

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

THESE PRESENTEE A

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR

CHRISTIAN SALESSE

LE MÉCANISME DE LA PREMIÈRE ÉTAPE DE L'AMPLIFICATION

DU PROCESSUS VISUEL

JUILLET 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.

RÉSUMÉ

Dans le but de résoudre la controverse relative au mécanisme de la première étape de l'amplification du processus visuel, nous avons effectué les mesures suivantes: (i) l'évaluation des critères de pureté pour les segments externes des bâtonnets (SEB) et la mise au point d'une méthode pour purifier les SEB; (ii) la caractérisation de la mesure ellipsométrique; (iii) l'estimation de la pression latérale dans la membrane discale; (iv) la mesure de l'adsorption de la G-protéine sur une monocouche de chaque phospholipide (PE, PC et PS) des SEB.

- (i) En biophysique, la pureté du matériel biologique est essentielle. Pour atteindre cet objectif, nos résultats démontrent que le rapport phospholipide/rhodopsine est le meilleur critère de pureté et que l'utilisation de la méthode du tourbillonnement pour détacher les SEB, suivie du cycle de flottation/sédimentation et d'un gradient continu tamponné de sucre, représente la meilleure méthode de purification des SEB.
- (ii) L'ellipsométrie de surface permet d'ajouter la dimension de l'épaisseur à la mesure des propriétés interfaciales des composantes du photorécepteur visuel. Cependant, il était important d'établir la pondération de chaque paramètre (n_x , n_z et d) dans la mesure ellipsométrique. Nous avons donc mesuré les isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique

d'une série homologue de phosphatidylcholines saturées et insaturées à l'interface azote-eau. Des simulations effectuées à l'aide d'un modèle moléculaire nous ont permis de démontrer qu'il n'existe qu'un nombre très restreint de combinaisons de n_x , n_z et d pour satisfaire les mesures expérimentales.

(iii) En effectuant la mesure des isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la rhodopsine intacte et hydrolysée dans différents environnements (déttergent et lipides) à l'interface azote-eau, nous avons estimé que la pression latérale dans la membrane discale était égale à 38 mN/m. Pour arriver à cette conclusion, nous avons supposé que la pression de surface nécessaire pour maintenir l'orientation transmembranaire de la rhodopsine était égale à la pression latérale dans la membrane discale.

(iv) L'adsorption de la G-protéine sur une monocouche de chaque phospholipide des SEB (PE, PC et PS) a été mesurée par les isothermes de pression de surface et ellipsométriques à l'interface azote-eau. Les mesures expérimentales ont clairement démontré que, quelle que soit la pression de surface (v.g. 38 mN/m), la G-protéine restait toujours associée à la monocouche de phospholipides. Ce résultat représente donc une évidence expérimentale contre le modèle du sautillement. Par contre, le modèle de la diffusion est encore valable pour expliquer le mécanisme de la première étape de l'amplification du processus visuel.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier M. François Boucher de m'avoir donné la possibilité de travailler dans son laboratoire où j'ai pu procéder à la purification des photorécepteurs visuels et de leurs constituants. De plus, il ne m'a jamais refusé l'opportunité d'avoir ensemble une bonne discussion stimulante. J'aimerais aussi souligner le soutien que m'a toujours apporté M. Pierre Tancrède.

La partie la plus importante de cette thèse a impliqué des collaborations intenses avec deux autres étudiants gradués. Il y a eu, en tout premier lieu, M. Daniel Ducharme, l'ellipsométriste, qui a aussi terminé sa thèse de doctorat. Malgré le fait que Daniel était professeur à temps plein au Cégep de Shawinigan, il a quand même pu consacrer beaucoup de temps à la recherche. Sa disponibilité, son intérêt soutenu, sa motivation, sa vivacité d'esprit et sa profonde humanité en ont fait un parfait collaborateur. Puis, il y a eu aussi M. François Lamarche avec qui la collaboration s'est avérée très intéressante. Elle m'a permis de connaître, à la fois, l'homme et le scientifique pour qui j'entrevois une brillante carrière. De plus, Daniel et François se caractérisent par leur amour de la recherche et leur envie de comprendre et de découvrir.

Tenir sous silence l'aide de M. Gaétan Munger, M. Alain Tessier et M. Paul Boivin serait comme nier l'existence du prédateur qui guide

ses disciples, vers le chemin le plus court pour atteindre l'objectif visé. C'est souvent grâce à leurs idées originales que l'équipe de recherche avance beaucoup.

Il y a eu aussi mon compagnon de bureau et ami, M. Jean-Joseph Max, avec qui je me suis bien marré à l'intérieur et à l'extérieur de l'Université sans pour autant être paumé, pour reprendre son français coloré. De plus, j'ai toujours apprécié la solidarité des autres membres du Centre de recherche en photobiophysique.

Par ailleurs, il est évident qu'après toutes ces années, je cerne beaucoup mieux le personnage dans toute sa profondeur, mon directeur de thèse, M. Roger M. Leblanc. Malheureusement, ces quelques lignes ne suffiront jamais à remercier tout le dévouement et l'énergie qu'il a porté à ma cause. Par contre, je sais très bien que la meilleure façon de le remercier serait de réussir à devenir un scientifique de renommée et que, après dix ans, on se rencontre dans un autre congrès international pour se remettre au diapason.

