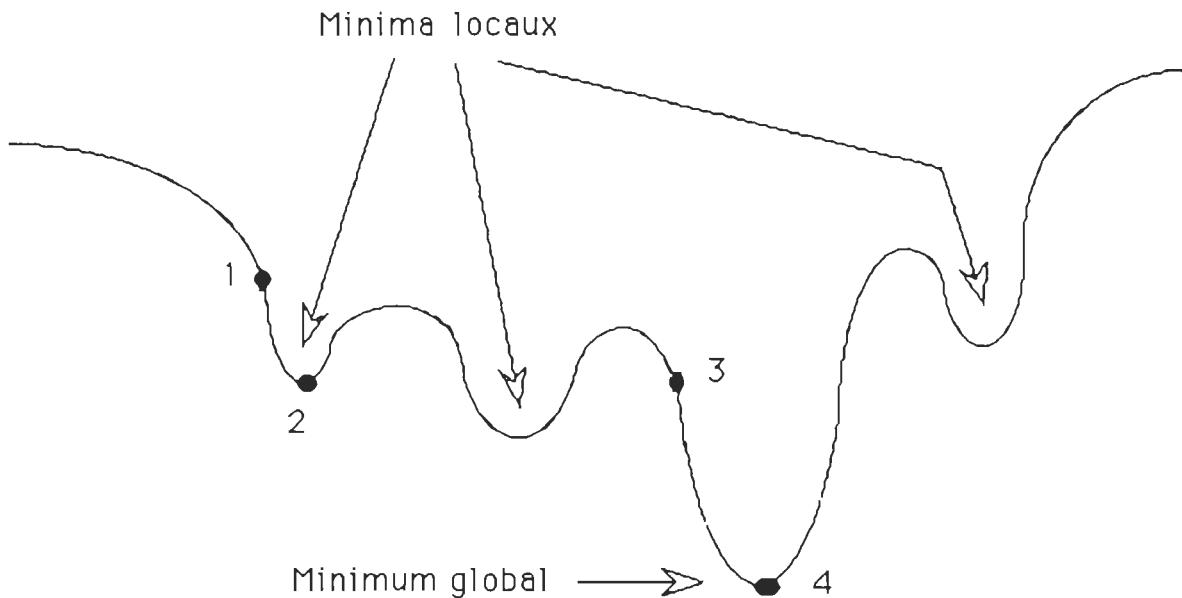
3.3.1 - Méthode du gradient simple.

Une façon de faire pour trouver le minimum d'une fonction, est de se servir du gradient de cette fonction comme direction de recherche de son minimum. En effet le gradient indique la pente maximum d'une fonction en un point. Ce gradient pointe dans la direction de l'accroissement maximum de la fonction; donc il suffit d'aller en sens inverse pour se diriger vers une diminution de cette fonction. Mais, ceci ne se fait pas en une seule tentative, il faut bien au contraire plusieurs itérations de ce processus de recherche.

La fonction que nous avons à minimiser, c'est celle du chi carré de l'équation (30). Nous pouvons imaginer cette fonction comme étant une surface dont nous devons localiser le point le plus bas, car comme nous le rappelons, c'est à cet endroit que la somme des écarts au carré entre la courbe expérimentale et la courbe théorique sera la plus faible. Imaginons aussi que cette surface est dans un système d'axes représentés par les paramètres de la fonction à minimiser et le χ^2 ; il y aura donc un axe des "A", "B", "C" et χ^2 . Nous dirons donc que notre surface est représentée dans l'espace des paramètres qui est de même dimension que notre système d'axes qui dans notre cas est de dimension quatre.

A présent que nous avons imaginé notre fonction sous forme de surface et que nous savons bien ce que nous voulons, on peut maintenant procéder à la recherche de notre minimum. Mais avant, il nous faut tout d'abord un point de départ pour commencer nos recherches, car puisque que notre surface s'étend à l'infini, il vaudrait mieux ne pas s'aventurer aussi loin de risque de ne plus en revenir. Dans notre cas, notre point de départ nous sera fourni par la méthode précédente et il nous faudra souhaiter que cette estimation ne nous mène pas directement vers la découverte d'un minimum local. La figure qui suit montre ce que nous voulons dire par minimum local:

Figure 3.3
Représentation de minima locaux



Ainsi, si notre point de départ est situé comme au point 1 de la figure précédente et que nous cherchions numériquement pas à pas par la méthode du gradient le minimum de cette fonction, nous n'arriverions pas au minimum global de la fonction représenté par le point 4 mais plutôt au point 2 qui est un minimum local. Le plus troublant c'est que nous n'avons aucun moyen de reconnaître à l'avance si notre point de départ nous mènera vers un minimum local puisque nous connaissons la fonction mais pas son allure. Mais ce n'est pas catastrophique comme problème car, notre première méthode, en plus d'être de bonne qualité, comporte toujours une vérification visuelle entre la courbe expérimentale et l'approximation théorique. Or si l'approximation passe dans le

bruit et ressemble à la courbe expérimentale, alors nous pouvons assumer que cette approximation nous donnera un bon point de départ qui sera localisé dans le bon creux de la fonction qui mène à son minimum global, comme par exemple le point 3 de la figure précédente.

Ainsi comme nous venons de le mentionner, nous tirons de la méthode de la section (3.2) notre point de départ que nous appelons $x_0 = (A_0, B_0, C_0)$. Procédons maintenant à l'évaluation du gradient de notre fonction à ce point. On définit traditionnellement le gradient d'une fonction dans un système quelconque i,j,k comme suit:

$$\nabla f = \frac{\partial f}{\partial x} \hat{i} + \frac{\partial f}{\partial y} \hat{j} + \frac{\partial f}{\partial z} \hat{k} \quad :36$$

Ceci deviendra pour nous, en substituant les axes i,j,k par A,B,C et en l'appliquant à notre fonction:

(note: nous identifierons le gradient de notre fonction par la lettre "g" pour simplifier la formulation.)

$$\vec{g} = \nabla \chi^2 = \frac{\partial \chi^2}{\partial A} \hat{A} + \frac{\partial \chi^2}{\partial B} \hat{B} + \frac{\partial \chi^2}{\partial C} \hat{C} \quad :37$$

Si on effectue chaque dérivée partielle individuellement et qu'on les évalue au point x_0 nous aurons la valeur des trois composantes du gradient au point x_0 comme suit:

$$\frac{\partial \chi^2(x_0)}{\partial A} = - \frac{2}{N} \sum_{i=1}^N \left[\left(C_0 + B_0 \exp \left(t_i / A_0 \right) \right) - D_{\text{exp.}} \right] \frac{t_i}{A} B_0 \exp \left(t_i / A_0 \right) \quad :38$$

$$\frac{\partial \chi^2(x_0)}{\partial B} = \frac{2}{N} \sum_{i=1}^N \left[\left(C_0 + B_0 \exp\left(\frac{t_i}{A_0}\right) \right) - D_{\text{exp},i} \right] \exp\left(\frac{t_i}{A_0}\right)$$
:39

$$\frac{\partial \chi^2(x_0)}{\partial C} = \frac{2}{N} \sum_{i=1}^N \left[\left(C_0 + B_0 \exp\left(\frac{t_i}{A_0}\right) \right) - D_{\text{exp},i} \right]$$
:40

Maintenant, comme nous le mentionnions au début de cette section, la valeur négative du gradient nous indique la direction dans laquelle nous devons procéder aux recherches pour minimiser notre fonction. Donc la direction qui nous intéresse sera ceci:

$$\vec{\mu} = -\vec{g}$$
:41

A présent que nous possédons une direction de recherche il nous faut minimiser la fonction dans cette direction. Nous ajouterons donc un incrément dans la direction de recherche au point de départ et nous ajusterons cet incrément de telle sorte qu'il minimise la fonction dans cette direction. A cet endroit nous aurons un deuxième point qui pourra servir à une prochaine itération. Représentons mathématiquement ce que nous venons de dire. Ainsi le deuxième point de recherche sera ceci:

$$\vec{x}_1 = \vec{x}_0 + \vec{\Delta x}$$
:42

Puisqu'il faut que l'incrément " Δx " soit dans la direction négative du gradient, nous le déduirons à partir d'une combinaison linéaire avec le vecteur " μ " comme suit:

$$\vec{\Delta x} = \lambda \vec{\mu}$$

:43

d'où l'équation (42) deviendra à l'aide de l'équation (43):

$$\vec{x}_1 = \vec{x}_0 + \lambda \vec{\mu}$$

:44

On voit de l'équation précédente que nous n'avons qu'un seul paramètre à ajuster afin que notre fonction soit minimum au point x_1 dans la direction " μ ". Ainsi dans le cas où la fonction est minimum au point x_1 sa dérivée à ce même point sera donc nulle. D'où:

$$\frac{\partial \chi^2}{\partial \lambda}(\vec{x}_1) = \frac{\partial \chi^2}{\partial \lambda}(\vec{x}_0 + \lambda \vec{\mu}) = 0$$

:45

Si on regarde bien l'équation (45) nous sommes vite tenté de penser, qu'en développant le terme central, nous pourrions isoler notre terme variable " λ " et ainsi le déterminer analytiquement. Mais la réalité est malheureusement tout autre vu la complexité de l'équation en cause. Il nous faudra donc encore une fois procéder de façon numérique et itérative en évaluant notre fonction pour différents " λ " pour enfin choisir celui que nous considérerons comme donnant le point " x_1 ". Bien sûr il nous faudra user de critères pour la sélection de nos " λ " pour respecter l'équation (46), afin qu'il y ait diminution de la fonction:

$$\chi^2(\vec{x}_0) \geq \chi^2(\vec{x}_0 + \lambda \vec{\mu})$$

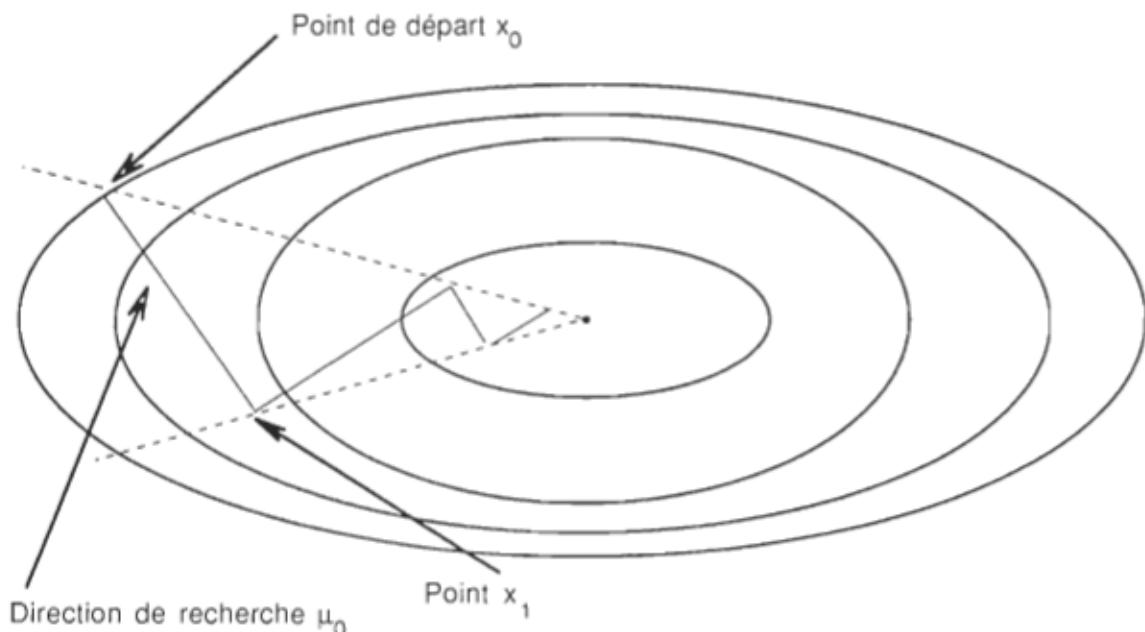
:46

Ainsi une valeur de départ pour " λ " trop élevée ou un incrément exagéré lors des itérations fera que nous risquerons de ne pas respecter la condition de l'équation (46) et que nous irons trop loin de l'autre côté de notre creux, de sorte que nous pourrions nous retrouver dans un minimum local à proximité. A l'inverse des itérations avec incrément minuscule feront en sorte que le temps de calcul sera immense pour arriver à une réponse satisfaisante de x_1 . Bien sûr il n'y a pas de critères fixes et tout dépend de nos courbes expérimentales et c'est pourquoi la qualité de ces critères va directement avec l'expérience de l'expérimentateur à bien saisir et à bien traiter ses résultats.

Après avoir localisé le deuxième point x_1 et considéré que la valeur du χ^2 ne nous satisfait pas, on peut la diminuer de façon significative, et recommencer une autre recherche dans une autre direction et ainsi de suite. La figure qui suit montre ce dont peut avoir l'air la recherche d'un minimum, à l'aide de la représentation d'une parabole à trois dimensions par courbes de niveaux:

Figure 3.4

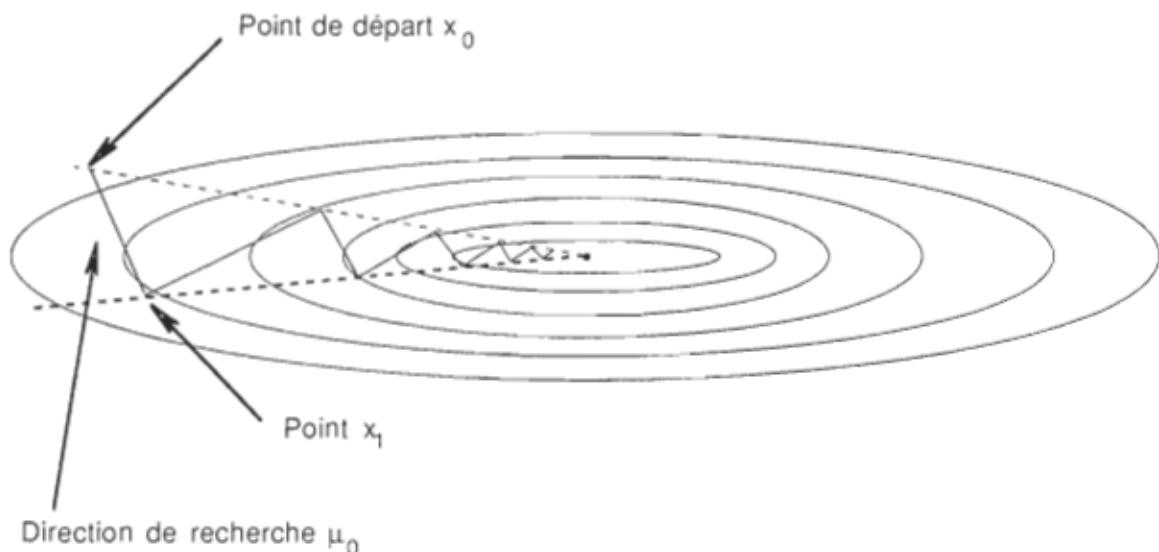
Représentation de la recherche du minimum d'une parabole par gradient simple.



Nous remarquons vite qu'il faut beaucoup d'itérations avec des trajectoires différentes pour arriver à une valeur près du minimum d'une fonction ce qui dévore énormément de temps de calcul sur ordinateur. Ce problème empire lorsque nos fonctions ressemblent à des vallées étroites car le nombres d'itérations augmente très vite et la méthode devient vite inutilisable. La figure suivante montre ce que nous voulons dire:

Figure 3.5

Représentation de la recherche du minimum d'une vallée étroite.



Ainsi, lors de l'application de cette méthode à nos résultats expérimentaux, nous sommes vite venus à la conclusion que nous ne pouvions utiliser ce procédé d'itération dans une vie humaine à cause de son temps de calcul énorme. Ceci est dû à l'allure de nos courbes en forme de vallées étroites et aussi à notre grand nombre de données numériques par courbe (autour de 16000), ce qui n'arrange rien dans nos calculs itératifs de sommation dans la fonction du chi carré. Il y a, par dessus tout, l'établissement de nos critères pour notre paramètre lambda " λ " dans la recherche du minimum dans une direction " μ " donnée et le critère d'arrêt de recherche lorsque le minimum est atteint. Il nous a donc fallu penser à une autre méthode que nous décrivons dans la section suivante.

3.3.2 - Méthode du gradient conjugué.

La méthode du gradient conjugué est à la fois de principe simple et de très grande puissance. C'est une méthode que l'on qualifie de deuxième ordre puisqu'elle converge vers le minimum d'une fonction à la puissance deux. Ainsi, contrairement à la méthode du gradient simple, nous pouvons avec une telle méthode trouver le minimum d'une fonction parabolique en " n " itérations, " n " étant le nombre de paramètres de la fonction. Bien sûr dans la vraie vie, il nous faut quelques itérations de plus... mais seulement quelques-unes. C'est que la fonction du chi carré n'est pas vraiment de forme parabolique et il faut donc en faire une approximation par une parabole. Cependant la convergence de la méthode du gradient conjugué reste quand même extrêmement rapide et il ne faut en moyenne que six à huit itérations pour obtenir un largement satisfaisant.

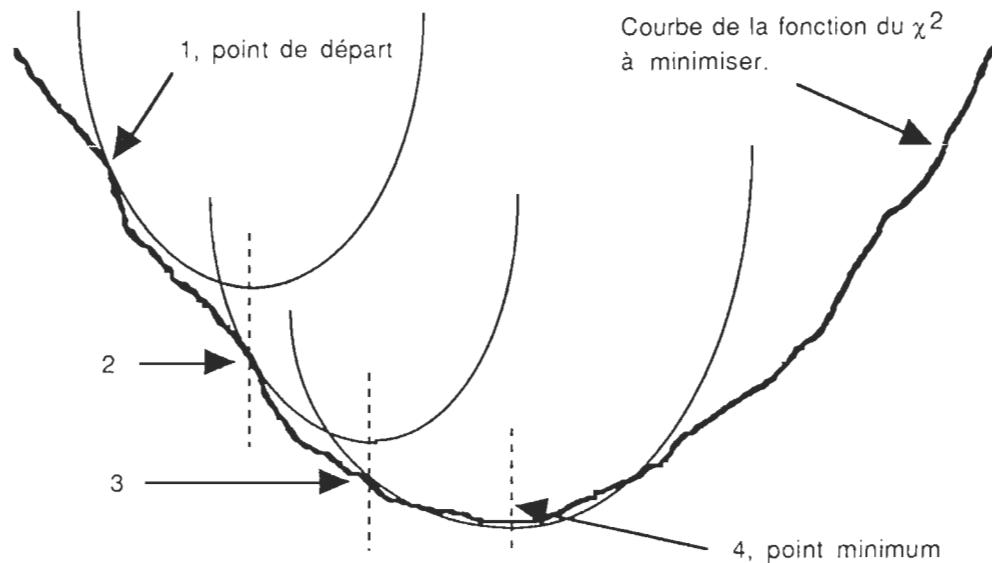
Comme nous venons de le mentionner, il nous faut faire une approximation parabolique du chi carré à minimiser car, comme son nom l'indique, cette méthode utilise comme directions de recherche du minimum d'une fonction, des directions conjuguées. Ce sont ces directions conjuguées, qui seront discutées en détail plus tard, qui sont la clef de l'efficacité de cette méthode et qui nous permettent de trouver le minimum d'une fonction parabolique de " n " paramètres en " n " itérations mais, comme il est dit, cela ne fonctionne que pour une parabole.

