

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

LOUISE GUERETTE

PREPARATION ET ANALYSE DE FORMES OLIGOMERIQUES

DE LA RHODOPSINE. INFLUENCE DE L'AGREGATION

SUR SES PROPRIETES PHOTOCHEMIQUES.

SEPTEMBRE 1986

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

RESUME

Grâce à l'utilisation du lauryl sucrose comme détergent pour la solubilisation et la purification de la rhodopsine bovine, trois méthodes ont été mises au point afin de préparer de la rhodopsine purifiée dépourvue de détergent. Il a été ainsi possible de préparer des agrégats de rhodopsine stables dont les dimensions permettent l'analyse spectrale et photochimique. Deux types d'agrégats: les agrégats structurés et les agrégats amorphes, qui ne sont pas des cristaux, se distinguent par leurs propriétés photochimiques.

L'analyse photochimique de ces agrégats révèle qu'ils ont un comportement photochimique différent de la rhodopsine contenue dans la membrane discale ou encore purifiée à l'aide de détergent.

Considérant que la décoloration des agrégats structurés ne dépasse pas l'étape lumirhodopsine et qu'à l'équilibre, ils contiennent approximativement 66% de lumirhodopsine et 33% de rhodopsine, on suppose la présence d'un photoéquilibre entre ces deux espèces.

De plus, la photosensibilité de la métarhodopsine I des agrégats amorphes révèle hors de tout doute l'existence d'un photoéquilibre entre la rhodopsine et la métarhodopsine I.

Enfin, la rhodopsine oligomère des agrégats structurés se trouve dans un environnement protéique constitué d'un réseau tridimensionnel rigide empêchant probablement tout mouvement de la surface de la protéine. Nous proposons qu'un changement sensible s'opère au cours de la transition lumirhodopsine - métarhodopsine I, bloquée dans les agrégats.

REMERCIEMENTS

A tous ceux et celles qui ont pu faciliter mon travail, aux membres du centre de recherche, aux techniciens du département de Chimie - Biologie, ainsi qu'à ceux de l'atelier mécanique, sincères remerciements.

Ma plus vive gratitude va au docteur François Boucher qui m'a accueillie dans son laboratoire. Il a dirigé cette recherche et m'a patiemment soutenue jusqu'à la fin. Son potentiel scientifique, autant par ses connaissances que par sa façon d'aborder les problèmes scientifiques rendent un travail sous sa direction, très stimulant.

TABLE DES MATIERES

RESUME	ii
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES.....	iv
LISTE DES HORS-TEXTES	ix
LISRE DES ABREVIATIONS	xi

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 La rétine	1
1.2 Le SEB.....	3
1.3 Le pigment visuel	3
1.4 L'environnement moléculaire	5
1.5 La séquence photolytique	9
1.6 La transduction visuelle.....	14
1.7 Pertinence du travail	18
1.8 Problématique du travail.....	19

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES.

2.1 Procédure de purification de la rhodopsine bovine.....	22
--	----

2.1.1 Préparation des segments externes des bâtonnets	
2.1.1.1 Dissection des yeux bovins	22
2.1.1.2 Extraction de la rétine	23
2.1.1.3 Isolation des segments externes des bâtonnets	23
2.1.1.4 Purification des segments externes des bâtonnets	23
2.1.2 Purification de la rhodopsine bovine	
2.1.2.1 Solubilisation de la rhodopsine	24
2.1.2.2 Délipidation de la rhodopsine par C.A.	25
a) Montage de la colonne	25
b) Chromatographie d'affinité (C.A.)	25
2.1.2.3 Dialyse de la rhodopsine éluée	26
2.1.3 Analyse spectrale de la rhodopsine purifiée	
2.1.3.1 Analyse qualitative	26
2.1.3.2 Analyse quantitative	27
2.2 Elimination du détergent	
2.2.1 Hydrolyse du lauryl sucrose	27
2.2.1.1 Hydrolyse enzymatique	
a) Choix de l'enzyme	27
b) Evaluation de l'activité estérasique	28
2.2.1.2 Hydrolyse alcaline	
a) Détermination du pH optimun	29

b) Hydrolyse alcaline à pH 10,5 en milieu dialysant	30
2.2.1.3 Evaluation du rendement de l'hydrolyse	31
2.2.2 Elimination du détergent d'échantillons de Rhod. solubilisée	32
2.2.2.1 Effet du milieu alcalin sur la rhodopsine solubilisée	
dans du lauryl sucrose	32
2.2.2.2 Par hydrolyse alcaline	33
2.2.2.3 Par dilution	33
2.3 Préparation de rhodopsine associée à une lectine	
2.3.1 Pour de la rhodopsine associée au lauryl sucrose	34
2.3.2 Pour de la rhodopsine non-associée au lauryl sucrose	35
2.4 Préparation de SEB séchés sur lamelle	35
2.5 Méthodes de caractérisation des agrégats de rhodopsine.	
2.5.1 Spectroscopie UV-visible	36
2.5.2 Spectroscopie photoacoustique	36
2.5.3 Spectroscopie de transmission - Microspectrophotométrie	39
2.5.4 Microphotographie	41
2.5.5 Techniques d'irradiation des agrégats de rhodopsine	
2.5.5.1 Spectroscopie U.V.-visible	41
2.5.5.2 Spectroscopie PA et Microspectrophotométrie	43
2.6 Solubilisation des agrégats de rhodopsine	43

2.7 Etude de la rhodopsine liée à la concanavaline A.....	44
2.8 Etude de SEB séchés sur lamelle.....	44
2.9 Produits utilisés	45

CHAPITRE 3: RESULTATS.

3.1 Spectre d'absorption de la rhodopsine bovine	48
3.2 Elimination du détergent	
3.2.1 Hydrolyse du détergent.....	50
3.2.2 Activité enzymatique en présence de divers substrats	51
3.2.3 Hydrolyse alcaline du lauryl sucrose	53
3.2.4 Effet du milieu alcalin sur la rhodopsine solubilisée dans le lauryl sucrose.....	55
3.2.5 Discussion	57
3.3 Dédétergation de la rhodopsine	
3.3.1 Par hydrolyse enzymatique.....	60
3.3.2 Par hydrolyse alcaline	61
3.3.3 Par dilution	64
3.3.3.1 Aspect physique de la rhodopsine agrégée	65
3.3.4 Discussion	68
3.4 Spectroscopie et photochimie de la rhodopsine agrégée	
3.4.1 Spectre d'absorption.....	70

3.4.2 Photosensibilité de la rhodopsine agrégée	70
3.4.3 Spectres photoacoustiques des agrégats	70
3.4.4 Microspectrophotométrie	76
3.4.5 Discussion	82
3.5 Photochimie de la rhodopsine monomérique.....	84
3.5.1 Photochimie de la rhodopsine liée à la Con A	84
3.5.2 SEB séchés sur lamelles	87
3.5.3 Discussion	89
CHAPITRE 4: CONCLUSION.....	90
BIBLIOGRAPHIE	94

LISTE DES HORS-TEXTES

Figure 1: Schéma d'une cellule photoréceptrice en bâtonnet.....p.	2
Figure 2: Modèle d'organisation moléculaire de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine à même la bicouche membranaire du disque.....p.	4
Figure 3: Spectre d'absorption U.V.-visible de la rhodopsine et du 11-cis rétinol.....p.	6
Figure 4: Arrangement moléculaire de la membrane discale.....p.	7
Figure 5: Séquence photolytique de la rhodopsine bovine.....p.	11
Figure 6: Modèle biochimique de la transduction visuelle.....p.	16
Figure 7: Diagramme du spectrophotomètre par effet photoacoustique...p.	37
Figure 8: Diagramme du microspectrophotomètre.....p.	40
Table 1: Liste des produits utilisés.....p.	46
Figure 9: Structure et chromatogramme du lauryl sucrose.....p.	47
Figure 10: Spectre d'absorption U.V.-visible de la rhodopsine solubilisée dans du lauryl sucrose 0,2% (p/v).....p.	49
Figure 11: Activité enzymatique de l'estérase de foie de porc sur divers substrats.....p.	52
Figure 12: Chromatogrammes du lauryl sucrose incubés durant 24 heures à divers pH alcalins.....p.	54
Figure 13: Evaluation de l'hydrolyse alcaline du lauryl sucrose 1,0% (p/v).....p.	56
Figure 14: Evaluation de l'hydrolyse alcaline du détergent d'une solution de rhodopsine bovine solubilisée dans du lauryl sucrose 0,2% (p/v).....p.	62

Figure 15: Spectre U.V.-visible de la rhodopsine solide obtenue par hydrolyse alcaline du lauryl sucrose.....	p.63
Figure 16: Microphotographies d'agrégats de rhodopsine obtenus par la méthode de dilution.....	p.66
Figure 17: Microphotographies d'agrégats de rhodopsine obtenus par la méthode de dilution.....	p.67
Figure 18: Spectre d'absorption U.V.-visible d'agrégats de rhodopsine agrégée.....	p.71
Figure 19: Spectre U.V.-visible de la photosensibilité de la rhodopsine agrégée.....	p.72
Figure 20: Spectre photoacoustique de la rhodopsine agrégée.....	p.74
Figure 21: Spectre photoacoustique de la rhodopsine agrégée.....	p.75
Figure 22: Spectre de transmission de la rhodopsine agrégée pris au microspectrophotomètre.....	p.77
Figure 23: Spectre de transmission de la rhodopsine agrégée pris au microspectrophotomètre.....	p.78
Figure 24: Spectre de transmission de la rhodopsine agrégée pris au microspectrophotomètre.....	p.79
Figure 25: Solubilisation de la rhodopsine agrégée après irradiation.....	p.81
Figure 26: Spectre photoacoustique de la rhodopsine liée à la concanavalline A et de la concanavalline A seule.....	p.85
Figure 27: Spectre photoacoustique de la rhodopsine liée à la concanavalline A.....	p.86
Figure 28: Spectre U.V.-visible de SEB séchés sur lamelles.....	p.88
Figure 29: Schéma réactionnel du pigment visuel.....	p.92

LISTE DES ABREVIATIONS

B.E.	butyrate d'éthyle
C10	chaîne à 10 carbones
C12	chaîne à 12 carbones
C14	chaîne à 14 carbones
C16	chaîne à 16 carbones
C.A.	chromatographie d'affinité
Ca ⁺⁺	ion calcium
CCM	chromatographie sur couche mince
CMC	concentration micellaire critique
Con A	concanavaline A
D.O.	densité optique
ϵ	coefficient d'extinction molaire
G	protéine GTP-liante
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
hres	heures
Km	constante de Michaelis
Lumi	lumirhodopsine
L.S.	lauryl sucrose
MI, Méta II	métarhodopsine I
MII, Méta II	métarhodopsine II
min.	minutes
Na ⁺	ion sodium
O.G.	octyl glucoside
PA	photoacoustique

PC	phosphatidylcholine
PDE	phosphodiesterase
PE	phosphatidyléthanolamine
PL	phospholipides
PS	phosphatidylsérine
Rhod	rhodopsine
SEB	segments externes des bâtonnets
U.V.	ultra violet

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La vision est le mécanisme physiologique par lequel les radiations lumineuses donnent naissance à des sensations permettant aux animaux une perception du monde extérieur. Physiologiquement, c'est la transformation de l'énergie lumineuse visible en énergie électrique dans le réseau nerveux.

1.1 La rétine

Chez les vertébrés, la vision s'accomplit au niveau de l'oeil, plus précisément au niveau de la rétine, représentant la seule partie photosensible de l'oeil. L'image perçue au niveau de la rétine qui tapisse le fond du globe oculaire, est transmise par le tissu nerveux pour se définir au niveau du cortex cérébral. La rétine contient 6 types de cellules nerveuses (Shichi, 1983) dont deux morphologiquement spécialisées dans la transduction de l'énergie lumineuse; soit les cônes et les bâtonnets. La lumière traverse la couche de cellules nerveuses pour atteindre les cellules photoréceptrices, siège de la transduction visuelle.

Les cônes sont les photorécepteurs de la vision photopique, i.e. de la vision des couleurs, et les bâtonnets, les photorécepteurs de la vision en lumière atténuée (vision scotopique). Contrairement aux bâtonnets contenant tous le même pigment, les cônes contiennent différents pigments.

La cellule photoréceptrice (figure 1, Schéma du bâtonnet) en forme de bâtonnet se compose de la synapse terminale, du segment interne et

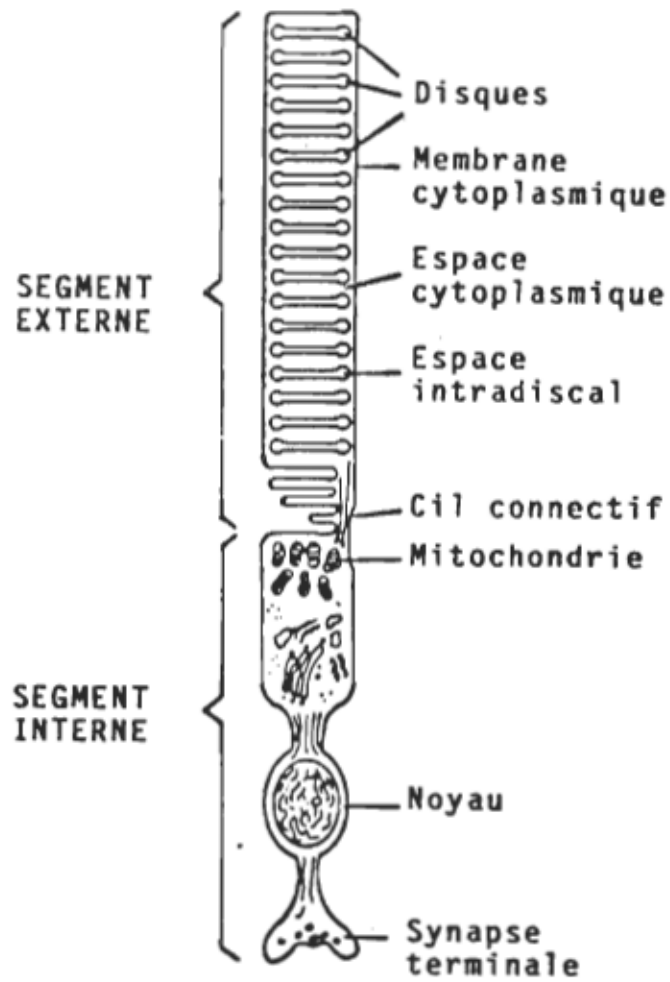


Figure 1: Schéma d'une cellule photoréceptrice en bâtonnet.

(O'Brien, 1982)

du segment externe (SEB). Ces deux derniers sont reliés par un fragile faisceau de microtubules appelé cil connectif (Dartnall, 1972).

1.2 Le SEB

La structure cylindrique du segment externe (1 μm de diamètre x 10 μm de long) (Haggins et al, 1973) se forme par l'empilement de structures membranaires aplaties, les disques (de 500 à 2 000 disques/SEB). La membrane discale se compose d'une bicouche de lipides de 60 à 70 Å d'épaisseur, et de protéines dont le pigment visuel appelé rhodopsine (10^5 molécules de rhodopsine/disque) (Dratz et Hargrave, 1983).

1.3 Le pigment visuel

La rhodopsine, responsable du processus primaire de la vision baigne dans la matrice lipidique des SEB. Composante protéique majeure de la membrane des disques, elle se forme par liaison covalente d'une glycoprotéine transmembranaire (l'opsine) avec un chromophore, le 11-cis rétinol (aldéhyde de la vitamine A).

La structure primaire de l'opsine est un polypeptide simple composé de 348 acides aminés (Ovchinnikov et al., 1982) dont la séquence est illustrée en figure 2. La rhodopsine est incluse asymétriquement dans la membrane discale (Chen et Hubbell, 1973; Hargrave et al., 1982). L'extrémité carboxyle baignant dans l'espace cytoplasmique possède 7 sites de phosphorylation (Hargrave et al., 1980) et représente la portion extramembranaire la plus importante de la protéine. La portion aminée terminale possède onze sucres dont le N-acétyl-glycosamine et le mannose

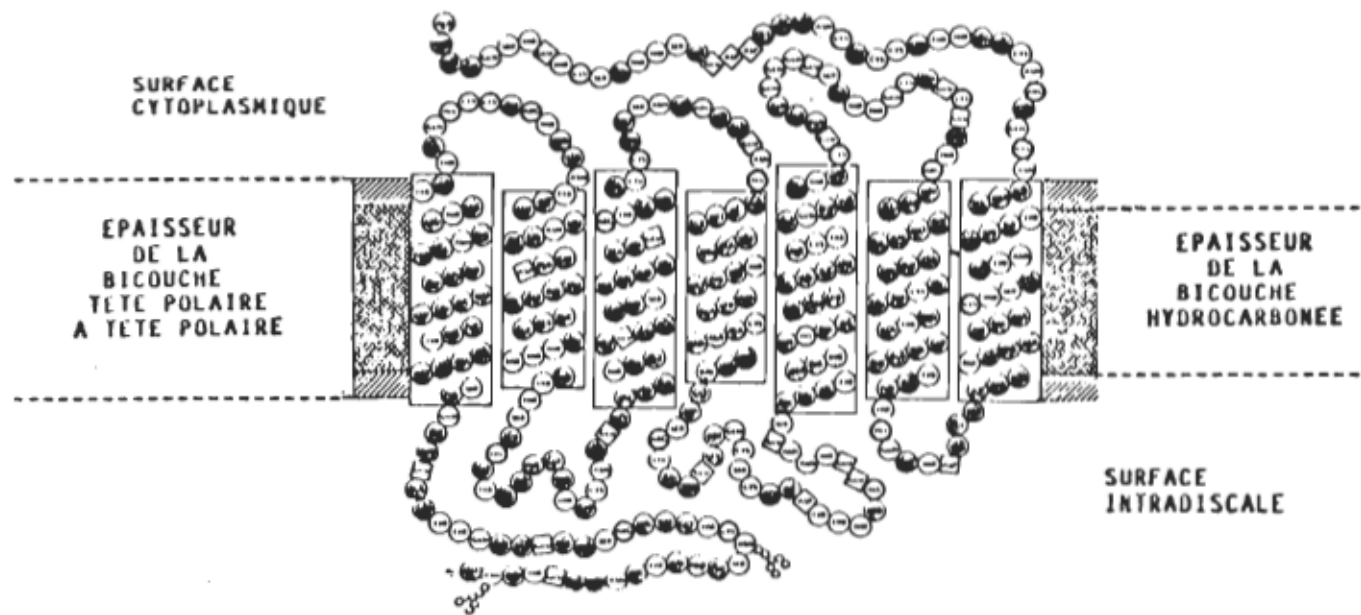


Figure 2: Modèle d'organisation moléculaire de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine à même la bicouche membranaire du disque. (Dratz & Hargrave, 1983). Les acides aminés des chaînes chargés positivement sont illustrés par les cercles ombragés & les acides aminés chargés négativement sont illustrés par les carrés ombragés. Les hydrates de carbone sont indiqués par des chaînes de petits cercles près de l'extrémité aminée. Les acides aminés hydrophobes sont indiqués par des cercles dont l'intérieur est ombragé.

(Liang et al., 1979). La portion transmembranaire de la rhodopsine semble hautement hydrophobe et la traverse 7 fois perpendiculairement à la surface, sous la forme d'une structure arrangée en α -hélices (à 60% de la protéine totale) (Shichi et al., 1969; Stubbs et al., 1976; Litman, 1979).

Le chromophore est lié au groupement ϵ -aminé de l'opsine par une liaison de base de Schiff (Bownds, 1967; Akhtar et al., 1967). Ce chromophore hydrophobe se trouve parallèle au plan de la membrane discale et situé au centre de la bicouche dans un environnement hydrophobe (Fager et al., 1978; Thomas et Stryer, 1982; Dratz et Hargrave, 1983).

Le pigment présente un spectre d'absorption caractéristique (voir figure 3) possédant 3 bandes d'absorption. Ce complexe chromophore-protéine présente deux bandes: α (498nm) et β (340 nm), dues au chromophore, ainsi qu'une bande γ (278 nm) due aux acides aminés aromatiques de l'opsine (Honig et Ebrey, 1974; Shichi, 1983). La bande α , habituellement bien définie sert à identifier le pigment, et est attribuée au 11-cis rétinol lié par un lien aldymine à l'opsine. La bande β est due au rétinol libre. Le spectre d'absorption est caractéristique de la structure électronique du chromophore baignant dans un microenvironnement protéique défini. Toute modification photoinduite sera évaluée et identifiée par des changements spectraux (Nakanishi et al., 1979; Honig et al., 1979).

1.4 L'environnement moléculaire

La rhodopsine baigne dans la matrice lipidique selon une architecture particulière (voir figure 4). Les membranes sont composées à 60 % en

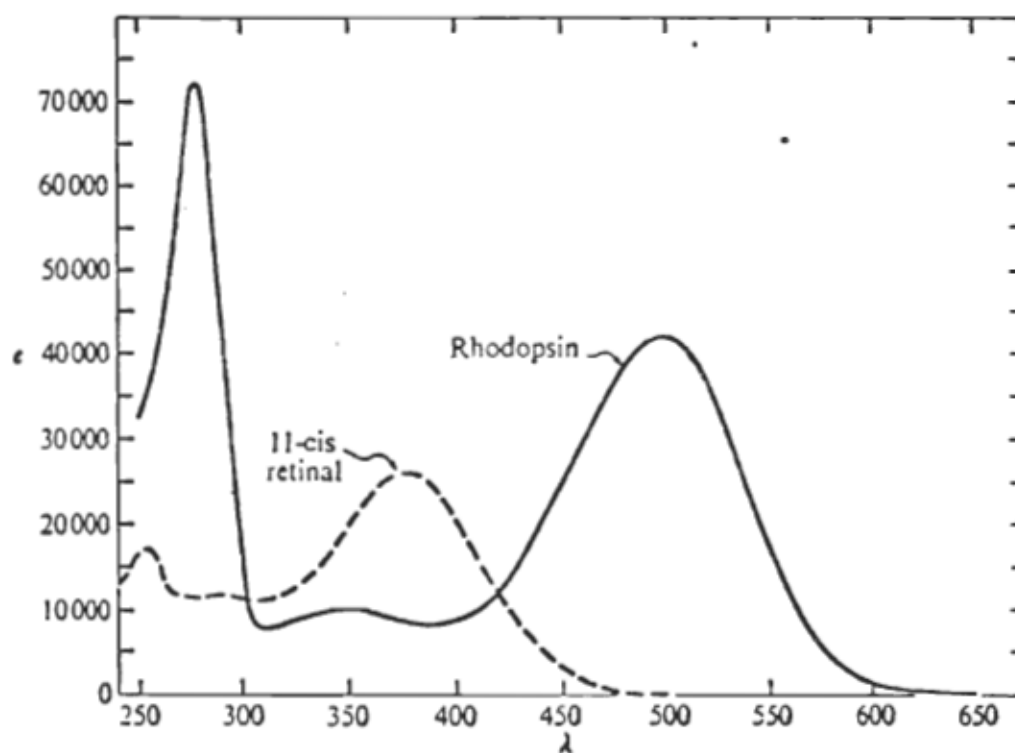


Figure 3: Spectre d'absorption U.V.-visible de la rhodopsine (trait continu) & du 11-cis rétinale (trait hachuré)

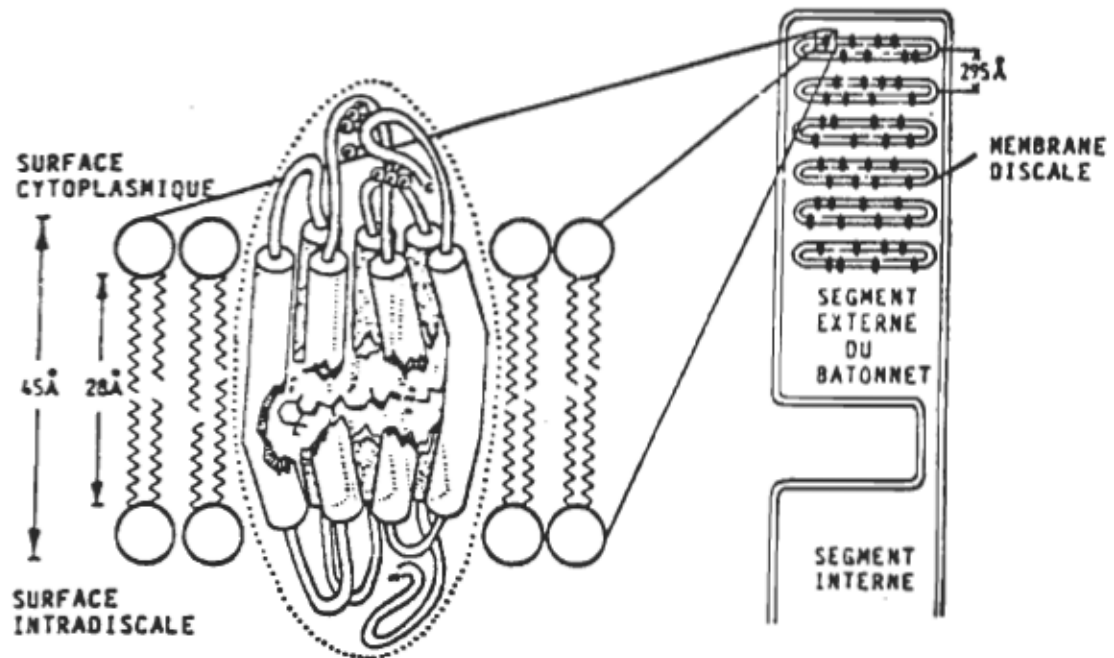


Figure 4: Arrangement moléculaire de la membrane discale (Dratz et Hargrave, 1983). Modèle d'organisation de la structure générale de la rhodopsine et de son association avec la bicouche phospholipidique de la membrane de SEB. La rhodopsine, protéine transmembranaire, est représentée comme une pelote allongée d'hélices quelque peu irrégulières, encastrées dans la bicouche lipidique. Le site de liaison du 11-cis rétinale, orienté presque parallèlement au plan de la membrane, est illustré schématiquement. Les 7 sites de phosphorylation connus sont indiqués avec la lettre P.

protéines et à 40 % en lipides. La rhodopsine, une protéine intrinsèque, représente plus de 80% des protéines membranaires du SEB (Shichi, 1983). Les protéines intrinsèques des membranes biologiques possèdent des zones hydrophobes leur permettant d'interagir au niveau de la zone hydrophobe de la bicouche lipidique membranaire assurant ainsi une interaction importante. La membrane discale des SEB bovins présente un rapport de 70 à 75 phospholipides (PL) pour une rhodopsine (Stubbs et Litman, 1978; Miljanich et al., 1981). Les PL représentent 95% du contenu lipidique total de la membrane discale. Les principaux PL sont 38% de phosphatidyléthanolamine (PE), 40% de phosphatidylcholine (PC) et 13% de phosphatidylsérine (PS) (Fager et al., 1972; Daemen, 1973; Abrahamson et Fager, 1973). Il n'existe dans la membrane discale qu'un faible pourcentage de cholestérol. Ceci, ainsi que le caractère hautement insaturé des PL (plus de 80% des PL sont insaturés) (Anderson et Sperling, 1971) confère à la membrane discale une fluidité élevée aux températures physiologiques (Miljanich, 1978), permettant à la rhodopsine une certaine mobilité. Environ 40 à 50% des chaînes d'acides gras sont de l'acide docosahexaénoïque (22:6) (Anderson et al., 1975; Stone et al., 1979).