Pour terminer, je veux remercier ma compagne et épouse, Lise Lebel, qui a bien voulu accepter les conditions difficiles durant toute cette thèse, i.e. les restrictions financières et mon absence chronique de la maison. Ces conditions étaient rendues encore plus difficiles par la présence de nos deux enfants qui, eux aussi, ont dû s'habituer à l'absence prolongée de leur père. Il est donc évident que Lise mérite un énorme crédit dans l'accomplissement de cette thèse.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvi
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES.....	xxi
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
1.1 La morphologie des photorécepteurs chez les bovins et leur composition chimique.....	1
1.1.1 La morphologie des photorécepteurs.....	1
1.1.2 La composition en protéines et en lipides des SEB.....	2
1.2 La structure moléculaire de la rhodopsine.....	5
1.2.1 La structure primaire et secondaire de la rhodopsine.....	6
1.2.2 Les chaînes de sucres et les sites de phos- phorylation de la rhodopsine.....	8
1.2.3 Le site de liaison avec le 11-cis rétinal....	9
1.3 Les propriétés de la rhodopsine.....	9
1.3.1 Le spectre d'absorption et la séquence pho- tolytique de la rhodopsine.....	9
1.3.2 La stabilité thermique et la régénérabi- lité de la rhodopsine.....	10

	Page
1.3.3 La mobilité de la rhodopsine.....	11
1.4 L'organisation de la membrane discale.....	11
1.4.1 La forme et la dimension de la rhodopsine....	11
1.4.2 La distribution transmembranaire et asymé- trique de la rhodopsine.....	14
1.4.3 L'orientation et la position du 11-cis rétinal.....	14
1.4.4 La répartition asymétrique des phospholi- pides.....	14
1.5 Le mécanisme de transduction visuelle et la pro- blématique de notre recherche.....	15
1.5.1 L'identité du messager interne: résolu- tion d'une controverse.....	15
1.5.2 La cascade enzymatique.....	16
1.5.3 La problématique de notre recherche: le mécanisme de la première étape de l'ampli- fication.....	22
1.5.3.1 le modèle de la diffusion.....	23
1.5.3.2 le modèle du sautillage.....	26
1.5.4 La méthodologie utilisée pour résoudre la problématique de notre recherche.....	27
1.5.5 Problématique secondaire à notre objectif principal: i) la détermination de l'orientation de la rhodopsine.....	29

	Page
1.5.6 Problématique secondaire à notre objectif principal: ii) l'évaluation des critères de pureté pour les membranes photorécep- trices.....	30
II. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	32
2.1 La purification des segments externes des bâton- nets.....	33
2.1.1 La flottation des SEB.....	33
2.1.2 La séédimentation des SEB dans un gradient continu de concentration de sucre.....	34
2.2 Les méthodes d'évaluation de la pureté des SEB.....	35
2.2.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption et la détermination du contenu en rhodopsine....	35
2.2.2 La détermination du contenu en phospho- lipides.....	39
2.2.3 La détermination de la composition en aci- des gras.....	39
2.2.4 La mesure des isothermes de pression de surface.....	41
2.3 La purification des membranes discales intactes.....	42
2.4 Les méthodes d'évaluation de la pureté et de l'in- tégrité des membranes discales intactes.....	43
2.4.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption et la détermination du contenu en rhodop- sine.....	43

	Page
2.4.2 La détermination du contenu en phospholipides.....	43
2.4.3 La détermination de la composition en acides gras.....	43
2.4.4 La mesure des isothermes de pression de surface.....	44
2.4.5 L'estimation qualitative du contenu en protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	44
2.4.6 L'évaluation de l'intégrité des membranes discales par microscopie électronique.....	46
2.5 Le traitement enzymatique de la rhodopsine des membranes discales avec la thermolysine.....	46
2.5.1 Le traitement enzymatique.....	46
2.5.2 L'évaluation du traitement enzymatique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	47
2.6 La purification de la G-protéine.....	47
2.7 Les méthodes d'évaluation de la pureté de la G-protéine.....	50
2.7.1 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide...	50
2.7.2 La mesure de l'activité GTPase de la G-protéine.....	50
2.8 L'extraction et la purification des phospholipides des SEB.....	51

	Page
2.8.1 L'extraction des phospholipides des SEB.....	51
2.8.2 La purification des phospholipides des SEB...	51
2.8.2.1 La chromatographie sur DEAE-	
cellulose.....	52
2.8.2.2 La chromatographie sur acide	
silicique.....	53
2.9 Les méthodes d'évaluation de la pureté des phospholipides des SEB.....	53
2.9.1 La chromatographie sur couche mince.....	53
2.9.2 La détermination de la composition en acides gras.....	54
2.9.3 La détermination des coefficients d'extinction molaire.....	54
2.9.4 La mesure des isothermes de pression de surface.....	54
2.10 La purification de la rhodopsine intacte ou hydrolysée.....	54
2.10.1 La préparation de l'échantillon.....	55
2.10.2 La chromatographie de la rhodopsine intacte ou hydrolysée.....	55
2.11 Les méthodes d'évaluation de la pureté de la rhodopsine intacte ou hydrolysée.....	57
2.11.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption.....	57
2.11.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine.....	57

	Page
2.11.3 La mesure des isothermes de pression de surface.....	59
2.11.4 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide...	59
2.12 La mesure des isothermes de pression de surface.....	59
2.12.1 Les phospholipides.....	61
2.12.2 La rhodopsine intacte ou hydrolysée et les membranes discales intactes ou traitées avec la thermolysine.....	61
2.12.3 L'adsorption de la G-protéine.....	64
2.13 La mesure des isothermes de potentiel de surface.....	65
2.14 La mesure des isothermes ellipsométriques.....	65
2.14.1 Le principe de la méthode.....	66
2.14.2 L'aspect théorique.....	68
2.14.3 La mesure ellipsométrique.....	69
III. RÉSULTATS.....	71
3.1 L'évaluation des critères de pureté pour les segments externes des bâtonnets.....	71
3.1.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption.....	72
3.1.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine.....	74
3.1.3 La détermination de la composition en acides gras.....	74
3.1.4 La mesure des isothermes de pression de surface.....	74