Or nous exprimons la fonction du chi carré sous forme de série, en la développant en série de Taylor autour d'un point. Cette série développée à l'infini n'est pas une approximation mais elle est exactement égale à la fonction. L'approximation en parabole vient lorsque l'on tronque le développement en série

pour n'en conserver que les trois premiers termes. Ainsi ces trois termes représentent une équation d'ordre deux qui est une parabole. Maintenant, de cette parabole, nous pourrons facilement trouver son minimum puisqu'elle est bien connue et ainsi minimiser notre fonction de départ. Bien entendu il ne faut pas s'attendre à trouver le minimum du chi carré du premier coup avec une seule approximation du deuxième ordre par série de Taylor. L'approximation que l'on fait ne tient que sur un petit intervalle de la fonction à minimiser et cet intervalle est d'autant plus petit que notre fonction ne ressemble pas à une parabole. Or après avoir fait une première approximation de la fonction par une parabole et avoir obtenu un premier minimum, il nous faudra probablement recommencer le processus pour avoir une meilleure évaluation du minimum de la fonction.

Voyons schématiquement par un graphique à deux dimensions ce à quoi ressemblerait la recherche d'un minimum par gradient conjugué:

Figure 3.6
Exemple de recherche par gradient conjugué.



On voit de la figure précédente qu'au point 1, pris comme point de départ de nos recherches, nous approximons la fonction par une parabole. Puis on trouve le minimum de cette parabole et on reporte ce minimum sur la fonction du chi carré, ce qui forme le point deux. Le point deux n'étant pas une réponse satisfaisante nous décidons de pousser notre processus de recherche un peu plus loin pour tenter d'améliorer notre évaluation du minimum de la fonction. Ainsi nous répétons la démarche itérative jusqu'au point 4 qui nous semble une réponse satisfaisante et ce, selon la rigueur des critères que l'on se fixe. Le critère que nous utilisons pour justifier la fin de nos recherche est simplement le calcul de la dérivée du chi carré au point en cause. On sait qu'au minimum exact d'une fonction la dérivée de cette dernière est nulle. Mais puisque nous effectuons des recherches numériques nous ne pouvons que tendre vers ce

minimum et c'est pourquoi la dérivée ne sera jamais nulle. Or il nous suffit simplement de décider à partir de quelle grandeur nous considérerons que la dérivée est suffisamment petite pour estimer que nous sommes au minimum de la fonction.

3.3.2.1-Expression matricielle d'une parabole à "n" dimensions.

Avant d'aller plus loin dans l'explication du gradient conjugué, il nous sera très utile d'être familier avec la notation matricielle d'une parabole à "n" dimensions ou en d'autres termes à "n" variables indépendantes. Pour commencer nous savons que l'équation générale d'une parabole à une dimension est donnée par:

$$F(x) = ax^2 + bx + c \quad :47$$

Permettons-nous d'écrire l'équation (47) sous la forme qui suit pour des fins d'analogies ultérieures, (qui nous paraîtront évidentes), avec notre notation matricielle.

$$F(x) = xax + bx + c \quad :48$$

Les dérivées première et seconde de l'équation (48) sont données par:

$$F'(x) = 2ax + b \quad :49$$

$$F''(x) = 2a \quad :50$$

Nous montrerons dans les lignes qui viennent, que nous pouvons obtenir les mêmes formes que dans les équations (48), (49) et (50) pour des paraboles à plusieurs dimensions et ceci en utilisant la notation matricielle. Nous baserons notre démarche sur l'étude d'une parabole à deux dimensions pour faciliter notre démarche mathématique et ensuite nous généraliserons à "n" dimensions.

Nous décrivons mathématiquement une parabole à deux variables indépendantes dans sa forme la plus générale de la façon suivante:

$$F(x_1, x_2) = a{x_1}^2 + b{x_2}^2 + cx_1x_2 + dx_1 + ex_2 + f \quad :51$$

Tentons maintenant d'exprimer les trois premiers termes de l'équation (51) par l'équation matricielle suivante:

$$P = \begin{bmatrix} x_1 & x_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a & c \\ c & b \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} \quad :52$$

Puis effectuons explicitement ce produit matriciel pour voir ce à quoi il ressemble:

$$P = \begin{bmatrix} x_1a + x_2c & x_1c + x_2b \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} \quad :53$$

$$P = ax_1^2 + bx_2^2 + cx_1x_2 + dx_1 + ex_2 + f \quad :54$$

$$P = ax_1^2 + bx_2^2 + 2cx_1x_2 \quad :55$$

Nous voyons que nous obtenons une forme identique aux trois premiers termes de l'équation (51) à l'exception du facteur deux du produit croisé de $x_1 x_2$. Or nous pourrions dorénavant écrire la forme générale d'une parabole en utilisant un facteur deux devant le terme du produit croisé des variables indépendantes sans changer rien dans la généralité de l'équation. Ainsi nous n'écrirons plus $F(x_1 x_2)$ à la façon de l'équation (51) mais plutôt comme ceci:

$$F(x_1, x_2) = ax_1^2 + bx_2^2 + 2sx_1x_2 + dx_1 + ex_2 + f \quad :56$$

$$\text{où } 2s = c \quad :57$$

De cette façon nous pouvons écrire l'équation (55) à l'aide de l'équation matricielle du même type que "P" mais en prenant soin de changer la variable "c" par "s", ce qui donnera:

$$G = \begin{bmatrix} x_1 & x_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a & s \\ s & b \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} \quad :58$$

$$F(x_1, x_2) = G + dx_1 + ex_2 + f \quad :59$$

A partir d'ici, on voit vite que les deuxième et troisième termes de (59) peuvent facilement être écrits par le produit matriciel suivant:

$$\begin{bmatrix} d & e \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} = dx_1 + ex_2 \quad :60$$

Maintenant des équations (58) et (59) dans (60) on obtient:

$$F(x_1, x_2) = [x_1 \ x_2] \begin{bmatrix} a & s \\ s & b \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} + [d \ e] \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} + f \quad :61$$

A présent, nommons les matrices de l'équation (61):

$$X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \end{bmatrix} \quad :62$$

$$A = \begin{bmatrix} a & s \\ s & b \end{bmatrix} \quad :63$$

$$B = \begin{bmatrix} d \\ e \end{bmatrix} \quad :64$$

$$C = f \quad :65$$

Nous pouvons réécrire (61) sous la forme matricielle suivante;

$$F(x_1, x_2) = X^t A X + B^t X + C \quad :66$$

Note: L'indice "t" au dessus du symbole d'une matrice, signifie que c'est la transposée de cette matrice.

Nous avons, pour ne rien vous cacher, pris intentionnellement les lettres majuscules "A", "B" et "C" pour rendre visible l'analogie entre la forme polynomiale de l'équation (48) et la forme matricielle de l'équation (66).

Procérons maintenant à l'établissement de la dérivée première de $F(x_1, x_2)$ à partir de l'équation (56):

$$F(x_1, x_2) = ax_1^2 + bx_2^2 + 2sx_1x_2 + dx_1 + ex_2 + f \quad :56$$

Ecrivons la différentielle d'une fonction à une variable:

$$dF(x) = F(x) dx \quad 67$$

Maintenant écrivons-la pour deux variables:

$$dF(x_1, x_2) = \frac{\partial F}{\partial x_1} dx_1 + \frac{\partial F}{\partial x_2} dx_2 \quad :68$$

On voit que l'on peut écrire l'équation (68) sous forme matricielle comme suit:

$$dF(x_1, x_2) = \begin{bmatrix} \frac{\partial F}{\partial x_1} & \frac{\partial F}{\partial x_2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} dx_1 \\ dx_2 \end{bmatrix} \quad :69$$

Puis identifiant les matrices de (69) à des symboles nous aurons une expression matricielle de la dérivée totale d'une fonction à plusieurs variables:

$$D = \begin{bmatrix} \frac{\partial F}{\partial x_1} & \frac{\partial F}{\partial x_2} \end{bmatrix} : 70$$

$$dX = \begin{bmatrix} dx_1 \\ dx_2 \end{bmatrix} : 71$$

$$dF(x_1, x_2) = D dX : 72$$

Ensuite nous pouvons identifier par analogie les deux termes centraux des équations (67) et (72) et ainsi écrire:

$$\left(F(x_1, x_2) \right)' = D = \begin{bmatrix} \frac{\partial F}{\partial x_1} & \frac{\partial F}{\partial x_2} \end{bmatrix} : 73$$

Effectuons les dérivées partielles:

$$\frac{\partial F}{\partial x_1} = 2ax_1 + 2sx_2 + d : 74$$

$$\frac{\partial F}{\partial x_2} = 2bx_2 + 2sx_1 + e : 75$$

Par substitution de (74), (75) dans (73) nous avons:

$$\left(F(x_1, x_2) \right)' = [2ax_1 + 2sx_2 + d \quad 2bx_2 + 2sx_1 + e] : 76$$

Réarrangant (76) sous forme de l'addition de deux matrices nous avons:

$$\left(F'(x_1, x_2) \right)^t = 2 [ax_1 + sx_2 \quad bx_2 + sx_1] + [d \quad e] \quad : 77$$

Ecrivons maintenant la première matrice de (77) sous forme du produit de deux matrices:

$$\left(F'(x_1, x_2) \right)^t = 2 [x_1 \quad x_2] \begin{bmatrix} a & s \\ s & a \end{bmatrix} + [d \quad e] \quad : 78$$

Finalement on reconnaît la forme suivante des matrices A, B et X que nous avons nommées auparavant, qui est la dérivée première d'une parabole à "n" dimensions sous forme matricielle:

$$\left(F'(x_1, x_2) \right)^t = 2 X^t A + B^t \quad : 79$$

De la même façon que pour l'équation (79), on peut montrer que la dérivée seconde de $F(x_1, x_2)$ est égale à:

$$F''(x_1, x_2) = 2 A \quad : 80$$

$$F(x) = xax + bx + c \quad \dots \rightarrow F(\vec{x}) = X^t A X + B^t X + C \quad : 81$$

$$F(x) = 2xa + b \quad \dots \rightarrow F'(\vec{x}) = 2AX + B \quad : 82$$

$$F(x) = 2a \quad \dots \rightarrow F'(\vec{x}) = 2A \quad : 83$$

Avec cette façon d'écrire les quadratiques, on peut trouver directement le sommet d'une parabole. Ainsi sachant qu'à une dimension le minimum d'une parabole est:

$$X_{\text{sommel}} = - \frac{1}{2} b A^{-1}$$

:84

alors par analogie à "n" dimensions on aura:

$$X_{\text{sommel}} = - \frac{1}{2} B^T A^{-1}$$

:85

Mais pour des raisons qui nous sont encore obscures, on ne peut utiliser la simplicité de l'équation (85) en toute sécurité. On peut présumer que les difficultés de cette équation viennent de l'inversion de la matrice "A". Cette méthode directe est d'autant plus capricieuse que l'on tente de l'appliquer à un système plus complexe de plus d'une exponentielle. Voilà pourquoi nous procédons par une méthode plus complexe, mais pas plus compliquée, de recherche de sommets par gradient conjugué.

3.3.2.2 - Recherche du sommet d'une parabole par gradient conjugué.

On peut chercher le minimum d'une parabole en se servant du gradient simple, c'est-à-dire, comme nous avons vu auparavant, en prenant comme direction de recherche le sens opposé au gradient. Mais cette méthode est longue et laborieuse car elle nécessite une très grande quantité d'itérations pour arriver à une réponse satisfaisante. Par chance il existe une méthode de recherche du minimum d'une parabole, qui ne nécessite pas plus d'itérations que le nombre de variables indépendantes de la parabole. Ainsi par exemple nous passons de centaines d'itérations pour une parabole à trois variables indépendantes à trois itérations. Cette méthode est celle du gradient conjugué, c'est-à-dire à direction conjuguée ou à direction non interférentielle.

Ainsi ce que nous entendons par direction conjuguée, ce sont des directions qui nous permettent, lorsque l'on a trouvé un minimum selon l'une d'elles, de procéder à une autre recherche dans une autre direction sans altérer les minimums antérieurement trouvés dans les autres directions . En d'autres termes, si nous avons un point donné et une direction donnée " u_1 " alors nous commençons par trouver le minimum dans cette direction. Par conséquent, au point minimum selon " u_1 " la dérivée dans la direction de " u_1 " est nulle. Maintenant, ce qui nous intéresse, c'est de trouver une seconde direction de recherche " u_2 " qui garde pour tout point dans la direction de " u_2 " la dérivée directionnelle selon " u_1 " nulle. Alors à cette condition la direction " u_2 " est conjuguée à la direction " u_1 " et ainsi de suite pour toute autre direction

répondant à la même condition entre elles une à une. Or une autre direction "u₃" devra être conjuguée aussi bien à "u₁" qu'à "u₂".

Voyons maintenant mathématiquement comment on procède à la recherche de ces directions et par conséquent au minimum d'une parabole. Tout d'abord prenons l'équation générale d'une parabole à "n" dimensions où "n" est le nombre de variables indépendantes (l'équation (81) de la section précédente) :

$$F(\vec{x}) = X^T A X + B^T X + C \quad :81$$

où X est un vecteur symbolisé par une matrice colonne:

$$X = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_n \end{bmatrix} \quad :86$$

Il nous faut commencer nos recherches à partir d'un point de départ quelconque que nous nommerons X₁. Nous devons maintenant choisir une première direction de recherche qui peut être n'importe laquelle, mais pour une raison que nous verrons un peu plus loin, nous prendrons la direction du gradient de la parabole au point X₁. Ainsi le gradient est donné par:

$$\nabla F(\vec{x}_1) = \left[\frac{\partial F}{\partial x_1} \frac{\partial F}{\partial x_2} \dots \frac{\partial F}{\partial x_n} \right] \quad :87$$

Pour faciliter notre écriture nous noterons le gradient de "F" au point "i" par "g_i" d'où:

$$g_1 = \nabla F(\vec{x}_1)$$

:88

On voit de l'équation (73) que le gradient est égal à la dérivée de la fonction en question et que de l'équation (82) on peut immédiatement écrire:

$$g_1 = F'(X_1) = 2 A X_1 + B$$

:89

Note: Nous noterons donc la dérivée première de "F" au point X_i par g_i d'où:

$$F'(X_i) = g_i$$

:90

Nous appellerons cette première direction de recherche $u_1 = g_1 = F'(X_1)$.

:91

A présent nous voulons trouver un point X_2 à partir du point X_1 dans la direction u_1 qui soit le minimum de la parabole selon cette direction. Pour ce faire nous dirons que:

$$X_2 = X_1 + \Delta X$$

:92

C'est-à-dire que nous ajoutons un incrément ΔX à X_1 et de plus nous souhaitons que ΔX soit dans la direction de u_1 . Ceci implique que l'incrément ΔX est une combinaison linéaire du vecteur direction u_1 , ce qui mathématiquement se décrit comme suit:

$$\Delta X = \lambda_1 u_1$$

:93

Donc X_2 est égale à:

$$X_2 = X_1 + \lambda_1 u_1$$

:94

On sait aussi que le gradient de la fonction au minimum dans la direction de u_1 , c'est-à-dire au point X_2 que l'on cherche, sera nul dans cette dernière direction; d'où la nullité de la projection du gradient au point X_2 selon la direction u_1 , ce qui est décrit par l'équation suivante:

Note: Lorsque nous parlons de projection de deux vecteurs, nous voulons dire le produit scalaire de deux vecteurs qui sous forme matricielle est le produit des deux matrices représentant les dits vecteurs placés dans l'ordre de projection.

$$g_2^T u_1 = (2A X_2 + B)^T u_1 = 0$$

:95

Par distributivité:

$$g_2^T u_1 = 2 X_2^T A u_1 + B^T u_1 = 0$$

:96

Remplaçons X_2 par sa valeur (équation 94):

$$g_2^T u_1 = 2 \left(X_1^T + \lambda_1 u_1^T \right) A u_1 + B^T u_1 = 0$$

:97

Par distributivité:

$$g_2^t u_1 = 2 X_1^t A u_1 + 2 \lambda_1 u_1^t A u_1 + B^t u_1 = 0 \quad :98$$

On reconnaît du premier et du troisième terme de la partie centrale de l'équation (98), la dérivée première de "F" au point X_1 ou le gradient de "F" au point X_1 d'où:

$$g_2^t u_1 = g_1^t u_1 + 2 \lambda_1 u_1^t A u_1 = 0 \quad :99$$

On peut maintenant isoler λ_1 pour obtenir:

$$\lambda_1 = \frac{-g_1^t u_1}{2 u_1^t A u_1} \quad :100$$

La valeur de X_2 sera donc donnée par la substitution de l'équation (100) dans (94) pour ainsi donner:

$$X_2 = X_1 - \left[\frac{g_1^t u_1}{2 u_1^t A u_1} \right] u_1 \quad :101$$

Nous avons donc localisé le minimum de la fonction dans la direction u_1 ; à cet endroit, la dérivée de la fonction est nulle selon la direction u_1 puisque c'est le minimum. Mais, nous ne sommes pas encore au minimum global de la fonction et il nous faudra procéder autant de fois qu'il y a de variables indépendantes. Or la prochaine étape est de trouver une nouvelle direction de recherche u_2 qui, comme

nous l'avons dit auparavant, nous permettra de conserver la dérivée de la fonction selon u_1 nulle et ce pour tout point dans la direction u_2 . Nous représenterons mathématiquement cette condition comme suit:

Ainsi un point quelconque X_3 dans la direction u_2 à partir de X_2 sera défini comme suit:

$$X_3 = X_2 + \lambda_2 u_2 \quad :102$$

Puis la dérivée pour tout point X_3 projetée dans la direction u_1 devra être égale à zéro d'où:

$$F'(X_2 + \lambda_2 u_2)^t u_1 = 0 \quad :103$$

Du résultat de la dérivée d'une parabole (équation (82)) substitué dans (103) nous aurons:

$$\left[2 A(X_2 + \lambda_2 u_2) + B \right]^t u_1 = 0 \quad :104$$

Puis par distributivité:

$$\left[2 A X_2 + B + 2\lambda_2 A u_2 \right]^t u_1 = 0 \quad :105$$

Reconnaissant dans les deux termes de gauche la dérivée de la parabole au point X_2 nous écrirons:

$$\left[F(X_2) + 2\lambda_2 A u_2 \right] u_1 = 0$$

:106

Encore par distributivité:

$$\left[F(X_2) u_1 + 2\lambda_2 u_2^t A u_1 \right] = 0$$

:107

Maintenant on voit que le terme de gauche est nul, puisqu'il représente la dérivée au point X_2 qui, comme nous le disions plus haut, est nulle selon u_1 :

$$F(X_2) u_1 = g_2 u_1 = 0$$

:108

Il ne reste donc plus que le terme de droite qui devra être égal à zéro pour satisfaire l'égalité et donc:

$$u_2^t A u_1 = 0$$

:109

C'est du respect de cette condition que l'on dit que u_2 est conjugué à u_1 . Mais cette équation n'est pas suffisante à elle seule pour trouver u_2 ; il nous faut un autre apport d'information. Nous irons chercher cette autre information en définissant u_2 par rapport à une autre base de vecteurs linéairement indépendants que nous connaissons bien. Ainsi, de façon générale, on peut à partir d'une base de vecteurs linéairement indépendants "G", en construire une autre, "U", qui sera aussi linéairement indépendante de la façon suivante en posant $u_1 = g_1$:

$$u_i = g_i + \sum_{j=1}^{i-1} c_{ji} u_j \quad i = 2, \dots, n \quad :110$$

Note : ceci est une variante de la méthode d'orthogonalisation de Gram-Schmidt à la différence que c_{ji} n'est pas ajusté, de telle sorte que U soit une base orthogonale, mais, seulement une base linéairement indépendante qui fera en sorte que l'équation (109) soit respectée.