Cette bicouche de lipides possède une distribution asymétrique en PL. La PS et la PC sont distribuées préférentiellement sur la face interne alors que la PE est plus abondante sur la face externe de la bicouche (Englander et Englander, 1977; Nemes et al., 1979; Dratz et al., 1979). De plus, les chaînes aliphatiques de la monocouche externe seraient en moyenne plus insaturées que celles de la monocouche interne. Cette mobilité dans la membrane se résume à une diffusion rotationnelle et à une faible

diffusion latérale (Brown, 1972; Poo et Cone, 1974). Les interactions rhodopsine-rhodopsine ne limitent pas les déplacements de la protéine puisque la rhodopsine se trouve sous forme monomérique dans la membrane discale (Chabre, 1975; Blaurock, 1977). La nature des interactions existant entre la rhodopsine et les autres constituants de la membrane, soit la caractérisation de l'état physique du microenvironnement où elle se situe dans la membrane visuelle, représente un apport important dans la détermination des propriétés du pigment lui-même et de son activité photochimique pour la compréhension de l'unité fonctionnelle en vision. Il existe donc une relation intime entre la fonction de la rhodopsine et son environnement moléculaire.

1.5 Séquence photolytique de la rhodopsine

L'étape initiale du processus visuel est l'absorption d'un photon par le chromophore de la rhodopsine. Cet acte photochimique implique les étapes suivantes:

1. une excitation électronique du chromophore.
2. des transitions non-radiatives par lesquelles l'énergie d'excitation est canalisée dans un état particulier à partir duquel l'événement chimique ou physique initial se produit.
3. et, l'événement initial lui-même, au cours duquel le chromophore subit un changement intra- et/ou inter-moléculaire avec transfert concomitant d'une fraction importante de l'énergie d'excitation électronique à l'environnement protéique du chromophore. (Uhl et Abrahamson, 1981).

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

La séquence photolytique de la rhodopsine bovine (voir figure 5) consiste en une modification de l'interaction chromophore-protéine par étapes discrètes produisant des intermédiaires spectralement identifiabiles. Le premier photoproduit de la rhodopsine détectable à la température de l'azote liquide est la bathorhodopsine, issue d'états électroniques excités de courtes demi-vie. L'événement photochimique primaire a été supposé être l'isomérisation cis-trans du chromophore (Rosenfeld & al.; 1977, Eyring & al., 1980). Le temps d'apparition de la bathorhodopsine, soit de 6 ps (Shichi, 1981), est cependant trop court pour une isomérisation complète. La translocation de protons a été proposée en alternative (Van der Meer et al., 1976) mais demeure controversée (Eyring & Mathies, 1979). La bathorhodopsine voit le chromophore passer de la forme 11-cis à une configuration tout-trans contrainte et distordue entre le 11e et le 12e carbone (Eyring et al., 1980). Ce changement de configuration amène un large déplacement bathochromique du maximum d'absorption qui se trouve à 543 nm (Yoshizawa & Wald, 1963; Abrahamson & Ostroy, 1967). Dans la suite du blanchiment, les modifications conformationnelles de l'opsine entraînent un changement d'orientation du chromophore dans le plan perpendiculaire à la membrane discale (Kawamura & al., 1977).

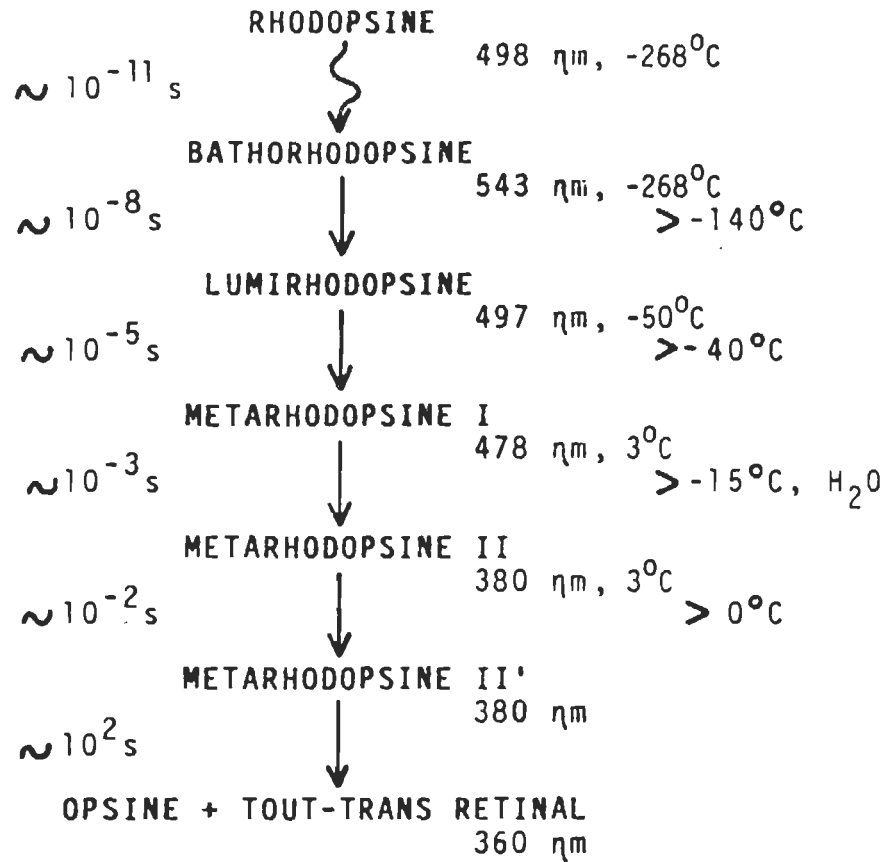


Figure 5: Séquence photolytique de la rhodopsine bovine. Sont listés le nom des photointermédiaires, leur λ_{max} , la température à laquelle ils sont stables, la température à laquelle ils subissent une réaction thermique pour former le photointermédiaire suivant, et la vitesse approximative à laquelle ils subissent une conversion à la température de la pièce.

Pendant la conversion thermique de la bathorhodopsine à la lumirhodopsine, le chromophore complète son isomérisation à la forme tout-trans non-tordue. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) de la lumirhodopsine est quinze (15) fois plus grand que celui de la rhodopsine suggérant la configuration trans du chromophore (Hubbard & Kropf, 1958). Le transfert d'énergie du chromophore à la protéine est complété au moment où la lumirhodopsine est formée. Les intermédiaires subséquents dans le cycle photolytique de la rhodopsine représentent une dissipation de cette énergie. Contrairement à la transition Méta I - Méta II, la disparition de la lumirhodopsine (demi-vie de 3 μ s) n'est pas dépendante de l'environnement aqueux de la protéine. Durant cette dégénérescence, on note un phénomène électronique rapide (Early Receptor Potential) dont l'origine moléculaire est un déplacement de charge à même l'opsine (Uhl & Abrahamson, 1981). Aucun changement d'orientation du chromophore n'est décelé lors de cette transition (Chabre, 1983).

Il existerait au moins deux formes isochromiques de Méta I (λ max = 478 nm) différenciables par leur cinétique de formation (Stewart & al., 1977; Hoffman & al., 1978), et dont l'origine serait intrinsèque à la partie protéique (Stewart, 1977).

Le premier photointermédiaire impliqué dans les processus intermoléculaires serait soit la Méta I, soit la Méta II (Uhl & Abrahamson, 1981). La transition Méta I - Méta II est très sensible à la composition du microenvironnement (Applebury & al., 1974). Au cours de cette transition, on note des changements définitivement reliés à la partie protéique du

1.6 La transduction visuelle

L'absorption de photons par les pigments visuels induit une hyperpolarisation de la membrane photoréceptrice (Cervetto et Fuortes, 1978). Ainsi, l'énergie lumineuse absorbée par la rhodopsine se convertit en potentiel d'action durant la transduction visuelle. Le potentiel membranaire se modifiant par le mouvement d'ions à travers la membrane (Tonita, 1970; Haggins, 1972), l'absorption de photons par la rhodopsine provoque une diminution du flux d'ions Na^+ à travers la membrane plasmique du SEB (Bownds et Brodie, 1975), engendrant une hyperpolarisation (Zuckerman, 1973). Une seule photoisomérisation peut bloquer le flux de 10^6 ions Na^+ vers l'intérieur du SEB (Stryer et al., 1981). Un messenger interne doit donc être modulé pour transporter le message du signal entraînant l'hyperpolarisation à la membrane plasmique.

L'hypothèse du GMPc (Stryer et al., 1981) suppose que la concentration en GMPc, très élevée dans les SEB, diminue de façon très marquée (Hubbell et Bownds, 1979; Woodruff et Bounds, 1979) sous illumination. Le GMPc affecte la perméabilité membranaire aux ions Na^+ . Une irradiation de SEB entraîne une diminution de la concentration en ions Na^+ dans le cytoplasme suite à une diminution du GMPc (Stryer et al., 1981). De plus, on a constaté l'existence de deux protéines membranaires (la protéine GTP-liante (G) et la phosphodiesterase (PDE)) associées à la surface des disques et qui sont des enzymes photoactivables (Kühn, 1980; Fung et al., 1981; Hubbell et Bownds, 1979).

Le modèle biochimique (O'Brien, 1982) (voir figure 6) permet une explication moléculaire du transfert du signal de la rhodopsine photoactivée au GMPc agissant comme messenger. La transduction visuelle pourrait ici s'expliquer par une amplification à deux niveaux (Liebman et Pugh, 1979). Une rhodopsine photoactivée peut catalyser l'échange de diphosphate de guanosine (GDP) pour du triphosphate de guanosine (GTP) sur plusieurs centaines de protéines GTP-liantes (G). Ces dernières sont alors capables d'activer la PDE (Yee et Liebman, 1978) qui peut hydrolyser des milliers de GMPc.

Certaines expériences démontrent le parallélisme entre la concentration en GMPc et la perméabilité aux ions Na^+ (Woodruff et Bownds, 1979). D'autres expériences révèlent que l'effet du GMPc et du Ca^{++} sont antiparallèles. Une diminution de GMPc comme une augmentation du Ca^{++} dans les SEB provoque une hyperpolarisation. Ces deux messagers cellulaires sont importants dans le système photoactivé du SEB. Leur interaction et leurs fonctions respectives dans la membrane des SEB demeurent non résolues.

En 1971, Yoshikami et Haggins ont proposé que le messenger serait le calcium. La rhodopsine photoexcitée induit un relargage d'ions Ca^{++} des disques vers le cytoplasme. Ces ions Ca^{++} diffuseraient vers les canaux à ions Na^+ de la membrane plasmique, pour diminuer leur perméabilité provoquant ainsi une hyperpolarisation de la membrane plasmique. L'hypothèse propose que le calcium soit pompé activement dans les disques à l'obscurité,

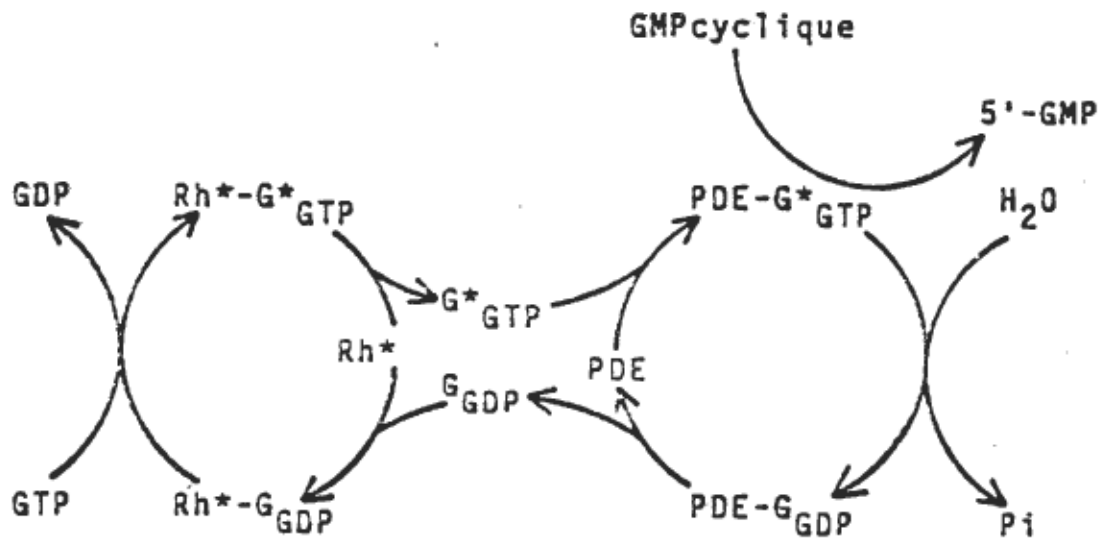


Figure 6 : Le modèle biochimique. La transduction visuelle pourrait s'expliquer par une amplification en deux paliers. Une rhodopsine photolysée peut catalyser l'échange de GDP pour du GTP sur plusieurs centaines de protéines GTP-liantes (G). Ces dernières sont alors capables d'activer la phosphodiesterase qui peut hydrolyser des milliers de GMP_c . La signification des abréviations est la suivante: Rh (rhodopsine), Rh* (rhodopsine photolysée), et PDE* (phosphodiesterase activée). (O'Brien, 1982)

maintenant peu de cet ion dans le cytoplasme. Plusieurs évidences expérimentales supportent l'hypothèse du calcium, quoiqu'il n'existe pas d'évidence(s) convaincante(s) d'une activité ATPasique à l'obscurité, ni de rôle possible des ions Ca^{++} dans la perméabilité des canaux à Na^{+} de la membrane plasmique. Le calcium ne peut ni être assez efficace ni quantitativement assez abondant pour satisfaire l'amplification requise dans le phénomène de transduction (Fatt, 1979; Uhl et Abrahamson, 1981). Par contre, l'attrait de cette hypothèse demeure sa simplicité.

Selon cette hypothèse le mécanisme basé sur le GMPc présente l'avantage d'être assez rapide (Liebman et Pugh, 1979; Kühn et al., 1981) et assez amplifié pour expliquer la transduction visuelle (Stryer et al., 1981). Il demeure néanmoins à démontrer comment la concentration du GMPc cytoplasmique régit la perméabilité au Na^{+} et la nécessité d'évaluer les rôles de la diffusion latérale des protéines et des vitesses de réaction comme éléments limitatifs. Ces deux hypothèses (Ca^{++} & GMPc) ne sont peut-être pas irréconciliables, puisque certaines expériences démontrent un parallélisme entre la concentration du GMPc et la perméabilité aux ions Na^{+} (Woodruff et Bownds, 1979) tandis que d'autres démontrent que les effets du GMPc et du Ca^{++} sont antiparallèles (Lipton et al., 1977; Cavaggioni et Sorbi, 1981). L'interaction entre les fonctions respectives du GMPc et des ions Ca^{++} et Na^{+} demande encore à être précisée afin d'élucider le phénomène de la transduction visuelle en termes moléculaires.

1.7 Pertinence du travail

La rhodopsine étant une protéine membranaire, elle possède un caractère hydrophobe prononcé. Ce caractère hydrophobe implique nécessairement lors des étapes de purification, l'utilisation d'un détergent afin d'éliminer les lipides membranaires, mais ces derniers seront remplacés par des molécules de détergent autour de la protéine qui doit se trouver entourée de molécules amphiphiles, sous forme de micelles, afin de conserver une certaine stabilité en solution.

Dans plusieurs études, il serait intéressant d'obtenir de la rhodopsine pure dans le vrai sens du terme, i.e. dépourvue de phospholipides ainsi que de détergent, notamment dans des études de reconstitution membranaire ainsi que de systèmes modèles de membrane.

Au cours de la purification, le détergent choisi ne doit pas altérer significativement les propriétés spectrales du pigment visuel. Nous avons utilisé le lauryl sucrose, un ester de sucrose et d'acides gras, pour des raisons de stabilité des pigments visuels dans ce détergent. Dû à la présence d'un lien ester dans cette molécule et à son instabilité relative, ce détergent présente l'avantage de pouvoir être éliminé par de simples méthodes d'hydrolyses enzymatique et chimique (en milieu alcalin).

Grâce à cette caractéristique du détergent, on pourra obtenir de la rhodopsine dépourvue de phospholipides par la purification, puis de détergent, i.e. de la rhodopsine à l'état solide dans un environnement exclusivement protéique.

Par l'étude du comportement photochimique de la rhodopsine ainsi obtenue, i.e. dans un environnement de nature uniquement protéique constitué d'un réseau tridimensionnel rigide, nous visons à améliorer la compréhension du mécanisme moléculaire de la vision puisque l'étude de ce phénomène exige une bonne connaissance des interactions de la rhodopsine avec son environnement moléculaire.

De nombreuses études ont été faites sur le comportement photochimique de la rhodopsine dans un environnement fluide, soit dans son environnement phospholipidique naturel, soit solubilisée dans un détergent. Certaines études suggèrent que ce comportement photochimique est relié à la fluidité de son environnement en ce qui concerne les vitesses de réaction. D'autres études suggèrent l'importance d'une réaction (Méta I - Méta II) dans le processus de phototransduction puisqu'elle implique des changements de conformation majeurs.

L'étude du comportement photochimique de la rhodopsine agrégée, dans un environnement solide apportera des renseignements additionnels pour une meilleure connaissance des interactions de la rhodopsine avec son environnement moléculaire.

1.8 Problématique et méthodologie

La question qui nous préoccupe dans ce travail est de savoir dans quelle mesure la présence de molécules amphiphiles (phospholipides ou détergents) associées à la rhodopsine déterminent ses propriétés d'absorption et de photodécoloration. La méthode que nous utilisons consiste à obtenir

des échantillons de rhodopsine exempte d'amphiphiles et de comparer leurs propriétés à celles qui sont connues pour la rhodopsine en présence d'amphiphiles.

Avant de pouvoir étudier le comportement photochimique de la rhodopsine dépourvue de phospholipides et de détergent, soit sous forme d'agrégats solides, nous devons premièrement l'extraire des tissus biologiques frais et la purifier convenablement. La méthode choisie devra être quantitativement intéressante et produire de la rhodopsine exempte de contaminants. Par la combinaison de deux méthodes, soit l'utilisation de gradients de sucrose et la chromatographie d'affinité sur concanavaline A, des échantillons de rhodopsine purifiée et solubilisée dans un détergent seront obtenus.

Pour obtenir de la rhodopsine dépourvue de phospholipides et de détergent deux méthodes d'hydrolyse de détergent seront évaluées: une méthode d'hydrolyse enzymatique qui consiste en une incubation d'échantillons de rhodopsine solubilisée dans du lauryl sucrose en présence du mélange enzymatique: estérase de foie de porc et lipase de Candida cylindracea, et une méthode d'hydrolyse alcaline consistant en une incubation, à la température de la pièce, d'un même échantillon dans une solution tamponnée de pH 10,5 -10,8. Ces deux méthodes devraient être non-dénaturantes pour la rhodopsine.

La rhodopsine dépourvue de phospholipides et de détergent pourrait être obtenue également par une méthode de dilution en effectuant une séquence dilution-ultrafiltration-dilution, diminuant ainsi la concentration en lauryl sucrose dans l'échantillon pour permettre l'agrégation de la

rhodopsine. Cette dilution serait suivie par une série de lavages afin d'obtenir des agrégats de rhodopsine dépourvus de détergent.

L'état physique et la dimension de nos échantillons de rhodopsine purifiée et dépourvue de détergent implique nécessairement des techniques d'étude spécifiques afin d'étudier son comportement photochimique. Notre travail repose sur une triple approche expérimentale de la séquence photolytique de la rhodopsine bovine: la spectroscopie d'absorption U.V.-visible grâce à un adaptateur pour échantillon diffusant, la spectroscopie par effet photoacoustique et la spectroscopie de transmission par la microspectrophotométrie.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Procédure de purification de la rhodopsine bovine

Toutes les procédures de purification, ainsi que toutes les manipulations impliquant les pigments visuels furent effectuées sous un éclairage rouge ($\lambda > 620\text{nm}$) de faible intensité puisque la rhodopsine se décompose irréversiblement par exposition à la lumière blanche. Les procédures de purification s'effectuent à une température voisine de 4°C afin de préserver l'intégrité du pigment.

2.1.1 Préparation des segments externes des bâtonnets

2.1.1.1 Dissection des yeux bovins

Les yeux, prélevés des animaux fraîchement abatus (Abattoir de la Mauricie Inc., St-Louis-de-France, Qué.) sont immédiatement placés dans un contenant étanche à la lumière et entreposés au laboratoire le même jour. La dissection des yeux débute dès leur arrivée. L'incision de l'oeil se fait d'abord au niveau de la cornée dans le but de faire une coupe sur le pourtour de celle-ci. Nous effectuons ensuite une incision transverse, de cette coupure vers le fond du globe oculaire, en prenant soin d'éviter le point d'insertion du nerf optique. Le contenu de l'oeil (cristallin, humeurs, ...) peut ainsi être vidé, et l'oeil inversé pour nous présenter le fond du globe oculaire.

2.1.1.2 Extraction de la rétine

Avec délicatesse et du bout du doigt, nous pouvons aisément dégager la rétine qui tapisse le fond du globe oculaire qui nous est alors accessible. La rétine se trouve alors suspendue en son point d'attache qu'est le nerf optique. Par une coupe à ce niveau, les rétines sont recueillies dans un b cher refroidi sur glace.

2.1.1.3 Isolation des segments externes des  tonnets

Les rétines sont suspendues dans le tampon d'isolement (0,75 ml de tampon/rétine). Le tampon d'isolement est composé de phosphate monodibasique (15 mM), de NaCl (120 mM), de MgCl₂ (0,4 mM), de CaCl₂ (0,4 mM), d'EDTA (0,5 mM) et de glucose (5,0 mM), son pH final est de 7,2. Cette suspension est agitée mécaniquement pendant quelques minutes. Cette étape a pour but de briser le cil connectif entre le segment externe et le segment interne du  tonnet.

2.1.1.4 Purification des segments externes des  tonnets

En raison de leur faible densité, 1,14 g/ml (Godchaux et Zimmerman, 1979; Salesse et al., 1984), les segments externes des  tonnets (SEB) peuvent être séparés des autres constituants de la rétine par centrifugation différentielle. Nous effectuons d'abord une flottation de SEB en diluant la suspension de rétines avec une solution aqueuse de sucrose (30% p/v) de manière   avoir une concentration finale de sucrose de 40% (p/v). Cette nouvelle suspension est répartie dans les tubes   centrifugation de 40 ml puis recouverte par environ 3 ml de tampon d'isolement. Ensuite,

nous effectuons une centrifugation de 30 min à 15 000 g dans un rotor (Sorvall HB-4) à godets basculants. Lors de cette opération, les SEB flottent à l'interface sucrose 40% : tampon d'isolement, tandis que les autres composants sédimentent. Avec une pipette Pasteur, les SEB sont minutieusement prélevés. Ceux-ci sont suspendus dans trois fois (3X) leur volume de tampon d'isolement, puis sédimentés à 25 000 g dans un rotor à angle fixe (Sorvall SS-34). Les culots de SEB sont recueillis dans un milieu d'isolement ajusté à 40% p/v en sucrose. Les étapes de flottation et de sédimentation sont reprises deux ou trois fois chacune, et les SEB sont finalement lavés par sédimentation dans l'eau pure. S'ils ne sont pas utilisés immédiatement, il convient de les couvrir de tampon d'isolement. Les SEB sont conservés sous atmosphère d'azote ou d'argon à -20°C.

2.1.2 Purification de la rhodopsine

2.1.2.1 Solubilisation de la rhodopsine

Les culots de SEB sont suspendus dans environ 5 à 10 ml d'eau distillée. Avec une solution de lauryl sucrose (L.S.) 10% (p/v) (Ryoto Co. Ltd, Tokyo, Japan), le volume est doublé. Cette solution est agitée jusqu'à ce qu'elle devienne limpide. Elle est ensuite clarifiée par centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes.

2.1.2.2 Délipidation de la rhodopsine par chromatographie d'affinité

a) Montage de la colonne

Le gel de concanavaline A-Sépharose 4B (Con A) (Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO, USA) est uniformément compacté par gravité dans une colonne à chromatographie (diam. = 1 cm.) (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) sur une hauteur d'environ 12 cm. La colonne est conditionnée par lavage avec du tampon Tris-Cl (100 mM) pH 7,3 contenant du CaCl_2 (1 mM), du MgCl_2 (1 mM), du MnCl_2 (1 mM) et du NaCl (1 mM), jusqu'à ce que l'éluat ait un pH de 7,3.

b) Chromatographie d'affinité

La chromatographie s'effectue au réfrigérateur. Tout le processus chromatographique s'effectue à flux ascendant. Ce procédé nous permet d'obtenir des fractions de rhodopsine plus concentrées ainsi qu'une purification supérieure. La solution de rhodopsine est chargée sur la colonne. Puisque la rhodopsine possède des hydrates de carbone soit le n-acétyl glucosamine et surtout le mannose, elle se lie spécifiquement aux sites récepteurs de la concanavaline A (Steineman et Stryer, 1973; Fukuda et al., 1979). La colonne est lavée avec plusieurs volumes de tampon Tris-Cl (50 mM) pH 7,3 ajusté à 0,2% en lauryl sucrose. Le lavage est complété lorsque le spectre des fractions est à son minimum en absorbance de 250 à 650 nm. La rhodopsine purifiée et délipidée est finalement éluée avec du tampon Tris-Cl 50 mM (pH 7,3) contenant 0,45 M d' α -méthyl-D-mannopyranoside, la rhodopsine est décrochée du gel par le sucre qui cause l'élution de la rhodopsine par compétition avec cette glycoprotéine

pour la concanavaline A. Les fractions d'élution recueillies par un collecteur de fractions (LKB 2112 RediRac, LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden) sont regroupées selon la pureté spectrale et la concentration en rhodopsine.

2.1.2.3 Dialyse de la rhodopsine élue

Les fractions de rhodopsine regroupées sont mises en dialyse contre deux litres de tampon Tris-Cl 25 mM (pH 7,3) durant 8 heures afin d'éliminer le sucre éluant. Si la rhodopsine n'est pas utilisée immédiatement, elle est stockée à -20°C sous atmosphère d'azote ou d'argon.