	Page
3.2 L'évaluation de la pureté et de l'intégrité des membranes discales intactes.....	77
3.2.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption.....	79
3.2.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine.....	79
3.2.3 La détermination de la composition en acides gras.....	79
3.2.4 La mesure des isothermes de pression de surface.....	82
3.2.5 L'estimation qualitative du contenu en protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	82
3.2.6 L'évaluation de l'intégrité par microscopie électronique.....	83
3.3 L'évaluation du traitement enzymatique de la rhodopsine des membranes discales.....	83
3.4 L'évaluation de la pureté de la G-protéine.....	91
3.4.1 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide...	91
3.4.2 La mesure de l'activité GTPase.....	94
3.5 L'évaluation de la pureté des phospholipides des SEB.....	94
3.5.1 La chromatographie sur couche mince.....	94
3.5.2 La détermination de la composition en acides gras.....	94
3.5.3 La détermination des coefficients d'extinction molaire.....	95

	Page
3.5.4 La mesure des isothermes de pression de surface.....	95
3.6 L'évaluation de la pureté de la rhodopsine intacte ou hydrolysée.....	95
3.6.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption.....	95
3.6.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine.....	96
3.6.3 La mesure des isothermes de pression de surface.....	96
3.6.4 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide...	96
3.7 La caractérisation de la mesure ellipsométrique.....	99
3.7.1 La mesure des propriétés de surface d'une série homologue de phospholipides saturés....	100
3.7.2 La mesure des propriétés de surface d'un phospholipide contenant une ou deux chaînes grasses insaturées.....	109
3.8 La détermination de l'orientation de la rhodopsine à l'interface azote-eau.....	113
3.8.1 La mesure des propriétés de surface des phospholipides des SEB.....	113
3.8.2 La mesure des propriétés de surface de la rhodopsine intacte ou hydrolysée.....	118
3.8.3 La mesure des propriétés de surface des membranes discales intactes.....	121
3.8.4 La mesure des propriétés de surface des membranes discales traitées.....	126

	Page
3.9 Le mécanisme de la première étape de l'amplification du processus visuel: la mesure de l'adsorption de la G-protéine sur une monocouche de chaque phospholipide des SEB.....	130
IV. DISCUSSION.....	136
4.1 L'évaluation des critères de pureté des SEB.....	136
4.2 L'évaluation de la pureté des différentes fractions de la purification des membranes discales.....	141
4.3 La caractérisation de la mesure ellipsométrique.....	142
4.3.1 L'isotherme ellipsométrique d'une série homologue de phospholipides saturés et insaturés.....	143
4.3.1.1 le modèle proposé.....	155
4.3.2 L'isotherme de pression et de potentiel de surface de la série homologue de phospholipides et la relation avec leur isotherme ellipsométrique.....	167
4.4 La détermination de l'orientation de la rhodopsine à l'interface azote-eau.....	169
4.4.1 Les phospholipides des SEB.....	169
4.4.2 La rhodopsine intacte ou hydrolysée.....	169
4.4.3 Les membranes discales intactes ou traitées.....	179

	Page
4.5 Le mécanisme de la première étape de l'amplification du processus visuel: évidences contre le modèle du sautillement.....	186
4.6 Le potentiel de la technique.....	190
4.7 La poursuite de ce travail.....	190
4.7.1 La vérification de notre estimation de la pression latérale.....	191
4.7.2 L'adsorption des sous-unités de la G-protéine.....	191
4.7.3 La formation du complexe R*-G-protéine.....	192
BIBLIOGRAPHIE.....	193

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AGPI	Acide gras polyinsaturé
ALO	Ammonyx LO
BHT	Hydroxytoluène butylé
BR	Blanchi-régénéré
C	Contrôle
CCB	Cil connectif du bâtonnet
CCM	Chromatographie sur couche mince
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CT	Membranes discales traitées à court terme
DAPC	Diarachidonoyl phosphatidylcholine
DEAE	Diéthyl aminoéthyl cellulose
DMPC	Dimyristoyl phosphatidylcholine
DOPC	Dioléoyl phosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoyl phosphatidylcholine
DSPC	Distearoyl phosphatidylcholine
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique acide
GDP	Guanosine diphosphate
_c GMP	Guanosine monophosphate cyclique

GP G-protéine

GTP Guanosine triphosphate

hr Heure

LT Membranes discales traitées à long terme

MD Membranes discales intactes

MEMB-C Membranes discales du culot

MEMB-F Membranes discales flottant sur Ficoll 5%

MEMB-FS Membranes discales préparées à partir de SEB-FS

min Minute

OG Octyl glucoside

PC Phosphatidylcholine

PD Phosphodiesterase

PE Phosphatidyléthanolamine

POPC Palmitoyl oléoyl phosphatidylcholine

PS Phosphatidylsérine

R Rhodopsine

R* Rhodopsine photoexcitée

Re Régénéré

RH Rhodopsine hydrolysée

RI Rhodopsine intacte

rpm	Révolutions par minute
s	Seconde
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SEB	Segment externe du bâtonnet
SEB-FS	SEB préparé par flottation et sémination
SEB-GNT	SEB préparé par gradient non tamponné
SEB-GT	SEB préparé par gradient tamponné
SEB-TGT	SEB préparé par tourbillonnement et gradient tamponné
SIB	Segment interne du bâtonnet
TEMED	N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine

LISTE DES TABLEAUX

	Page
TABLEAUX	
1. Le contenu en protéines des SEB.....	4
2. La pureté optique et le contenu en phospholipides des différentes fractions des SEB.....	73
3. La composition en acides gras (poids %) des différentes fractions des SEB.....	75
4. La pureté optique et le contenu en phospholipides des différentes fractions de la purification des membranes discales.....	80
5. La composition en acides gras (poids %) des différentes fractions de la purification des membranes discales.....	81
6. La variation de l'aire moléculaire (ΔA), de l'angle ellipsométrique ($\delta\Delta$) et du potentiel de surface (ΔV) pour les différents états physiques des phospholipides saturés.....	106
7. La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DMPC....	145

	Page
8. La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DPPC....	147
9. La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DSPC....	149
10. La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DAPC....	150
11. La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DOPC....	152
12. La valeur de l'angle ellipsométrique ($\delta\Delta$) au début et à la fin de l'isotherme.....	154
13. La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DSPC en fonction de l'aire moléculaire.....	163
14. La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DOPC en fonction de l'aire moléculaire.....	164

LISTE DES FIGURES

	Page
FIGURES	
1 Modèle schématique de la structure générale de la rhodopsine et de son association avec la bicouche lipidique...	3
2 Modèle de l'organisation de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine dans la bicouche lipidique.....	7
3 Arrangement hypothétique des hélices alpha de la rhodopsine (coupe transversale de la membrane).....	13
4 Schéma de la cascade enzymatique.....	18
5a Modèle de la diffusion.....	25
5b Modèle du sautillage.....	25
6a Spectres d'absorption de l'échantillon C avant (courses 1 et 3) et après (courbe 2) blanchiment; SEB incubés à 4°C avant solubilisation (courbe 3).....	37
6b Spectres d'absorption avant (—) et après (---) blanchiment de l'échantillon Re (courses 1) et de l'échantillon BR (courses 2).....	37

	Page
7a Schéma du prisme et du système d'étalement (vue de côté)...	63
7b Schéma du prisme dans le bain de Langmuir (vue de côté)....	63
8 Diagramme de l'ellipsomètre.....	67
9 L'isotherme de pression de surface des SEB-FS (courbe 1), des SEB-GNT bande I (courbe 2) et des SEB-GNT bande II (courbe 3) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $20,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	76
10. Photographie de membranes discales par microscopie élec- tronique (agrandissement de 13 200).....	84
11. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la rhodop- sine intacte (RI) et des membranes discales traitées à court terme (CT).....	86
12. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de membranes discales intactes (MD) et traitées à long terme (LT).....	89
13. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la phospho- diestérase (PD), la G-protéine (GP), la rhodopsine intacte (RI) et la rhodopsine hydrolysée (RH).....	92

	Page
14 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la rhodopsine intacte (RI) et la rhodopsine hydrolysée (RH).....	97
15 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DMPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $17,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$	101
16 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DPPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $17,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$	102
17 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DSPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $18,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$	103
18 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DAPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $16,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$	104
19 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la POPC à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$	110

	Page
20 L'isotherme de pression , de potentiel de surface et ellipsométrique de la DOPC à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	111
21 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la PE des SEB à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	114
22 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la PC des SEB à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	115
23 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la PS des SEB à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	116
24 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la rhodopsine intacte à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	119
25 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la rhodopsine hydrolysée à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	122

	Page
26 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la rhodopsine intacte (—) et de la rhodopsine hydrolysée (---). Conditions expérimentales données dans les figures 24 et 25.....	123
27 L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique des membranes discales intactes à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$	124
28 L'isotherme de pression de surface (π) et ellipsométrique ($\delta\Delta$ et ψ) des membranes discales intactes à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$	127
29 L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique des membranes discales intactes (—), traitées à court terme (---) et à long terme (.....), à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$	128
30a L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique de la PE des SEB en absence (compression) et en présence de G-protéine (décompression et recompression) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$	131

	Page
30b Le graphique de l'angle ellipsométrique en fonction de la pression de surface pour la PE des SEB (—) et pour la recompression du film de PE des SEB-G-protéine (---).....	131
31a L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique de la PC des SEB en absence (compression) et en présence de G-protéine (décompression et recompression) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à 19,0 ± 0,5°C.....	132
31b Le graphique de l'angle ellipsométrique en fonction de la pression de surface pour la PC des SEB (—) et pour la recompression du film de PC des SEB-G-protéine (---).....	132
32a L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique de la PS des SEB en absence (compression) et en présence de G-protéine (décompression et recompression) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à 19,0 ± 0,5°C.....	133
32b Le graphique de l'angle ellipsométrique en fonction de la pression de surface pour la PS des SEB (—) et pour la recompression du film de PS des SEB-G-protéine (---).....	133

	Page
33 Le graphique de la pureté relative de chaque fraction des SEB en fonction du rapport phospholipides/rhodopsine. La pureté relative est exprimée, pour chaque critère de pureté, comme étant (la valeur de la meilleure fraction)/(la valeur d'une fraction donnée), excepté pour le % 22:6 ω 3 où le rapport est inversé. Les critères de pureté sont: pureté optique (●—●); rapport phospholipides/rhodopsine (○—○); % 22:6 ω 3 (\triangle — \triangle); isothermes de pression de surface (\blacktriangle — \blacktriangle).....	139
34 Le graphique de la valeur de l'angle ellipsométrique à la fin de l'isotherme de DMPC, DPPC, DSPC et DAPC en fonction du nombre de carbones de chaque chaîne aliphatische.....	156
35 Le modèle montrant l'importance du θ_{\min} dans l'orientation des phospholipides.....	158
36 Le modèle pour calculer l'aire moléculaire à $\theta < \theta_{\min}$	161
37 La comparaison entre l'isotherme ellipsométrique simulée (x—x) et expérimentale (+) de la DSPC.....	165
38 La comparaison entre l'isotherme ellipsométrique simulée (x—x) et expérimentale (+) de la DOPC.....	166