Il nous faut donc une base G que nous connaissons bien et que nous savons linéairement indépendante. Quoi de mieux dans notre cas que d'utiliser les gradients de la fonction à son point de départ et à tout ses autres points minimums que nous trouverons selon chaque direction de recherche. Ainsi à tous ces points, les gradients sont orthogonaux et forment nécessairement une base de vecteurs linéairement indépendants.

Maintenant écrivons (110) pour u_2 :

$$u_2 = g_2 + c_{12} u_1 \quad :111$$

où comme nous l'avons dit:

$$u_1 = g_1 = F'(X_1) \quad :112$$

$$g_2 = F'(X_2) \quad :113$$

Substituons maintenant (111) dans (109):

$$(g_2 + c_{12} u_1)^T A u_1 = 0 \quad :114$$

Par distributivité:

$$g_2^T A u_1 + c_{12} u_1^T A u_1 = 0 \quad :115$$

Et de l'isolement de c_{12} on a:

$$c_{12} = -\frac{g_2^T A u_1}{u_1^T A u_1} \quad :116$$

Maintenant de la substitution de (116) dans (111) :

$$u_2 = g_2 - \left[\frac{g_2^T A u_1}{u_1^T A u_1} \right] u_1 \quad :117$$

On a donc trouvé la nouvelle direction u_2 . Mais nous pouvons simplifier encore notre équation (117) car on peut montrer facilement de la façon qui suit que $Au_1 = (g_2 - g_1)/2\lambda_1$. Or, pour démontrer ceci nous établissons la différence entre deux gradients consécutifs:

$$g_{i+1} - g_i = F(X_{i+1}) - F(X_i) \quad :118$$

Puisque le point X_{i+1} est toujours donné à partir du précédent comme suit:

$$X_{i+1} = X_i + \Delta X_i$$

:119

on a donc en substituant (119) dans (118):

$$g_{i+1} - g_i = F(X_i + \Delta X_i) - F(X_i)$$

:120

De la définition de la dérivée première de "F" à un point quelconque X, (équation (82)), nous aurons:

$$g_{i+1} - g_i = 2A(X_i + \Delta X_i) + B - 2A(X_i) - B$$

:121

Par distribution et simplification des termes identiques il ne reste plus que :

$$g_{i+1} - g_i = 2A\Delta X_i$$

:122

Nous avons donc une équation générale pour tout "i". Dans le cas de notre équation (120) "i = 1" et $\Delta X_1 = \lambda_1 u_1$, ce qui remplacé dans (122) donne:

$$g_2 - g_1 = 2\lambda_1 A u_1$$

:123

et par isolement de $A u_1$:

$$\frac{g_2 - g_1}{2\lambda_1} = A u_1$$

:124

Il nous faut maintenant remplacer le résultat (124) dans l'équation (117):

$$u_2 = g_2 - \left[\frac{\begin{matrix} t \\ g_2 - g_1 \\ \hline 2 \lambda_1 \end{matrix}}{\begin{matrix} t \\ u_1 - g_1 \\ \hline 2 \lambda_1 \end{matrix}} \right] u_1$$
:125

Par distribution, simplification des dénominateurs et le remplacement de u_1 par g_1 car $u_1 = g_1$ comme première direction, on a:

$$u_2 = g_2 - \left[\frac{\begin{matrix} t \\ g_2 g_2 - g_2 g_1 \\ \hline t \\ g_1 g_2 - g_1 g_1 \end{matrix}}{\begin{matrix} t \\ t \\ \hline t \\ t \end{matrix}} \right] u_1$$
:126

Puisque les gradients aux points X_1 et X_2 sont orthogonaux, il va de soi que les produits scalaires des vecteurs "g" d'indices différents sont nuls d'où (126) devient:

$$u_2 = g_2 + \left[\frac{\begin{matrix} t \\ g_2 g_2 \\ \hline t \\ g_1 g_1 \end{matrix}}{\begin{matrix} t \\ t \\ \hline t \\ t \end{matrix}} \right] u_1$$
:127

On a maintenant une expression simple de notre nouvelle direction de recherche en des termes que nous connaissons bien. Il suffit à présent de recommencer le processus de recherche du minimum selon u_2 , de la même façon que nous avons localisé le minimum X_2 selon u_1 .

Ainsi nous voulons un point X_3 qui, à partir du point X_2 , soit minimum dans la direction de u_2 . Or comme nous avons fait précédemment, X_3 sera minimum dans la direction u_2 lorsque la projection du gradient au point X_3 selon u_2 sera nulle, d'où:

$$\mathbf{g}_3^T \mathbf{u}_2 = 0$$

:128

Le gradient au point X_3 étant égal à la dérivée première de "F" au même point, nous aurons de l'équation (82) dans (128):

$$(2A\mathbf{X}_3 + \mathbf{B})^T \mathbf{u}_2 = 0$$

:129

Puis en substituant \mathbf{X}_3 par l'équation (102) et en réarrangeant par distribution nous aurons:

$$2\mathbf{X}_2^T A \mathbf{u}_2 + 2\lambda_2 \mathbf{u}_2^T A \mathbf{u}_2 + \mathbf{B}^T \mathbf{u}_2 = 0$$

:130

Reconnaissant le gradient de "F" au point X_2 dans (130) et isolant λ_2 pour ensuite l'introduire dans la définition de X_3 (équation (102)), nous avons finalement le résultat donnant le point minimum X_3 dans la direction \mathbf{u}_2 :

$$\mathbf{X}_3 = \mathbf{X}_2 - \left[\frac{\mathbf{g}_2^T \mathbf{u}_2}{2 \mathbf{u}_2^T A \mathbf{u}_2} \right] \mathbf{u}_2$$

:131

Il nous faut maintenant poursuivre notre méthode du gradient conjugué en déterminant comme précédemment une nouvelle direction de recherche \mathbf{u}_3 . On définit donc un nouveaux point X_4 comme suit:

$$\mathbf{X}_4 = \mathbf{X}_3 + \lambda_3 \mathbf{u}_3$$

:132

Puis pour que u_3 soit une direction conjuguée, il faut que les projections de la dérivée première de "F" pour tout point X_4 dans la direction u_3 , sur u_1 et u_2 soient nulles, d'où:

$$\left[F(X_3 + \lambda_3 u_3) \right]' u_1 = 0 \quad :133$$

$$\left[F(X_3 + \lambda_3 u_3) \right]' u_2 = 0 \quad :134$$

En développant les équations (133) et (134) de la même façon que nous avons fait pour la recherche de u_2 , nous trouverons les deux équations suivantes qui sont les conditions pour que u_3 soit une direction conjuguée:

$$u_3' A u_1 = 0 \quad :135$$

$$u_3' A u_2 = 0 \quad :136$$

Maintenant les deux conditions précédentes n'étant pas suffisantes pour déterminer u_3 , il nous faut recourir encore une fois à l'équation (110) et l'écrire pour u_3 comme suit:

$$u_3 = g_3 + \sum_{j=1}^{3-1} c_j u_j \quad :137$$

En développant la sommation:

$$u_3 = g_3 + c_{13}u_1 + c_{23}u_2$$

:138

Maintenant nous avons un système de trois équations (135, 136 et 137) que nous voulons résoudre pour u_3 . Nous commencerons par la substitution de (137) dans (135):

$$g_3^t A u_1 + c_{13} u_1^t A u_1 + c_{23} u_2^t A u_1 = 0$$

:139

Puisque antérieurement nous avons choisi u_2 conjugué à u_1 il va de soi que le troisième terme de (139) est nul, et que nous pouvons isoler c_{13} de la façon suivante:

$$c_{13} = - \frac{g_3^t A u_1}{u_1^t A u_1}$$

:140

Revenant au résultat général que nous avons établi à l'équation (122), nous pourrons substituer Au_1 dans (140) par une différence de deux gradients et obtenir l'équation suivante:

$$c_{13} = - \frac{g_3^t g_2 - g_3^t g_1}{u_1^t g_2 - u_1^t g_1}$$

:141

Sachant que les gradients d'indices différents, c'est-à-dire à des points minimums différents sont orthogonaux, nous remarquons que le numérateur de (141) est nul, d'où :

$$c_{13} = 0 \quad :142$$

Maintenant continuons la résolution de notre système d'équations en substituant l'équation (138) dans (136):

$$g_3^t A u_2 + c_{13} u_1^t A u_2 + c_{23} u_2^t A u_2 = 0 \quad :143$$

Encore une fois puisque u_1 est conjugué à u_2 alors le deuxième terme de (143) est nul d'où:

$$c_{23} = - \frac{g_3^t A u_2}{u_2^t A u_2} \quad :144$$

Du résultat (122) on trouve que:

$$A u_2 = \frac{g_3 - g_2}{2 \lambda_2} \quad :145$$

Et de (145) dans (144) on arrive à:

$$c_{23} = - \frac{\frac{t}{g_3 g_3 - g_3 g_2}}{\frac{t}{u_2 g_3 - u_2 g_2}} \quad :146$$

Puisque les gradients d'indices différents sont orthogonaux et puisque le point X_3 est le minimum dans la direction u_2 , alors la composante du gradient selon u_2 au point X_3 est nulle, donc, u_2 est orthogonal à g_3 , d'où:

$$g_3^T g_2 = 0 \quad :147$$

$$u_2^T g_3 = 0 \quad :148$$

Et ainsi:

$$c_{23} = \frac{g_3^T g_3}{u_2^T g_2} \quad :149$$

Maintenant il ne reste plus qu'à remplacer (149) dans (138) pour finir de résoudre notre système d'équations et obtenir:

$$u_3 = g_3 + \left[\frac{g_3^T g_3}{u_2^T g_2} \right] u_2 \quad :150$$

On a donc trouvé une façon de déterminer la nouvelle direction u_3 , mais nous pouvons rendre ce résultat beaucoup plus pratique en vue d'une future forme itérative de la détermination des directions conjuguées. Il suffit de substituer u_2 au dénominateur de l'équation précédente par son expression de l'équation (127):

$$u_3 = g_3 + \left[\frac{t}{g_3 g_3} \right] u_2$$

$$\left[\left(g_2 + \left[\frac{t}{\frac{g_2 g_2}{t}} \right] u_1 \right) g_2 \right]$$

:151

Par distribution:

$$u_3 = g_3 + \left[\frac{t}{g_3 g_3} \right] u_2$$

$$\left[\frac{t}{g_2 g_2 + \left[\frac{t}{\frac{g_2 g_2}{t}} \right] u_1 g_2} \right]$$

:152

Puisque X_2 est minimum dans la direction u_1 , alors nous avons la relation d'orthogonalité suivante:

$$u_1^T g_2 = 0$$

:153

Et évidemment par substitution de (153) dans (152) on a:

$$u_3 = g_3 + \left[\frac{t}{g_3 g_3} \right] u_2$$

:154

Maintenant que nous avons une nouvelle direction de recherche, nous pourrions effectuer la détermination d'un point X_4 qui serait minimum selon cette dernière direction, puis trouver une autre direction et ainsi de suite "n" fois. Mais, si vous êtes comme moi, on se lasse vite de tous ces calculs répétitifs. Réunissons

plutôt tous nos résultats obtenus précédemment pour en tirer peut-être une forme itérative:

$$X_1 = \text{point de départ donné} \quad u_1 = g_1$$

$$X_2 = X_1 - \left[\frac{g_1^T u_1}{2 u_1^T A u_1} \right] u_1 \quad u_2 = g_2 + \left[\frac{g_2^T g_2}{g_1^T g_1} \right] u_1$$

$$X_3 = X_2 - \left[\frac{g_2^T u_2}{2 u_2^T A u_2} \right] u_2 \quad u_3 = g_3 + \left[\frac{g_3^T g_3}{g_2^T g_2} \right] u_2$$

Effectivement, nous voyons que l'on peut tirer les formes itératives suivantes:

$$X_1 = \text{point de départ donné}$$

$$\text{et posons que } u_1 = g_1$$

alors;

$$X_{i+1} = X_i - \left[\frac{g_i^T u_i}{2 u_i^T A u_i} \right] u_i \quad :155$$

$$u_{i+1} = g_{i+1} + \left[\frac{g_{i+1}^T g_{i+1}}{g_i^T g_i} \right] u_i \quad :156$$

Pour $i = (1, 2, 3, 4, \dots, n)$ où "n" est le nombre de variables indépendantes et sachant que

$$g_i = F'(X_i) = 2AX_i + B$$

nous avons une façon simple et itérative, facilement programmable, de trouver l'extrémum de n'importe quelle parabole.

3.3.2.3 - Idée derrière le gradient conjugué.

L'idée qui se cache derrière le gradient conjugué est tout simplement la recherche d'un nouveau système d'axes, ou autrement dit, une nouvelle base qui soit plus propice à la recherche du sommet d'une parabole.

Ainsi, notre fonction quadratique est originalement définie dans une base X, dont les axes sont représentés par les variables indépendantes de la fonction. La matrice A de notre parabole est le terme clef de la forme quadratique de notre fonction et évidemment cette matrice est définie dans la base X. C'est cette matrice qui définit l'allure de notre parabole par rapport à notre système d'axes et chacun de ses termes représente, à un facteur une demie près, la dérivée seconde partielle de la fonction selon chaque axe de la base où elle est définie. On la représente donc ainsi:

$$Ax = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_1} & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_2} & \dots & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_j} \\ \frac{\partial^2 F}{\partial x_2 \partial x_1} & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial^2 F}{\partial x_i \partial x_1} & \dots & \dots & \frac{\partial^2 F}{\partial x_i \partial x_j} \end{bmatrix}$$

Règle générale, la matrice A_x qui est dans le système d'axes d'origine a des termes croisés, (c'est-à-dire les termes autres que ceux de la diagonale), qui ne sont pas nuls. Or ces termes signifient que chacune des composantes du gradient de la fonction, n'est pas invariante lorsque l'on se déplace dans une autre direction. Par exemple, si nous calculons le gradient de "F" selon la direction x_1 en un point quelconque de la fonction, nous aurons une certaine valeur de g_1 . Maintenant si la dérivée de g_1 par rapport à une autre composante x_2 de la base n'est pas nulle, c'est-à-dire que le terme croisé correspondant dans la matrice A_x n'est pas nul, alors, en effectuant un déplacement dans la direction x_2 , la valeur du gradient selon x_1 calculée auparavant changera tout au long de notre déplacement sur x_2 .

Par contre le but du gradient conjugué, est de trouver un nouveau système d'axes qui fait en sorte que chaque composante du gradient soit invariante pour tout mouvement dans toute autre direction. Pour ce faire, la méthode du gradient conjugué effectue un changement de base de la matrice A_x dans la base X à une matrice A_u dans la base U qui représente la même parabole de départ mais dans U. Mais, U est déterminé de telle sorte que les termes croisés de A_u soient nuls, ainsi, nous représenterons ce changement de base par l'équation matricielle suivante:

$$A_u = U^\dagger A_x U$$

$$\begin{bmatrix} \frac{\partial^2 F}{\partial u_1 \partial u_1} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \frac{\partial^2 F}{\partial u_i \partial u_j} \end{bmatrix} =$$

$$\begin{bmatrix} u_{11} & u_{12}, \dots, & u_{1j} \\ u_{21} & u_{22}, \dots, \dots, \\ \dots, \dots, \dots, \dots, \\ u_{ij}, \dots, \dots, & u_{ij} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_1} & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_2} & \dots & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_j} \\ \frac{\partial^2 F}{\partial x_2 \partial x_1} & \dots & \dots, \dots, \dots, \\ \dots, \dots, \dots, \dots, & \dots, \dots, \dots, \dots, & \dots, \dots, \dots, \\ \frac{\partial^2 F}{\partial x_i \partial x_1} & \dots, \dots, \dots, \dots, & \frac{\partial^2 F}{\partial x_i \partial x_j} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_{11} & u_{21}, \dots, & u_{i1} \\ u_{12} & u_{22}, \dots, \dots, \\ \dots, \dots, \dots, \dots, \\ u_{1j}, \dots, \dots, & u_{ij} \end{bmatrix}$$

:159

Chaque colonne de la matrice U est un vecteur de la base U et ces vecteurs sont les directions conjuguées.

En résumé, la méthode du gradient conjugué est un procédé qui effectue un changement de base servant à la diagonalisation d'une matrice par un autre système d'axes linéairement indépendants dans le but de faciliter notre recherche d'un point spécifique sur notre fonction définie en partie par la matrice diagonalisée.

Remarque: Si la base U, en plus d'être linéairement indépendante, était aussi orthogonale, alors, la base U serait formée des vecteurs propres de la matrice A_x

qui, dans le cas d'une parabole, seraient appelés les axes principaux de la parabole.

3.3.2.4 - Application du gradient conjugué à notre problème.

Maintenant que nous avons bien compris, j'espère, le principe du gradient conjugué et que nous avons une façon itérative simple de l'appliquer à une parabole, il nous faut revenir à notre problème initial, c'est-à-dire, la minimisation de la fonction du chi carré de l'approximation exponentielle des résultats expérimentaux. On se rappellera que la fonction du chi carré dans notre cas s'écrit comme suit:

$$\chi^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left[C + B \exp\left(\frac{t_i}{A}\right) - D_{\text{exp},i} \right]^2$$
:160

Le gradient conjugué n'étant pas applicable à une telle fonction puisqu'elle n'est pas parabolique, nous la développerons en série de Taylor comme suit:

$$\chi^2(x_0) = \chi^2(x_0) + \frac{1}{1!} [\chi^2(x_0)]' \Delta x + \frac{1}{2!} [\Delta x]^2 [\chi^2''(x_0)] \Delta x + \dots$$
:161

$$x_i = \begin{bmatrix} C_i \\ B_i \\ A_i \end{bmatrix}$$

Ici X_i est un point de départ où l'on commence nos recherches, et autour duquel on effectue le développement en série de Taylor. Dans notre cas, notre premier point de départ nous est donné par la méthode discutée à la section (3.2).