2.1.3 Analyse spectrale de la rhodopsine purifiée

2.1.3.1 Analyse qualitative. (Pureté spectrale)

Les échantillons de rhodopsine purifiée dans du lauryl sucrose sont analysés par la prise de spectres UV-visible (Pye Unicam SP8-100, Pye Unicam Ltd, Cambridge, England) de 650 nm à 250 nm. La bande α du spectre d'absorption de la rhodopsine correspond au chromophore, le 11-cis rétinale, lié à l'opsine. Dans le cas de la rhodopsine bovine, son λ_{max} (ou bande α) se situe à 498 nm. La bande δ de la rhodopsine, principalement due à son contenu en acides aminés aromatiques, se situe à 278 nm. L'absorbance de la rhodopsine à 278 nm est approximativement 1,6X supérieure à son absorbance à 498 nm (Hargrave, 1982). Ainsi, nous mesurons le rapport des absorbances A_{278}/A_{498} pour évaluer la pureté des préparations de rhodopsine. Des valeurs inférieures à 2,0 sont associées à des préparations de rhodopsine très pures.

2.1.3.2. Analyse quantitative

Le coefficient d'extinction molaire de la rhodopsine bovine à 498 nm est de 41 000 l/mole cm et son poids moléculaire de 40 000 daltons. Se référant à la loi de Beer-Lambert, nous pouvons évaluer la quantité de rhodopsine présente dans un échantillon en effectuant l'opération suivante:

$$A_{498} \times \text{vol. de l'échantillon (ml)} = \text{quantité de rhodopsine (mg)}$$

2.2 Elimination du détergent

2.2.1 Hydrolyse du lauryl sucrose

Etant donné la présence d'un lien ester dans la molécule de lauryl sucrose ainsi que son instabilité prononcée, nous pouvons imaginer comme technique pour éliminer ce détergent des hydrolyses enzymatiques ou alcalines en autant que dans les conditions expérimentales requises à la poursuite de ces deux types de réaction, la rhodopsine ne soit pas dénaturée.

2.2.1.1 Hydrolyse enzymatique

a) Choix de l'enzyme

Un test d'activité enzymatique a été fait sur le lauryl sucrose à l'aide de différentes enzymes soit l'estérase de foie de porc, la lipase de *Candida cylindracea*, la lipase de *Rhizopus arrhizus*, la lipase de pancréas de porc et la lipase de germe de blé, toutes choisies pour des facteurs, soit de coût, soit de disponibilité, et provenant toutes de Sigma Chemicals Co. Nous avons retenu l'estérase de foie de porc

puisque'elle démontrait le meilleur potentiel enzymatique sur ce substrat. (Tessier, M., Rapport de stage, 1981.) Des hydrolyses enzymatiques sur le mélange rhodopsine solubilisée dans du L.S. furent effectuées avec succès produisant de la rhodopsine native dont le λ max est de 505 nm (spectroscopie PA), mais la période d'incubation est très longue, environ de 300 hres. Puisque l'estérase de foie de porc devrait posséder une activité enzymatique élevée sur le détergent, nous avons effectué une évaluation de son activité.

b) Evaluation de l'activité estérasique

Par une méthode de dosage titrimétrique, nous pouvons évaluer l'activité enzymatique optimale de l'estérase de foie de porc sur son substrat standard, soit le butyrate d'éthyle (Aldrich Chemicals Co., Milwaukee, Wi., U.S.A.). Pour ces dosages, des solutions non-tamponnées de butyrate d'éthyle, de lauryl sucrose (L.S.) et d'octyl glucoside (O.G.) (Sigma Chemicals Co.) furent préparées et ajustées à pH 8,0 avec une solution diluée de NaOH. Nous avons fait une solution saturée en butyrate d'éthyle puisque ce dernier est très peu soluble dans l'eau, alors que la concentration finale pour le L.S. et l'O.G. fut ajustée à 1%. L'enzyme est diluée à une concentration finale de 1 mg/ml dans du tampon Tris-Cl (25 mM) ajusté à pH 8,0. A 2,0 ml d'une solution saturée de butyrate d'éthyle, nous ajoutons 5,75 ml d'eau distillée, puis la réaction est déclenchée par addition de 0,1 ml de solution enzymatique. Durant l'incubation à la température de la pièce, la quantité d'acide produit en fonction du temps est déterminée par titration avec un standard, du NaOH 0,01 N,

et ce, en mesurant le volume de NaOH nécessaire pour maintenir un pH constant de 8,0. Connaissant ainsi la quantité d'acide produit par minutes, l'activité enzymatique de cette enzyme est exprimée en μ moles de H^+ libérés par minutes. L'activité enzymatique de cette enzyme est aussi évaluée sur d'autres substrats, des détergents, soit sur le lauryl sucrose (1,0 %), sur le n-octylglucoside (1,0 %), ainsi que sur le mélange de ces derniers avec le butyrate d'éthyle (1,0 %), toujours en suivant la procédure décrite précédemment, sauf dans le cas des mélanges où nous ajoutons un volume de 2,0 ml du deuxième substrat. Les concentrations des substrats demeurent toujours constantes.

2.2.1.2 Hydrolyse alcaline

a) Détermination du pH optimum

Le pH optimum pour l'hydrolyse alcaline du lauryl sucrose a été déterminé par chromatographie sur couche mince (CCM), en effectuant une série d'hydrolyses à différents pH, de pH 7,0 à pH 10,8. Pour obtenir une échelle de pH aussi étendue, nous avons dû utiliser différents tampons, soit le tampon phosphate pour préparer les tampons de pH 7,0 et 7,5, le tampon Tris-Cl pour les pH 8,0 - 8,5 et 9,0 et le tampon carbonate-bicarbonate pour les pH 9,5 - 10,0 - 10,5 et 10,8. Les tampons furent tous préparés avec un pH mètre Corning - model 10 (Corning Glass Works, Medfield, MA, USA). L'hydrolyse alcaline est déclenchée en ajoutant à 6,0 ml d'une solution de lauryl sucrose 1,0% (p/v), 4,0 ml de tampon 62,5 mM, choisi selon le pH désiré. Dans le cas du témoin, nous avons utilisé 4,0 ml d'eau distillée (pH=6,0). Durant l'incubation à la température

de la pièce, des aliquots de 5 μ l sont prélevés périodiquement et chromatographiés par CCM afin de vérifier l'évolution de l'hydrolyse. Cette évolution est suivie par la disparition des spots caractéristiques pour le L.S. dans ce système de chromatographie (décrit à 2.2.1.3). Au fur et à mesure que l'hydrolyse (alcaline ou enzymatique) du L.S. s'effectue, cet ester d'acide gras et de sucrose produit du sucrose et des acides gras. Dans le système à chromatographier utilisé, ces deux produits ont aussi un comportement migratoire particulier, i.e. que le sucrose, très polaire, ne migrera pas et demeurera au point de déposition, alors que l'acide gras, peu polaire, migrera en front de solvant. Nous noterons donc, tout au long de l'hydrolyse, une disparition des spots caractéristiques au L.S. ainsi qu'une apparition et augmentation de l'intensité du spot au point de déposition.

b) Hydrolyse alcaline à pH 10,5 en milieu dialysant

Le pH retenu pour l'hydrolyse alcaline du L.S. est de 10,5. Pour déclencher l'hydrolyse alcaline, 4,0 ml de tampon carbonate-bicarbonate (62,5 mM) ajusté à pH 10,5 sont ajoutés à 6,0 ml d'une solution de L.S. (1,0%). Pour le témoin, nous ajoutons 4 ml de tampon phosphate (62,5 mM) ajusté à pH 7,0. Ces deux échantillons sont mis en dialyse contre leur tampon respectif dont la concentration est de 25 mM. Durant l'incubation à la température de la pièce, des aliquots de 2 μ l sont prélevés périodiquement et chromatographiés par CCM afin de vérifier l'évolution de l'hydrolyse. Les chromatogrammes seront différents dans ce

cas-ci puisqu'en dialyse le sucrose quitte le milieu réactionnel, et ne pourra donc être perçu sur les chromatogrammes. Ainsi, en vérifiant l'évolution de l'hydrolyse alcaline du L.S., nous ne noterons que la disparition des spots caractéristiques au L.S. en CCM, et non l'apparition et l'augmentation du spot caractéristique au sucrose au point de déposition.

2.2.1.3 Evaluation du rendement de l'hydrolyse

L'évaluation du rendement de l'hydrolyse du détergent s'effectue par chromatographie sur couche mince (CCM). Nous déposons 2 µl de l'échantillon en spots sur une plaque de gel Silica 6250µ (Analtech, Mandel Scientrific, Montréal, Qué.) préalablement activée (une nuit à 120°C). Après séchage, on développe le chromatogramme par migration d'un mélange de solvants composé de chloroforme, de méthanol et d'eau en proportion 20:5:0,7. La plaque est révélée par vaporisation d'un colorant révélateur spécifique aux sucres, le Réactif de Kagi-Mischer (0,5 ml d'anisaldéhyde, 1,0 ml d'acide sulfurique et 50,0 ml d'acide acétique glacial) (Kirchner J.G, TLC). Le rendement de l'hydrolyse du lauryl sucrose est déterminé par disparition des spots caractéristiques au lauryl sucrose en fonction du temps. La sensibilité de cette méthode est de moins de 0,6 µg. Cette détermination s'effectue par visualisation comparative des spots sur le chromatogramme par rapport à une courbe standard du lauryl sucrose effectuée par CCM.

2.2.2 Elimination du détergent d'échantillons de rhodopsine solubilisée

Afin d'obtenir de la rhodopsine dépourvue de lipides et de détergent, nécessairement sous forme solide, nous éliminons le détergent soit par l'hydrolyse alcaline, soit par la dilution.

2.2.2.1 Effet du milieu alcalin sur la rhodopsine solubilisée dans du L.S.

Avant de pouvoir éliminer le détergent du mélange rhodopsine solubilisée dans le lauryl sucrose par hydrolyse alcaline, il est nécessaire de connaître la stabilité de la rhodopsine en milieu alcalin, considérant que notre but est d'obtenir de la rhodopsine native après l'élimination du détergent. Nous avons premièrement effectué une courbe de titration de la rhodopsine solubilisée dans du L.S. 0,2%. Nous avons suivi le comportement spectral de la rhodopsine en fonction de l'ajout de NaOH (0,1 N). Nous avons donc noté la densité optique (D.O.) à 498 nm, bande principale de la rhodopsine, en fonction du pH de la solution. Considérant une légère variation de la D.O. à 498 nm due à la faible augmentation du volume de l'échantillon par ajout de NaOH, nous avons titré la solution jusqu'au point de virage, i.e. lorsque la rhodopsine se dénature, démontrant ainsi une perte de la D.O. à 498 nm. Nous avons de plus étudié la stabilité spectrale de la rhodopsine dans un milieu fortement alcalin, et de pH plus élevé que le pH retenu, soit à un pH de 11,0. Dans ce but, nous avons suivi le comportement spectral de la rhodopsine solubilisée dans du L.S. 0,2% (p/v) durant 3,5 heures à ce pH.

2.2.2.2 Par hydrolyse alcaline

Dans certaines conditions expérimentales, l'hydrolyse alcaline du L.S. était efficace et rapide. Ainsi, à 4,0 ml d'une solution de rhodopsine purifiée dans du tampon Tris-Cl (50 mM) ajusté à pH 7,3 et contenant du lauryl sucrose (0,2%) (p/v), nous ajoutons 3,5 ml de tampon carbonate-bicarbonate (250 mM) ajusté à pH 10,5. Cette solution est mise en dialyse contre du tampon carbonate-bicarbonate (116,6 mM) ajusté à pH 10,5. Durant l'incubation à la température de la pièce, des aliquots de 2 µl sont prélevés périodiquement et chromatographiés par CCM afin de vérifier l'évolution de l'hydrolyse. Lorsque la réaction est complétée, nous recueillons la rhodopsine par sédimentation (5 000 rpm - 10 min) sur des lamelles de verre, au moyen d'adapteurs en acrylique pour les tubes à centrifuger de 40,0 ml. Les échantillons sont asséchés en présence d'un dessiccant (CaSO₄ anhydre-Drierite) durant au moins 8 heures et sont conservés en présence de ce même dessiccant.

2.2.2.3 Par dilution

Nous pouvons aussi éliminer le détergent en effectuant une forte dilution de celui-ci. Une dialyse du détergent serait très longue (50% de L.S. 1,0% est dialysé en 63 heures) (Fong & al., 1982) puisque le L.S. a une concentration micellaire critique (CMC) très élevée, soit de 0,18 mM (Helenius & al., 1979) et serait donc aussi forcément incomplète. Nous diluons selon un rapport 1:40 notre échantillon de rhodopsine bovine solubilisée dont la concentration initiale en lauryl sucrose est de 0,2%

(p/v) avec du tampon Tris-Cl (50 mM) ajusté à pH 7,3. Après concentration de cette solution en rhodopsine par ultrafiltration sur membrane Amicon (PM 10 000) (Amicon Corp., Lexington, Mass, USA), nous rediluons selon un rapport 1:6, avec du tampon Tris-Cl (50 mM) ajusté à pH 7,3. A cette étape, la faible concentration en détergent permet l'agrégation de la rhodopsine qui sédimente à 19 000 rpm. Nous effectuons une série de lavages (au moins 3) consistant en une dilution 1:60, où la rhodopsine est remise en suspension, suivie d'une sédimentation (18 000 rpm - 10 min.). Ces couples lavage - sédimentation nous permettent d'obtenir des agrégats de rhodopsine. Les agrégats de rhodopsine sont sédimentés sur lamelle de quartz (ou de verre) à 10 000 rpm durant 5 minutes. Nous recueillons aussi les agrégats qui adhèrent à la pipette Pasteur lors de la mise en suspension des culots par aspiration et reflux à la pipette Pasteur.

2.3 Préparation de rhodopsine liée à une lectine

2.3.1 Pour de la rhodopsine associée au lauryl sucrose

Pour préparer de la rhodopsine liée à une lectine, la concanavaline A, et associée au lauryl sucrose, nous préparons des SEB. Nous purifions ensuite la rhodopsine bovine selon le protocole de purification précédemment décrit (réf. section 2.1). A l'étape de la délipidation de la rhodopsine par chromatographie d'affinité sur la Con A, lorsque le lavage est complété, plutôt que d'éluer la rhodopsine purifiée et délipidée pour la décrocher du gel, nous prélevons directement de la colonne le gel sur lequel est

liée la rhodopsine bovine. Par séchage du gel en présence de dessicant (CaSO_4 anhydre) durant 24 - 48 hres (selon la quantité préparée), nous obtenons alors des échantillons de rhodopsine liée à une lectine en présence de détergent. Ces échantillons sont conservés à la température de la pièce.

2.3.2 Pour de la rhodopsine dépourvue de lauryl sucrose

Pour préparer de la rhodopsine liée à une lectine et dépourvue de détergent, nous suivons le protocole décrit en 2.3.1. Par contre, avant de prélever le gel de la colonne, nous effectuons un lavage à l'eau pure d'au moins 10 volumes de colonne, afin d'éliminer le détergent. Le gel extrait de la colonne est séché en présence d'un dessicant (CaSO_4 anhydre) durant 24 - 48 hres. Nous obtenons alors des échantillons de rhodopsine liée à une lectine et dépourvue de détergent. Ces échantillons sont conservés à la température de la pièce.

2.4 Préparation de SEB séchés sur lamelle

Afin de préparer des SEB séchés sur lamelles, une suspension de SEB purifiés (10 000 rpm - 40 min) est sédimentée sur une lamelle de verre. Cet échantillon de SEB sédimentés est séché en présence de dessicant (CaSO_4 anhydre) durant 24 - 48 hres.

2.5 Méthodes de caractérisation des agrégats de rhodopsine

2.5.1 Spectroscopie UV-visible

Nous mesurons des spectres d'absorption U.V.-visible de 650 nm à 250 nm pour des échantillons d'agrégats de rhodopsine sédimentés sur des lamelles de verre ou de quartz, ainsi que pour des échantillons d'agrégats de rhodopsine sélectionnés et trappés entre deux lamelles. Ces spectres sont pris sur un spectrophotomètre Pye Unicam SP8-100 en fixant les lamelles sur une cuvette à spectroscopie en quartz. Ce spectrophotomètre est équipé d'un support à échantillon diffusant qui permet l'enregistrement de spectres de SEB sans aucune distortion originant de la lumière diffusante.

2.5.2 Spectroscopie photoacoustique

Les échantillons d'agrégats de rhodopsine sédimentés sur lamelle sont étudiés par spectroscopie photoacoustique (PA) directement en déposant la lamelle dans la cellule photoacoustique. Nous avons aussi étudié des échantillons constitués d'agrégats sélectionnés en fonction de l'intensité de leur coloration ainsi que de leur stabilité photochimique. Ces agrégats sont déposés sur des lamelles que l'on insère dans le fond de la cellule photoacoustique. Nous prenons des spectres photoacoustiques de 750 nm à 400 nm.

Les spectres photoacoustiques sont enregistrés par un spectrophotomètre photoacoustique construit dans nos laboratoires. Le spectrophotomètre est équipé d'une cellule de résonance munie d'un microphone à gaz. Les autres composantes sont de l'équipement standard. (Schéma de l'appareil, figure

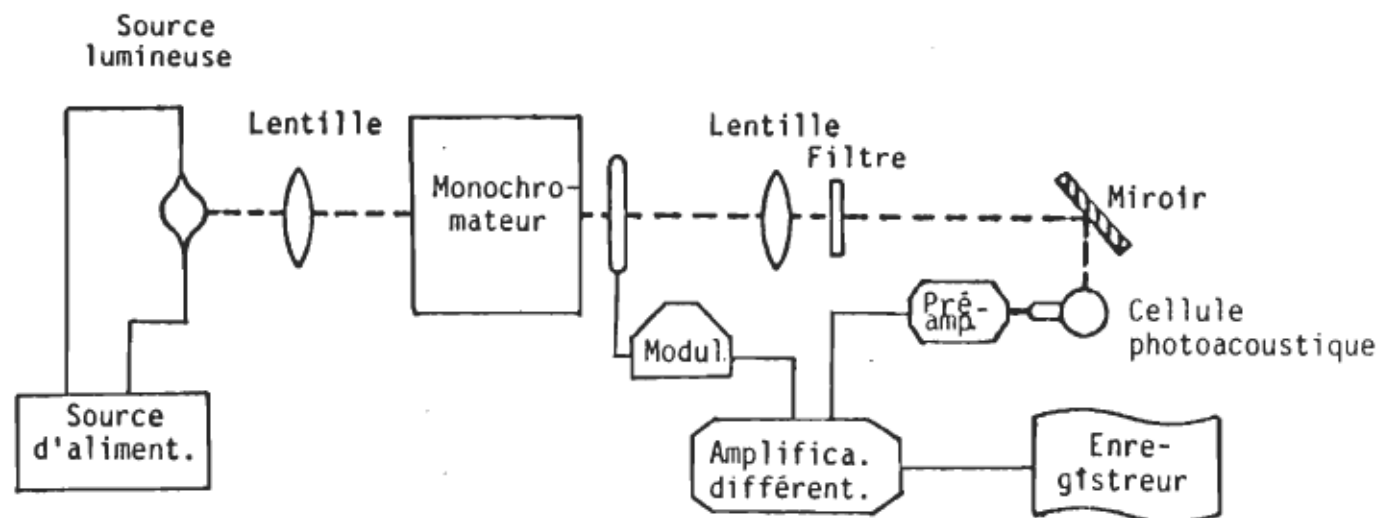


Figure 7: Diagramme du spectrophotomètre par effet photoacoustique.
 On dépose l'échantillon dans la cellule photoacoustique.
 En trait hachuré est représenté le faisceau d'analyse.

7). La source lumineuse est une lampe au Xénon (Xe) de 1 000 W (Schoeffel Instrument Corp., Westwood, New Jersey) convergeant sur la fente d'entrée d'un monochromateur (Schoeffel Instrument Corp.) actionnée par un moteur alimenté en courant continu et à vitesse variable. La lumière monochromatique est modulée par un modulateur mécanique (chopper) à une fréquence variable de 20 à 1 000 Hz. La lumière produite par le monochromateur est convergée puis réfléchiée sur la cellule photoacoustique. Le signal produit est amplifié et alimente un amplificateur Lock-in (Ithaco Dynatrac model 393, Aptec, Montréal) recevant le signal de référence du chopper. Le signal produit par le Lock-in en fonction de la longueur d'onde est emmagasiné dans un microordinateur (Challenger II, Ohio Scientific, Aurora, OH) et normalisé pour des variations d'intensité de la lumière incidente en divisant le signal PA de l'échantillon à chaque longueur d'onde par un signal PA préalablement mis en réserve, d'un matériel complètement absorbant (le noir de charbon). Puisque des échantillons biologiques sont toujours caractérisés par une forte absorption dans le visible, un filtre coupant 50% de transmittance à 496 nm et contrôlé par ordinateur est introduit sur le parcours lumineux à des longueurs d'ondes plus grandes que 500 nm, de façon à réduire le signal de fond dû à la lumière de fréquence de seconde harmonique. Entre 350 nm et 500 nm, l'intensité moyenne de la lumière à la position de l'échantillon est de 30 Wm^{-2} , intensité qui photolyse instantanément un échantillon de SEB ou de rhodopsine solubilisée.

2.5.3 Microspectrophotométrie

Ayant observé, premièrement de grandes variations dans les propriétés spectrales des agrégats par spectroscopie U.V.-visible, et deuxièmement, par visualisation, que les agrégats présentent un aspect morphologique également variable, nous constatons qu'il existe une relation entre ces deux observations. Nous avons donc premièrement utilisé la microscopie optique pour observer les agrégats de rhodopsine. Cette étude corrobore l'observation précédente, à savoir que les agrégats ont une morphologie structurale variable. Vu la non-uniformité morphologique et spectrale des agrégats, et en raison de leur petite taille, soit d'approximativement 1 μ m ou moins, il a fallu se tourner vers une autre méthode spectroscopique, la microspectrophotométrie. Nous avons d'abord sélectionné par microscopie optique les agrégats démontrant une morphologie plus structurée. Ensuite nous déposons l'agrégat sélectionné sur une lamelle de microscope et nous prenons des spectres sur une plage de longueurs d'ondes s'étalant de 650 nm à 300 nm. Ces spectres sont enregistrés par un microspectrophotomètre monté dans nos laboratoires à partir du montage du spectrophotomètre PA (voir figure 8), et ce, en remplaçant la cellule photoacoustique par un microscope optique monté d'une photodiode (UDT model phase 1223, 1 cm^2 de surface active dans l'U.V.-visible, United Detector Technology, Hawthorne, California) sur un des deux oculaires. La lumière produite par le monochromateur est convergée puis réfléchiée sous le plateau du microscope, traversant ainsi l'échantillon. Le signal produit est recueilli

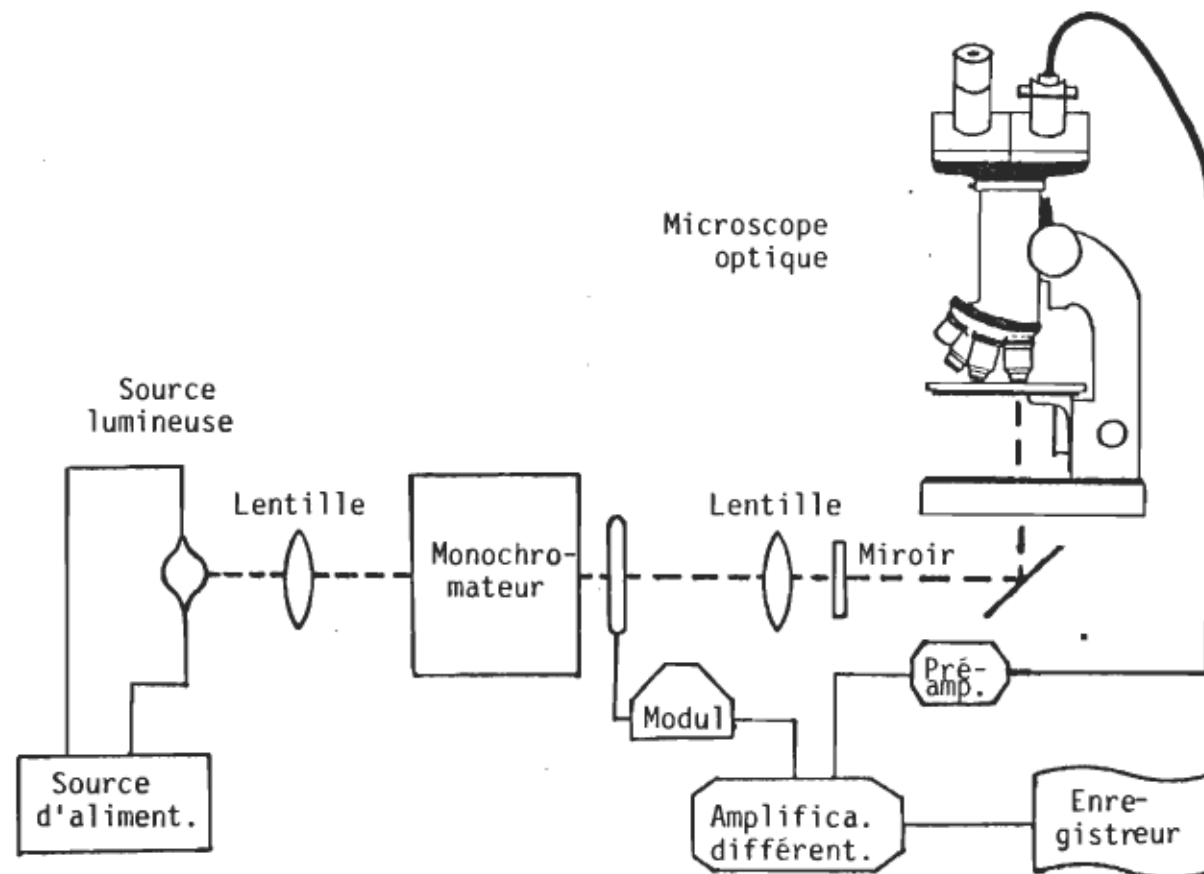


Figure 8: Diagramme du microspectrophotomètre monté à partir du spectrophotomètre par effet photoacoustique. On dépose l'échantillon sur le plateau du microscope. En trait hachuré est représenté le faisceau d'analyse.

par la photodiode, amplifié et dirigé vers un amplificateur Lock-in recevant le signal de référence du chopper. Tout comme en spectroscopie PA, à la différence que le signal produit est un signal de transmission et non un signal d'absorption, le signal produit par le Lock-in en fonction de la longueur d'onde est emmagasiné dans un miniordinateur et normalisé pour les variations d'intensité de la lumière incidente par un signal de transmittance préalablement mis en réserve d'un matériel complètement transparent, soit la lamelle de verre.