	Page
39 L'isotherme de pression de surface de la rhodopsine intacte: compression (.....), décompression (- · -) et recompression (—).....	177
40 L'isotherme de pression de surface de la rhodopsine intacte (- · -), des lipides totaux (—) et des membranes discales intactes (—) en termes de $\text{Å}^2/\text{mol}$ molécule de rhodopsine.....	184

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La morphologie des photorécepteurs chez les bovins et leur composition chimique

1.1.1 La morphologie des photorécepteurs

On retrouve deux types de photorécepteurs chez les vertébrés, i.e. les cellules visuelles en forme de bâtonnet et celles en forme de cône. Toutefois, au cours de ce travail, on s'intéresse strictement aux bâtonnets d'origine bovine. Les bâtonnets se divisent en trois parties, i.e. le segment interne (SIB), le cil connectif (CCB) et le segment externe (SEB). Le SIB sert au fonctionnement métabolique de la cellule. Le CCB qui relie le segment interne au segment externe revêt une très grande utilité pour les biophysiciens puisque, grâce à sa grande fragilité, on peut aisément détacher le SEB du SIB (voir section 2.1). Par ailleurs, le SEB est ultra-spécialisé dans l'induction d'un signal électrique par le biais de l'absorption d'énergie lumineuse par le pigment visuel. La longueur et le diamètre des SEB chez les bovins, sont de 7-10 μm et de 2 μm , respectivement (Mason, 1973). On peut consulter le travail de Nir et Hall (1979), Steinberg et al. (1980), Bownds (1981), Hollyfield et al. (1982), Miller (1983), Corless et McCaslin (1984) pour observer d'excellentes photographies en

microscopie électronique de transmission et à balayage du SIB, du CCB et du SEB. Le schéma de la figure 1 montre que la membrane plasmique des SEB renferme un empilement de cinq cents disques (Wolken, 1966). De plus, il n'existe pas de contact physique ou électrique entre chacun de ces disques et entre ceux-ci et la membrane plasmique (Laties et Liebman, 1970; Cohen, 1972; Ruppel et Hagins, 1973).

Par ailleurs, je réfère le lecteur à mon mémoire de maîtrise (Salesse, 1983) pour consulter les schémas et la description de l'oeil et de la rétine.

1.1.2 La composition en protéines et en lipides des SEB

Les SEB comportent, en poids sec, environ 50% de protéines et 50% de lipides (Fliesler et Anderson, 1983). La rhodopsine, le pigment visuel, constitue au moins 95% des protéines intrinsèques des membranes discales et 85% du contenu en protéines des SEB (Krebs et Kühn, 1977; Amis et al., 1981). Le tableau 1 fournit une liste des principales protéines des SEB et leurs caractéristiques. Ainsi, on peut voir que les SEB renferment deux types de protéines périphériques ou associées à la membrane discale, i.e. la G-protéine (GP) et la phosphodiestérase (PD) que l'on retrouve respectivement à un rapport molaire d'environ 1:10 et 1:300 avec la rhodopsine (Chabre, 1985). Il existe aussi deux types de protéines solubles (non-associées à la membrane discale), la 48K et la rhodopsine kinase, dont les rapports molaires avec la rhodopsine sont environ de 1:300 et 1:1 000, respectivement (Chabre, 1985).