En tronquant l'équation (161) après les trois premiers termes, nous aurons une approximation de la fonction chi carré. Nous nommerons cette nouvelle fonction $F(X_i)$ et elle sera de forme quadratique:

$$F(X_i) = \chi^2(X_i) + \frac{1}{1!} [\chi^2(X_i)]' \Delta X + \frac{1}{2!} [\Delta X]^T [\chi^2''(X_i)] \Delta X \quad :162$$

Pour faciliter l'écriture nous ferons les substitutions suivantes:

$$K = \chi^2(X_i) \quad :163$$

$$G = \chi^2'(X_i) \quad :164$$

$$H = \frac{1}{2} \chi^2''(X_i) \quad :165$$

$$F(X_i) = K + G^T \Delta X + [\Delta X]^T H \Delta X \quad :166$$

L'équation (166) étant de forme parabolique connue, il suffit maintenant d'appliquer de façon itérative la méthode du gradient conjugué. Le minimum ainsi obtenu pourra servir comme point de départ pour une autre approximation de Taylor et ainsi de suite, de manière à continuer le processus jusqu'à une valeur du minimum de la fonction du chi carré acceptable. Il est à noter que le critère

pour une valeur acceptable du minimum est la grandeur du module du gradient de la fonction chi carré. Plus il est petit, meilleure est l'estimation du minimum et la décision d'arrêt face à la grandeur de ce module est laissée à l'utilisateur.

En conclusion nous utilisons deux méthodes de ce chapitre pour le traitement des résultats expérimentaux. La première est l'ajustement d'une exponentielle par moindre carré et sa série de Taylor décrite à la section (3.2). La force de cette méthode est de trouver un point qui soit assez près du minimum de notre fonction et ce, sans avoir à lui fournir aucune information si ce n'est la courbe expérimentale elle-même. Puis, le point localisé par cette méthode nous sert de point de départ pour la méthode par gradient conjugué qui elle a besoin de l'information de ce point près du minimum de la fonction à minimiser.

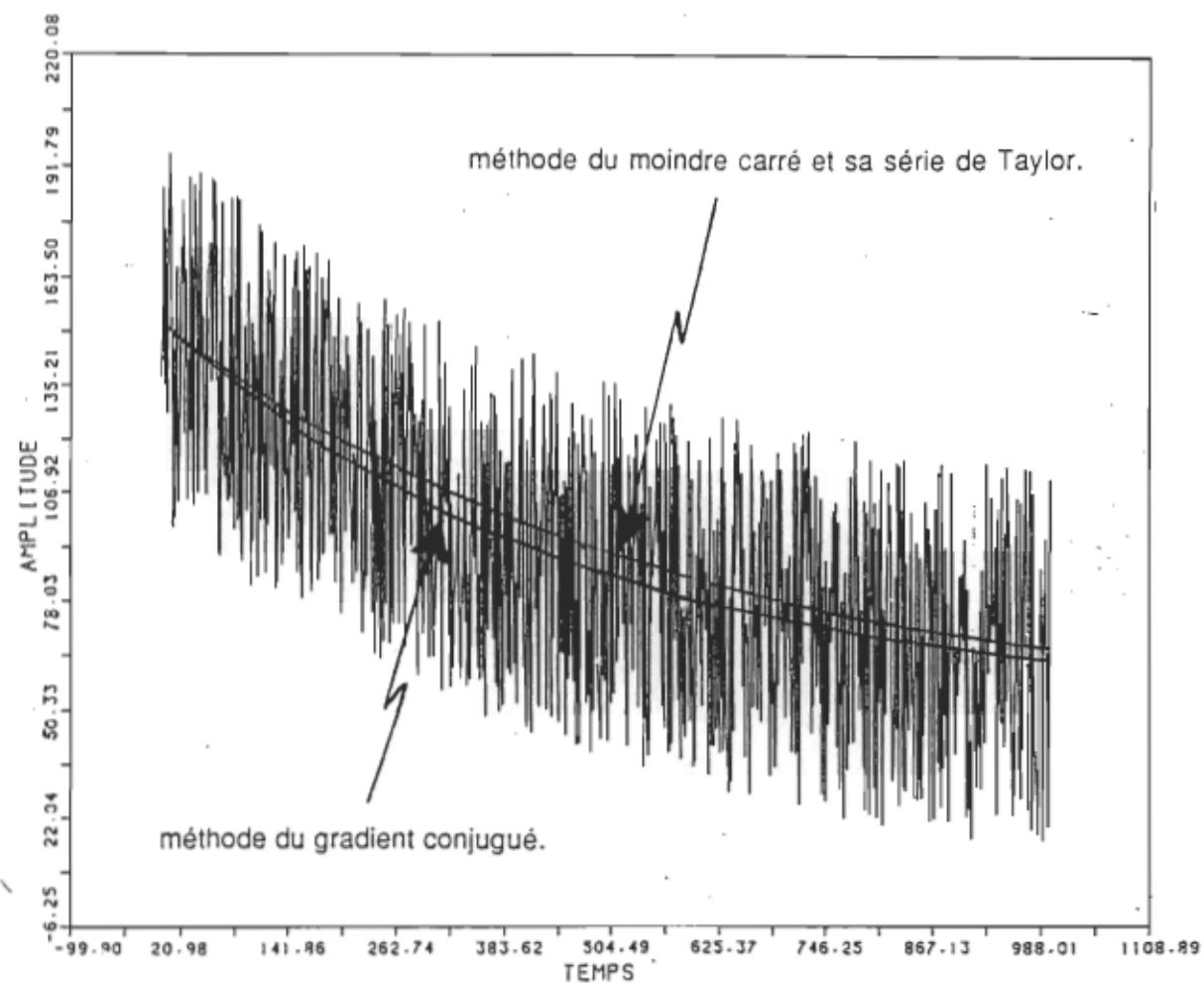
En guise d'exemple de raffinement de paramètres par gradient conjugué, nous avons repris la courbe théorique utilisée à la section (3.2). Nous avons injecté les valeurs des paramètres obtenus à cette section comme point de départ du gradient conjugué et nous avons trouvé les nouvelles valeurs suivantes:

Tableau 3.2

	Théorique	Valeur de la section(3.2)	Gradient conjugué
Temps de vie	500	562	508
Amplitude	100	102	100
Niveau constant	50	49	51

Figure 3.7

Graphique comparatif entre la méthode par série de Taylor
et la méthode du gradient conjugué.



3.3.2.5 - Etude statistique de l'incertitude du gradient conjugué.

Nous avons procédé au traitement de plusieurs courbes théoriques avec du bruit superposé dans le but de vérifier la précision de la méthode du gradient conjugué et de s'assurer que cette précision avec bruit aléatoire, est supérieure à la précision estimée avec les courbes expérimentales que nous verrons plus tard. La courbe théorique qui a servi à l'étude avait les paramètres suivants:

Temps de vie	:	100
Niveau de base	:	50
Amplitude	:	100

Nous avons dans un premier temps traité quarante courbes avec 100% de bruit puis nous avons repris le même traitement avec seulement 50% de bruit.

Les résultats obtenus sont dans le tableau 3.3 qui suit:

Tableau 3.3

Résultats de l'étude statistique de l'incertitude du gradient conjugué.

No. de courbes	Courbes avec 100% de bruit			Courbes avec 50% de bruit		
	Temps de vie	Niveaux de base	Amplitudes	Temps de vie	Niveaux de base	Amplitudes
1	103	50	93	94	50	106
3	108	50	101	101	50	100
5	98	50	97	95	50	104
7	101	50	97	100	51	97
9	108	50	87	110	50	97
11	96	48	105	103	50	99
13	104	50	97	97	50	99
15	99	51	101	97	51	97
17	98	52	97	110	49	97
19	101	50	92	93	51	102
21	116	50	97	96	50	105
23	87	50	104	101	50	100
25	94	50	98	103	49	99
27	90	50	107	98	51	99
29	86	49	110	106	50	98
31	91	52	99	91	50	105
33	95	50	107	101	50	100
35	105	49	102	105	50	95
37	103	50	97	103	50	96
39	100	51	93	105	50	101
Moyennes	100	50	100	101	50	100
Ecart types	8.8	1.0	6.2	5.3	0.5	2.9

Note : Par contrainte d'espace, il n'y a qu'un résultat sur deux qui a été affiché dans le tableau précédent.

De ce tableau, nous tirerons la valeur des écarts types comme valeur de l'incertitude absolue des résultats du gradient conjugué. Nous garderons ces

incertitudes sous leur forme absolue, car leur grandeur ne dépend pas de la valeur du paramètre cherché mais plutôt de la grandeur du bruit qui est superposé à la courbe.

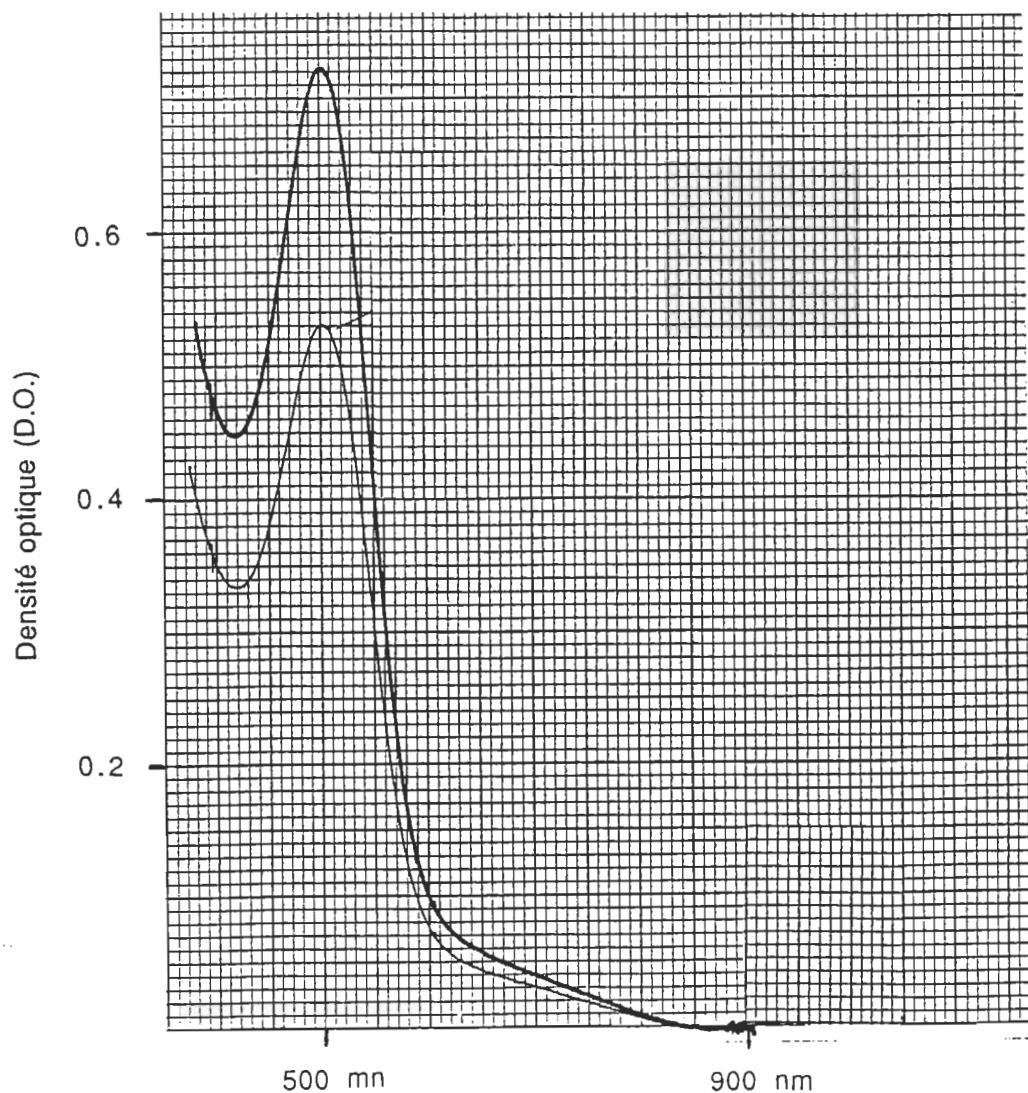
4 - Résultats et discussion.

4 - Résultats et discussion.

Les parties qui suivent font état des résultats obtenus lors de la photolyse de membranes discales dissoutes ou non dans différents détergents. Les disques furent extraits de la façon décrite à la section 2.1. La figure qui suit représente un spectre typique de ce type d'échantillon.

Figure 4.1

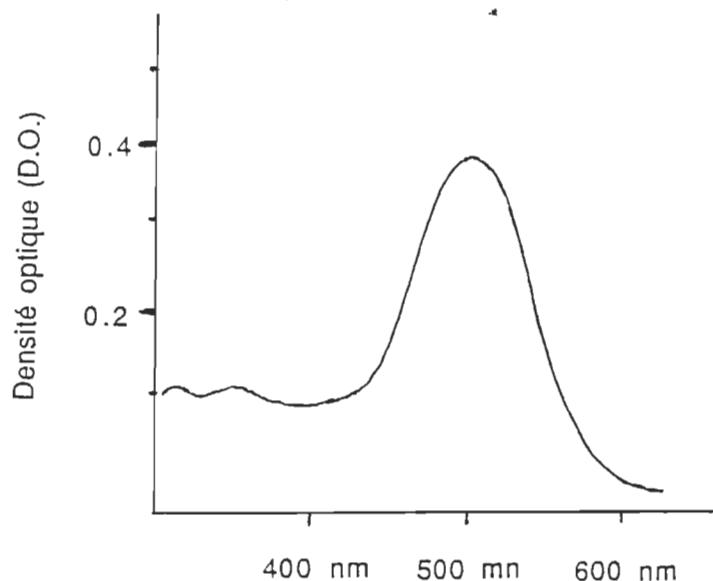
Spectre d'absorption non corrigé de membranes discales dissoutes dans 4% (p/v) d'Ammonyx LO.



Ce spectre diffère considérablement de ceux que l'on rencontre généralement dans la littérature (voir figure 4.2). La principale raison de cette différence est que le spectre de la figure 4.1 est mesuré sur un grand intervalle de longueurs d'onde et qu'il n'est pas corrigé pour la diffusion de la lumière par les grosses particules que constituent les membranes discales dissoutes. Ainsi il met bien en évidence les conditions optiques dans lesquelles les mesures de photolyse sont effectuées. La faible transmission due, d'une part, à l'absorption par le chromophore et d'autre part, à la diffusion optique, permet de comprendre pourquoi le bruit constitue parfois la partie la plus importante du signal qu'on cherche à mesurer.

Figure 4.2

Spectre typique de rhodopsine bovine obtenu après correction pour la diffusion
(tiré de Motoyama et al., 1985).



4.1 - Mesure des absorptions transitoires suite à l'excitation d'un échantillon.

L'allure générale des variations de transmission observées après l'excitation ponctuelle de la rhodopsine dans l'intervalle de temps correspondant aux transitions entre la métarhodopsine I et la métarhodopsine II et la lumirhodopsine et la métarhodopsine I est présentée aux figures 4.3 et 4.4. Ces exemples sont tirés d'expériences réalisées avec des membranes discales intactes. Il est à noter que l'axe vertical représente l'intensité de lumière transmise relative à 450 nm.

Figure 4.3

Exemple de cinétique de la transition Méta I \leftrightarrow Méta II, (disques à 20 °C).

La flèche indique le moment où l'échantillon reçoit l'éclair de lumière.

Vitesse d'échantillonnage : 5 μ s/point

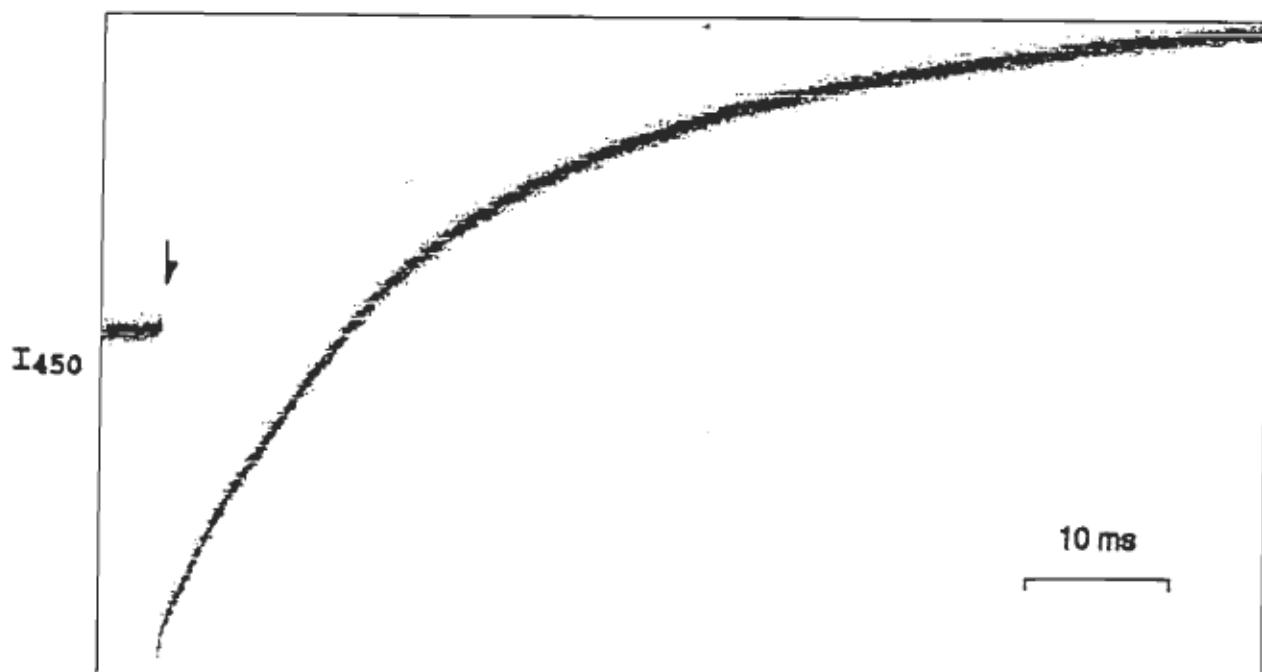
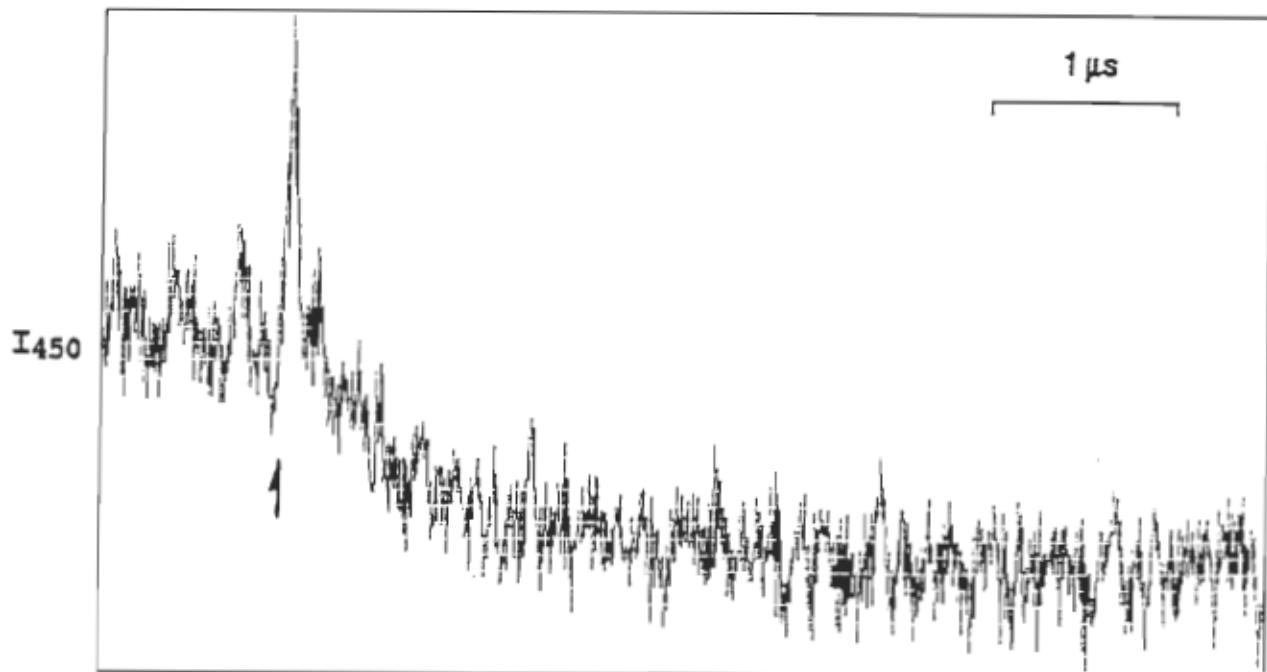


Figure 4.4

Exemple de cinétique de la transition Lumi \rightarrow Méta I, (disques à 0 °C).