2.5.4 Microphotographies

Nous avons pris des microphotographies de divers agrégats avec un appareil photo Leizman (Leizman, Allemagne). Ces microphotographies furent prises en contraste de phase et en contraste interférentiel, et ce, à divers grossissements variant de 28 X à 75 X.

2.5.5 Techniques d'irradiation des agrégats de rhodopsine

2.5.5.1 En spectroscopie U.V.-visible

La rhodopsine est habituellement étudiée soit dans un environnement lipidique naturel, i.e. dans les SEB, soit dans un environnement artificiel, variant par la grande diversité de détergents disponibles sur le marché pour obtenir de la rhodopsine purifiée, i.e. délipidée et solubilisée. Cette solubilisation implique le remplacement des molécules lipidiques naturelles par des molécules conférant à la rhodopsine une certaine stabilité

photochimique variant selon le détergent utilisé. On sait que le L.S. est un détergent efficace et doux dans lequel la rhodopsine est très stable (Fong & al., 1982). La rhodopsine dans un environnement protéique solide dû à l'agrégation des molécules de rhodopsine nous intéresse. Nous avons donc premièrement étudié la stabilité du pigment dans cet environnement protéique, en prenant des spectres U.V.-visible de 650 nm à 300 nm. Afin de voir si le pigment est stable, nous reprenions des spectres du même échantillon à des intervalles de temps allant de 5 - 10 minutes à même quelques jours. Même, nous pouvions reprendre un spectre quelques jours plus tard. Afin de voir le comportement photochimique des agrégats, nous avons effectué divers types d'irradiations. Dans un premier temps, nous avons effectué des irradiations en lumière blanche, à l'aide d'un projecteur à diapositive (Kodak Ektagraphic Slide Projector - Model AF-2) pour voir si le pigment se photolysait et pour déterminer à quel photointermédiaire la réaction se stabilisait, et ce, pour quelle période de temps. Ainsi, nous avons effectué de courtes irradiations suivies d'une prise de spectre de l'échantillon. Dans un second temps, nous avons effectué des irradiations sélectives des agrégats sélectionnés avec des filtres interférentiels dont la bande est centrée à 550 nm (550 WB L8X) et à 450 nm. Nous avons irradié premièrement avec le filtre interférentiel dont la bande est centrée à 550 nm pour de courtes périodes de temps jusqu'à ce que le λ max soit stable (ou encore jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de variation du λ max) par la suite les échantillons sont irradiés avec le filtre interférentiel dont la bande est centrée à 450 nm, afin de vérifier la stabilité photochimique des intermédiaires formés.

2.5.5.2 En spectroscopie PA et en microspectrophotométrie

Nous n'avons pu effectuer d'irradiations ni en spectroscopie PA, ni en microspectrophotométrie puisque l'intensité de la source lumineuse à la position de l'échantillon produit une lumière d'intensité moyenne de 30 Wm^{-2} . Il nous aurait fallu une source d'irradiation plus intense afin de pouvoir noter un effet s'il y a lieu de cette source d'irradiation qui de toute façon aurait thermolysé nos échantillons. Il y a eu des irradiations des agrégats en spectroscopie PA et en microspectrophotométrie afin d'observer la stabilité photochimique de ces agrégats en augmentant la fente de l'ouverture de la source lumineuse de 3 mm à 5 mm pour 5 minutes, et ce, à 500 nm.

2.6 Solubilisation des agrégats de rhodopsine

L'ultime moyen de vérifier avec certitude la nature des agrégats, à savoir s'ils contiennent réellement de la rhodopsine, et ce, à l'état natif, est de les solubiliser pour ensuite prendre des spectres UV-visible de la solution. Nous solubilisons les agrégats de rhodopsine dans un volume minimum (2-5 ml) d'Ammonyx 1,0%, en broyant au mortier la lamelle sur laquelle les agrégats avaient été sédimentés. Après centrifugation du broyat (5 000 rpm - 5 min.), nous recueillons le surnageant. Ensuite nous prenons un spectre UV-visible de ce dernier (Pie Unicam), afin de déterminer la quantité de rhodopsine native dans le surnageant. Dans le but de déterminer si la rhodopsine présente est native ou non, nous ajoutons une goutte d'hydroxylamine à cet échantillon de rhodopsine solubilisée. Puisque ces agrégats ont déjà subi une irradiation, la présence

d'hydroxylamine amène une dégradation de toute rhodopsine non-native (MII, MI, LUMI), en rétinoloxime. Après agitation, nous prenons un spectre UV-visible de la solution. Puis nous l'irradions à la lumière du jour qui photolyse la rhodopsine native. Celle-ci se transformera en rétinoloxime grâce à la présence de l'hydroxylamine. Nous reprenons alors un spectre UV-visible.

2.7 Etude de la rhodopsine liée à la concanavaleine A

La rhodopsine liée à la concanavaleine A ne peut être étudiée que par spectroscopie PA à cause de la présence même de la Con A et du gel. Nous déposons de l'échantillon sur une lamelle de verre que l'on dépose dans la cellule photoacoustique. Nous prenons un spectre PA de 650 nm à 300 nm. Le signal produit par le lock-in en fonction de la longueur d'onde est emmagasiné dans un miniordinateur et normalisé pour des variations d'intensité de la lumière incidente en divisant le signal PA de l'échantillon à chaque longueur d'onde par un signal PA préalablement mis en réserve (le noir de charbon). Dû à la diffusion de la lumière par le gel de Con A, le signal PA possède une ligne de base qui augmente beaucoup plus on se déplace vers le bleu. Nous reprenons le spectre après quelques intervalles de 5 minutes afin de vérifier la stabilité du pigment dans cet environnement.

2.8 Etude de SEB séchés sur lamelle

Une lamelle de SEB sédimentée est déposée dans la cellule photoacoustique. On prend un spectre PA de 650 nm à 300 nm. Le signal

produit par le lock-in en fonction de la longueur d'onde est emmagasiné dans un miniordinateur et normalisé pour des variations d'intensité de la lumière incidente en divisant le signal PA de l'échantillon à chaque longueur d'onde par un signal PA préalablement mis en réserve (le noir de charbon). Un autre spectre PA est pris après quelques minutes afin de vérifier la stabilité du pigment.

2.9 Produits utilisés

La liste des produits utilisés figure dans la table 1. Le lauryl sucrose que nous avons utilisé au cours de nos travaux n'est pas encore disponible commercialement, il nous a été généreusement fourni par Ryoto Co. Ltd, Tokyo, Japan. Le lauryl sucrose est un additif alimentaire produit par transestérification. Ce produit n'est pas pur puisqu'il est constitué d'environ 80% de lauryl monoester et de 20% de di- et triesters. Plus de 98% des chaînes d'acides gras sont des chaînes en C₁₂, les autres étant des chaînes en C₁₀, C₁₄ et C₁₆. Cette non-homogénéité du détergent est particulièrement bien mise en évidence dans la figure 9, où on voit que le L.S. donne lieu à plusieurs "spots" lorsqu'analysé par chromatographie sur couche mince.

9. <u>PRODUITS UTILISES</u>	<u>FOURNISSEUR</u>	<u>NATURE</u>
Acide acétique glacial	Fisher Scien. Co.	réac. ACS
Acide chlorhydrique	Baker Analyzed Regent	cert. ACS
Acide sulfurique	Anachemia	réac. ACS
Ammonyx	Onyx Chem. Co.	-
Anisaldéhyde	Fisher Scien. Co.	-
Azoture de sodium	Fisher Scien. Co.	purifié
Bicarbonate de sodium	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Carbonate de sodium	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Chloroforme	Anachemia	-
Chlorure de calcium	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Chlorure de magnésium	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Chlorure de sodium	Fisher Scien. Co.	certifié
Concanavaline A Sé- pharose 4B	Sigma Chem. Co.	suspension 10 mg/ml
Ethylènediamine diso- dium tétraacétate/EDTA	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Hydrochlorure	-	-
Hydrochlorure d'hydro- xylamine	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Hydroxyde de sodium	-	-
Hydroxyméthyl aminomé- thane, 99,9% / TRIS	Aldrich Chem. Ltd	ultrapure hygroscopique
Méthanol	Anachemia	99,8% min.
α -méthyl-D-mannopyra- noside	Aldrich Chem. Ltd	99%
Phosphate dibasique	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Phosphate monobasique	Fisher Scien. Co.	cert. ACS
Sucrose	Sigma Chem. Co.	Grade 1
Sulfate de calcium	Hammond Drierite Co.	-

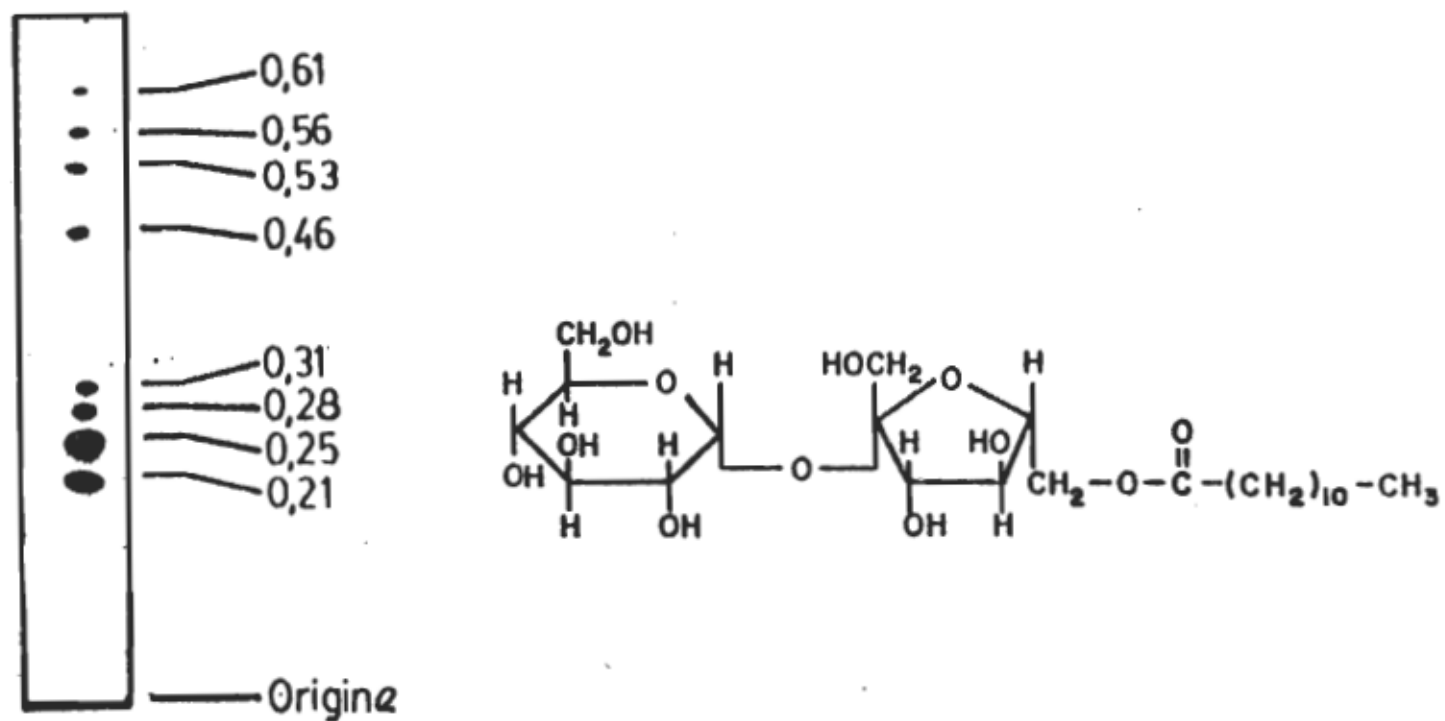


Figure 9: Structure et chromatogramme du L.S..

Le chromatogramme est développé en présence d'un mélange chloroforme : méthanol : eau (20:5:0,7 v/v) et révélé avec le réactif de Kagi-Mischer.

CHAPITRE 3

RESULTATS

3.1 Spectre d'absorption de la rhodopsine bovine

Lors de l'extraction du pigment visuel, il peut arriver que de l'opsine et/ou du rétinol soit entraînés avec le pigment. Pour l'expérimentation, il faut que les préparations répondent à un certain critère de pureté: il faut que le rapport des deux principales bandes d'absorption soit plus petit ou égal à deux. La figure 10 montre un spectre typique de la rhodopsine avec ses trois bandes d'absorption caractéristiques. Cette rhodopsine est solubilisée en présence de lauryl sucrose 0,2% (p/v). La bande α , dont le λ max est à 498 nm représente l'absorption principale du chromophore, le 11-cis rétinol, lié à l'apoprotéine. La bande β dont le λ max à 330 nm appartient également au chromophore. La bande γ dont le λ max est à 278 nm correspond à la partie protéique du pigment visuel: l'opsine, et est due à l'absorption par les acides aminés aromatiques, soit le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Nous avons utilisé tout au long de cette étude de la rhodopsine purifiée dont le rapport A_{278}/A_{498} était de 2,0 ou moins. Deux autres éléments indiquent la pureté des préparations. Premièrement, la valeur en absorbance à 410 nm par rapport à sa valeur à 500 nm. Plus une préparation est pure, plus cet écart est grandement. Deuxièmement, l'intensité et la netteté des deux creux de part et d'autre de la bande

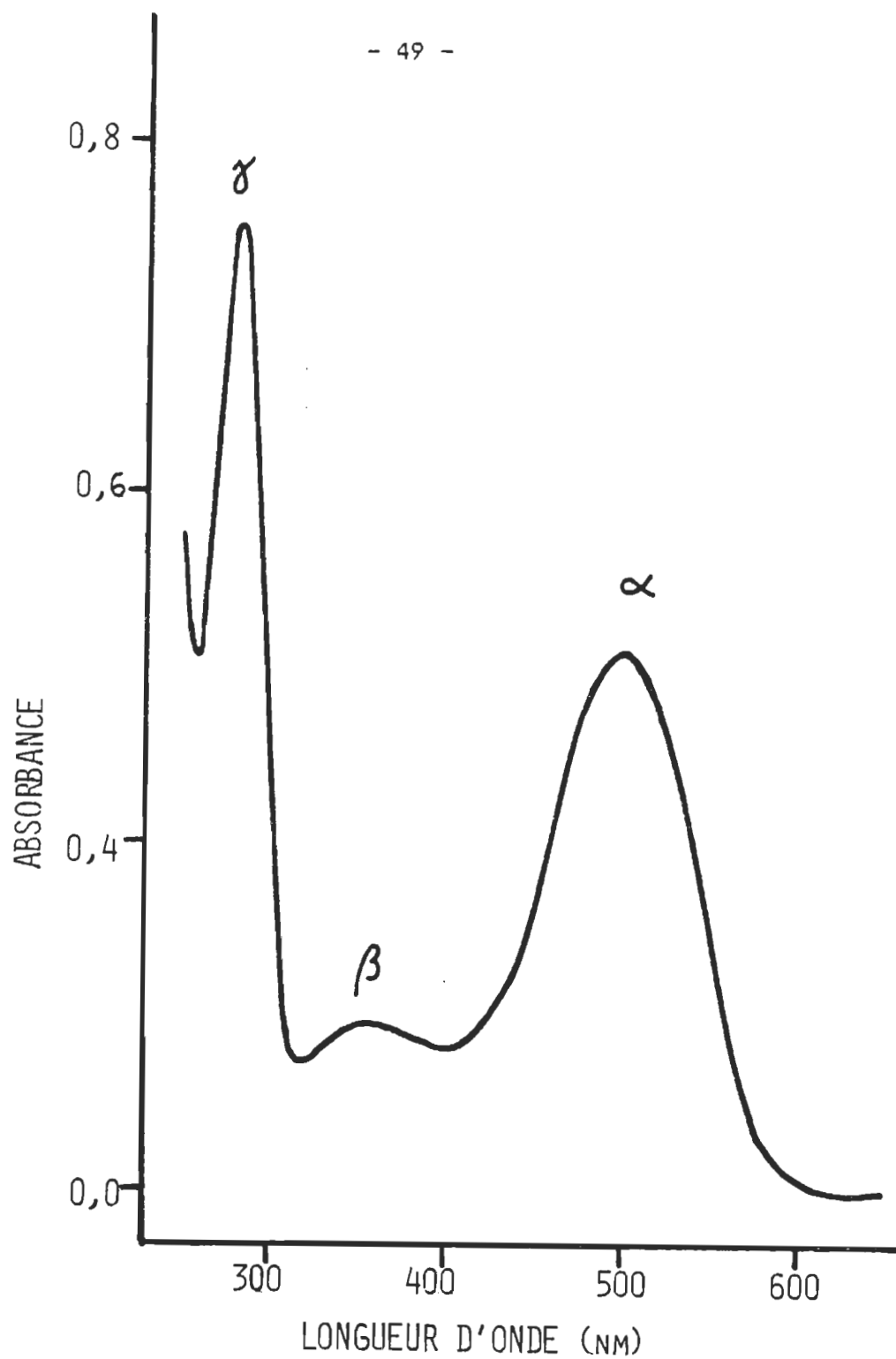


Figure 10: Spectre d'absorption U.V.-visible de la rhodopsine solubilisée dans du lauryl sucrose 0,2% (p/v), à la température de la pièce.

β , et le fait que le creux dans l'UV soit plus prononcé que le creux dans le visible.

3.2 Elimination du détergent

3.2.1 Hydrolyse du détergent

Puisque le lauryl sucrose possède une concentration micellaire critique (CMC) très faible, soit de 0,14 mM (Tessier, M, Mémoire de maîtrise, U.Q.T.R., 1985), et conséquemment un pouvoir dialysant très faible, nous avons considéré que sa nature de substrat enzymatique nous permettrait de contourner le problème qu'entraîne l'élimination du détergent par dialyse. Cette dialyse serait très longue, soit de 63 heures pour éliminer 50% du lauryl sucrose 0,1% (p/v). Nous avons premièrement envisagé une méthode biochimique simple, soit une hydrolyse enzymatique du détergent. Des hydrolyses enzymatiques de rhodopsine solubilisée dans du lauryl sucrose 0,2% (p/v), furent effectuées à l'aide de différentes enzymes (5) afin de vérifier quelle(s) enzyme(s) démontrait(ent) le meilleur potentiel enzymatique. Il fut établi (M. Tessier, Rapport de stage, 1981) que l'estérase de foie de porc et la lipase de *Candida cylindracea* démontraient le meilleur potentiel enzymatique. Après incubation du lauryl sucrose 0,6% (p/v) en présence de ces 2 enzymes pour 69 heures, il est impossible de détecter la présence d'esters de sucrose, indication que plus de 99% du détergent a été hydrolysé. Cette longue période requise pour compléter l'hydrolyse du détergent (approximativement 3 jours) suggère que les enzymes ont une faible affinité pour les esters de sucrose. Il est généralement

accepté que les lipases et les estérases sont plus actives à l'interface huile-eau, et parfois inhibées par des produits de réaction ou des lipides ayant des têtes polaires larges. Alors nous avons évalué des cinétiques enzymatiques de l'estérase de foie de porc, l'enzyme la plus active sur le lauryl sucrose. Cette évaluation a porté sur divers substrats.

3.2.2 Activité enzymatique en présence de divers substrats

Afin d'évaluer des cinétiques enzymatiques de l'estérase de foie de porc, nous avons effectué une détermination titrimétrique des acides gras produits lors de l'hydrolyse par l'enzyme.

Nous pouvons voir par la figure 11 que l'estérase induit une hydrolyse rapide et complète du butyrate d'éthyle (figure 11), ce dernier étant le substrat utilisé dans la détermination de son activité, i.e. son substrat standard. Toutefois, la même réaction est fortement inhibée (environ 95% d'inhibition) si du lauryl sucrose 1,0% (p/v) est présent (figure 11). En présence de 1% d'octyl glucoside, l'octyl éther du glucose, un détergent doux qui ne devrait pas avoir d'affinité pour cette enzyme, l'inhibition est observée mais à un degré plus faible (environ 43% d'inhibition; figure 11). L'octyl glucoside seul ne démontre aucune activité, si on omet le saut artéfactuel dû à l'ajout de l'enzyme (figure 11), alors que le lauryl sucrose seul démontre une hydrolyse très lente après l'ajout d'enzyme (figure 11). La pente de la courbe après l'ajout de l'estérase de foie de porc à du lauryl sucrose 1% (p/v) correspond à la production de 1,6 μ moles d'acide laurique par heure. A ce taux, 5 ml d'une solution 1% (p/v)

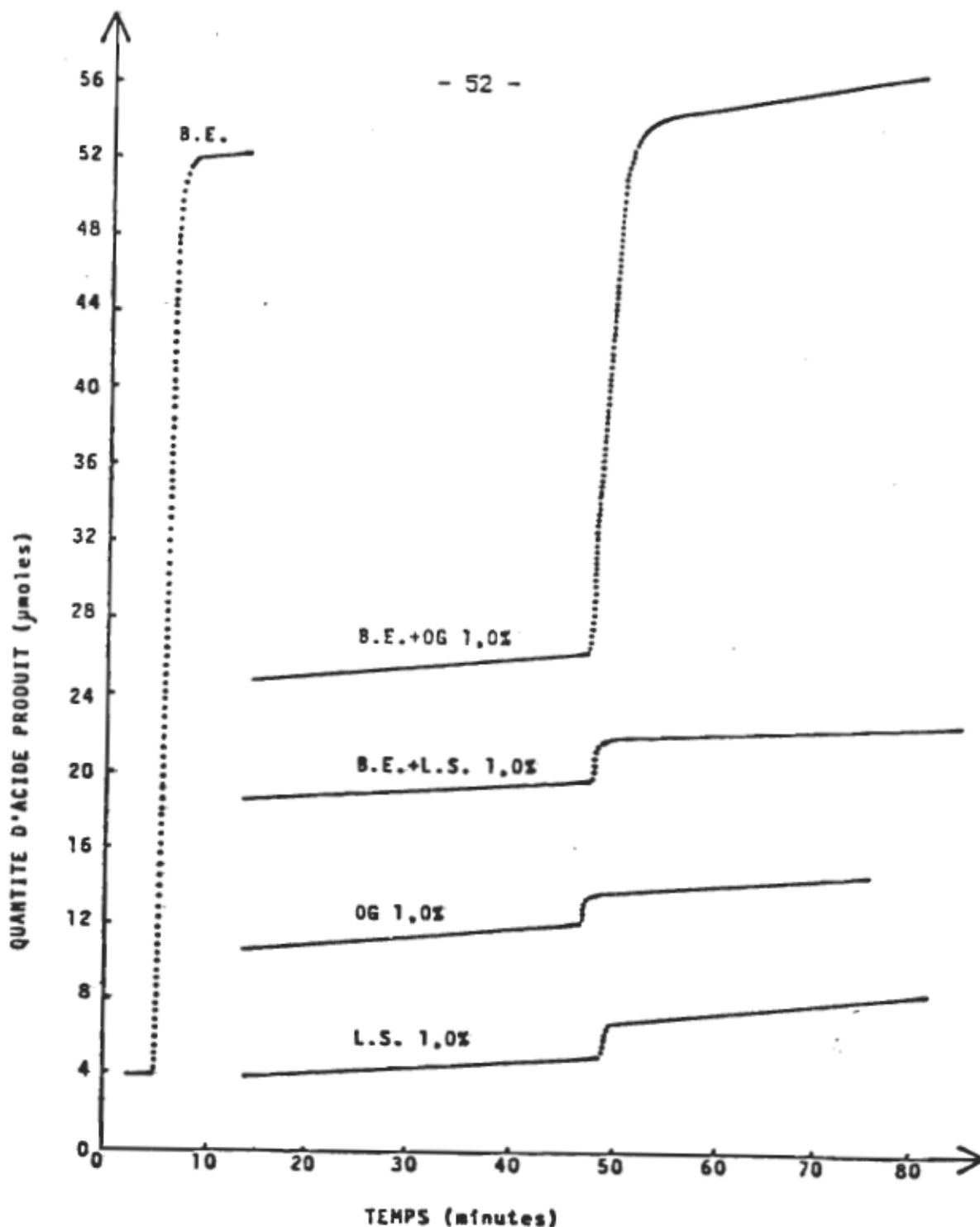


Figure 11: Activité enzymatique de l'estérase de foie de porc sur divers substrats: le butyrate d'éthyle (B.E.), l'octyl glucoside (O.G.), le lauryl sucrose (L.S.), ainsi que sur des mélanges de ces derniers. Le saut sur la courbe O.G. représente le saut artificiel dû à l'ajout de l'enzyme.

en lauryl sucrose serait hydrolysée en 66 heures, environ la même période requise pour la disparition des esters de sucrose dans les expériences précédentes. (Tessier, M, Rapport de stage, U.Q.T.R., 1984).

Les résultats de la figure 11 ne nous permettent pas d'établir le mécanisme de l'inhibition enzymatique. L'estérase pourrait aussi bien être inhibée par la chaîne acyl (octyl ou lauryl) que par la propriété surfactante de ces molécules. Toutefois l'inhibition presque complète de l'hydrolyse du butyrate d'éthyle par le lauryl sucrose pourrait suggérer que l'ester de sucrose a une affinité plus forte pour l'enzyme que le butyrate d'éthyle lui-même. La lenteur de la réaction pourrait alors être attribuée à l'encombrement stérique dû à la large tête polaire qu'est le sucrose.

3.2.3 Hydrolyse alcaline du lauryl sucrose

Quoiqu'efficace, l'hydrolyse enzymatique du lauryl sucrose est lente et peut devenir un inconvénient si le détergent doit être enlevé plus rapidement. La présence du lien ester dans le détergent et l'instabilité relative de ce groupement dans les acides et dans les bases nous a permis de considérer une méthode chimique simple pour enlever le détergent, soit l'hydrolyse alcaline.