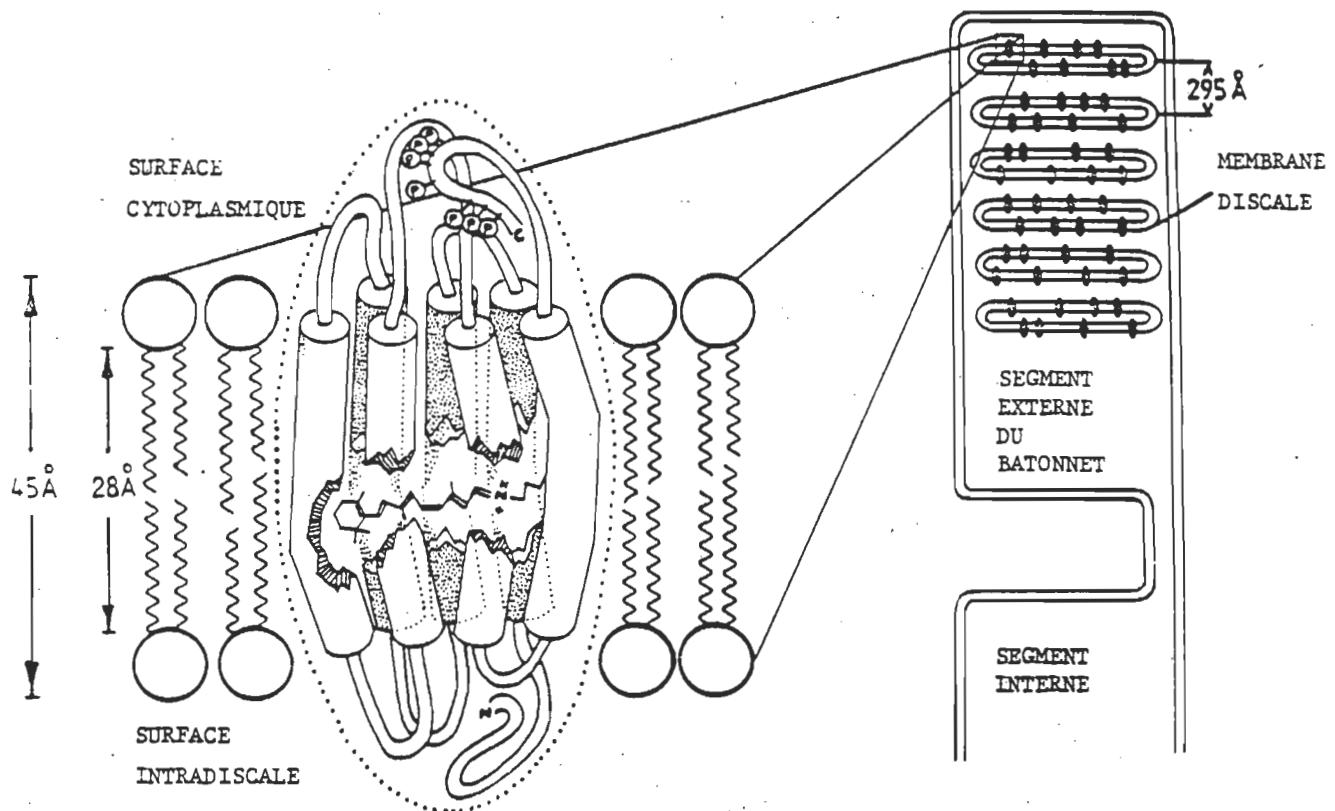


Figure 1. Modèle schématique de la structure générale de la rhodopsine et de son association avec la bicouche lipidique (Dratz et Hargrave, 1983).

Tableau 1

LE CONTENU EN PROTÉINES DES SEB

(compilé par Chabre, 1985)

Protéines	Relation avec la membrane	Poids moléculaire (kD)	Stoechiométrie par rapport à la rhodopsine	Concentration molaire dans le cytoplasme
Rhodopsine	Intrinsèque	41	1	-
G-protéine	Périmétrique ou (3 sous-unités: α + β + γ)	\sim 80 (39 + 37 + 6)	\sim 10^{-1}	500 μM
Phosphodiesterase	Périmétrique (2 sous-unités + 1 inhibiteur: $\alpha\beta$ + γ)	\sim 180 (88 + 84 + 13)	$\sim 3 \cdot 10^{-3}$	150 μM
48K	Soluble	\sim 50	\sim 10^{-2}	50 μM
Rhodopsine kinase	Soluble	65	\leq 10^{-3}	5 μM
Protéine du bord	Intrinsèque	240	$\sim 3 \cdot 10^{-4}$	-

Par ailleurs, on note aussi la présence d'une autre protéine intrinsèque à la membrane discale (~1:3 000 rhodopsines) qui a un poids moléculaire très élevé (240 kD). On retrouve cette protéine uniquement de chaque bord du disque et on lui attribue donc la fonction de maintenir la forme aplatie des disques (Molday, 1985). L'existence d'une ATPase intrinsèque aux disques a aussi été rapportée (Uhl et al., 1979a et b; Puckett et al., 1985).

Parmi les lipides des SEB, on retrouve environ 10-15 mol% de lipides neutres et environ 85-90 mol% (90-95%, p/p) de phospholipides (Fliesler et Anderson, 1983). Plus spécifiquement, on retrouve la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylséristine (PS), le cholestérol et des acides gras libres qui comportent respectivement 32, 29, 11, 8 et 6 molécules par molécule de rhodopsine (Miljanich, 1978; Miljanich et al., 1981). La caractéristique la plus saisissante des phospholipides des SEB, est leur important contenu en chaînes polyinsaturées qui constituent environ 60% (p/p) des acides gras et dont environ 80% de ces chaînes grasses polyinsaturées sont attribuées au 22:6ω3 (Miljanich et al., 1979; Stone et al., 1979; Drenthe et al., 1981; Fliesler et Anderson, 1983; Salesse, 1983; Salesse et al., 1983; Salesse et al., 1984; N'Soukpoé-Kossi et al., 1985). Le tableau 3 (voir page 75) présente la composition en acides gras des différentes fractions des SEB.

1.2 La structure moléculaire de la rhodopsine

Depuis le début des années '80, il s'est produit une très grande

évolution dans les connaissances de la structure et de l'organisation de la rhodopsine dans la membrane discale. Nous allons donc présenter l'état actuel de la recherche en nous limitant aux points importants tout en référant le lecteur aux titres originaux et à des articles de revue.

1.2.1 La structure primaire et secondaire de la rhodopsine

Le groupe d'Ovchinnikov a déterminé récemment la séquence complète en acides aminés de la rhodopsine (Abdulaev et al., 1982; Ovchinnikov et al., 1982). Par la suite, Hargrave et al. (1983) corrigerent légèrement cette séquence en acides aminés. La chaîne polypeptidique de la rhodopsine comporte donc 348 acides aminés (figure 2). La séquence a ensuite été confirmée par Nathans et Hogness (1983) qui ont réussi le clonage du gène de la rhodopsine bovine. La masse de ce polypeptide est donc de 39 000 daltons. L'observation de la séquence complète de la rhodopsine (voir figure 2) montre qu'elle comprend une alternance de segments hydrophiles et hydrophobes. L'utilisation de sondes chimiques et enzymatiques (voir la revue de Hargrave, 1982) ont démontré que les régions hydrophiles étaient localisées à la surface aqueuse de la membrane, alors que les régions hydrophobes étaient encastées dans la bicouche lipidique de la membrane discale (voir figures 1 et 2). On sait maintenant que les résidus de ces régions hydrophobes sont en conformation d'hélice alpha (pour une revue, voir Corless et McCaslin, 1984; Chabre, 1985). De plus, ces hélices alpha, orientées perpendiculairement au plan de la membrane (Chabre, 1978; Michel-Villaz