La flèche indique le moment où l'échantillon reçoit l'éclair de lumière.

Vitesse d'échantillonnage : 5 ns/point



Comme le montre la figure 4.3, la transition entre les métarhodopsines I et II correspond à une augmentation de la quantité de lumière transmise par l'échantillon. Elle a un excellent rapport signal sur bruit ce qui la rend facilement traitable par notre méthode numérique. La première descente très rapide que l'on peut observer sur ce graphique mais que la base de temps de l'oscilloscope n'a pas permis d'échantillonner correspond à la transition Lumirhodopsine \rightarrow Métarhodopsine I. Cette descente, que nous pouvons mieux voir sur la figure 4.4, est observable sur un autre oscilloscope utilisant une

base de temps 100 fois plus rapide (5 ns/pt). L'amplitude du signal est identique dans les figures 4.3 et 4.4. Toutefois l'échantillonnage rapide introduit de 80 à 100% de bruit dans le signal. Si on fait référence au tout début de ce chapitre, cet exemple de cinétique rapide (figure 4.4) montre bien les problèmes que nous apporte la diffusion importante de la lumière par les particules. Néanmoins, la qualité des signaux que nous avons réussi à enregistrer se compare, parfois avantageusement à ceux que l'on peut trouver dans la littérature récente. Ainsi, nos enregistrements de la cinétique de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II sont de qualité égale ou supérieure à ceux rapportés par d'autres laboratoires (figure 4.5). Par ailleurs, peu d'auteurs ont montré les signaux associable à la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I. Néanmoins, des signaux récemment obtenus par le groupe de Yoshizawa (figure 4.6) nous permettent de croire à la qualité et la fiabilité des absorptions transitoires que nous avons enregistrées dans le domaine de temps des microsecondes.

Figure 4.5

Cinétiques de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II rapportées par:

- A - Applebury et al., 1974, (rhodopsine bovine dissoute dans Ammonyx-LO 0.05 M, $\lambda = 380$ nm, $T = 23$ °C).
- B - Parkers et Liebman, 1984, (membranes discales, $\lambda = 390$ nm, $T = 5.5$ °C).
- C - Lewis et al., 1981, (membranes discales, $\lambda = 380$ nm, $T = 20$ °C).
- D - Straume et al., 1990, (membranes discales, $\lambda = 380$ nm, $T = 10$ °C, enregistrement sur base de temps logarithmique).

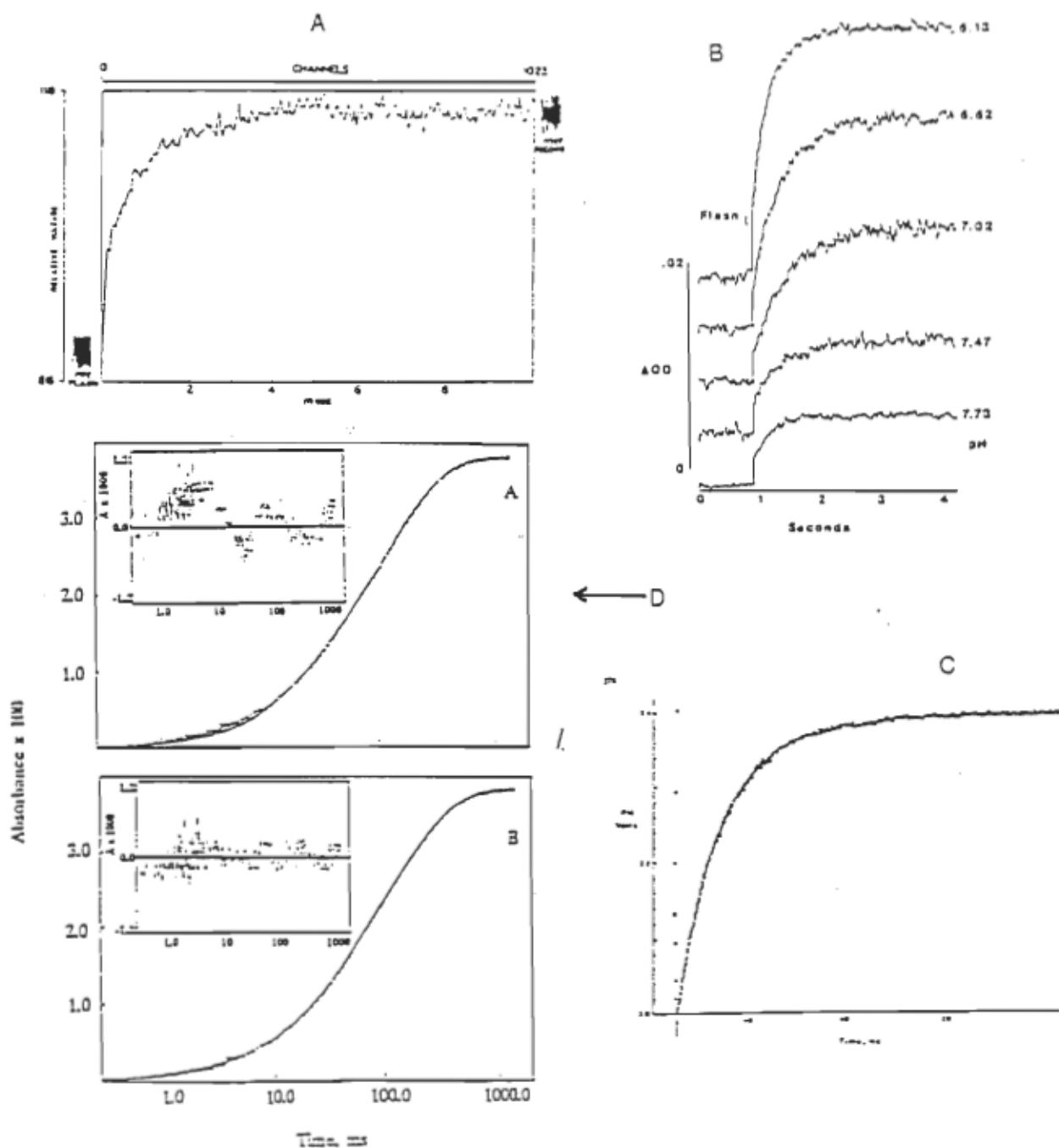
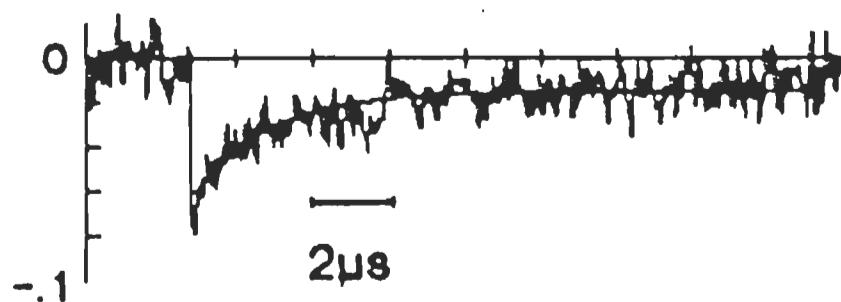


Figure 4.6

Cinétique de la lumirhodopsine rapportée par Okada et al., 1991
(rhodopsine bovine régénérée avec le 9-cis rétinal, $\lambda = 470$ nm, $T = 22$ °C).



4.2 - Incertitude des résultats:

Comme une bonne partie de ce travail repose sur l'analyse des temps de vie des intermédiaires de la séquence photolytique, il est important d'en connaître la précision. L'incertitude sur les valeurs des temps de vie calculés pour la Lumi.- et la métarhodopsine I figure dans les tableaux des sections qui suivent. Elle a été déterminée statistiquement en photolysant et en traitant les résultats obtenus à partir de quarante échantillons de membranes discales dissoutes dans l'Ammonyx-LO. Les résultats sont compilés séparément pour les cinétiques des transitions Lumi \rightarrow Méta I et Méta I \leftrightarrow Méta II (enregistrées simultanément sur deux oscilloscopes), car elles ne montrent pas le même rapport signal sur bruit à cause de leur différence de vitesse d'échantillonnage. Le tableau 4.1 de la page suivante montre la compilation de ces expériences. Pour des raisons d'espace ce tableau ne contient que vingt des quarante résultats obtenus, mais la moyenne, l'écart type et l'incertitude affichés au bas sont calculés à partir des quarante échantillons.

L'incertitude obtenue pour les temps de vie déterminés avec l'oscilloscope 4094 C (transition Lumi \rightarrow Méta I) est de 30% et de 7% pour l'autre transition (Méta I \leftrightarrow Méta II) mesurée avec l'oscilloscope 4094. Il faut bien noter, que ces incertitudes sont d'un seul écart type, ce qui revient à dire que 68.27% des résultats obtenus sont contenus à l'intérieur de cet écart. Mais, ceci n'est vrai que si les données recueillies se comportent selon une distribution gaussienne. Les figures 4.7 et 4.8 montrent ces densités de distribution et elle révèlent qu'au moins 65% des résultats sont contenus dans l'écart type.

Tableau 4.1

Compilation des temps de vie (à 20 °C) obtenus lors de la photolyse,
 pour fin d'étude statistique , de membranes discales
 dissoutes dans 4.0% d'Ammonyx-LO.

Numéro d'échantillon	Temps de vie	
	Transition Lumi -> Méta I [ns]	Transition Méta I<->Méta II [μs]
1	299	9.06
2	158	7.98
3	133	8.47
4	173	8.55
5	310	9.03
6	200	8.55
7	243	8.05
8	231	8.17
9	242	8.80
10	141	8.75
11	184	8.97
12	251	10.0
13	309	10.2
14	356	9.26
15	148	8.36
16	294	9.77
17	221	9.32
18	252	8.87
19	259	9.30
20	179	9.43

Moyenne =	228	8.68
Ecart type =	64	0.59
incertitude =	±30%	±7%

Figure 4.7

Distribution des temps de vie pour la transition Lumi \rightarrow Métarhodopsine I.
 (Moyenne = 228 ns, écart type = 64).

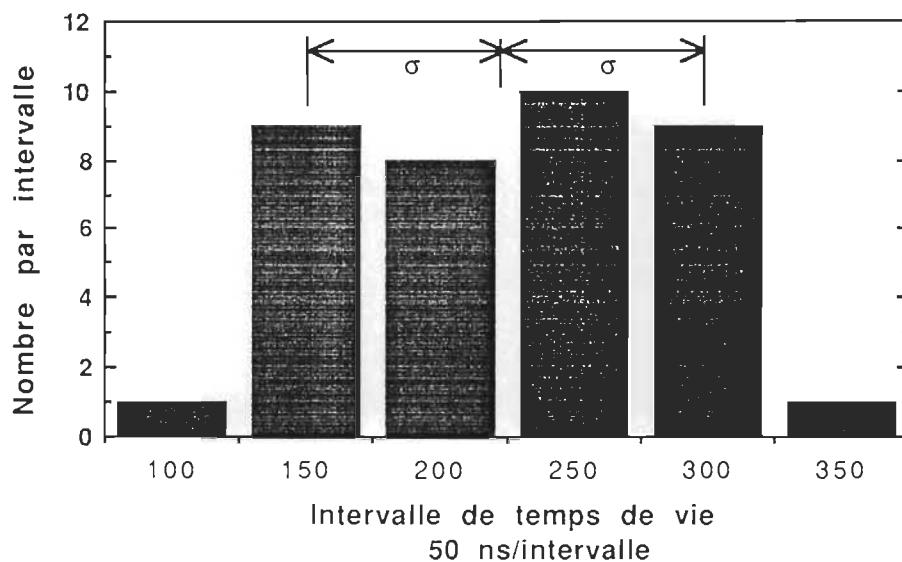
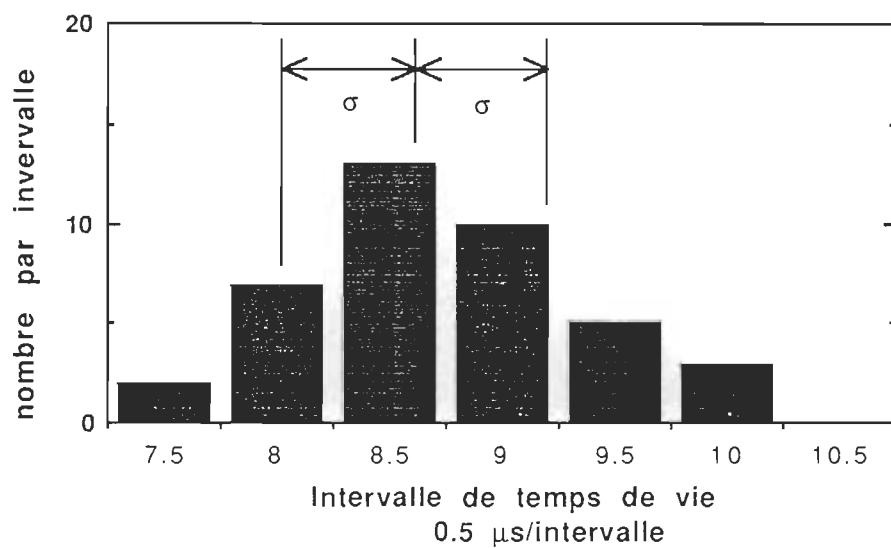


Figure 4.8

Distribution des temps de vie pour la transition Métarhodopsine I \leftrightarrow II.
 (Moyenne = 8.68 μ s, écart type = 0.59).



Pour ce qui est des autres incertitudes découlant des calculs, elles ont été estimées à partir de la dérivée totale des équations utilisées. Par conséquent, l'incertitude sur ces données n'est pas une incertitude probable mais plutôt entière ou totale.

Les incertitudes sur les pentes ont été déterminées graphiquement, c'est-à-dire que pour chaque graphique, nous avons considéré deux autres droites qui englobent un maximum de points à l'intérieur des incertitudes de chacun. L'une de ces droites était de pente maximum et l'autre de pente minimum; l'écart moyen entre ces deux droites et la droite expérimentale a été choisi comme incertitude maximale, ce qui explique en partie les fortes incertitudes.

4.3 - La transition métarhodopsine I \leftrightarrow II.

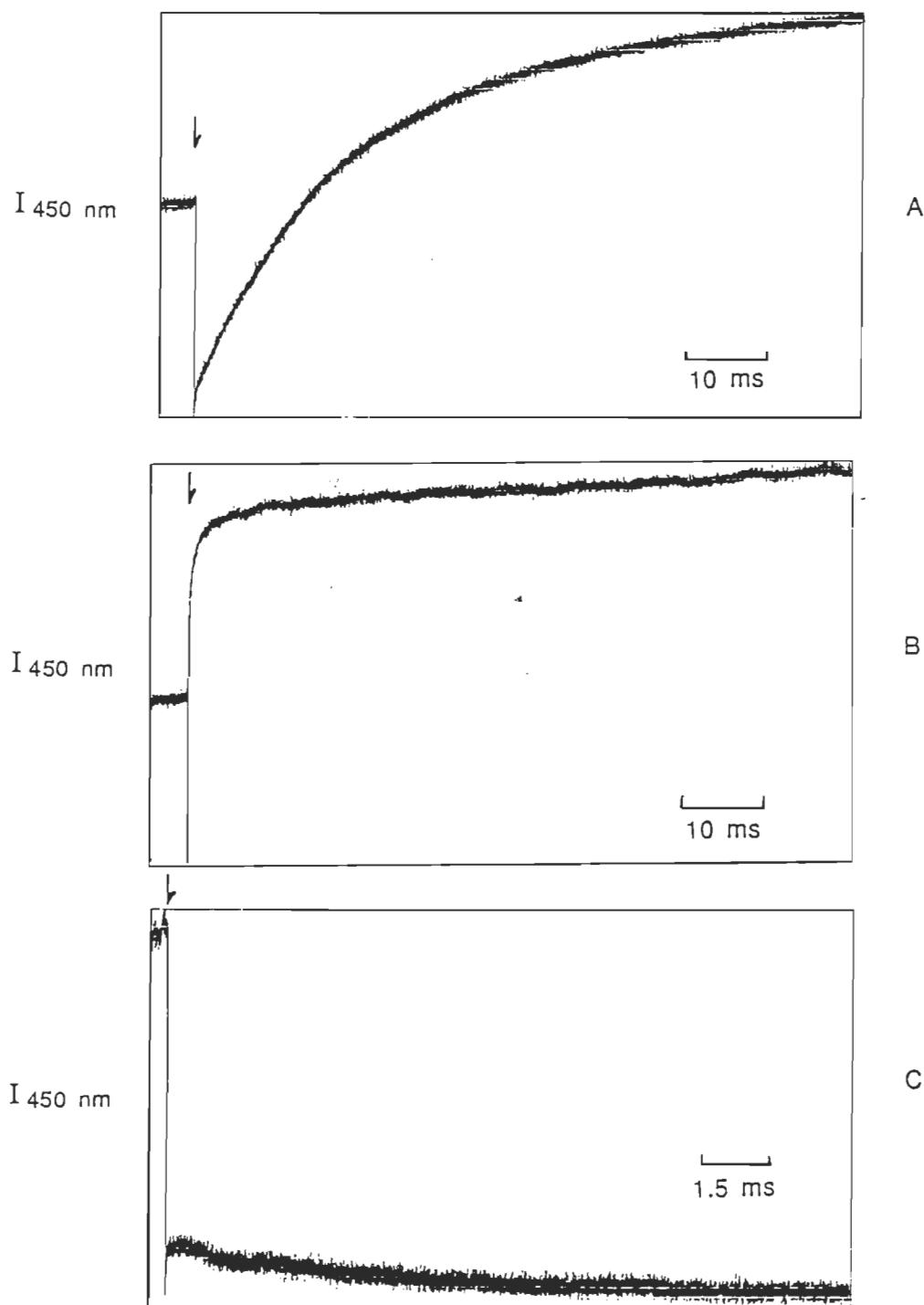
Nous commencerons cette analyse par la description des résultats bruts, représentant la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II, tels que mesurés lors de la photolyse. Les figures qui suivent montrent les cinétiques de la transition en question pour différentes conditions expérimentales. Elles ont été échantillonnées avec des bases de temps de l'ordre de quelques micro- à quelques dizaines de microsecondes, pour bien mettre en évidence la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II. L'axe vertical de nos graphiques représente le changement de transmission de lumière à travers l'échantillon à 450 nm. A cette longueur d'onde il faut s'attendre, comme nous avons expliqué à la section 2.3, à une augmentation de la quantité de lumière transmise par l'échantillon pour la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II. Les flèches sur les graphiques représentent le début de la séquence photolytique qui est amorcée par l'éclair laser. Pour chacune des conditions expérimentales, des mesures ont été effectuées à différentes températures pour déterminer la dépendance thermique et calculer l'énergie d'activation du phénomène observé.