A cet effet, nous avons analysé la stabilité du lauryl sucrose à différents pH. La figure 12 montre des chromatogrammes de solutions de lauryl sucrose incubé pour 24 heures dans divers tampons à pH variant de 7,0 à 10,8. La diminution en intensité des spots caractéristiques

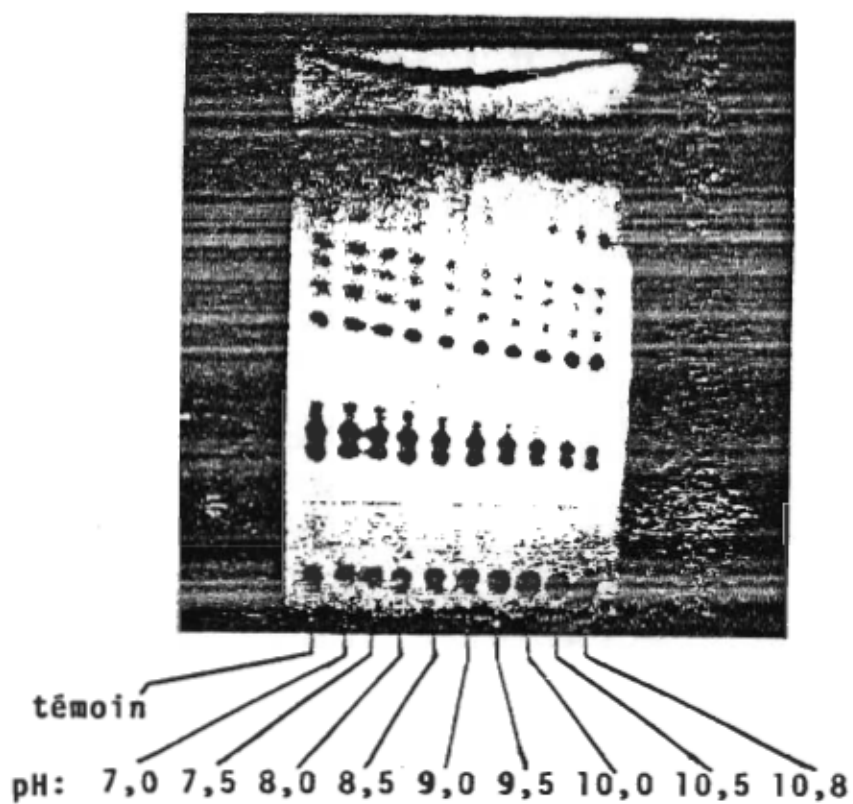


Figure 12: Chromatogrammes du lauryl sucrose incubés durant 24 heures à différents pH, de pH 7,0 à pH 10,8.

de ces esters (rf de 0,21 à 0,61) et l'augmentation de l'intensité des spots caractéristiques du sucrose au point de déposition indiquent que le lauryl sucrose est instable à $\text{pH} > 9,5$. Le chromatogramme demeure inchangé même après 6 jours d'incubation. Ceci n'indique pourtant pas que la réaction a atteint l'équilibre. Un abaissement du pH par la formation d'acide gras est principalement responsable de l'arrêt de la réaction. Une solution de lauryl sucrose 1% (p/v) correspond à une concentration de 20 mM. Alors une hydrolyse avancée de l'ester est suffisante pour réduire le pH d'un tampon 25 mM. Nous avons donc amélioré la technique grâce à l'utilisation de sacs à dialyse comme enceinte au milieu d'incubation. En fait, lorsque le lauryl sucrose est incubé dans un sac à dialyse, l'hydrolyse est terminée après 6 heures.

Nous avons fait une évaluation de l'hydrolyse alcaline du détergent par visualisation comparative des différents spots obtenus par chromatographie sur couche mince (voir figure 13). Nous observons qu'après 270 minutes (4,5 hres), l'hydrolyse est complétée à plus de 95 %. La dialyse procure un avantage supplémentaire en éliminant le sucrose au fur et à mesure de sa formation. Il est à noter que la dialyse elle-même ne peut être responsable de la disparition des esters de sucrose, puisque ce détergent dialyse très lentement. Approximativement trois jours sont requis pour que 50% du lauryl sucrose soit dialysé.

PERIODE D'INCUBATION (min.)	LAURYL SUCROSE 1,0% (p/v)
0	+ + + +
90	+ +
150	+
210	+
270	- (> 95%)

Figure 13: Evaluation de l'hydrolyse du lauryl sucrose 1,0% (p/v), incubés à la température de la pièce en présence d'un tampon carbonate-bicarbonate de pH 10,5.

3.2.4 Effet du milieu alcalin sur la rhodopsine solubilisée dans le lauryl sucrose

Avant de pouvoir éliminer le détergent du mélange rhodopsine solubilisée dans du lauryl sucrose par hydrolyse alcaline, il faut préalablement évaluer la stabilité de la rhodopsine aux pH alcalins. Il est important d'évaluer cette stabilité en fonction du pH et du temps. Par titrage de la rhodopsine solubilisée dans du lauryl sucrose 0,2% (p/v), nous pourrions déterminer un pH de travail pour l'hydrolyse alcaline de ce mélange. Cette étude nous permet d'évaluer que le pKa apparent de la stabilité de la rhodopsine est supérieur à 11. A pH=11,8, la rhodopsine est instantanément dénaturée, alors qu'à pH=11,0, elle demeure stable.

Lorsque nous incubons de la rhodopsine solubilisée dans du lauryl sucrose 0,2% (p/v) en milieu alcalin à pH=11,0, le spectre d'absorption de la rhodopsine ne subit aucune modification. La rhodopsine conserve ses propriétés natives et démontre toujours un λ max de 498 nm, et ce, jusqu'après 3,5 hres d'incubation à pH=11,0. Ainsi, l'hydrolyse du lauryl sucrose en présence de rhodopsine s'effectue à pH=10,5-10,8 sous un éclairage rouge ($\lambda < 620$ nm).

3.2.5 Discussion

Grâce à l'utilisation du lauryl sucrose comme détergent et dû à la présence du lien ester dans le détergent ainsi qu'à l'instabilité relative de ce groupement, de simple méthodes d'hydrolyses enzymatique et chimique

devraient permettre d'éliminer le détergent. Nous avons constaté que le mélange enzymatique possédant le meilleur potentiel enzymatique sur le lauryl sucrose exigeait une longue période pour effectuer une hydrolyse complète de ce dernier. A la lumière de ces résultats, nous nous sommes intéressés à l'activité enzymatique de l'estérase de foie de porc sur le lauryl sucrose, l'enzyme la plus active sur le L.S.. Pour ce faire, nous avons mesuré la vitesse d'hydrolyse de divers substrats, seuls ou mélangés, par cette enzyme: le butyrate d'éthyle, son substrat naturel, le L.S., un ester de sucrose et d'acides gras, l'octyl glucoside (O.G.), un éther de sucrose et d'acide gras, et des mélanges B.E.-L.S. et B.E.-O.G.. Nous avons constaté que sur les mélanges, la présence de détergent inhibait fortement la réaction, et ce, beaucoup plus dans le cas du L.S. (à 95%) que de l'O.G. (à 43%). Résultat prévisible, car le lauryl sucrose est un ester alors que l'O.G., un éther. Ce que nous constatons d'ailleurs, puisque l'octyl glucoside ne démontre aucune activité, alors que le L.S. démontre une hydrolyse très lente après ajout de l'enzyme. Ces résultats ne nous permettent pas d'établir l'identité moléculaire responsable de l'inhibition enzymatique. L'estérase pourrait aussi bien être inhibée par la chaîne acyl que par la propriété surfactante de ces molécules. Par contre, l'inhibition presque complète de l'hydrolyse du B.E. par le L.S. suggère que l'ester de sucrose a une affinité plus forte pour l'enzyme que le B.E. lui-même. La lenteur de la réaction pourrait alors être attribuée à l'encombrement stérique dû à la large tête polaire qu'est le sucrose ou encore à son K_m (constante de Michaelis) trop faible.

Si le détergent doit être enlevé rapidement, cette dernière méthode enzymatique quoiqu'efficace, peut devenir un inconvénient dû à sa lenteur.

Compte tenu de l'instabilité relative des esters dans les acides et dans les bases, nous avons considéré une méthode chimique d'hydrolyse du lauryl sucrose: l'hydrolyse alcaline. Après investigation de la stabilité du L.S. aux pH alcalins, nous notons que celui-ci est très instable aux $\text{pH} > 9,5$. Mais l'hydrolyse alcaline n'est efficace qu'en milieu dialysant. Ce dernier procure l'avantage d'éliminer le sucrose, favorisant ainsi la réaction d'hydrolyse par déplacement de l'équilibre. A $\text{pH} > 9,5$, l'hydrolyse est complétée en 4 hres. La dialyse elle-même ne peut être responsable de la disparition du L.S. puisqu'il dialyse très lentement, soit 50% du L.S. en 3 jours. Quant à la stabilité de la rhodopsine dans ces mêmes conditions, nous avons déterminé un pK_a apparent de sa stabilité aux environs de 11,4, ce qui nous permet d'évaluer un pH de travail sûr pour l'hydrolyse efficace du détergent aux environs de 10,5 à 10,8 sans risque de dénaturer la protéine. A la lumière de ces résultats, l'hydrolyse alcaline du L.S. s'avère beaucoup plus efficace, en terme de temps, que l'hydrolyse enzymatique. Le L.S. est hydrolysé à plus de 95% en 4 hres en milieu alcalin, par rapport à 63 hres en milieu enzymatique. La rhodopsine bovine ne se dénaturant pas dans ces conditions alcalines, les conditions expérimentales pour l'hydrolyse du mélange rhodopsine solubilisée dans du L.S. 0,2% (p/v) sont une incubation du mélange à $\text{pH}=10,5-10,8$, en milieu dialysant, à la température de la pièce.

3.3 Dédétergentation de la rhodopsine

3.3.1 Par hydrolyse enzymatique

Le L.S., lorsque chromatographié sur couche mince, présente un patron caractéristique (voir figure 9). Lorsqu'une solution de rhodopsine bovine purifiée dans du L.S. est déposée sur une plaque de CCM, le chromatogramme montre, en plus, un faible spot jaune dont le $R_f=0,17$. La rhodopsine dénaturée par le solvant de migration est manifestement responsable de l'apparence de ce spot. Lorsque cette solution de rhodopsine est incubée en présence du mélange enzymatique: lipase-estérase, l'hydrolyse du détergent devient évidente au fur et à mesure que la rhodopsine précipite: après une nuit d'incubation 90% de la rhodopsine est sédimentée par une centrifugation de 150 minutes (10 000g), alors que des échantillons incubés pour la même période de temps sans enzymes ne démontrent pas de sédimentation sous les mêmes conditions expérimentales. De plus, la période d'incubation nécessaire à l'hydrolyse complète du L.S. du mélange est plus longue (300 hres) par rapport à celle pour le L.S. seul (63 hres). Cette période représente une réaction quatre fois (4X) moins rapide que lorsque le L.S. est seul. En fait, environ 95% du détergent est hydrolysé après 150 hres, à en juger par la pâleur des spots caractéristiques du sucrose après cette période d'incubation. La disparition complète de ces spots nécessite 300 hres.

Un spectre photoacoustique de la rhodopsine purifiée et solide obtenue par centrifugation d'un échantillon duquel le détergent avait été enlevé, a été pris. Cette mesure fut prise à 173°K. Le photointermédiaire stable

à cette température est la lumirhodopsine ($\lambda_{\text{max}} = 497\text{nm}$). L'absorbance maximum de notre échantillon (505 nm) est près du λ_{max} de la rhodopsine solubilisée dans le lauryl sucrose et indique que la rhodopsine ne fut pas dénaturée par l'élimination de détergent.

3.3.2 Par hydrolyse alcaline

Lorsque nous incubons une solution de rhodopsine solubilisée dans du L.S. 0,2% (p/v) en milieu alcalin de pH=10,5-10,8 (voir figure 14), le L.S. s'hydrolyse en deçà de 4,5 hres. Nous avons effectués ces incubations à 4°C ainsi qu'à la température de la pièce. Après 2,5 hres d'incubation, l'hydrolyse à la température de la pièce est beaucoup plus avancée que celle effectuée à 4°C. Nous ne pouvons toutefois pas discuter de valeurs quantitatives quant aux vitesses de réaction puisque ces évaluations sont effectuées par visualisation en comparant l'intensité des spots obtenus expérimentalement tout au long de l'incubation à une gamme de spots standards de concentration connue. Cette méthode d'évaluation est efficace jusqu'à une concentration de 0,06 μg , correspondant à 1,5% de la concentration du L.S. dans la solution initiale. Nous pouvons donc aisément postuler que la réaction est complétée à plus de 95%.

Nous obtenons alors de la rhodopsine débarrassée de phospholipides lors de la purification et désormais dépourvue de détergent. A ce stade, nous obtenons de la rhodopsine sous forme solide grâce à l'absence de détergent pour la maintenir en solution sous forme de micelles. La rhodopsine solide conserve ses propriétés spectrales natives puisque son spectre U.V.-visible (voir fig. 15) démontre un λ_{max} à 490 nm. Après irradiation,

PERIODE D'INCUBATION (min.)	RHODOPSINE BOVINE DANS DU LAURYL SUCROSE 0,2%	
	T pièce	4°C
0	+ + + +	+ + + +
90	+ +	
150	+	+ + +
270	-	-

Figure 14: Evaluation de l'hydrolyse alcaline du détergent par incubation d'une solution de rhodopsine bovine solubilisée dans du lauryl sucrose 0,2%, en présence d'un tampon carbonate-bicarbonate de pH 10,5, à 4 C ainsi qu'à la température de la pièce.

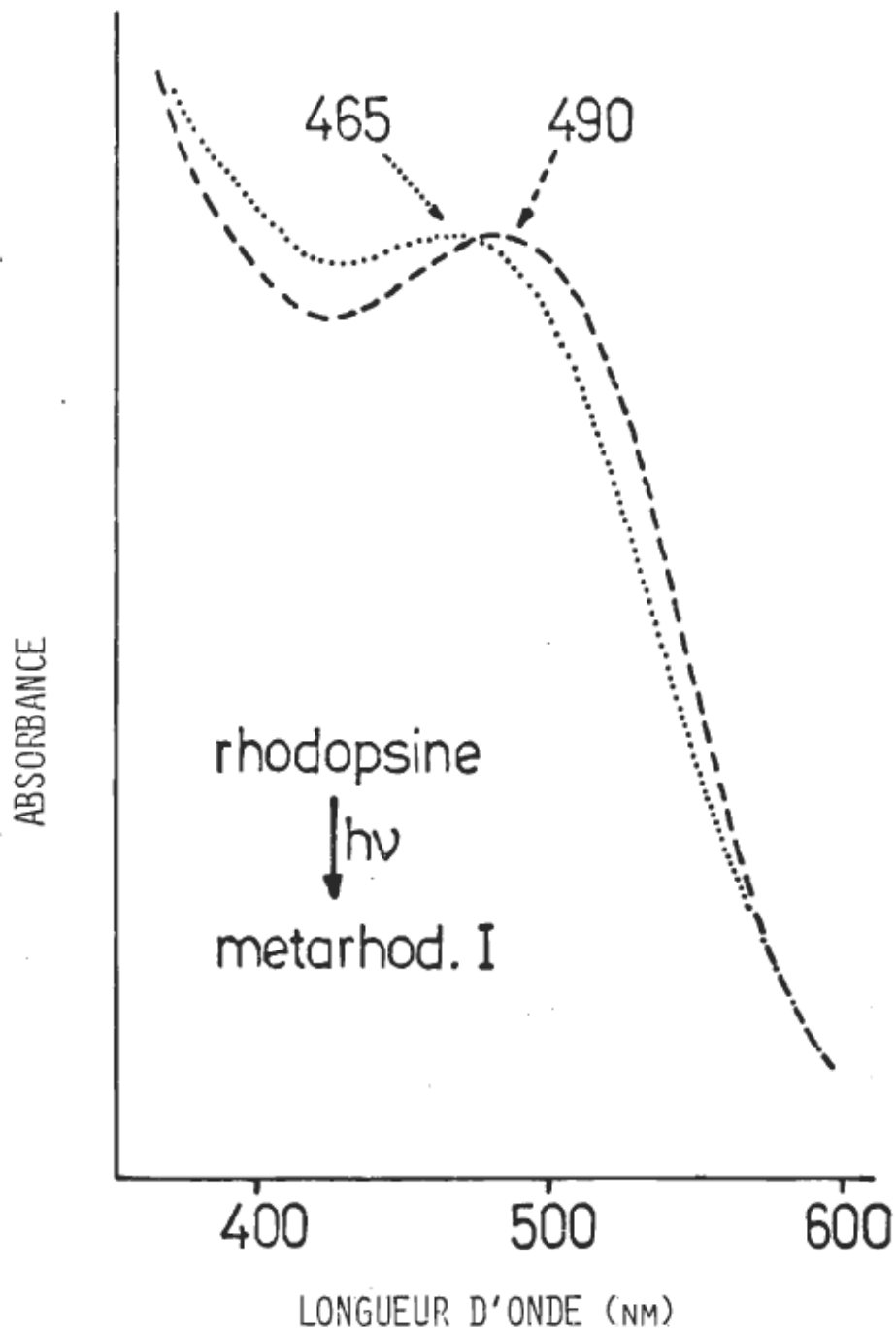


Figure 15: Spectre U.V.-visible de la rhodopsine solide, avant (- - -) et après (. . . .) irradiation à la température de la pièce.

nous notons un déplacement spectral vers 465 nm où il y a stabilisation d'un photointermédiaire. Ce déplacement spectral est associé à la photoconversion de rhodopsine en Méta I. Ces deux espèces, lorsque solubilisées, possèdent des λ max respectifs de 498 nm et 478 nm. Les différences observées sont dues, en partie à la diffusion due à la présence de sels dans les échantillons solides de rhodopsine, et surtout à la diffusion de la lumière par les agrégats, et ce, malgré l'utilisation d'un spectrophotomètre muni d'un support pour échantillon diffusant.

Une hydrolyse alcaline du mélange rhodopsine purifiée dans du L.S. produit une rhodopsine non dénaturée par élimination du détergent. Un des avantages de l'hydrolyse alcaline par rapport à l'hydrolyse enzymatique, est que la période d'incubation nécessaire à l'hydrolyse du détergent est beaucoup plus rapide. Ainsi, cette méthode présente un grand avantage par rapport à l'hydrolyse enzymatique.

3.3.3 Par dilution

Dans le but de produire une quantité intéressante de rhodopsine sous forme solide afin de pouvoir en étudier le comportement photochimique et d'en évaluer le caractère natif, nous nous sommes butés à des problèmes de reproductibilité. Selon les lots de L.S. utilisés, les rendements variaient et nous ne pouvions obtenir d'hydrolyse même à pH 10,5. Nous avons ainsi considéré une méthode physique, la dilution. Les échantillons de rhodopsine préparés selon cette méthode, telle que décrite en 2.2.2.3, ne révèlent aucune trace de lauryl sucrose lorsqu'ils sont analysés par CCM. Si nous considérons que tous les monomères de L.S. sont distribués

dans l'ensemble de la phase aqueuse au cours des lavages, nous pouvons estimer théoriquement que la concentration du L.S. dans les agrégats de rhodopsine obtenus à la fin des étapes de dilution est approximativement de $10^{-3}\%$, ce qui correspond à 10^{-4} molécules de L.S. par molécule de rhodopsine. Par cette méthode efficace et reproductible par rapport à l'hydrolyse alcaline où nous avons eu des problèmes de reproductibilité dû au lot de L.S., nous obtenons beaucoup de rhodopsine, autant à la fin du processus de dilution, qu'au cours de la procédure de dilution lorsque les agrégats adhèrent aux parois des pipettes Pasteur au cours des opérations d'aspiration et reflux effectuées pour remettre en suspension la rhodopsine sédimentée.

3.3.3.1 Aspect physique de la rhodopsine agrégée

Par observation, en lumière rouge, des agrégats obtenus, nous constatons la non-uniformité dans l'apparence des agrégats. Ils n'ont pas tous la même dimension, ni le même aspect. Certains ont un aspect plutôt cristallin, alors que d'autres ont un aspect plus amorphe. L'aspect physique de ces agrégats sera pris en considération lorsque viendra le temps d'en faire l'analyse spectroscopique et photochimique.

Afin d'obtenir une évaluation plus précise de cette non-uniformité, nous avons observé les agrégats au microscope optique. A un grossissement de 1 000, nous notons une grande hétérogénéité dans l'organisation structurale des agrégats (voir figures 16 & 17). Lorsque de l'eau distillée est utilisée plutôt que du tampon au cours des étapes de dilution, nous obtenons des agrégats d'une plus grande homogénéité côté aspect structural. De plus, nous notons que la coloration de ces agrégats est très stable.

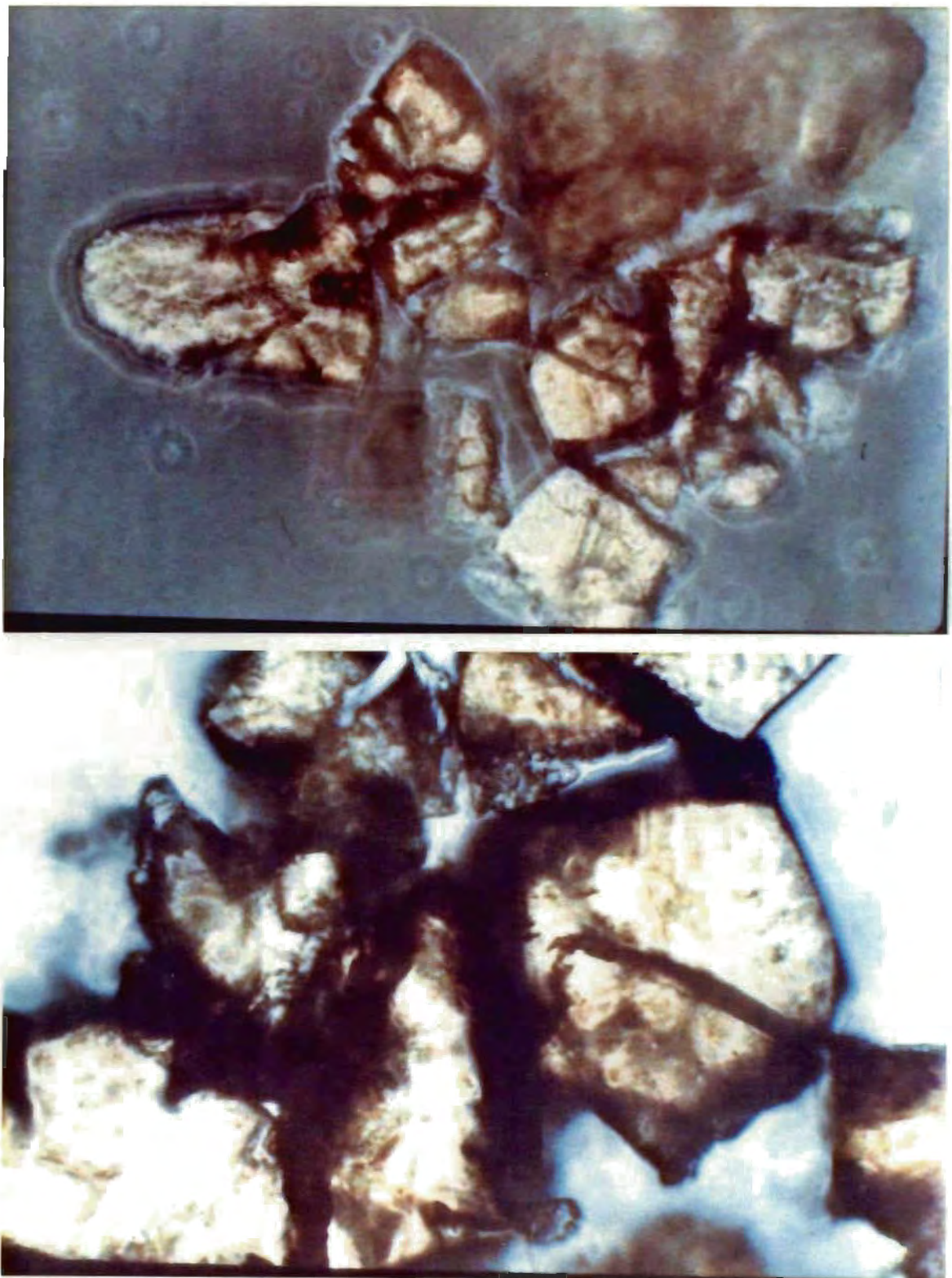


Figure 16: Microphotographies d'agrégats de rhodopsine obtenus par la méthode de dilution.

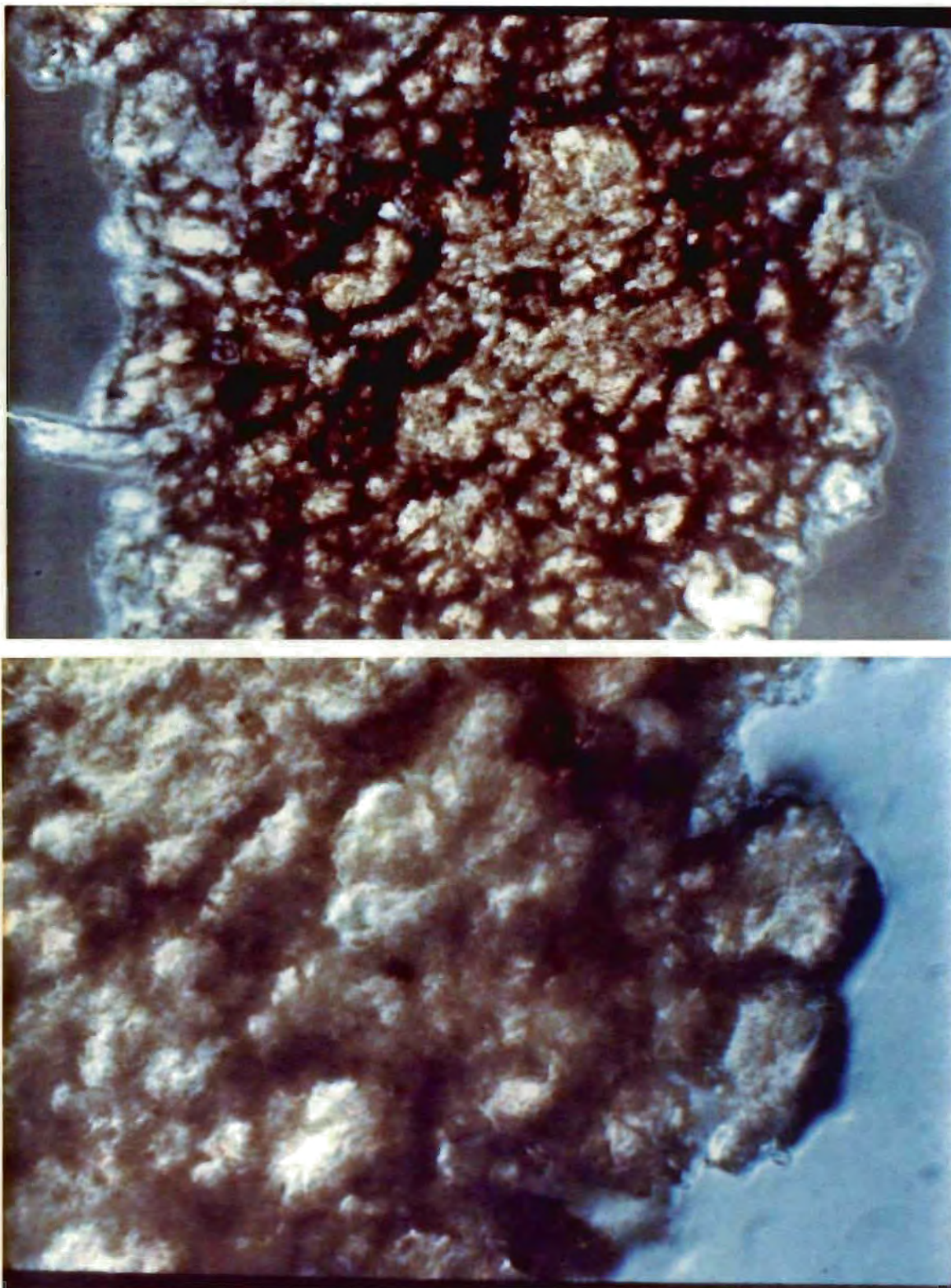


Figure 17: Microphotographies d'agrégats de rhodopsine obtenus par la méthode de dilution.