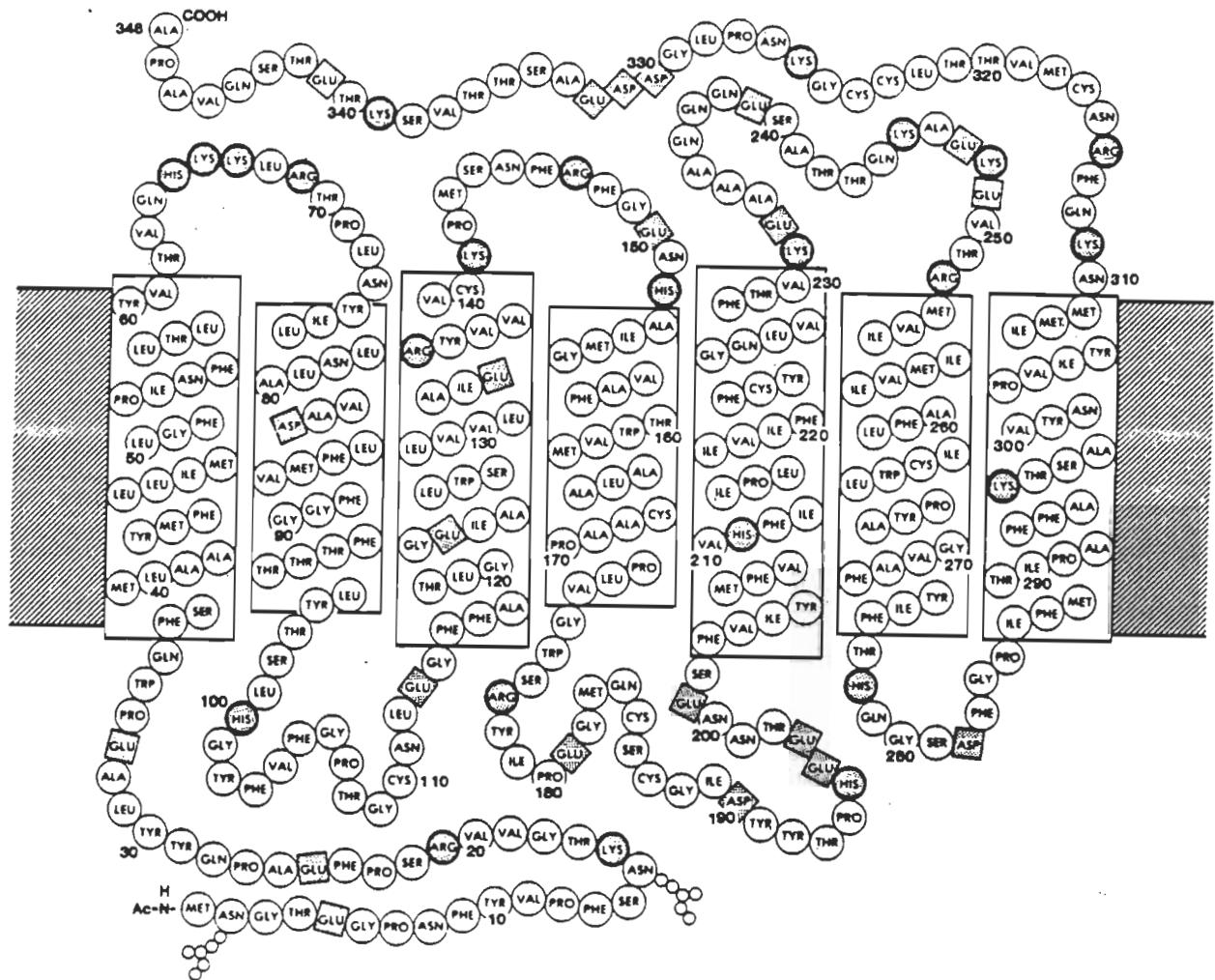


Figure 2. Modèle de l'organisation de la chaîne polypeptidique de la rhodopsine dans la bicoche lipidique (Hargrave et al., 1984).

et al., 1979; Rothschild et al., 1980), comprennent presque la moitié des acides aminés de la rhodopsine (Corless et McCaslin, 1984). En plus des références mentionnées ci-dessus, on peut, pour plus de détails, consulter les revues de Ovchinnikov (1982), Dratz et Hargrave (1983), Ovchinnikov (1983a et b), Hargrave et al. (1984), Ovchinnikov (1984) et Ovchinnikov et Abdulaev (1985).

1.2.2 Les chaînes de sucres et les sites de phosphorylation de la rhodopsine

Heller (1968) et Shichi et al. (1969) ont été les premiers à déterminer que la rhodopsine était une glycoprotéine. La rhodopsine contient deux oligosaccharides dont les sites de glycosylation se situent au niveau des résidus d'asparagine 2 et 15 (Hargrave et Fong, 1977) (voir figure 2). La séquence et la structure de ces oligosaccharides ont été déterminées par Fukuda et Papermaster (1979) et Liang et al. (1979). On retrouve respectivement 9 et 12 molécules de mannose et de N-acétylglucosamine par molécule de rhodopsine. De plus, en ajoutant la masse de ces deux chaînes d'oligosaccharides (2 000 daltons) à celle du polypeptide (39 000 daltons), on obtient un poids moléculaire de 41 000 daltons pour la rhodopsine. Pour connaître la structure précise de ces oligosaccharides, on peut consulter les revues de Shichi et al. (1980), Hargrave (1982) et Hargrave et al. (1984).

Par ailleurs, les sept sites connus de phosphorylation de la rhodopsine se situent le long de la chaîne du carboxyle terminal (Hargrave et al., 1980) (voir figures 1 et 2).

1.2.3 Le site de liaison avec le 11-cis rétinal

Une molécule de 11-cis rétinal est attachée de façon covalente à la lysine 296 de l'opsine (Wang et al., 1980). Le rétinal est lié par une base de Schiff avec le groupement ϵ -aminé de la lysine. L'état de protonation de cette base de Schiff a été à l'origine d'une controverse qui n'est pas encore clairement réglée (pour une revue, voir Balogh-Nair et Nakanishi, 1982).