La figure 4.9 montre un exemple des deux types de phénomènes observés par rapport à la cinétique de la réaction métarhodopsine I \leftrightarrow II dans les membranes discales. La première possibilité est une accélération de la vitesse de la transition lors de la solubilisation des membranes, l'autre possibilité est une diminution de cette vitesse. L'accélération tout comme la diminution de la vitesse de cette réaction peuvent être de plusieurs ordres de grandeur. Dans certains cas, la diminution de la vitesse est telle que la transition apparaît complètement bloquée, conduisant ainsi à des temps de vie infinis pour la métarhodopsine I.

Figure 4.9

Exemples d'effets de la solubilisation des membranes discales sur la vitesse de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II à 20 °C et pH = 7.5.

- A - Cinétique observée dans les membranes intactes.
B - Cinétique accélérée par solubilisation dans 0.5% d'octylglucoside.
C - Cinétique bloquée par solubilisation dans 2.0% de cholate de sodium.



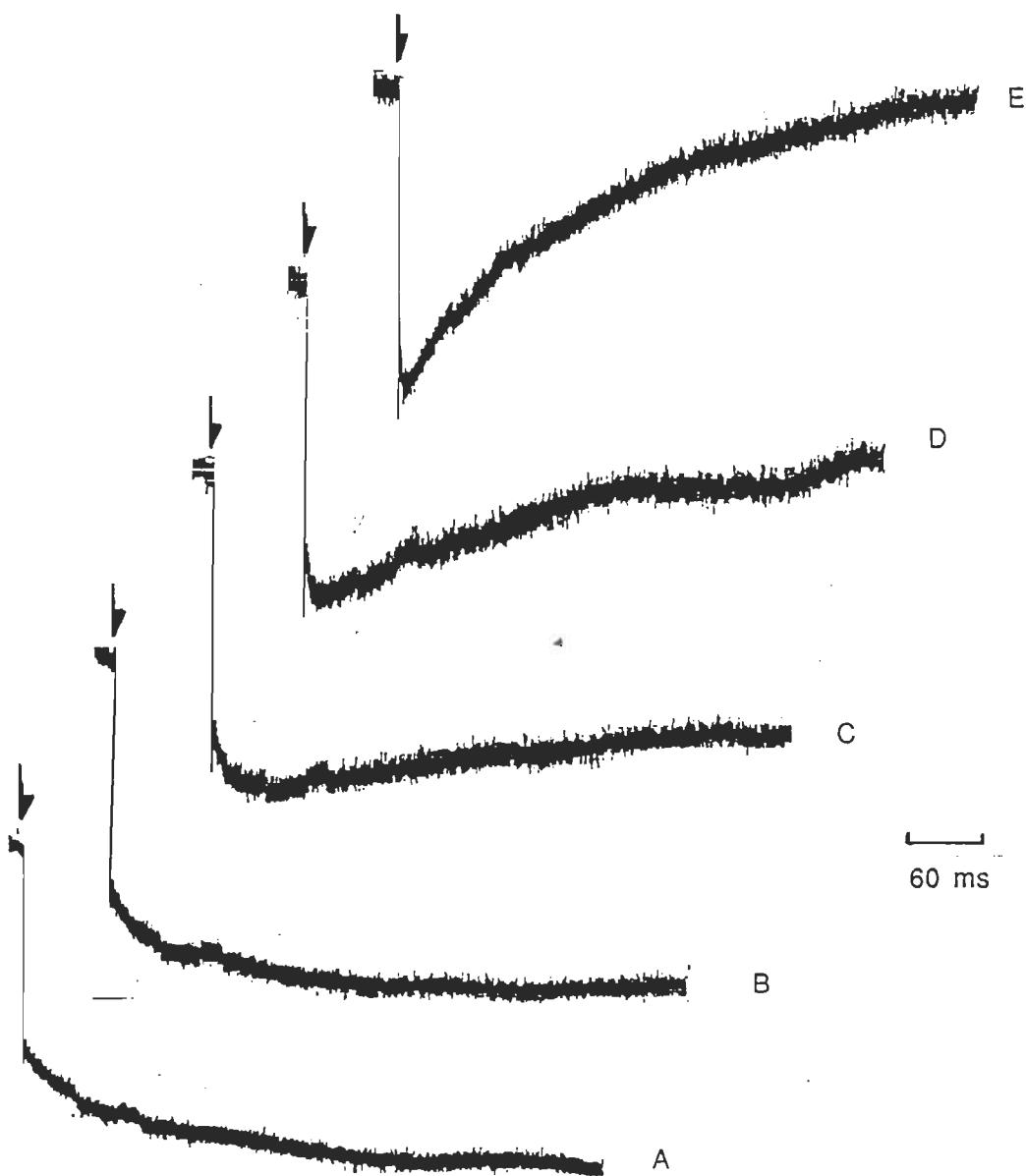
Il est important de distinguer cet effet de la solubilisation de l'effet de la température sur la même cinétique. Dans certains cas (voir figure 4.10) il est possible d'observer un blocage de la transition à des températures voisines de 0 °C et une récupération progressive d'une transition " normale " à mesure qu'on s'approche de la température physiologique.

Figure 4.10

Apparition progressive de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II entre 0 et 20 °C

dans des disques dissous dans 2.0% de déoxycholate à pH = 7.5.

Les tracés A à E ont été mesurés à 0, 5, 10, 15 et 20 °C respectivement.



Les résultats de l'analyse de la transition entre les métarhodopsines I et II sont regroupés dans le tableau 4.2. Dans les cas où cela était possible, nous avons comparé nos résultats avec ceux de la littérature (tableau 4.3). Cette comparaison montre que nos résultats sur la cinétique de cette transition sont tout à fait en accord avec ceux des autres laboratoires.

Tableau 4.2

Tableau des temps de vie de la métarhodopsine I à différentes températures pour chaque condition expérimentale.

Conditions expérimentales	Temps de vie de la métarhodopsine I (Les valeurs sont en ms)				
	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
Disques	∞	---	---	---	16.5 ± 8
Disques dissous dans 0.5% d'octylglucoside	---	---	22.5 ± 2	7.86 ± 0.8	1.62 ± 0.2
Disques dissous dans 2.0% de cholate	∞	---	---	---	∞
Disques dissous dans 2.0% de déoxycholate	∞	640 ± 100	335 ± 30	135 ± 14	---
Disques dissous dans 4.0% d'Ammonyx-LO	1.236 ± 0.060	0.662 ± 0.030	0.299 ± 0.010	0.1588 ± 0.008	0.0844 ± 0.004

∞ : Cinétique bloquée, temps de vie infini.

--- : Résultat non disponible.

Tableau 4.3

Comparaison des temps de vie observés pour la métarhodopsine I
avec ceux disponibles dans la littérature.

Conditions expérimentales	Temps de vie à 20 °C (temps en ms)	
	Ce travail	Littérature
Disques	16.5 ±8	17.5 ±5 (3) 16 (2) 13 (1)
Disques dissous dans 4.0% d'Ammonyx-LO	0.0844 ±0.004	0.076 (4)

- 1- O'brien et al., 1981
- 2- Rapp, 1978
- 3 - Lewis et al., 1981
- 4 - Applebury et al., 1974

Dans les cas où le nombre de données expérimentales le permettait, nous avons tracé le graphique d'Arrhénius pour cette même transition (figure 4.11). Dans ce cas aussi les valeurs que nous obtenons pour l'énergie d'activation de la transition, dans différentes conditions, se comparent bien aux résultats rapportés par différents auteurs (tableau 4.4) et confirment l'identité du phénomène que nous observons avec les paramètres connus pour la transition métarhodopsine I <-> II.

Figure 4.11
Graphique d'Arrhénius pour la transition
métarhodopsine I \leftrightarrow II

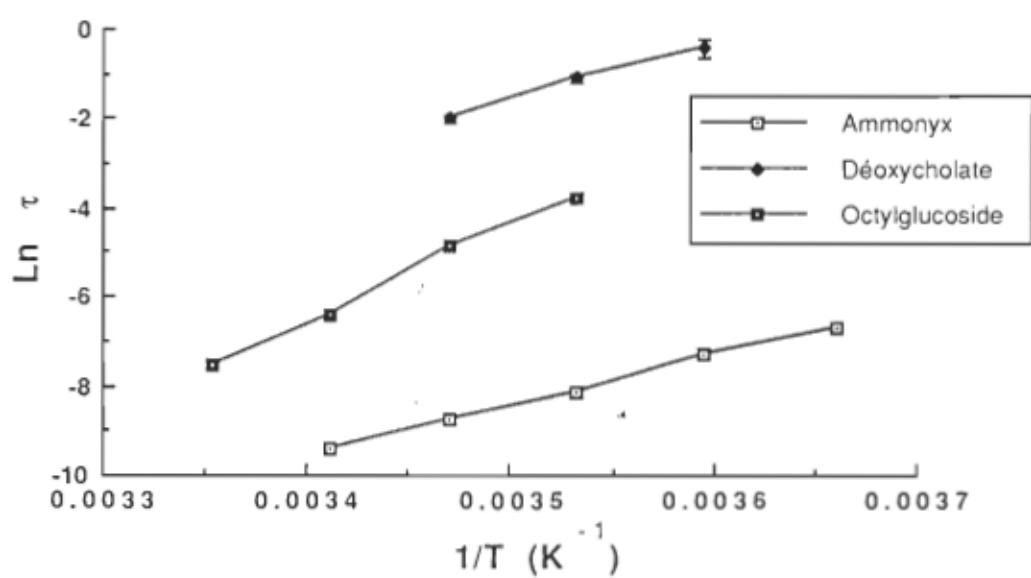


Tableau 4.4

Comparaison des énergies d'activation de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II
avec ceux de la littérature.

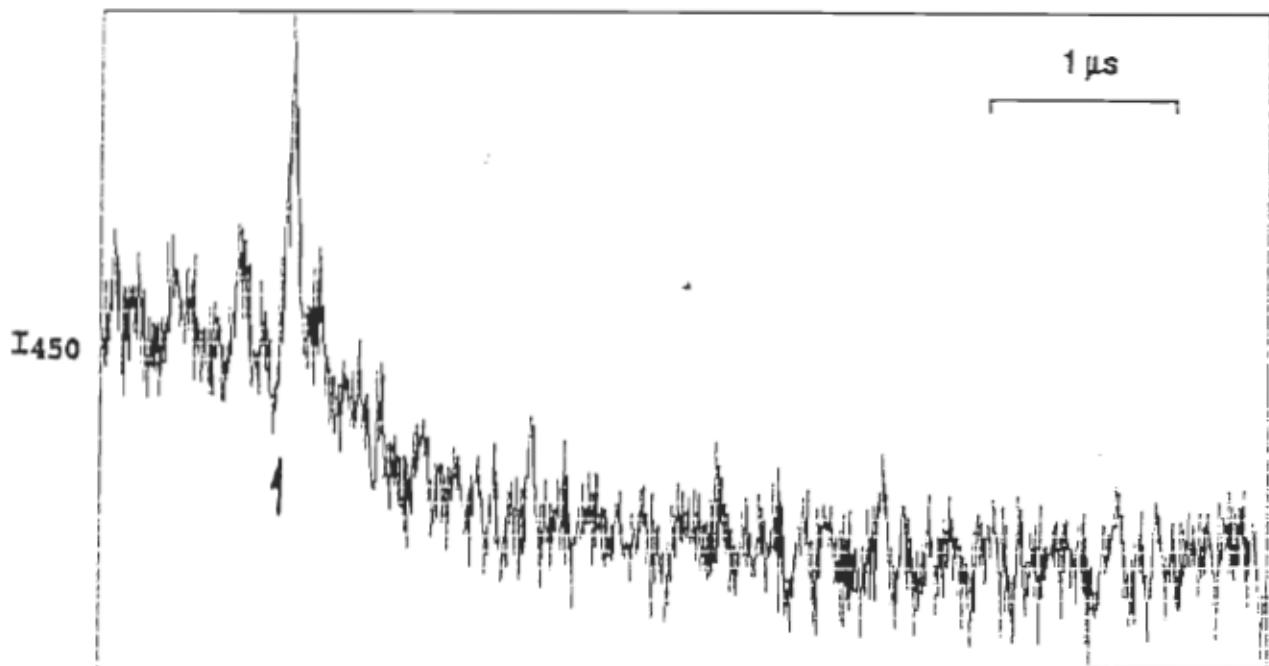
Conditions expérimentales	Energie d'activation (kj/mole)	
	Ce travail	Littérature
Disques	-----	121.3 (1) 125 \pm 1 (2) 130.9 \pm 6.7 (3) 140 \pm 1 (4)
Disques dissous dans 0.5% octylglucoside	181 \pm 20	-----
Disques dissous dans 2.0% cholate	-----	-----
Disques dissous dans 2.0% déoxycholate	103 \pm 20	-----
Disques dissous dans 4.0% Ammonyx-LO	90.6 \pm 3	80 (5)

- 1- O'brien et al., 1981
- 2- Rapp, 1979
- 3 - Lewis et al.,1981
- 4 - Sengbush et Stieve, 1971
- 5 - Applebury et al., 1974

4.4 - La transition lumirhodopsine \rightarrow métarhodopsine I.

La figure 4.12 montre un exemple du signal observable lors de la transition de la lumi - à la métarhodopsine I. Comme précédemment, l'axe vertical indique le changement de transmission de lumière à travers l'échantillon à 450 nm. Mais ici, à 450 nm, il faut plutôt s'attendre à une diminution de la quantité de lumière transmise (tel que décrit à la section 2.3) et ceci se traduira par un signal de signe opposé à celui de la transition précédente

Figure 4.12
Type de courbe observée pour la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I.



Contrairement à la section précédente, il n'est pas nécessaire de présenter plus d'un graphique puisque le phénomène observé n'est que d'un seul type. Cette transition se manifeste donc toujours comme une cinétique dont le signe et l'amplitude sont constants. Elle est très rapide et doit donc être échantillonnée au maximum de vitesse de l'appareillage dont nous disposons, soit 5 ns/point.

Le tableau 4.5 regroupe les temps de vie tirés de l'analyse de la transition lumi -> métarhodopsine I, après ajustement tel que décrit au chapitre 3.

Tableau 4.5

Tableau des temps de vie de la lumirhodopsine à différentes températures pour chaque conditions expérimentales.

Conditions expérimentales	Temps de vie de la lumirhodopsine (Les valeurs sont en ns)				
	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
Disques	670 ±200	-----	-----	-----	180 ±30
Disques dissous dans 0.5% d'octylglucoside	850 ±200	580 ±200	370 ±100	244 ±70	224 ±60
Disques dissous dans 2.0% de cholatate	1000 ±283	-----	-----	-----	283 ±80
Disques dissous dans 2.0% de déoxycholate	830 ±200	660 ±200	530 ±100	390 ±100	350 ±100
Disques dissous dans 4.0% d'Ammonyx-LO	1170 ±200	740 ±100	451 ±60	360 ±50	272 ±40

Comme précédemment (section 4.3) nous avons, lorsque que ceci s'avérait possible, comparé nos résultats à ceux de la littérature (tableau 4.6)

mais cette fois-ci il n'y a pas d'accord entre nos mesures et ceux des autres laboratoires. Il est à noter que même les différents laboratoires entre eux sont en désaccord.

Tableau 4.6
Comparaison des temps de vie de la lumirhodopsine
avec ceux de la littérature.

Conditions expérimentales	Temps de vie à 20 °C (temps en μ s)	
	Ce travail	Littérature
Disques	0.180 \pm 0.030	3330 \pm 1100 (2) 72.9 \pm 0.1 (3) 1280 \pm 100 (4)

- 2 - Lewis et al., 1981
 3 - Mitchell et al., 1990
 4 - Straume et al., 1990

Puisque le nombre le permettait, nous avons tracé le graphique d'Arrhénius de la réaction dans les différentes conditions expérimentales (figure 4.13) et comparé avec les énergies d'activation obtenues avec celles rapportées dans la littérature. Nos valeurs d'énergies d'activation, contrairement aux valeurs des temps de vie, sont comparables à celles obtenues par d'autres auteurs.

Figure 4.13

Graphique d'Arrhénius pour la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I.

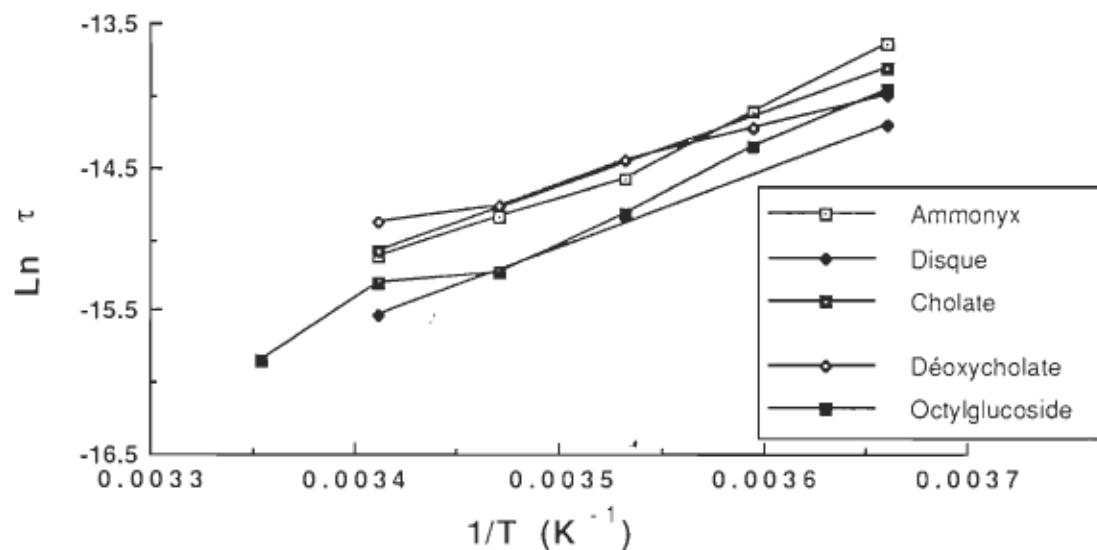


Tableau 4.7

Comparaison des énergies d'activation de la transition entre
la lumi- et la métarhodopsine I avec ceux de la littérature.