3.3.4 Discussion

L'hydrolyse enzymatique du détergent d'une solution de rhodopsine solubilisée dans du L.S. produit de la rhodopsine agrégée ayant conservée ses propriétés natives puisqu'elle présente un λ max de 505 nm qui se déplace à 500 nm après irradiation ce qui correspond à la transition rhodopsine - lumirhodopsine. L'inconvénient majeur de cette technique est le fait que la période d'incubation nécessaire est de très longue durée, soit de 300 hres, cette période étant quatre fois (4X) plus longue que lorsque le L.S. est seul en solution. Ainsi, la présence du pigment ralentit beaucoup la réaction d'hydrolyse enzymatique du L.S..

L'hydrolyse alcaline est une méthode chimique d'élimination du L.S. intéressante puisqu'elle nous permet d'obtenir aux pH de 10,5-10,8, pH où le L.S. est très instable et où le pigment est stable, de la rhodopsine agrégée en moins de 4,5 hres à la température de la pièce. Cette rhodopsine agrégée conserve ses propriétés natives puisqu'elle présente un spectre U.V.-visible dont le λ max est à 490 nm pour se déplacer à 465 nm après irradiation à la température de la pièce ce qui correspond à la photogénération de métarhodopsine I. Toutefois, selon le lot de L.S. utilisé, la réaction d'hydrolyse alcaline présente des problèmes de reproductibilité. De plus, bien que les hydrolyses enzymatiques et alcalines nous permettent d'obtenir de la rhodopsine agrégée, dépourvue de lipides et de détergent, on ne peut confirmer l'absence d'acides gras (produit d'hydrolyse) dans ces échantillons. Une méthode physique, la dilution, fut donc considérée

en alternative. Cette méthode présente un meilleur rendement quantitatif et ne dénature pas non plus la rhodopsine. Nous avons constaté que les agrégats ont une apparence structurale hétérogène. En microscopie optique, nous observons que cette hétérogénéité est reliée à l'aspect structural plus ou moins organisé, conférant aux agrégats une apparence, soit cristalline, soit amorphe.

Lorsque les dilutions sont effectuées avec de l'eau distillée et non avec du tampon, nous obtenons des agrégats de rhodopsine plus homogènes, d'apparence cristalline en microscopie optique. L'absence de sels et le pH de l'eau distillée semble donc favoriser une agrégation plus efficace. Ainsi, pour éliminer le détergent, la dilution s'avère être la méthode présentant le meilleur rendement côté quantitatif et côté qualitatif. Le fait d'utiliser de l'eau distillée plutôt que du tampon lors des étapes de dilution implique premièrement une modification du pH, de 7,3 à 6,0, ainsi qu'une élimination des sels du milieu d'incubation. Cette modification du pH affecte donc les propriétés électrolytiques des acides aminés de la rhodopsine favorisant ainsi une agrégation plus efficace tout en produisant des agrégats auxquels aucun sel ou électrolyte ne peut adhérer.

3.4 Spectroscopie et photochimie de la rhodopsine agrégée

3.4.1 Spectre d'absorption

La rhodopsine obtenue sous forme d'agrégats est sédimentée sur lamelle de quartz afin de déterminer la position de son maximum d'absorption. Pour des échantillons n'ayant subi aucune irradiation préalable, le λ max est toujours inférieur à 500 nm, généralement 496 nm (voir figure 18). Ceci correspond à un déplacement de 6 à 7 nm vers la bleu, comparativement à la rhodopsine contenue dans les membranes des bâtonnets ou dans les détergents comme le lauryl sucrose (Motoyama & al.).

3.4.2 Photosensibilité de la rhodopsine agrégée

La rhodopsine agrégée sur lamelle, après irradiation à 550 nm, subit un déplacement vers 485 nm (voir figure 19). Une deuxième excitation à 450 nm provoque un second déplacement vers 500 nm. Ainsi, nous observons une décoloration très partielle ne dépassant pas l'étape métarhodopsine I. Nous constatons, de plus, que la réaction est photoréversible.

3.4.3 Spectres photoacoustiques des agrégats

L'application de la spectroscopie photoacoustique à l'étude des pigments visuels a été décrite dans des ouvrages antérieurs (Boucher, F. & Leblanc, R.M., 1981; Boucher, F. & Leblanc, R.M., 1981; Boucher, F. & Leblanc, R.M., 1985) cependant, nous devons rappeler que les intensités lumineuses nécessaires pour générer un signal photoacoustique sont largement suffisantes pour décolorer complètement la rhodopsine. Néanmoins, les avantages qu'offrent

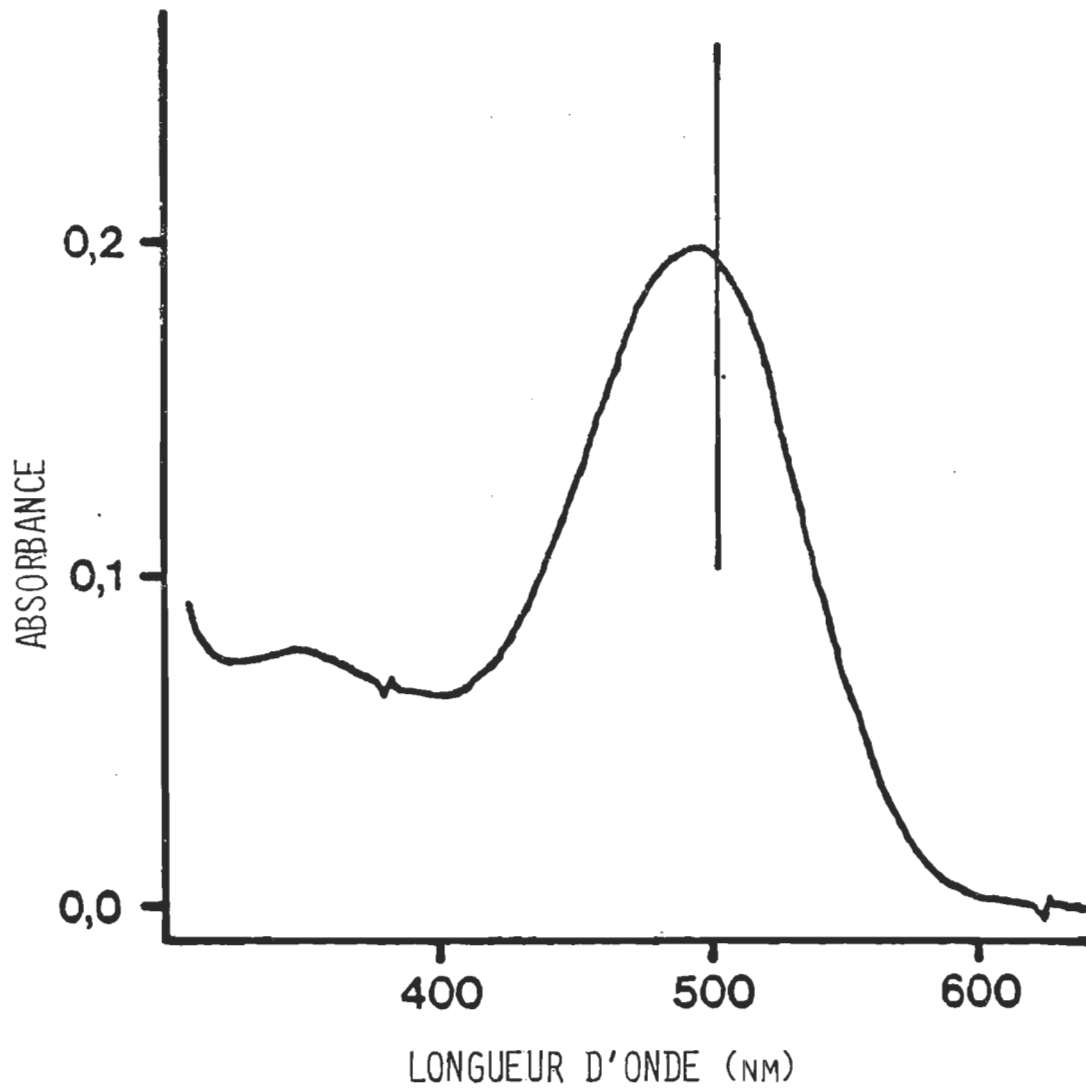


Figure 18: Spectre d'absorption U.V.-visible d'agrégats de rhodopsine,
à la température de la pièce.

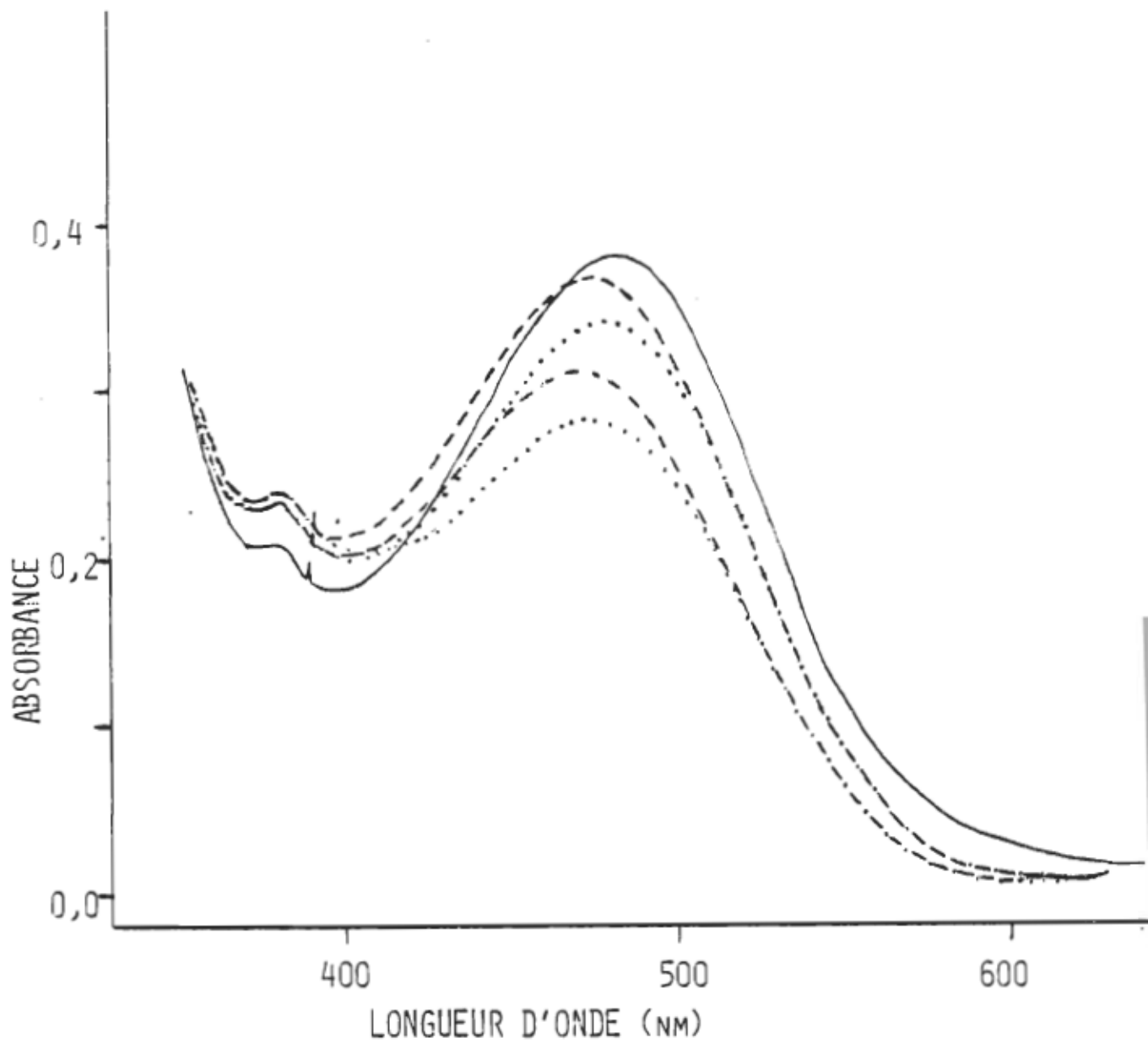


Figure 19: Spectre U.V.-visible de la photosensibilité de la rhodopsine agrégée. En trait hachuré (---), est illustrée la courbe obtenue après irradiation à 550 nm; en pointillé (...), la courbe obtenue après irradiation à 450 nm.

cette technique pour l'analyse d'échantillons solides nous a incités à l'utiliser dans la caractérisation des agrégats de rhodopsine.

Les figures 20 & 21 montrent des spectres photoacoustiques d'agrégats de rhodopsine sédimentés sur lamelles circulaires. Comme ces spectres sont mesurés sous une intensité lumineuse considérable (50 Wm^{-2}), nous nous attendons à ce qu'ils montrent un maximum d'absorption vers 480 nm puisque nous avons déjà établi que la décoloration de ces échantillons ne dépassait pas l'étape métarhodopsine I. C'est effectivement ce que nous observons dans la figure 20. Cependant, il est clair, d'après la figure 21 que ce n'est pas le cas de tous les échantillons. En effet, certains d'entre eux montrent un maximum beaucoup plus près de 500 nm que de 480 nm. (fig. 21 vs fig. 20)

L'expérience confirme premièrement que la décoloration ne dépasse pas l'étape métarhodopsine I, et deuxièmement qu'une partie de l'échantillon n'atteint pas l'étape métarhodopsine I puisque le λ_{max} est souvent beaucoup plus grand que 480 nm.

Il est possible que ce comportement photochimique soit relié à l'aspect physique des agrégats puisque les plus amorphes deviennent orange (Méta I) lors de l'illumination, et que les plus structurés demeurent rouges, même lorsqu'ils sont laissés plusieurs heures à la lumière ambiante (la rhodopsine ne se décolore donc pas).

Afin de préciser ce point, les agrégats ayant la coloration rouge stable ont été sélectionnés manuellement à l'aide d'un microscope et analysés par microspectrophotométrie.

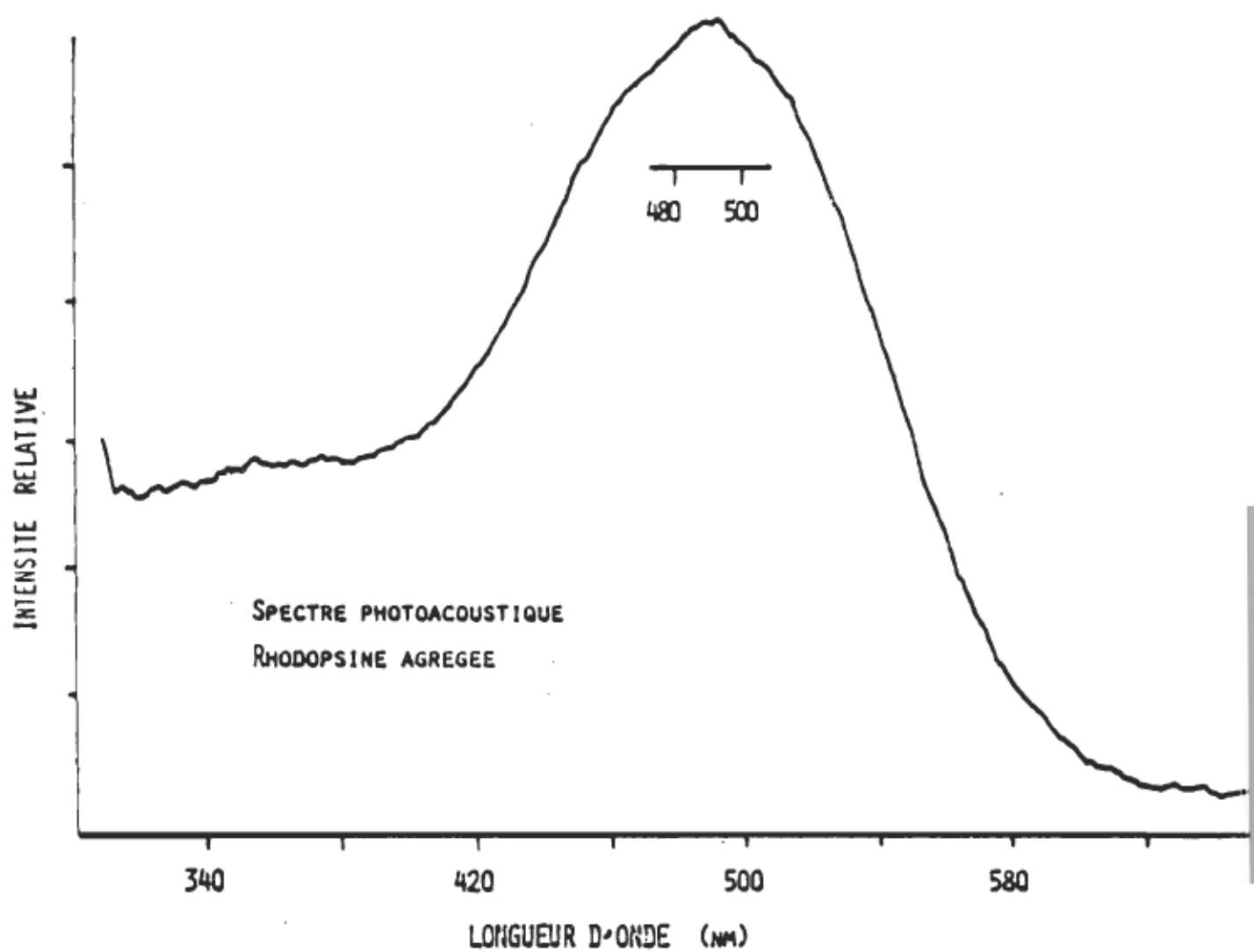


Figure 20: Spectre photoacoustique de rhodopsine agrégée,
à la température de la pièce.

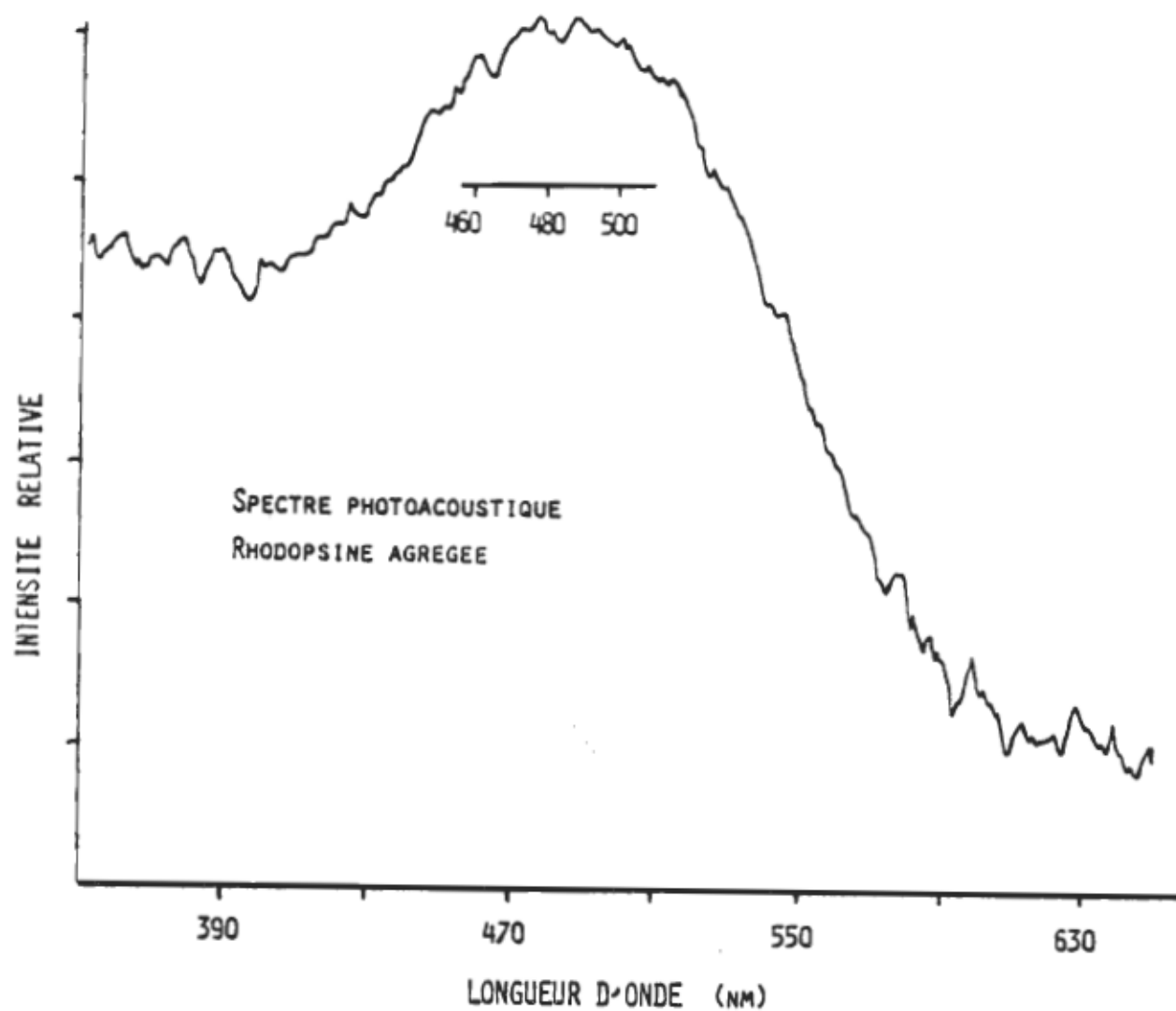


Figure 21: Spectre photoacoustique de rhodopsine agrégée, à la température de la pièce.

3.4.4 Microspectrophotométrie

La méthode décrite en 2.5.5.2 permet de mesurer le spectre de transmission d'un agrégat sélectionné individuellement sous le champ d'un microscope. Le montage utilise la même source lumineuse que le spectrophotomètre photoacoustique. L'échantillon est donc soumis à une irradiation susceptible de la décolorer entièrement. Les figures 22 & 23 montrent le spectre de transmission obtenu pour deux agrégats donnés présentant des minimum de transmission à 492 & 500 nm respectivement. Ces résultats démontrent bien que la rhodopsine "pure" sous forme d'agrégats d'apparence cristalline est pratiquement insensible à la lumière, vue qu'elle ne se décolore apparemment pas même sous des intensités lumineuses considérables. La figure 24 montre un spectre de transmission obtenu pour un agrégat amorphe dont le λ max est à 480 nm. Ce résultat démontre bien qu'un agrégat dont l'aspect physique est amorphe subit une photodécoloration qui ne dépasse pas l'étape Méta I.

Il est à noter que lorsque ces agrégats sont mouillés par quelques microlitres d'ammonyx LO, un détergent dans lequel la décoloration complète de la rhodopsine est très rapide (Tessier, 1984; Applebury, 1974), il est impossible d'observer une bande d'absorption attribuable au pigment. Le spectre est dans ce cas complètement plat.

Toutefois, le fait que les agrégats de rhodopsine conservent des maxima d'absorption à ou près de 500 nm ne signifie pas nécessairement qu'il n'ont subi aucune réaction photochimique. En effet, la lumirhodopsine (λ max = 497 nm) aurait pu s'accumuler dans ces échantillons et le peu de différence spectrale entre la rhodopsine et son lumiintermédiaire ne permettrait pas de préciser la nature du pigment contenu dans l'agrégat.

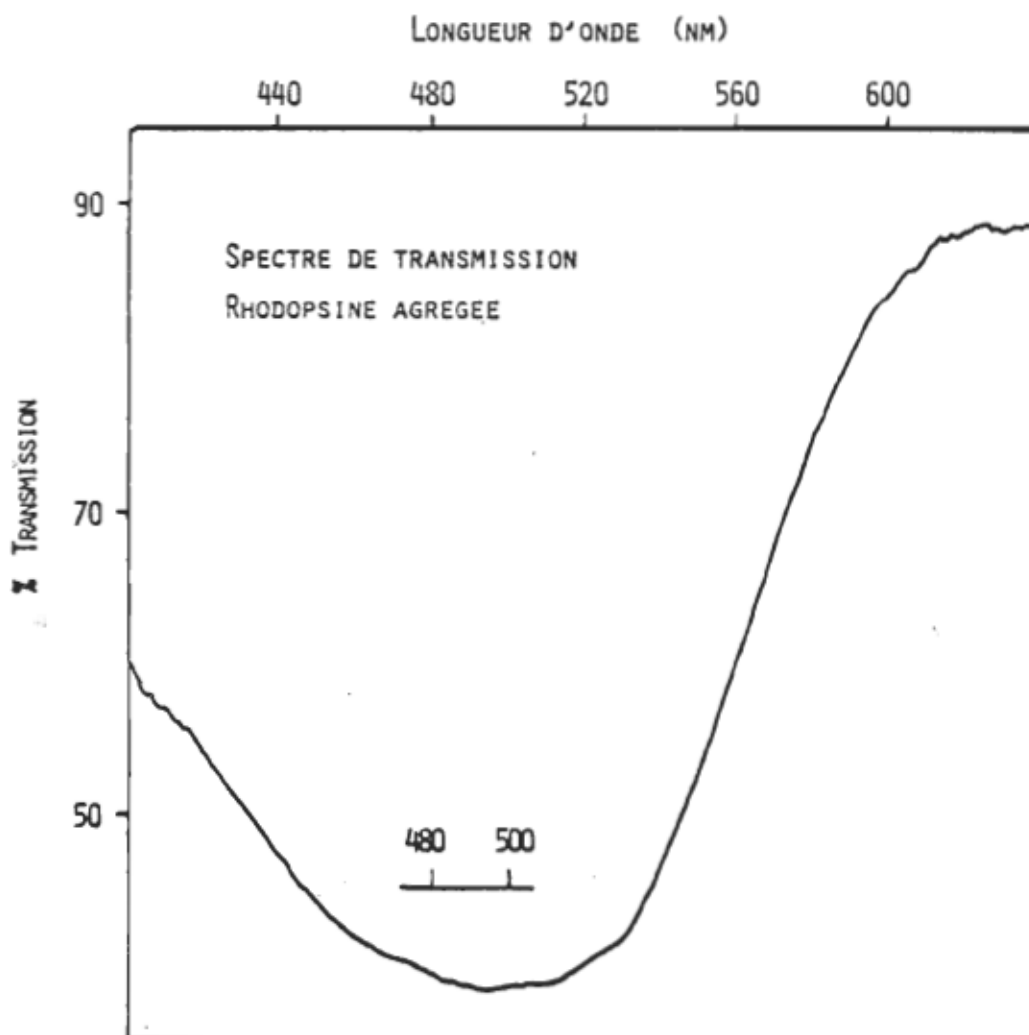


Figure 22: Spectre de transmission de rhodopsine agrégée pris en microspectrophotométrie.

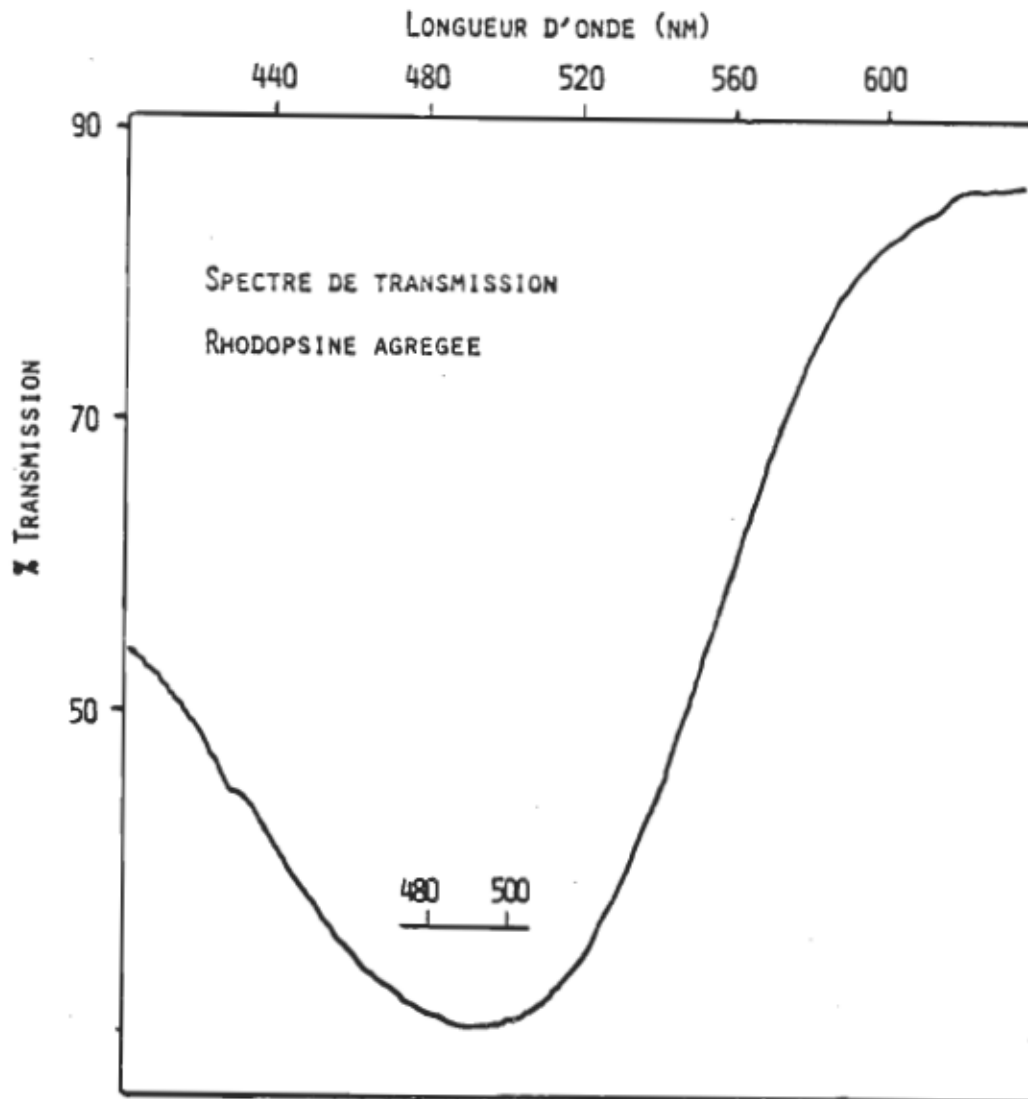


Figure 23: Spectre de transmission de rhodopsine agrégée pris en microspectrophotométrie.

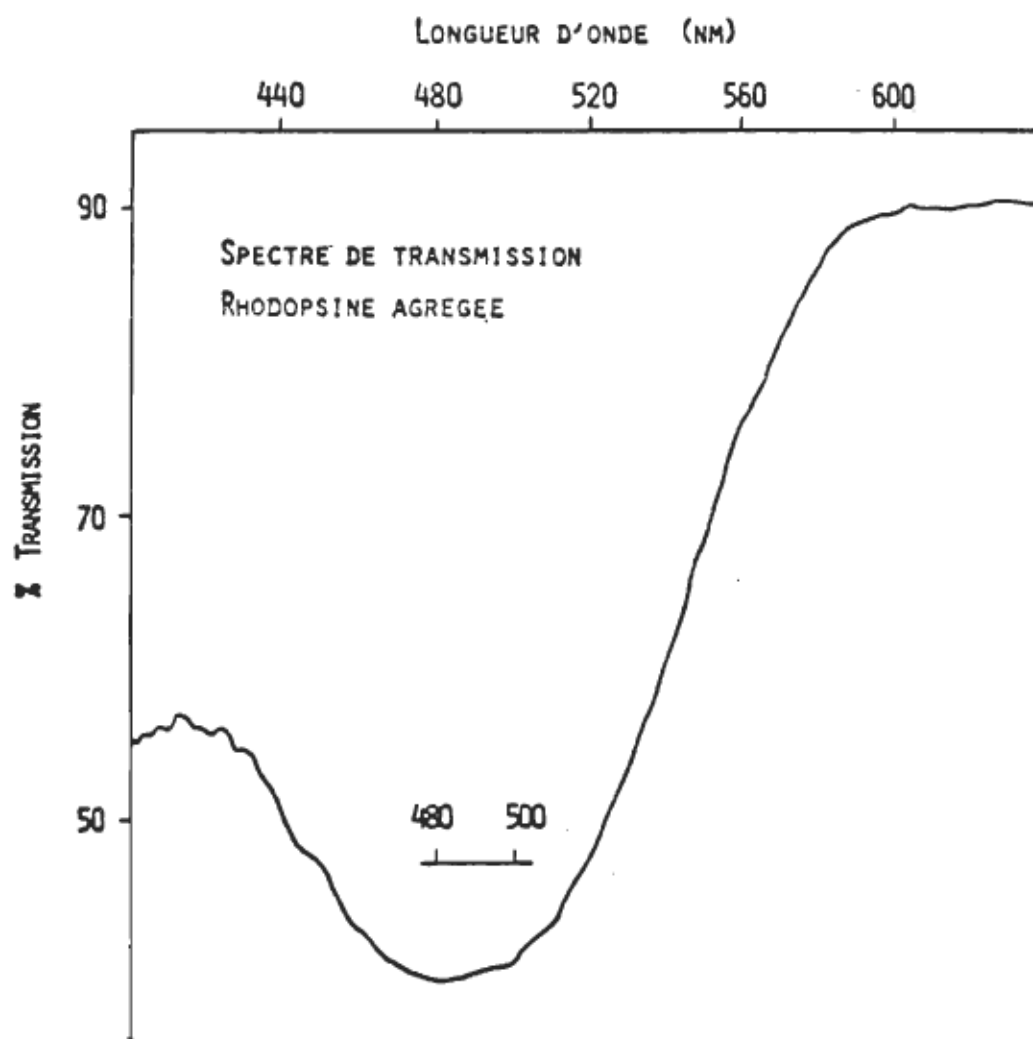


Figure 24: Spectre de transmission de rhodopsine agrégée pris en microspectrophotométrie.

Afin de préciser cette question, nous avons tout simplement solubilisé individuellement les agrégats de rhodopsine dont la coloration rouge était stable à la lumière dans un détergent où les photointermédiaires sont instables: l'ammonyx L0. Le principe de cette mesure est simple: si les agrégats demeurés rouges (λ max de 492-500 nm) après irradiations contiennent toujours de la rhodopsine, après solubilisation, nous pourrions encore y observer la spectre de la rhodopsine au moyen d'un spectrophotomètre conventionnel (qui ne décolore pas le pigment). Dans le cas contraire, nous devons conclure que le pigment responsable de la couleur rouge des agrégats est la lumirhodopsine, instable dans l'ammonyx, et le spectre de l'agrégat solubilisé devrait alors montrer la présence de métarhodopsine II et/ou de rétinale.

La figure 25 montre le résultat de cette expérience. Le spectre de l'agrégat préalablement irradié et solubilisé montre deux bandes: une à 500 nm (rhodopsine) et une à 380 nm (métarhodopsine II). En présence d'hydroxylamine, la bande à 380 nm est déplacée à 360 nm. Ceci confirme l'attribution de la bande à 380 nm à la métarhodopsine II convertie en rétinaleoxime par l'hydroxylamine, et celle de la bande à 500 nm à la rhodopsine qui est stable en présence d'hydroxylamine. De plus, l'irradiation ultérieure de l'échantillon décolore complètement le pigment qui est alors transformé entièrement en oxime.

Il est donc possible de conclure que l'agrégat contenait de la lumirhodopsine. A partir de l'intensité relative de la bande d'oxime avant et après irradiation dans l'ammonyx, nous pouvons estimer que l'agrégat était constitué d'environ 2 lumirhodopsine, pour 1 rhodopsine.

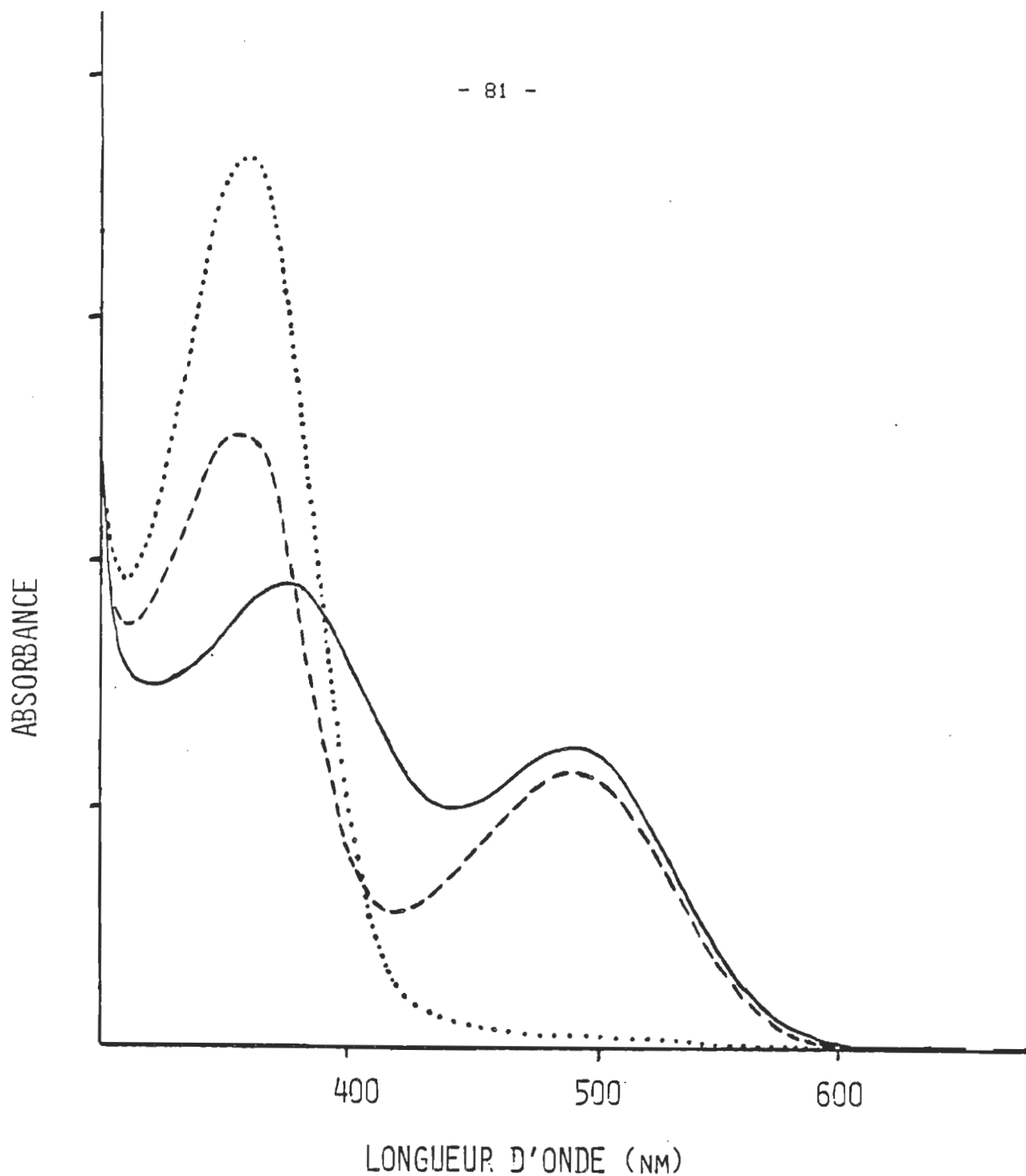


Figure 25: Solubilisation de rhodopsine agrégée après irradiation. L'agrégat solubilisé dans l'ammonyx LO(—), ajout d'hydroxylamine à cette solution, avant irradiation (---) et après irradiation (....).

3.4.5 Discussion

L'étude de la photochimie des agrégats de rhodopsine, démontre que la rhodopsine agrégée, après irradiation, présente un λ max de 495 nm. Cette étude faite en microspectroscopie, qui tout comme la spectroscopie photoacoustique, décolore le pigment, démontre une insensibilité apparente de la rhodopsine agrégée. Cette insensibilité apparente pourrait néanmoins masquer la présence d'un ou plusieurs photointermédiaires.

En solubilisant l'agrégat dans de l'Ammonyx, nous constatons qu'il est constitué en partie (1/3) de rhodopsine insensible à la lumière et en partie (2/3) d'un photointermédiaire instable dans ce détergent, selon toute évidence la lumirhodopsine.

Les agrégats de rhodopsine sont constitués de rhodopsine oligomère, i.e. que la protéine se trouve dans un environnement protéique, constitué d'un réseau tridimensionnel rigide. Ce réseau tridimensionnel rigide empêcherait tout mouvement moléculaire de surface de la protéine permettant la poursuite de la séquence photolytique.

De plus, nos résultats montrent que lorsque la rhodopsine est dépourvue de phospholipides et de détergent, elle possède un λ max, à 20°C, de 496 nm.

L'absorbance de la rhodopsine, en terme de valeur du λ max, est fonction de la température à laquelle nous l'étudions ainsi que du milieu dans lequel elle se trouve. Cette relation avec la température est due au chromophore. A 20°C, et dans son environnement phospholipidique naturel,

elle possède un λ max à 502 nm; sans phospholipides, dans divers détergents tels les esters de sucrose en C₁₈, C₁₂ & C₈ ainsi que dans d'autres détergents soit la digitonine, le triton X-100 et l'ammonyx L0, la rhodopsine présente des λ max respectifs de 502 nm, 500 nm, 498 nm et 498 nm pour ces trois derniers détergents. (Motoyama et al., sous presse)

Ces fines variations dans le λ max d'absorption de la rhodopsine reflètent sûrement de faibles variations dans les interactions chromophore-protéine induites par son microenvironnement. Celui-ci est constitué soit de ses phospholipides naturels, soit d'un détergent donné, soit de l'absence complète de PL ou de détergent. Il semble que cette variation du λ max d'absorption de la rhodopsine est fonction de la capacité des différents détergents d'opérer une solvation appropriée de la zone hydrophobe de la protéine. Ce degré de solvation pourrait être dû à la grandeur de la micelle formée et/ou à la rigidité micellaire, contribuant à maintenir les propriétés natives d'absorption de la rhodopsine. A la limite, la rigidité micellaire affecte cette solvation puisque les agrégats de rhodopsine présentent un λ max de 496 nm. Nous ne pouvons toutefois pas postuler que pour la rhodopsine agrégée ses propriétés spectrales ne sont pas modifiées bien qu'aucune étude en ce sens n'a pu être effectuée avec la rhodopsine agrégée puisqu'il nous faut solubiliser la rhodopsine dans un détergent quelconque avant de pouvoir effectuer des études de régénérabilité. Selon le détergent utilisé pour la solubiliser, il a été démontré que le pigment n'est complètement régénérable que lorsque le λ max d'absorption ne varie que de 1 nm par rapport au λ max d'absorption de la rhodopsine dans les SEB.

3.5 Photochimie de la rhodopsine monomérique.

Les résultats qui viennent d'être décrits se rapportent à la forme oligomérique de la rhodopsine soit des agrégats solides de rhodopsine purifiée où les interactions rhodopsine - rhodopsine sont importantes.

Afin de dissocier l'effet des interactions protéine - protéine de l'effet de phase "solide" sur la photochimie du pigment, nous avons effectué des mesures de contrôle avec la rhodopsine à l'état solide mais toujours sous forme monomérique. Ces échantillons ont été préparés soit par séchage des membranes des SEB où la rhodopsine est contenue sous forme de monomère, soit en analysant directement la rhodopsine liée à la concanavaleine A, un état où l'interaction du pigment avec le support chromatographique prévient l'agrégation de la rhodopsine.

3.5.1 Photochimie de la rhodopsine liée à la Con A

La rhodopsine liée à la Con A et séchée ne peut être étudiée que par spectroscopie PA, à cause de la présence de la Con A. Normalement en spectroscopie PA, l'intensité élevée du rayon d'étude provoque nécessairement une décoloration photochimique du pigment. La figure 26 montre le spectre PA de la rhodopsine liée à la Con A en absence de détergent et d'eau. Ce spectre montre une bande principale à 476 nm et un épaulement à 360 nm. La grande stabilité de ce pigment qui ne se photolyse que très partiellement après 12 heures d'irradiation indique bien que dans cet état physique la décoloration ne dépasse pas l'étape métarhodopsine I. Il est à noter que l'addition d'eau à cet échantillon ne diminue pas sa stabilité thermique.

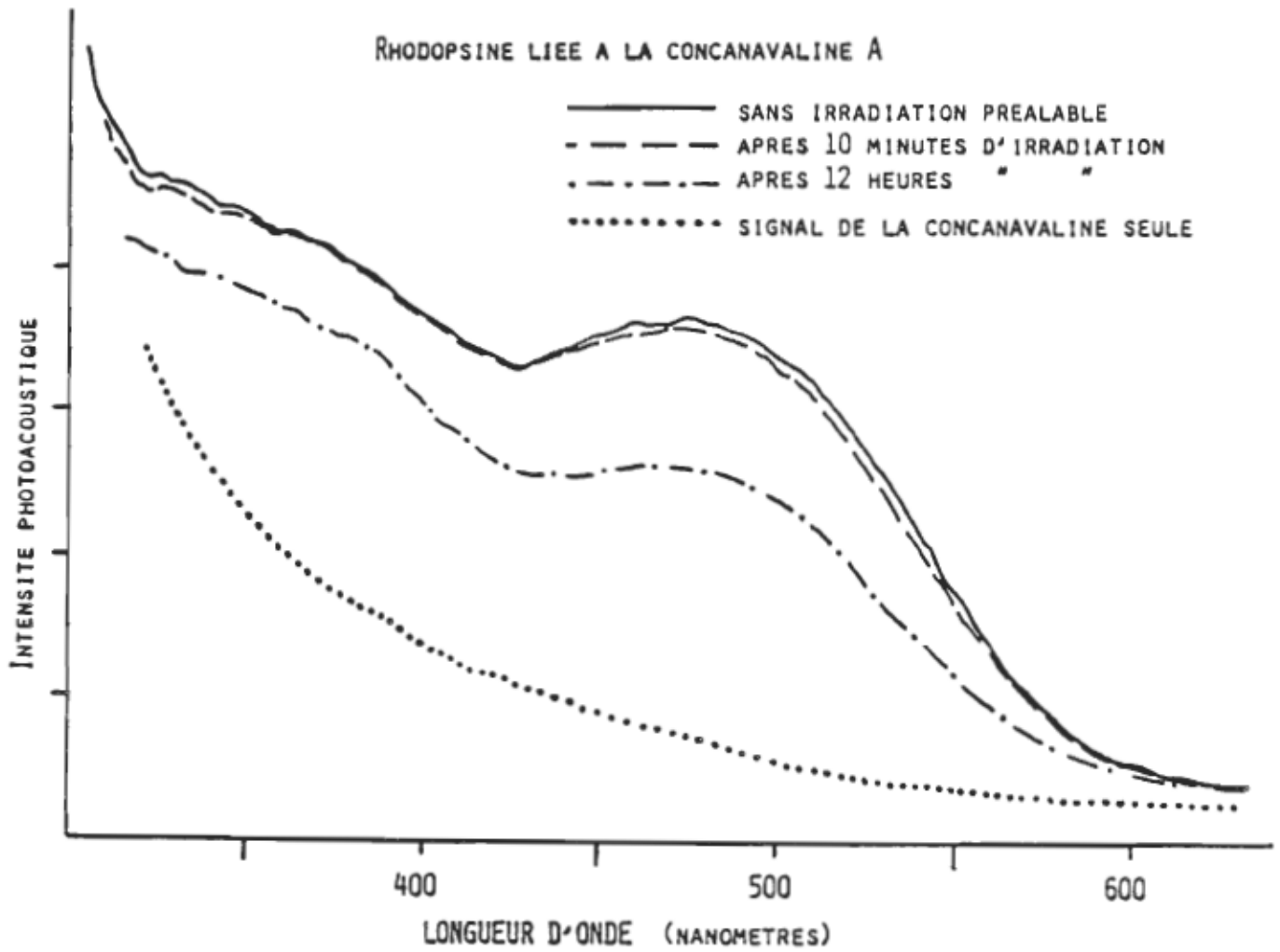


Figure 26: Spectre photoacoustique de la rhodopsine liée à la concanavaline A.

D'autre part, lorsque la rhodopsine liée à la Con A est séchée en présence de détergent, nous constatons qu'elle peut être photodécolorée complètement, comme en font foi les spectres présentés à la figure 27.

Cette expérience simple permet de tirer une conclusion importante: contrairement à ce que nous voyons depuis longtemps, la présence d'eau n'est pas essentielle à la transition Méta I - Méta II. En effet, cette dernière peut très bien s'opérer à l'état solide si la rhodopsine est solvatée de manière appropriée par un détergent.

3.5.2 SEB séchés sur lamelles.

Contrairement aux détergents, les phospholipides des SEB fournissent un environnement beaucoup plus rigide à la rhodopsine et dans ce cas, l'eau devient nécessaire à la transition Méta I - Méta II.

La figure 28, nous présente le comportement photochimique de la rhodopsine dans les SEB séchés sur lamelle de quartz. Nous notons que le λ max de la rhodopsine est situé à 498 nm, en spectroscopie U.V.-visible. Par des irradiations douces et successives, elle subit un déplacement hypsochrome pour se stabiliser à 480 nm, par étapes discrètes. Si nous poursuivons l'irradiation, nous n'observons aucune modification du λ max mais bien une perte en densité optique du λ max à cette longueur d'onde. Cette perte de la densité optique serait due à une photooxydation de la rhodopsine qui ne pourrait poursuivre sa séquence de photodécoloration qu'en milieu aqueux. Nous observons donc une photodécoloration incomplète du pigment qui se stabilise à l'étape Méta I, et en présence d'eau, une photolyse complète du pigment.

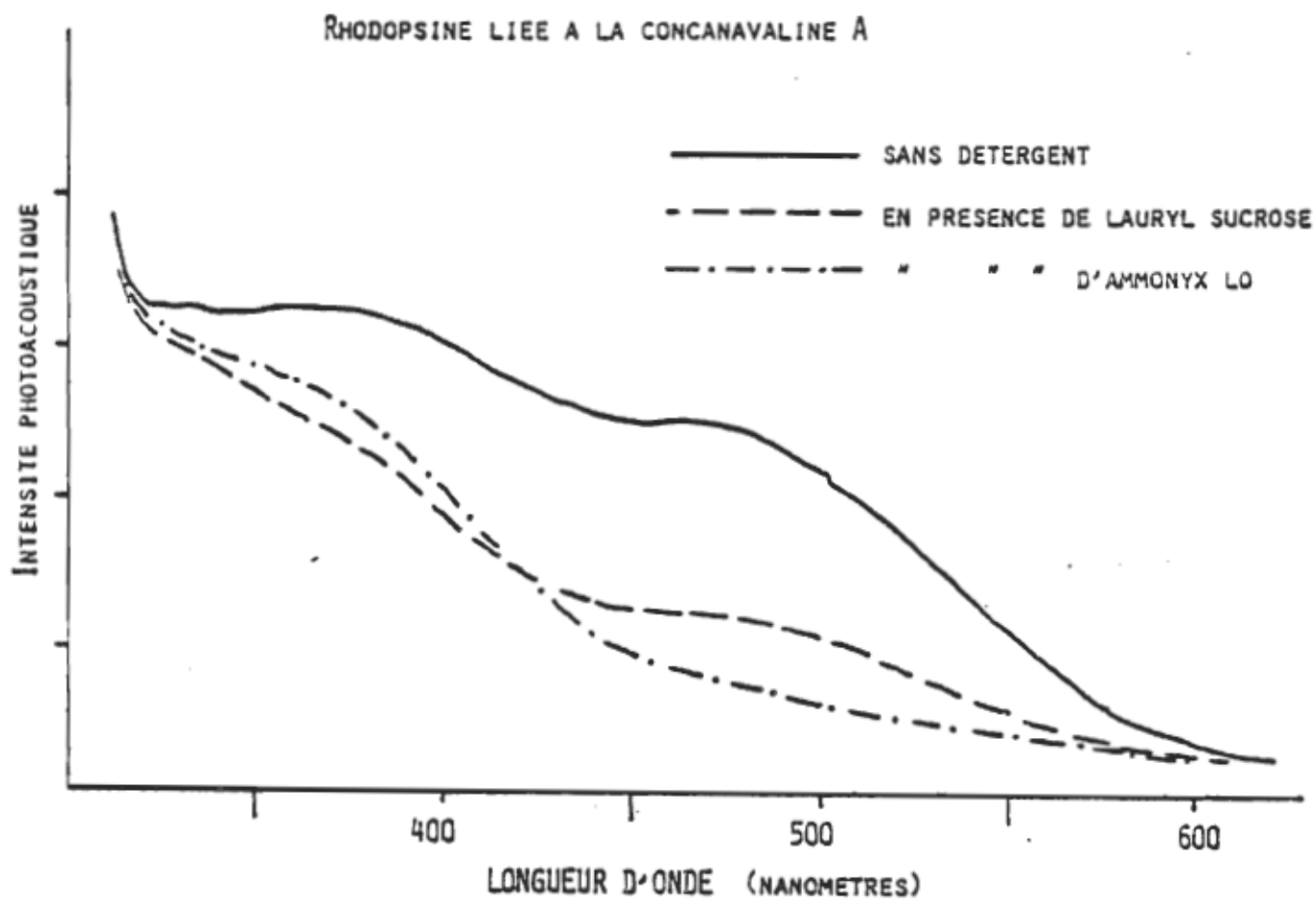


Figure 27: Spectre photoacoustique de la rhodopsine liée à la concanavaline.