Conditions expérimentales	Energie d'activation (kj/mole)	
	Ce travail	littérature
Disques	44 ± 20	88.7 ± 18 (1) 77.8 ± 4.2 (2) 65.2 ± 3 (3) 62.7 (4) 28 (5)
Disques dissous dans 0.5% octylglucoside	49 ± 20	-----
Disques dissous dans 2.0% cholate	42 ± 20	-----
Disques dissous dans 2.0% déoxycholate	30 ± 20	-----
Disques dissous dans 4.0% Ammonyx-LO	48.6 ± 7	-----

1 - Sengbuch et Stive, 1971

2 - Lewis et al., 1981

3 - Mitchell et al., 1990

4 - Straume et al., 1990

5 - Rapp, 1979

4.5 - Discussion

Dépendamment de leur structure et de leurs propriétés physico-chimiques, les détergents agissent différemment sur les membranes biologiques (Helenius et Simons, 1975). Dans le cas des membranes discales, on peut classer ces effets en distinguant deux groupes de détergents: ceux qui solubilisent complètement les membranes (octylglucoside et Ammonyx-LO) et ceux qui solubilisent plutôt de gros fragments membranaires (déoxycholate et cholate). Dans le premier cas, ces détergents solubilisent la membrane en formant de petites micelles contenant un monomère de rhodopsine généralement exempt de lipides et procurant aux molécules un environnement plutôt fluide. Par contre la deuxième catégorie a de la difficulté à solubiliser complètement les membranes et à former de petites vésicules. On y retrouve plutôt de gros agrégats contenant deux ou trois molécules de rhodopsines et des lipides. Ainsi ces détergents s'agglomèrent comme des briques au travers des lipides déjà existant et il en résulte une structure plutôt rigide (Makino et al., 1977, Wald et Brown, 1952).

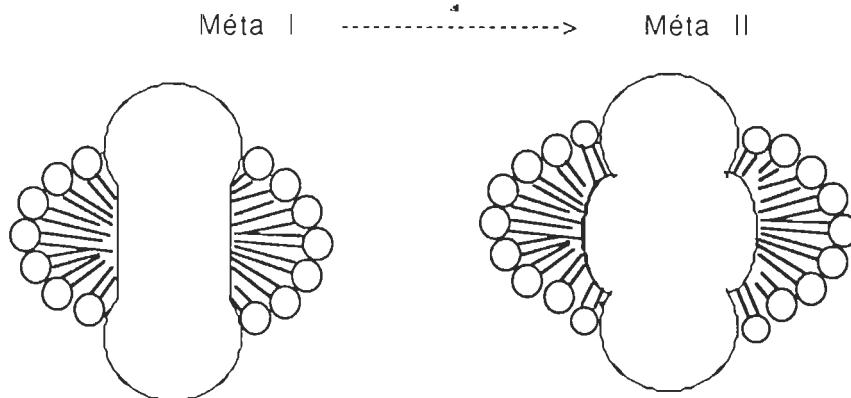
L'action de ces détergents a déjà été mise à profit pour mettre en évidence des changements conformationnels de la rhodopsine lors de la transition de méta I \leftrightarrow métarhodopsine II (Motoyama et al., 1985). Ainsi on a constaté que la vitesse de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II est inversement proportionnelle à la rigidité de l'environnement immédiat de la rhodopsine. Les détergents qui forment des structures rigides ou des agrégats autour de la protéine amènent un ralentissement de la vitesse de transition. Par contre ceux qui forment des micelles petites et fluides accélèrent la transition (Abran et al., 1988).

Puisque la rigidité du milieu qui entoure la rhodopsine module la vitesse de transition de l'intermédiaire méta I à l'intermédiaire métarhodopsine II, il est clair que lors du passage entre ces deux étapes, la molécule effectue un travail sur son environnement immédiat. On peut imaginer que la rhodopsine, lors de cette transition, doit prendre de l'expansion et déplacer certaines parties de sa structure. Donc plus ce milieu sera rigide, plus il sera difficile pour la protéine d'agir sur ce dernier de façon mécanique et la réaction sera ralentie et inversement pour les milieux plus mobiles.

La figure qui suit montre schématiquement un modèle de ce qui peut arriver comme transformation à la rhodopsine:

Figure 4.14

Modèle de changement conformationnel de la rhodopsine
lors de la transition métarhodopsine I<->II.



Essentiellement, nos résultats sur la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II confirment ce modèle du changement conformationnel de la protéine. Le tableau 4.8 montre de combien de fois les différents agents de solubilisation peuvent ralentir ou accélérer la transition Métarhodopsine I \leftrightarrow II. Cet effet est considérable et fait varier la vitesse de la réaction par plusieurs ordres de grandeur.

Rappelons que l'un des buts de ce travail est d'employer la même technique pour connaître les effets dès mêmes détergents sur la transition lumi- \rightarrow métarhodopsine I. Or le tableau 4.8 compare les résultats obtenus sur la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I avec ceux de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II. On remarque que les effets des détergents sur la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I sont différents et d'amplitude nettement inférieure, ce qui montre que l'influence des détergents est beaucoup plus faible. Ces effets sont quand même significatifs dans les limites d'incertitude des mesures effectuées.

Tableau 4.8

Tableau comparatif des vitesses de transition de la métarhodopsine I \leftrightarrow II et lumi- \rightarrow métarhodopsine I dans différents détergents.

Agent de solubilisation	Vitesse par rapport aux membranes natives à 20 °C	
	M I \leftrightarrow M II	L \rightarrow M I
Disques	16.5 ± 8 ms	180 ± 30 ns
Cholate	∞ fois + lent	1.6 fois + lent
Déoxycholate	8 fois + lent	1.9 fois + lent
Octylglucoside	10 fois + vite	1.2 fois + lent
Ammonyx-LO	195 fois + vite	1.5 fois + lent

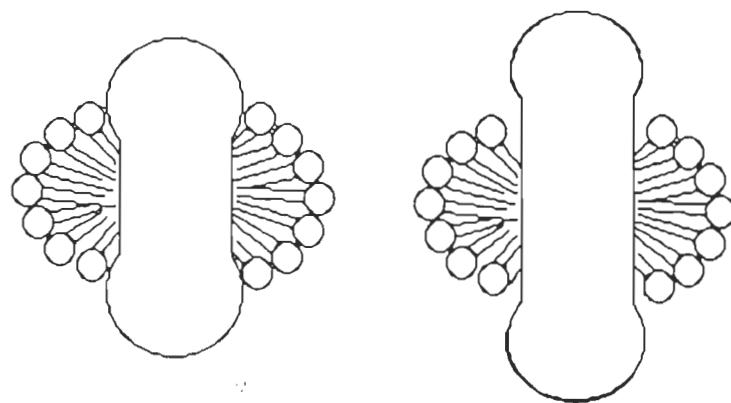
Curieusement, on observe que tous les détergents amènent une diminution de la vitesse de transition entre la lumi- et la métarhodopsine I par rapport aux membranes natives et que ce sont les détergents qui rigidifient la structure autour de la protéine qui ralentissent le plus la transition, comme dans le cas du passage de la métarhodopsine I \leftrightarrow II. Mais même si les détergents qui ralentissent le plus la transition lumi- \rightarrow métarhodopsine I sont les même que pour la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II, on ne peut conclure à des changements conformationnels similaires au cours des deux transitions puisqu'il n'y a pas accélération de la transition pour les détergents qui solubilisent complètement la membrane. Il nous faut donc penser à un changement conformationnel différent.

A notre connaissance, il n'existe pas d'autres études publiées sur l'effet de l'environnement moléculaire et sur la vitesse de la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I que celle de Guérette et al., (1988) qui montre que dans les agrégats tridimensionnels de rhodopsine purifiée, cette transition est bloquée. Ce résultat indique que l'environnement immédiat du pigment participe à la transition. Par ailleurs, on sait également qu'il est possible de solubiliser les membranes discales sans modifier aucune des propriétés de la rhodopsine (régénérabilité, stabilité thermique, maximum d'absorption, équilibre M_I \leftrightarrow M_{II}; Motoyama et al., 1985, 1986, Abran et al., 1988) en faisant un choix judicieux de détergent, sauf dans le cas de la température de transition entre la lumi \rightarrow et la métarhodopsine I. En effet, dans les membranes discales, la situation est unique au sens où cette transition apparaît à 210 K alors qu'elle se situe vers 240 K dans la plupart des détergents. A lui seul, ce résultat permet d'imaginer qu'à la température de la pièce, la transition soit plus rapide dans les membranes natives que dans les membranes solubilisées.

D'autre part, il faut réaliser que dans les membranes discales, la rhodopsine subit une pression latérale considérable, de l'ordre de 50 mN/m (Gruen et Wolfe, 1982) et que cette pression est enlevée lors de la solubilisation. Dans ce contexte, on peut imaginer que le ralentissement de la transition soit, du moins en partie, dû à l'absence de pression latérale sur le pigment, ce qui permet de l'associer à un changement conformationnel opposé (contraction) et ou perpendiculaire (étirement) à celui qui se produit au cours de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II. La figure 4.14 montre un modèle du changement que nous proposons pour cette transition.

Figure 4.15

Model de changement conformationnel de la rhodopsine
pour la transition lumi->métarhodopsine I.



4.6 - Mise en évidence d'un nouveau signal optique entre la lumi- et la métarhodopsine I.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, la séquence photolytique de la rhodopsine qui est admise dans la littérature est le passage de la rhodopsine à la bathorhodopsine, de la batho- à la lumirhodopsine, de la lumi- à la métarhodopsine I et finalement de méta I à la métarhodopsine II. Or, compte tenu de la vitesse de notre appareillage et de la longueur d'onde à laquelle nous observons la séquence, la partie de la séquence photolytique qui doit expliquer les cinétiques que nous obtenons est la transition lumi - métarhodopsine I et métarhodopsine I \leftrightarrow II. Mais une anomalie du signal se produit à des temps intermédiaires entre la lumirhodopsine et la métarhodopsine I. Dans certaines conditions expérimentales, les signaux enregistrés ne peuvent s'expliquer par la séquence traditionnelle de décoloration de la rhodopsine. Pour bien situer cette irrégularité, la figure 4.15 met en évidence les signaux en question. Ils sont caractérisés par une diminution suivie d'une augmentation de la transmission, à des temps qui se situent entre les transitions lumi-> métarhodopsine I et métarhodopsine I \leftrightarrow II. Cette exemple a été observé avec des disques solubilisés dans du déoxycholate (2.0 %). On remarque que cette augmentation transitoire de la transmission est clairement située entre la première descente rapide (lumi-> métarhodopsine I) et la remontée très lente (métarhodopsine I \leftrightarrow II) que l'on voit à 20 °C. On constate aussi que la vitesse et l'amplitude de cette anomalie augmentent avec la température ce qui nous assure que ce phénomène n'est pas un artefact de notre appareillage, d'autant plus qu'il a été observé avec les membranes natives ou solubilisées dans d'autres détergents. Les valeurs des

temps de vie pour l'apparition et la disparition de ce signal (τ_a et τ_b) sont répertoriées dans les tableaux 4.9 et 4.10 qui suivent.

Figure 4.16

Signal optique observé entre les intermédiaires lumi. et métarhodopsine I.

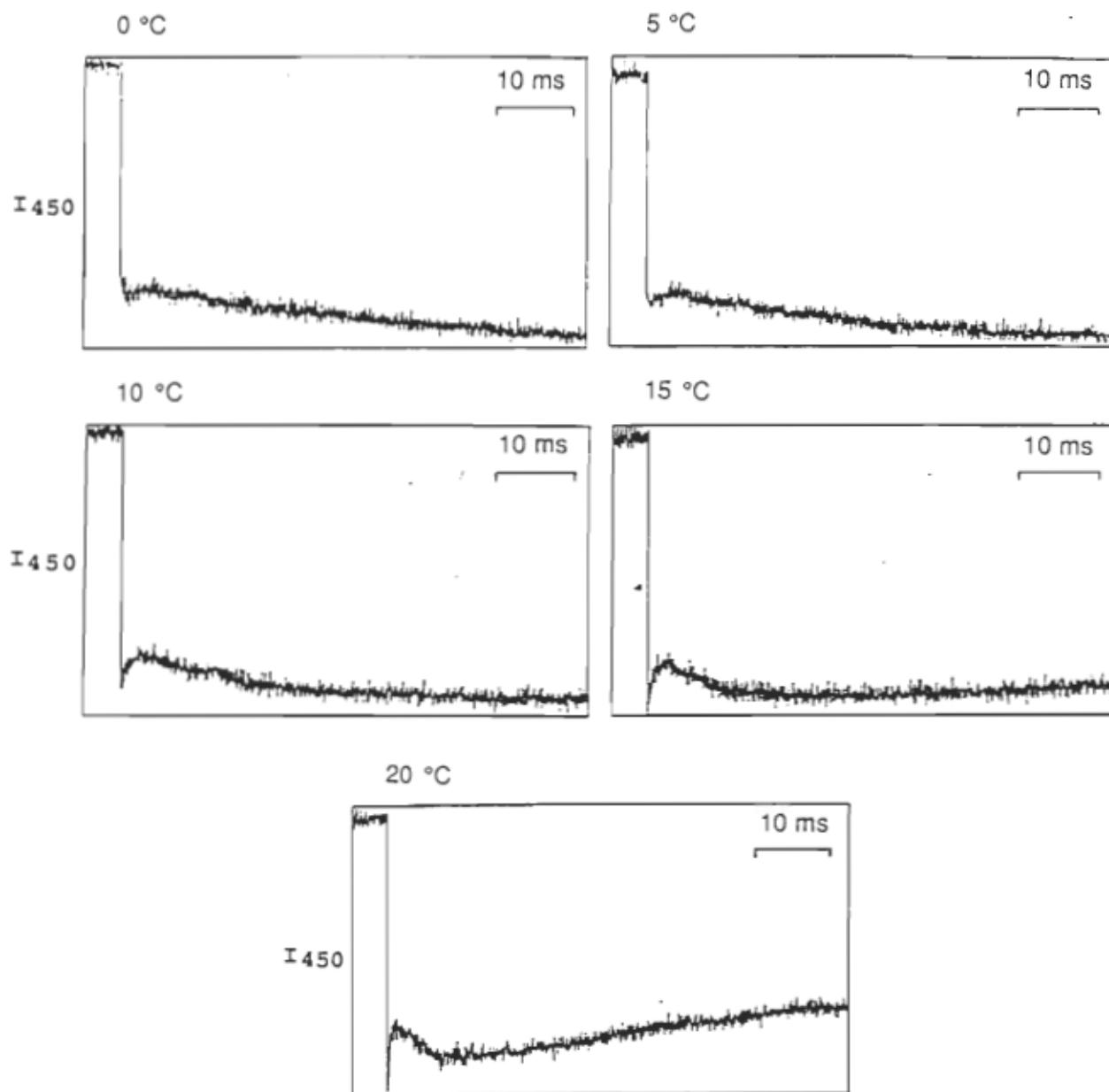


Tableau 4.9

Tableau des temps de vie (τ_a) à différentes températures

dans différentes conditions expérimentales.

Conditions expérimentales	Temps de vie (τ_a) (Les valeurs sont en μs)				
	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
Disques	57.2 ±6	-----	-----	-----	27.9 ±3
Disques dissous dans 0.5% d'octylglucoside	166 ±20	184 ±20	-----	-----	-----
Disques dissous dans 2.0% de cholate	184 ±10	-----	-----	-----	16.2 ±2
Disques dissous dans 2.0% de déoxycholate	-----	2030 ±80	944 ±30	423 ±20	269 ±10
Disques dissous dans 4.0% d'Ammonyx-LO	Non visible	Non visible	Non visible	Non visible	Non visible

--- : Résultat non disponible.

Tableau 4.10

Tableau des temps de vie (τ_b) à différentes températures
dans différentes conditions expérimentales.

Conditions expérimentales	Temps de vie (τ_b) (Les valeurs sont en ms)				
	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
Disques	0.00726 ± 0.0007	-----	-----	-----	Non visible
Disques dissous dans 0.5% d'octylglucoside	Non visible	Non visible	Non visible	Non visible	Non visible
Disques dissous dans 2.0% de cholate	8.54 ± 0.9	-----	-----	-----	4.61 ± 0.5
Disques dissous dans 2.0% de déoxycholate	-----	18.8 ± 0.1	11.9 ± 0.5	6.61 ± 0.4	Non visible
Disques dissous dans 4.0% d'Ammonyx-LO	Non visible	Non visible	Non visible	Non visible	Non visible

--- : Résultat non disponible.

Note: On ne voit pas de valeurs de τ_b dans l'octylglucoside car la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II a des temps de vie qui chevauchent ceux de τ_b .

Il est important de remarquer que ce signal n'est visible que si la vitesse de formation de la métarhodopsine II est suffisamment lente. Il est donc impossible de l'observer dans des membranes dissoutes dans l'Ammonyx-LO ou l'octylglucoside.

Pour garder l'analogie avec les sections précédentes, le tableau 4.11 qui suit, compare pour chacune des phases du signal les variations de vitesse en présence de différents agents de solubilisation. On constate que les deux

cinétiques sont influencées par les différents détergents et que cette influence se traduit par un ralentissement des vitesses de transition par rapport aux membranes natives.

Tableau 4.11

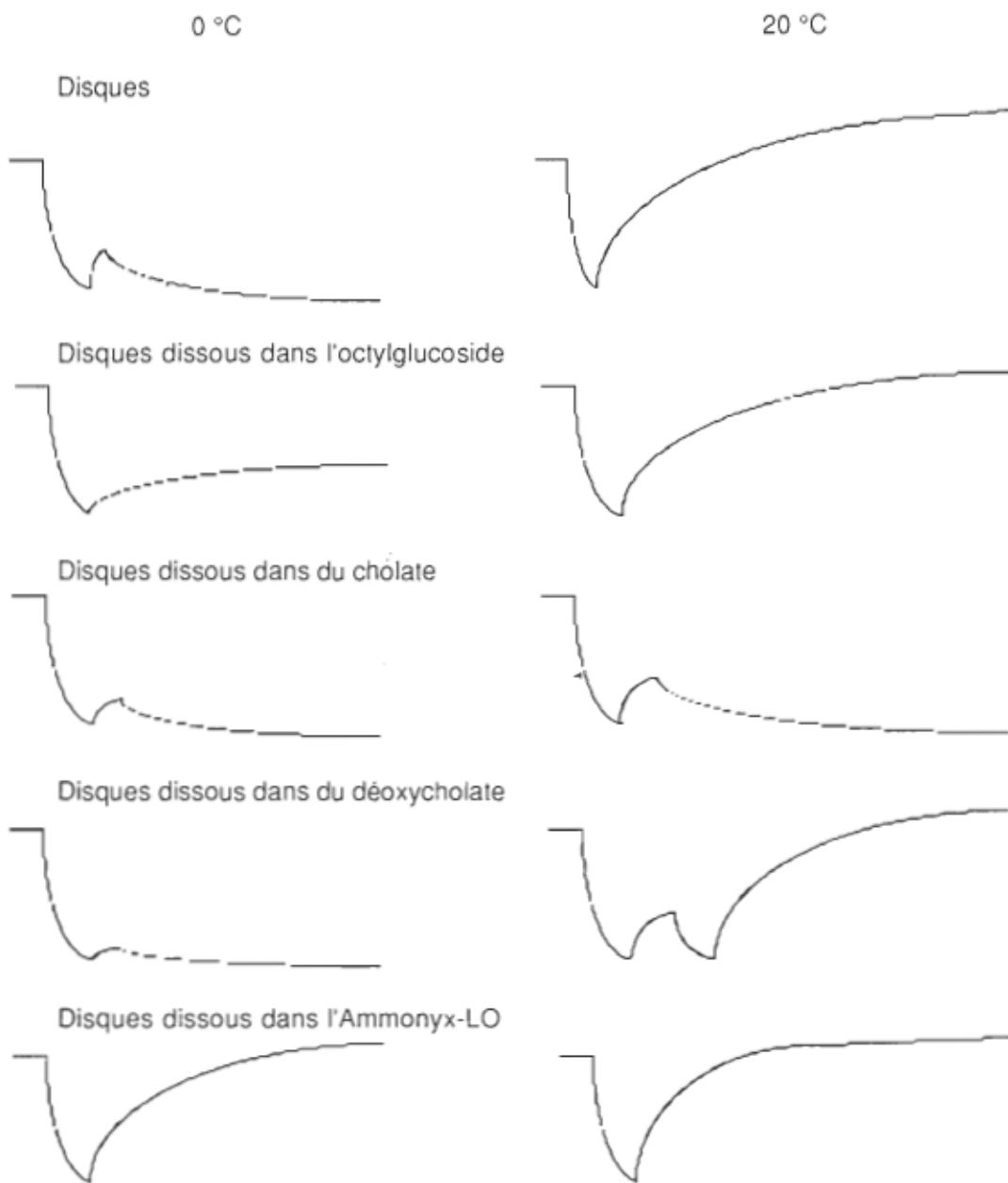
Tableau comparatif des vitesses de transition de (τ_a) et (τ_b) dans différents détergents.