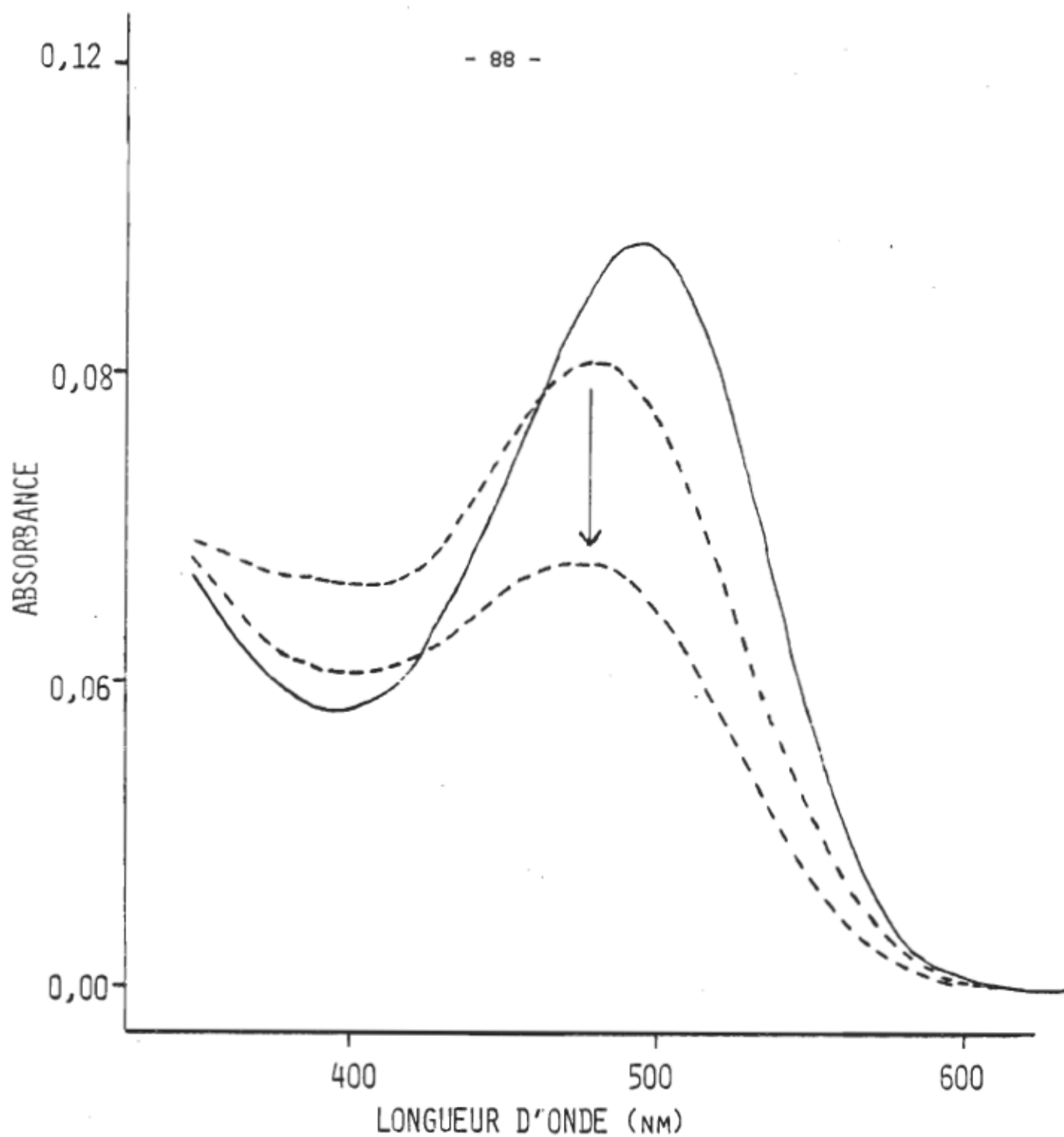


Figure 28: Spectre U.V.-visible de SEB séchés sur lamelle à la température de la pièce, avant irradiation (—) et après des irradiations successives jusqu'à un déplacement spectral stable à 480 nm (---).

3.5.3 Discussion.

Nous avons précédemment étudié la rhodopsine agrégée qui se trouve dans un environnement de nature uniquement protéique. La rhodopsine possède un haut degré d'hydrophobicité (approximativement 60%) qui permet une agrégation moléculaire lors de l'élimination du détergent, les molécules de rhodopsine jouant le rôle de molécules amphiphiles servant à se stabiliser elles-mêmes par un phénomène d'agrégation. Nous avons observé que dans un environnement protéique où la rhodopsine se situe dans un réseau tridimensionnel rigide, celle-ci possède une photochimie particulière, à savoir, que la rhodopsine semble insensible à la lumière. Cette insensibilité n'est qu'apparente puisque les 2/3 de la rhodopsine est réellement insensible à la lumière alors que le 1/3 ne subit qu'une photolyse incomplète se stabilisant à l'étape Lumi du photocycle de la rhodopsine. Dans ces agrégats, la rhodopsine se trouve sous forme d'oligomère.

La rhodopsine à l'état solide sous forme de monomère, autant dans les SEB que lorsqu'elle est liée à la Con A en absence de détergent, ne subit qu'une photodécoloration incomplète se stabilisant à l'étape Méta I. Cette décoloration peut se poursuivre soit après solvation de la rhodopsine avec un détergent sur la Con A, soit par hydratation des phospholipides des SEB.

Ces résultats appuient fortement la suggestion de Motoyama et al. (1985) voulant que la transition Méta I - Méta II soit facilitée dans la mesure où l'environnement possède une certaine fluidité.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

Trois méthodes ont été mises au point afin de préparer de la rhodopsine purifiée dépourvue de détergent. Il s'est avéré que la méthode la plus simple est aussi la plus efficace. Il a été ainsi possible de préparer des agrégats stables dont les dimensions permettent l'analyse spectrale et photochimique.

Si nous considérons la rhodopsine dont 60% des résidus sont hydrophobes comme un bâtonnet dont le centre est hydrophobe et les extrémités hydrophiles, nous pouvons concevoir qu'en absence de détergent et en milieu aqueux, des interactions hydrophobes protéine - protéine soient favorisées provoquant la création d'un réseau bidimensionnel. La juxtaposition de plusieurs de ces réseaux donnerait naissance aux agrégats que nous avons obtenus.

L'étude de l'aspect de ces agrégats permet de les classifier en deux types: les agrégats structurés et les agrégats amorphes. Ces deux types d'agrégats se distinguent également par leurs propriétés photochimiques. Il est opportun de noter ici que ces agrégats ne sont pas des cristaux de rhodopsine. En effet, des mesures de diffraction des rayons-X effectuées sur ces agrégats par le Dr. Toshiaki Hamanaka du laboratoire de cristallographie de l'Université d'Osaka ne permettent pas d'identifier de réseaux cristallins dans ces agrégats.

L'analyse photochimique de ces agrégats révèle qu'ils ont un comportement différent de la rhodopsine contenue dans la membrane discale ou encore purifiée à l'aide de détergent. La figure 29 présente le schéma réactionnel du pigment et les aspects particuliers à la rhodopsine agrégée y sont notés. Ces aspects particuliers sont:

1. En absence de phospholipides ou de détergent, la rhodopsine possède une bande d'absorption dont le λ max est inférieur à 500 nm, généralement 496 nm.
2. La rhodopsine dans les agrégats structurés montre une coloration stable. La décoloration ne dépasse pas l'étape lumirhodopsine. Leur coloration rouge est stable même après plusieurs heures d'illumination. A l'équilibre, ces échantillons contiennent approximativement 66% de lumirhodopsine et 33% de rhodopsine.
3. La quantité de rhodopsine (33%) que nous retrouvons dans les agrégats structurés après irradiation ne signifie pas nécessairement qu'il s'agit là de pigments insensibles à la lumière. Il est plus probable que la rhodopsine présente dans les agrégats résulte d'un photoéquilibre entre la rhodopsine et la lumirhodopsine. Toutefois, nous ne pouvons que supposer la présence de ce photoéquilibre. Nous n'avons aucune indication de son existence.
4. Dans les agrégats amorphes, la transition métarhodopsine I - métarhodopsine II ne s'opère pas. Cependant, il n'y a pas lieu de croire que ce blocage soit dû aux interactions rhodopsine - rhodopsine puisque cette transition est également bloquée dans la rhodopsine monomérique en absence de détergent.

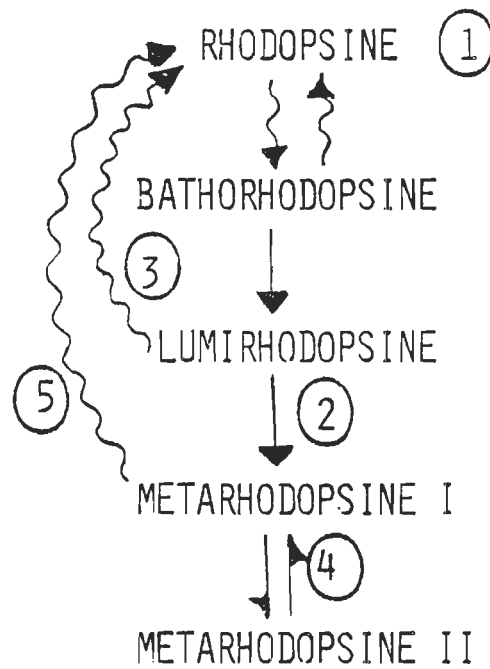


Figure 29: Schéma réactionnel du pigment visuel. Les chiffres indiquent les étapes particulières à la rhodopsine agrégée. (voir texte pour les détails)

5. La stabilité de la métarhodopsine I dans les agrégats amorphes a permis de mesurer directement sa photosensibilité. La présence d'un photoéquilibre entre la rhodopsine et la métarhodopsine I a souvent été invoquée par différents auteurs pour expliquer la présence de rhodopsine après irradiation des échantillons. Les mesures effectuées sur les agrégats amorphes démontrent hors de tout doute l'existence de ce photoéquilibre puisqu'il a été possible d'observer le déplacement de 480 vers 500 nm de l'absorption de ces échantillons après irradiation.

Il est généralement admis que la modulation de la transition Méta I - Méta II par l'environnement moléculaire est attribuable au fait qu'un changement conformationnel important s'opère à la surface de la protéine à cette étape. Dans les agrégats structurés où la rhodopsine oligomérique se trouve dans un environnement protéique constitué d'un réseau tridimensionnel rigide empêchant probablement tout mouvement de la surface de la protéine, nous avons vu que la transition lumirhodopsine - métarhodopsine I est également bloquée. Nous proposons donc qu'un changement conformationnel sensible s'opère également à cette étape. Les résultats présentés ici ne permettent pas de prédire l'ampleur de ce changement par rapport à celui qui s'opère à la transition subséquente mais comme il s'agit d'un changement perceptible à la surface de la protéine, il est fort probable qu'il soit tout aussi déterminant dans le couplage de la décoloration du pigment avec la génération de l'influx nerveux par la cellule photoréceptrice.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamson, E. W. & Fager, R. S., The chemistry of vertebrate and invertebrate visual photoreceptors. Curr. Top. Bioenerg., 1973, 5, 125.
- Akhtar, M., Blosse, P.T. & Dewhurst, P.B., Studies on vision. Nature of the retinal-opsin linkage. Biochemistry, 1968, 110, (4), 693-703.
- Anderson, R. E. & Sperling, L., Positional distribution of fatty acids in the phospholipids of bovine retina rod outer segments. Archs. Biochem. Biophys., 1971, 144, 673-677.
- Anderson, R. E., Maude, M.B. & Zimmerman, W., Lipids of ocular tissues- X. Lipid composition of subcellular fractions of bovine retinae. Vision Res., 1975, 15, 1087-1090.
- Applebury, M., Zuckerman, D., Lamola, A. & Jovin, T., Rhodopsin. Purification and recombination with phospholipids assayed by the metarhodopsin I - metarhodopsin II transition. Biochemistry, 1974, 13, 3448-3458.
- Blaurock, A. E., What X-ray and neutron diffraction contribute to understanding the structure of the disc membrane. In H. B. Barlow & P. Fatt (Eds) Vertebrate photoreceptor. New-York: Academic Press, 1977, pp. 61-76.
- Boucher, F. & Leblanc, R.M., Photoacoustic spectroscopy of cattle visual pigment at low temperature. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1981, 100, (1), 385-390.

- Boucher, F. & Leblanc, R.M., Simple device to measure photoacoustic spectra from 77 to 300°K. Canadian journal of spectroscopy, 1981, 26, (4), 190-193.
- Boucher, F. & Leblanc, R.M., Energy storage in the primary photoreaction of bovine rhodopsin. A photoacoustic study. Photochemistry and Photobiology, 1985, 40, 1-7.
- Bownds, M. D., Site of attachment of retinal in rhodopsin. Nature, 1967, 216, 1178-1181.
- Bowds, D. & Brodie, A. E., Light-sensitive swelling of isolated rod outer segments as in "in vitro" assay for visual transduction and dark adaptation. J. Gen. Physiol., 1975, 66, 407-425.
- Brown, P. K., Rhodopsin rotates in the visual receptor membrane. Nature New Biol., 1972, 236, 35-38.
- Cavaggioni, A. & Sorbi, R. T., Cyclic GMP releases calcium from disc membranes of vertebrate photoreceptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 3964-3968.
- Chabre, M., X-ray diffraction studies of retinal rods. Structure of the disc membrane, effects of illumination. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 382, 322-335.
- Chabre, M., Conformational and functional changes induced in vertebrate rhodopsin by photon capture. In D.J. Cosens & D. Vince-Price (ed.) The Biology of Photoreception, 1983, pp. 87-108.
- Chen, Y. S. & Hubbell, W. L., Temperature- and light-dependent structural changes in rhodopsin-lipid membranes. Exp. Eye Res., 1973, 17, 517.

- Daemen, F. J., Vertebrate rod outer segment membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 300, 255.
- Dartnall, H., Photosensitivity. Handbook of Sensory Physiology, vol. VII/I, 122-145.
- Dratz, E. A., Miljanich, G. P., Nemes, P. P., Gaw, J. E. & Swartz, S., The structure of rhodopsin and its disposition in the rod outer segment disk membrane. Photochem. Photobiol., 1979, 29, 661.
- Dratz, D. F. & Hargrave, P. A., The structure of rhodopsin and rod outer segment disk membrane. TIBS, 1983.
- Englander, J. J. & Englander, S. W., Comparison of bacterial and animal rhodopsins by hydrogen exchange studies. Nature(London), 1977, 265, 658-659.
- Eyring, G., Curry, B., Mathies, R., Fransen, R., Palings, I. & Lugtenberg, J., Interpretation of the resonance Raman Spectrum of bathorhodopsin based on visual pigment analogues. Biochemistry, 1980, 19, 2410-2418.
- Eyring, G. & Mathies, R., Resonance raman studies of bathorhodopsin: Evidence for a protonated Schiff base linkage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1979, 76, 33-37.
- Fager, R. S., Sejnowski, P. & Abrahamson, E. W., Aqueous cyanohydroborate reduction of the rhodopsin chromophore. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1972, 47, 550.
- Fager, R. S., Gentilecore, P.C. & Abrahamson, E. W., Kinetics of cyanoborohydride reduction of bovine rhodopsin. Vision Research, 1978, 18, 483.

- Fatt, P., Decline of the calcium hypothesis of visual transduction. Nature, 1979, 280, 355-356.
- Fong, S.L., Tsin, A.T.C., Bridges, C.D.B. & Liou, G.I., Detergents for extraction of visual pigments: type, solubilization and stability. In L. Packer (ed.), Methods in enzymology, Vol. 81, Part H. New-York: Academic Press, 1982, pp. 133-140.
- Fukuda, M. N., Papermaster, D. S. & Hargrave, P. A., Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharide attached at two sites near the NH₂ terminus. J. Biol. Chem., 1979, 254, 8201-8207.
- Fung, B. K-K, Hurley, J. B. & Stryer, L., Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 152-156.
- Godchaux, W. & Zimmerman, W. F., Soluble proteins of intact bovine rod cell outer segments. Exp. Eye Res., 1979, 28, 483-500.
- Haggins, W. A., The visual process: Excitatory mechanisms in the primary receptor cells. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1972, 1, 131-58.
- Haggins, W. A., Penn, R. D. & Yoshisawa, S., Dark current and photocurrent in retinal rods. Biophys. J., 1970, 10, 380-412.
- Hargrave, P. A., Fung, S.L., McDowell, J.H., Mas, M. T., Curtis, D. R., Wang, J. K., Juszczak, E. & Smith, D. P., The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane. Neurochem. Intern., 1980, 1, 231-244.

- Hargrave, P. A., Rhodopsin chemistry, structure and topography. Prog. Retinal Res., 1982, 1, 1-51.
- Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Siemiatkowski-Juszczak, E.C., Fong, S.L., Kuhn, H., Wang, J.K., Curtis, D.R., Rao, J.K.M., Argos, P. & Feldmann, R.J., The carboxyl-terminal one-third of bovine rhodopsin: its structure and function. Vision Res., 1982, 22, 1429-1438.
- Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E. & Tanford, C., Properties of detergents. In L. Packer (ed.), Methods in enzymology, vol. 61. New-York: Academic Press, 1979, pp. 734-749.
- Heller, J., Structure of visual pigments. 1. Purification, molecular weight, and composition of bovine visual pigment 500. Biochemistry, 1968, 7, 2906-2913.
- Hoffman, W., Siebert, F., Hofmann, K.P. & Kreutz, W., Two distinct rhodopsin molecules within the disc membrane of vertebrate rod outer segments. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 503, 450-461.
- Honig, B. & Ebrey, I., The structure and spectra of the chromophore of the visual pigments. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1974, 3, 151.
- Honig, B., Ebrey, T., Callender, R. H., Dinur, U. & Ottolenghi, M., Photoisomerisation, energy storage, and charge separation. A model for light energy transduction in visual pigment and bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1979, 76, 2503-2507.
- Hubbard, R. & Kropf, A., The action of light on rhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1958, 44, 130.

- Hubbell, W. L. & Bownds, M. D., Visual transduction in vertebrate photoreceptors. Annu. Rev. Neurosci., 1979, 2, 17-34.
- Kimble, E.A. & Ostroy, S.E., Kinetics of reaction of sulfhydryl groups of rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 325, 323-331.
- Kirschner, T.G., Thin-layer chromatography. Techniques of chemistry, vol. XIV, 1978, Toronto, John Wiley & Sons, 1137 p..
- Kühn, H., Light and GTP regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. Nature(London), 1980, 283, 587-589.
- Kühn, H., Bennett, N., Michel-Villaz, M. & Chabre, M., Interaction between photoexcited rhodopsin and GTP binding protein; kinetics and stoichiometric analysis from light-scattering changes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 6873-6877.
- Liang, C. J., Yamashita, K., Shichi, H., Muellenberg, C. G. & Lobata, A., Abstracts, Association for research in vision and ophthalmology (ARVO), Spring Meeting, 1979, p. 115.
- Liebman, P.A. & Pugh, E. N., The control of phosphodiesterase in rod disc membranes. Kinetics possible mechanisms and significance for vision. Vision Res., 1979, 19, 375-380.
- Lipton, S.A., Ostroy, S.E. & Dowling J.E., Electrical & adaptative properties of rod photoreceptors in *Bufo marinus*. J. Gen. Physiol., 1977, 70, 747-770.
- Litman, B.J., Rhodopsin: its molecular structure and phospholipid interactions. Photochem. Photobiol., 1979, 29, 671-677.

- Miljanich, G.P., Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane. Doctoral thesis, University of California, Santa Cruz, 1978.
- Miljanich, G. P., Nemes, P. P., White, D. L. & Dratz, E. A., The asymmetric transmembrane distribution of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and fatty acids of the bovine retinal rod outer segment disk membrane. J. Membr. Biol., 1981, 60, 249-255.
- 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. Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1985, 63, (11), 1152-1159.
- Motoyama, H., Hamanaka, T., Kîto, Y., Morita, H., Guérette, L., Abran, D., Boucher, F., Wavelength modulation by molecular environment in visual pigments. Biochim. Biophys. Acta, (sous Presse).
- Nakanishi, K., Balough-Nair, M. A., Gawinowicz, M. A., Annaboldi, M., Motto, M. & Honig, B., Double point charge for visual pigments; Evidence from dihydorhodopsins, Photochem. Photobiol., 1979, 29, 659-660.
- Nemes, P. P., Miljanich, G. P., White, D. L. & Dratz, E. A., Covalent modification of rhodopsin with imidoesters: Evidence for transmembrane arrangement of rhodopsin in rod outer segment disk membrane. Biochemistry, 1979, 19, 2067.
- O'Brien, D. F., The chemistry of vision, Science, 1982, 218, 961-966.

- Ovchinnikov, Y. A., Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. Febs Letter, 1982, 148, (2), 179-191.
- Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G., Feigina, M. Y., Antamonov, I. D., Zolotarev, A. S., Kostina, M. B., Bogachuk, A. S., Miroshnikov, A. I., Martinov, V. I. & Kudelin, A. B., The complete amino acid sequence of visual rhodopsin. Bioorg. Khim., 1982, 8, 1011-1014.
- Papernmaster, D.S. & Dreyer, W.J., Rhodopsine content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. Biochemistry, 1974, 13, 2438-2444.
- Peters, K., Applebury, M.L. & Rentzepis, P.M., Primary photochemical events in vision: Proton translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1979, 74, 3119-3123.
- Poo, M. & Cone R., Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. Nature, London, 1974, 247, 438-441.
- Rafferty, C.N., Muellenberg, C.G. & Shichi, H., Tryptophan in bovine rhodopsine: its content, spectral properties and environment. Biochemistry, 1980, 19, 2145-2151.
- Rosenfeld, T., Honig, B., Ottolenghi, M., Hurley, J. & Ebrey, T.G., Cis-trans isomerization in the photochemistry of vision. Pure Appl. Chem., 1977, 49, 341-351.
- Salesse, C., Boucher, F. & Leblanc, R. M., Evaluation of purity criteria of bovine rod outer segment membranes, Analytical Biochemistry, 1984, 142, 258-266.

- Shichi, H., Lewis, M. S., Inneverne, F. & Stone, A. L., Biochemistry of visual pigments. 1. Purification and properties of bovine rhodopsin. J. Biol. Chem., 1969, 244, 529.
- Schields, J. E., Dinovo, E. O., Hendricksen, R. A., Kimbel, R. L. Jr. & Millar, P. G., The purification and amino acid composition of bovine rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1967, 147, 238.
- Steineman, A. & Stryer, L., Accessibility of the carbohydrate moiety of rhodopsin. Biochemistry, 1973, 12, 1499-1502.
- Stewart, J.G., Baker, B.N. & Williams, T.P., Evidence for conformational states of rhodopsin. Biophys. Struct. Mech., 1977, 3, 19-29.
- Stone, W. L., Farnsworth, C. C. & Dratz, E. A., A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat & frog retinal rod outer segment. Exp. Eye Res., 1979, 28, 387-397.
- Stryer, L., Hurley, J. B. & Fung, B. K-K., First stage of amplification in the cyclic-nucleotide cascade of vision. Curr. Top. Membr. Transp., 1981, 15, 93-108.
- Stubbs, G. W., Smith, H. G. & Litman, B. L., Alkyl glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin. A comparison with several commonly used detergents. Biochim. Biophys. Acta., 1976, 426, 46-59.
- Stubbs, G.W. & Litman, B.J., Effect of alterations in the amphipathic microenvironment of the conformational stability of bovine opsin. 2. Rate of loss of rhodopsin regenerability. Biochemistry, 1978, 17, (2), 220-225.

- Szuts, E. Z., Calcium flux across disk membranes. Studies with intact rod photoreceptors and purified disks, J. Gen. Physiol., 1980, 76, 253-286.
- Tessier, M., Photochimie et biochimie de la rhodopsine. Rapport de stage, U.Q.T.R., 1981.
- Tessier, M., Effet de l'environnement moléculaire sur la séquence photolytique de la rhodopsine bovine. Mémoire de maîtrise, U.Q.T.R., 1985.
- Thomas, D. D. & Stryer, L., Transverse location of the retinal chromophore of rhodopsin in rod outer segment disc membranes, J. Mol. Biol., 1982, 154, 145-157.
- Tomita, T., Electrical activity of vertebrate photoreceptors. Rev. Biophys., 1970, 3, 179-222.
- Uhl, R. & Abrahamson, E. W. Dynamics processes in visual transduction. Chem. Rev., 1981, 81, 291-312.
- Van Breugel, P.J.G.M., Geurts, P.H.M., Daemen, F.J.M. & Bonting, S.L., Biochemical aspects of the visual process. XXXVIII. Effect of lateral aggregation on rhodopsin phospholipase-C treated photoreceptor membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 509, 136-147.
- Van der Meer, K., Mulder, J.J.C. & Lugtenberg, J., A new facet in rhodopsin photochemistry. Photochem. Photobiol., 1976, 24, 363-367.

- Woodruff, M. L. & Bownds, M.D., Amplitude, Kinetics, and reversibility of a light-induced decrease in guanosine 5',5'-cyclic monophosphate in frog photoreceptor membrane. J. Gen. Physiol., 1979, 73, 629.
- Yee, R & Liebman, P.A., Light activated phosphodiesterase of the rod outer segment. J. Biol. Chem., 1978, 253, 8902-8909.
- Yoshikami, S. & Haggins, W. A., Light, calcium, and the photocurrent of rod and cones. Biophys. J., 1971, 11, 47a.
- Yoshizawa, T. & Wald, G., Prelumirhodopsin and the bleaching of visual pigment. Nature(London), 1963, 197, 1279-1286.
- Zuckerman, R., Ionic analysis of photoreceptor membrane currents. J. Physiol., London, 1973, 235, 333.