Vitesse par rapport aux membranes natives à 0 °C		
Agent de solubilisation	(τ_a)	(τ_b)
Disques	57.2 ± 6 µs	7.26 ± 0.7 ms
Octylglucoside	2.9 fois + lent	Non visible
Cholate	3.2 fois + lent	1.2 fois + lent
Déoxycholate	35.4 fois + lent	2.5 fois + lent
Ammonyx-LO	Non visible	Non visible

Pour bien se représenter les différentes apparitions et disparitions de ces nouvelles cinétiques et ensuite en tirer un modèle, voyons schématiquement à l'aide de la figure 4.17 comment se comporte cette anomalie pour les différents agents de solubilisations à 0 et 20 °C.

Figure 4.17

Représentation schématique de l'observation des nouvelles cinétiques pour différentes conditions expérimentales.

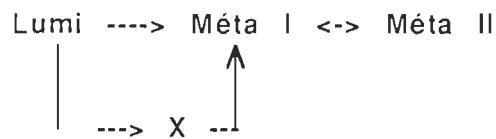


A 0 °C on voit apparaître l'anomalie pour tous les détergents à l'exception de Ammonyx-LO. On peut expliquer ceci en supposant qu'à 0 °C la transition de métarhodopsine I \leftrightarrow II est suffisamment ralentie pour laisser paraître l'anomalie sans la camoufler en chevauchant les mêmes temps de vie, ce qui ne serait pas le cas pour les disques dissous dans l'Ammonyx-LO. Si on reprend cette explication à 20 °C, on voit bien qu'il n'y a effectivement que les détergents qui ralentissent la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II qui permettent d'observer l'anomalie.

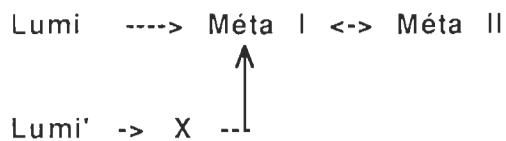
Cette nouvelle transition optique qui est normalement cachée sous la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II ne peut pas s'expliquer par la séquence traditionnelle de décoloration de la rhodopsine. Si on l'attribue à un nouvel intermédiaire, on peut imaginer trois nouvelles séquences photolytiques pour expliquer les résultats que nous obtenons. Le premier modèle est linéaire, il suppose donc deux nouveaux intermédiaires X_1 et X_2 associés au deux temps de vie (τ_a) et (τ_b). La nouvelle séquence photolytique se représenterait ainsi:



Le deuxième modèle est parallèle et se scinde en deux possibilités qui n'impliquent qu'un seul nouvel intermédiaire X. La première possibilité c'est que parallèlement à la transition lumi- \rightarrow métarhodopsine I, s'effectue la transition lumi- \rightarrow X et X- \rightarrow métarhodopsine I, ce qui amène à la nouvelle séquence suivante:



La deuxième possibilité est de supposer l'existence d'une autre forme de lumirhodopsine coexistant avec la première mais dont le passage vers la métarhodopsine I nécessiterait la transition par un intermédiaire X. La séquence serait comme suit:



Il est à noter que l'existence de deux types de lumirhodopsine a déjà été proposée par d'autres auteurs (Einterz et al., 1987) pour expliquer l'existence de deux bathorhodopsines qui transitionneraient de manière parallèle pour former des lumirhodopsines.

Nos résultats ne nous permettent pas de favoriser un mécanisme plus que l'autre. Néanmoins, ils montrent clairement que les transitions optiques de la rhodopsine dans l'intervalle de temps qui va des microsecondes aux millisecondes ne peut s'expliquer par la séquence photolytique classique du pigment.

5 - Conclusion

5 - Conclusion.

Le premier problème qu'il nous a fallu résoudre lors de la réalisation de cette étude a été celui du traitement des signaux bruts obtenus lors de la photolyse. En effet, les signaux étaient de faible amplitude et comportaient une large part de bruit (entre 50% et 100%). Puisqu'il était impossible d'améliorer les signaux de façon expérimentale, la solution se trouvait dans un traitement de signal puissant et adéquat. Ainsi, à partir d'une première tentative de développement d'une méthode par polynômes et série de Taylor, une méthode qui a très bien réussi même si elle ne donnait pas la précision que nous souhaitions, nous avons mis au point, pour le traitement des signaux, une autre méthode beaucoup plus puissante: celle du gradient conjugué qui s'est avéré excellente autant du point de vue de la vitesse de calcul que de la fiabilité. C'est avec cette méthode que nous avons réussi à isoler les temps de vie des intermédiaires analysés dans les expériences de photolyse.

A partir de travaux antérieurs montrant qu'il y a un changement conformationnel important lors de la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II et qu'il est possible de mettre en évidence ce changement et de moduler sa vitesse en rigidifiant ou fluidifiant l'environnement immédiat de la rhodopsine à l'aide de détergents, nous avons étendu ce procédé à la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I afin de vérifier la présence de changements conformationnels lors de la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I et de comparer l'influence des divers agents de solubilisation avec leurs effets déjà connus sur la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II. Nos résultats montrent que l'influence des détergents sur la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I est différente de celle qui est observée sur la transition

métarhodopsine I \leftrightarrow II; elle est beaucoup plus faible et tous les détergents ralentissent sa cinétique par rapport aux membranes natives alors qu'il y a accélération ou ralentissement des cinétiques pour la transition métarhodopsine I \leftrightarrow II. D'un point de vue mécanique, l'explication la plus vraisemblable du ralentissement de la transition se trouve dans la disparition de la pression latérale exercée sur la rhodopsine par la membrane et nous amène à postuler l'existence d'un changement conformationnel dans des axes perpendiculaires, lors des transitions lumi \rightarrow métarhodopsine I et métarhodopsine I \leftrightarrow II. Ainsi le changement conformationnel lors de la transition lumi \rightarrow métarhodopsine I pourrait être une contraction de la partie centrale de la protéine et/ou un étirement de cette dernière. Un tel changement serait modulé par la pression latérale sur la molécule.

Enfin, l'analyse détaillée des signaux optiques associés aux intermédiaires lumi. et métarhodopsine nous a amenés à la découverte accidentelle, mais fort bien accueillie, d'un nouveau signal qui ne peut s'expliquer par la séquence traditionnelle de la décoloration de la rhodopsine. Pour expliquer les résultats obtenus nous avons dû introduire deux nouveaux intermédiaires X_1 et X_2 ou un nouvel intermédiaire X (selon le modèle choisi) entre la lumi. et la métarhodopsine I. Il faudra se pencher plus à fond sur cette nouvelle séquence photolytique pour déterminer s'il y a un ou deux nouveaux intermédiaires.

Bibliographie

Abran, D. Dissipation d'énergie dans la rhodopsine: une étude par photolyse. Mémoire de maîtrise; 1987.

Ali, M. A.; Klyne, M. A. La vision chez les vertébrés. Décarie Masson; 1986: 226 p.

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

Attwood, P.J.; Gutfreund, H. The application of pressure relaxation to the study of the equilibrium between metarhodopsin I and II from bovine retinas. FEBS Lett.; 1980; 119: 323-326.

Bagley, K.A.; Balogh-Nair, V.; Croteau, A.A.; Dollinger, G.; Ebrey, T.G.; Eisenstein, L.; Hong, M.K.; Nakanishi, K.; Vittitow, J. Fourier-transform infrared difference spectroscopy of rhodopsin and its photoproducts at low temperature. Biochemistry; 1985; 24: 6055-6071.

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

Baldwin, P. A.; Hubbell, W. L. Effects of lipid environment on the light-induced conformational changes of rhodopsin. 2. Roles of lipid chain length, unsaturation, and phase state. Biochemistry; 1985b; 24: 2633-2639.

Birge, R.R. Photophysics of light transduction in rhodopsin and bacteriorhodopsin. Annu. Rev. Biophys. Bioeng.; 1981; 10: 314-354.

Boucher, F.; Leblanc, R. M. Energy storage in the primary photoreaction of bovine rhodopsin. A photoacoustic study. Photochem. photobiol.; 1985; 41: 459-465.

Brown, P. K. Rhodopsin rotates in the visual receptor membrane. Nature New Biology; 1972 ; 236: 35-38.

Buchert, J.; Stefancic, V.; Doukas, A.G.; Alfano, R.R.; Callender, R.H.; Pande, J. Picosecond kinetics absorption and fluorescence studies of bovine rhodopsin with fixed 11-ene. Biophys. J.; 1983; 43: 279-283.

Busch, G.E.; Appelbury, M.L.; Lamola, A.A.; Rentzepis, P.M. Formation and decay of prelumirhodopsin at room temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 1972; 69: 2802-2806.

Clapp, R. E. Piezoelectric energy transduction in alpha-helical proteins. The MITRE Corporation Bedford, Massachusetts; 1987.

Cone, R. A. Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. Nature New Biology; 1972 ; 236: 39-43.

Cooper, A. Energy uptake in the first step of visual excitation. Nature; 1979a; 282: 531-533.

DeGrip, W.J.; Gillespie, J.; Rothschild, K.J. Carboxyl group involvement in the meta I and meta II stages in rhodopsin bleaching. A Fourier transform infrared spectroscopic study. Biochim. Biophys. Acta.; 1985; 809: 97-106.

Denton, E.J. The contribution of the oriented photosensitive and other molecules to the absorption of whole retina. Proc. Roy. Soc. B.; 1959; 150: 78-94.

Doukas, A.G.; Aton, B.; Callender, R.H.; Ebrey, T.G. Resonance raman studies of bovine metarhodopsin I and metarhodopsin II. Biochemistry; 1978; 17: 2430-2435.

Doukas, A.G.; Junnarkar, M.R.; Alfano, R.R.; Callender, R.H.; Kakitani, T.; Honig, B. **Fluorescence quantum yield of visual pigments: evidence for subpicosecond isomerization rates.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 1984; 81: 4790-4794.

Doukas, A.G.; Lu, P.Y.; Alfano, R.R. **Fluorescence relaxation kinetics from rhodopsin and isorhodopsin.** Biophys. J.; 1981; 35: 547-550.

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

Ebrey T. G. **Circular dichroism investigation of rhodopsin.** Exp. Eye. Res.; 1973; 17: 545-556.

Einterz, C. M.; Lewis, J. W.; Klier, D. S. **Spectral and kinetic evidence for the existence of two forms of bathorhodopsin.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 1987; 84: 3699-3703.

Fukada, Y.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T.; Ito, M.; Kodama, A.; Tsukida, K. **Studies of structure and function of rhodopsine by use of cyclopentatrienylidene 11-cis-locked-rhodopsin.** Biochemistry; 1984; 23: 5826-5832.

Ganter, U.M.; Gartner, W.; Siebert, F. **Rhodopsin-lumirhodopsin phototransition of bovine rhodopsin investigated by fourier transform infrared difference spectroscopy.** Biochemistry; 1988; 27: 7480-7488.

Green, G.H.; Monger, T.G.; Alfano, R.R.; Aton, B.; Callender, R.H. . Nature; 1977; 269: 179-180.

Gruen,D. W. R.; Wolfe,J. Lateral tensions and pressures in membranes and lipid monolayers. Biochim. Biophys. Acta; 1982; 688: 572-580.

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

Hubbard, R.; Kropf, A. The action of light on rhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 1958; 44: 130-139.

Kandori, H.; Matuoka, S.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T.; Ito, M.; Tsukida, K.; Balogh-Nair, V.; Nakanishi, K. Mechanism of isomerization of rhodopsin studied by use of 11-cis-locked rhodopsin analogues excited with a picosecond laser pulse. Biochemistry; 1989a; 28: 6460-6467.

Kandori, H.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T. Absolute absorption spectra of batho- and photo-rhodopsins at room temperature. Picosecond laser photolysis of rhodopsin in polyacrylamide. Biophys. J.; 1989b; 56: 453-457.

Kliger, D.S.; Horwitz, J.S.; Lewis, J.W.; Einterz, C.M. Evidence for a common batho intermediate in the bleaching of rhodopsin and isorhodopsin. Vision Res.; 1984; 24: 1465-1470.

Kuhne, W. Chemical processes in the retina. Handbook of physiology; 1879; 3:1;1274-1316.

Lamola, A.A.; Yamane, T.; Zipp, A. Effects of detergents and high pressures upon the metarhodopsin I \leftrightarrow metarhodopsin II equilibrium. Biochemistry; 1974; 13: 738-745.

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

Liebman, P.A. Microspectrophotometry of photoreceptors. Handbook of Sensory Physiology; 1972; VII/I: 481-528.

Litman, B.J.; Kalisky, O.; 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.

Maeda, A.; Ogurusu, T.; Shichida, Y.; Tokunaga, F.; Yoshizawa, T. Formation of a 7-cis retinal pigment by irradiating cattle rhodopsin at low temperature. FEBS Lett.; 1978; 92: 77-80.

Maeda, A.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T. Formation of 7-cis and 13-cis retinal pigments by irradiating squid rhodopsin. Biochemistry; 1979; 18: 1449-1453.

Mao, B.; Ebrey, T.G.; Crouch, R. Bathopproducts of rhodopsin, isorhodopsine I, and isorhodopsin II. Biophys. J.; 1980; 29: 247-256.

Matthews, R.G.; Hubbard, R.; Brown, P.K.; Wald, G. Tautomeric forms of metarhodopsin. J. Gen. Physiol.; 1963; 47: 215-240.

Mitchell, D. C.; Kibelbek, J.; Litman, B. J. Rhodopsin in dimyristoylphosphatidylcholine-reconstituted bilayers forms metarhodopsin II and activates G. Biochemistry; 1991; 30: 37-42.

Mitchell, D. C.; Straume, M.; Miller, J. L.; Litman, B. J. Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids. Biochemistry; 1990; 29: 9143-9149.

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

Nakanishi, K.; Honig, B.; Dinur, U.; Balogh-Nair, V.; Gawinowicz, M. A.; Arnaboldi, M.; Motto, M. G. An external point-charge model for wavelength regulation in visual pigments. *Journal of the American Chemical Society*; 1979; 101: 7084-7086.

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

Okada,T.; Kandori,H.; Shichida,Y.; Yoshizawa,T.; Denny,M.; Zhang,B.-W.; Asato,A. E.; Liu,R. S. H. Spectroscopic study of the batho-to-lumi transition during the photobleaching of rhodopsine using ring-modified retinal analogues. *Biochemistry*; 1991; 30: 4796-4802.

Olive, J. The structural organization of mammalian retinal disc membrane. *Int. Rev. of Cytology*; 1980; 64: 107-164.

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.; Kudelin, A.B. The complete amino acid sequence of visual rhodopsin. *Bioorg. Khim.*; 1982; 8: 1011-1014.

Parkes, J. H.; Lieberman, P. A. Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions. *Biochemistry*; 1984; 23: 5054-5461.

Pellicone, C.; Nullans, G.; Virmaux, N. V. Localization of light-induced conformational changes in bovine rhodopsin. FEBS Lett; 1985; 181: 179-188.

Peters, K.; Applebury, M.L.; Rentzepis, P.M. Primary photochemical event in vision: proton translocation. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.; 1977; 74: 3119-3123.

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

Rothschild, K.J.; Cantore, W.A.; Marrero, H. Fourier transform infrared difference spectra of intermediates in rhodopsin bleaching. Science; 1983; 219: 1333-1335.

Rudzki, J.E.; Peters, K.S. Picosecond absorption studies on rhodopsin and isorhodopsin in detergent and native membrane. Biochemistry; 1984; 23: 3843-3848.

Salesse, C.; Boucher, F.; Leblanc, R. M. Propriétés interfaciales des phospholipides de la membrane des bâtonnets rétiniens. Rev. Can. Biol. Exptl.; 1983; 42: 123-130.

Sengbusch, G. V.; Stieve, H. Flash photolysis of rhodopsin. II. Measurements on rhodopsin digitonin solutions and fragments of rod outer segments. Z. Naturforsch; 1971; 26 b: 861-862.

Shichida, Y.; Matuoka S.; Yoshizawa, T. Formation of photorhodopsin, a precursor of bathorhodopsin, detected by a picosecond laser photolysis at room temperature. *Photobiochem. Photobiophys.*; 1984; 7: 221-228.

Siebert, F.; Mantele, W.; Gerwert, K. Fourier-transform infrared spectroscopy applied to rhodopsin, the problem of the protonation state of retinylidene Schiff base re-investigated. *Eur. J. Biochem.*; 1983; 136(119-127).

Stewart, J. G.; Baker, B. N.; Williams, T. P. Kinetic evidence for a conformational transition in rhodopsin. *Nature*; 1975 ; 258: 89-90.

Stone, W.L.; Farnsworth, C.C.; Dratz, E. A. A reinvestigation of the fatty acid content of bovine rat and frog retinal rod outer segments. *Exp. Eye Res.*; 1979; 28: 387-397.

Straume, M.; Mitchell, G. C.; Miller, J. L.; Litman, B. J. Interconversion of metarhodopsins I and II: a branched photointermediate decay model. *Biochemistry*; 1990; 29: 9135-9142.

Stryer, L.; Hurley, J.B.; Fung, B.K.-K. Transduction: an amplifier protein in vision. *Trends Biol. Sci.*; 1981; 81: 245-247.

Stryer, L. Les molécules de la vision. *Pour La Science*; 1987; 119: 18-27.

Sundstrom, V.; Rentzepis, P.M.; Peters, K.; Applebury, M.L. Kinetics of rhodopsin at room temperature measured by picosecond spectroscopy. Nature; 1977; 267: 645-646.

Warshel, A.; Barboy, N. Energy storage and reaction pathways in the first step of the vision process. J. Am. Chem. Soc.; 1982; 104: 1469-1476.

Yoshizawa, T.; Wald, G. Pre-lumirhodopsine and the bleaching of visual pigments. Nature; 1963; 197: 1279-1286.