1.3 Les propriétés de la rhodopsine

1.3.1 Le spectre d'absorption et la séquence photolytique de la rhodopsine

La rhodopsine se distingue par ses deux bandes d'absorption principales. L'une, à 280 nm, provient de l'absorption des acides aminés aromatiques (voir section 2.11.1) de la protéine et l'autre, à 500 nm, est due à la présence de la base de Schiff entre le 11-cis rétinal et l'opsine. En figures 6a et 6b, on présente des spectres d'absorption des SEB.

Lorsque la rhodopsine absorbe un photon, il s'en suit une séquence d'intermédiaires spectraux. On peut consulter les revues de Ostroy (1977) et Uhl et Abrahamson (1981) pour connaître cette séquence photolytique. Cependant, la transition de métarhodopsine I à métarhodopsine II est la plus importante dans le processus visuel. La

métarhodopsine II est l'espèce active qui interagit avec la G-protéine (voir section 1.5.2). Ainsi, cette vitesse de transition est l'étape limitante dans le processus d'activation de la G-protéine. De plus, il est bien connu que cette transition, où se produisent des changements conformationnels de l'opsine, est fortement dépendante de l'environnement lipidique (pour une revue, voir Bonting et al., 1977; Salesse, 1983). On peut aussi consulter les articles récents de De Grip et al. (1983), Parkes et Liebman (1984) et Baldwin et Hubbell (1985a et b).

1.3.2 La stabilité thermique et la régénérabilité de la rhodopsine

La stabilité thermique de la rhodopsine est extrêmement dépendante de la présence ou de l'absence de phospholipides. La rhodopsine est beaucoup plus stable dans un environnement lipidique (au moins 50 phospholipides/rhodopsine) que lorsqu'elle est entourée de détergent (Bonting et al., 1977; De Grip, 1982; Daemen et De Grip, 1984).

De la même façon, la régénérabilité de la rhodopsine est, elle aussi, extrêmement dépendante de l'environnement lipidique (voir section 2.2.1 pour connaître la technique de régénération). La rhodopsine se régénère, à la fois, beaucoup plus efficacement et plus rapidement lorsqu'elle se trouve en présence de phospholipides (pour une revue, voir Bonting et al., 1977; Salesse, 1983).

1.3.3 La mobilité de la rhodopsine

Il a été démontré que la rhodopsine faisait une rotation sur elle-même et diffusait latéralement dans la membrane discale (Brown, 1972; Cone, 1972; Liebman et Entine, 1974; Poo et Cone, 1973, 1974; Baroin et al., 1977; Kusumi et al., 1978; Wey et al., 1981). De plus, Baroin et al. (1979) ont montré que si 30% (ou plus) des phospholipides sont enlevés, la rhodopsine devenait immobile.

1.4 L'organisation de la membrane discale

1.4.1 La forme et la dimension de la rhodopsine

La figure 1 présente un modèle schématique de la structure générale de la rhodopsine et de son association avec la bicoche lipidique de la membrane discale (Dratz et Hargrave, 1983). Cette figure montre que la rhodopsine a une forme ellipsoïdale dans son orientation transmembranaire. Cependant, il n'existe pas de données expérimentales indiquant la forme détaillée de la rhodopsine à la surface aqueuse de la membrane, du côté intra- ou extra-discal. Donc, le dessin de l'arrangement des boucles entre les différentes hélices alpha, montré en figure 1, est arbitraire. Par contre, en considérant la séquence en acides aminés et un modèle de l'organisation tridimensionnelle des hélices alpha de la rhodopsine (Hargrave et al., 1984), on peut supposer que la forme ellipsoïdale, donnée à la rhodopsine, est acceptable. Ainsi, on dénommera, tout au long de ce travail, cette ellipse perpendiculaire

au plan de la membrane comme étant la "grande ellipse". Le grand axe de cette grande ellipse mesure 70 \AA (Dratz et al., 1979; Corless et al., 1982). Par ailleurs, son petit axe a deux dimensions. On montre, en figure 3, une vue de dessus (coupe transversale de la membrane) de l'arrangement hypothétique des hélices alpha de la rhodopsine (Hargrave et al., 1984). Ainsi, on peut voir que la rhodopsine a aussi une forme à peu près ellipsoïdale dans sa dimension parallèle au plan de la membrane. On appellera donc cette ellipse, "petite ellipse". Corless et al. (1982) ont estimé le diamètre de la rhodopsine comme étant de $\sim 25 \text{ \AA}$. Cependant, comme décrit ci-dessus, la rhodopsine a probablement une forme ellipsoïdale et non pas circulaire dans ce plan de la membrane. Par ailleurs, les cristaux de dimères de rhodopsine (Corless et al., 1982) ne permettaient pas de donner deux dimensions à la rhodopsine dans ce plan de la membrane (J.M. Corless, communication personnelle). Ainsi, nous avons donc supposé que cette dimension de 25 \AA correspondait probablement au petit axe de cette petite ellipse. Cette supposition est justifiée puisque, si on présume une dimension de 25 \AA pour le grand axe de cette petite ellipse (au lieu du petit axe), on calculera une aire moléculaire de $245 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ de rhodopsine dans la membrane discale. Il est évident que cette estimation est beaucoup trop faible et n'est pas réaliste (voir section 4.4.2). Ainsi, en prenant pour acquis que la dimension du petit axe de la petite ellipse est de 25 \AA , on peut calculer la dimension du grand axe puisque, selon le modèle moléculaire de Hargrave et al. (1984) (non montré), ce dernier est 2,1 fois plus grand que le petit axe, i.e. $52,5 \text{ \AA}$.

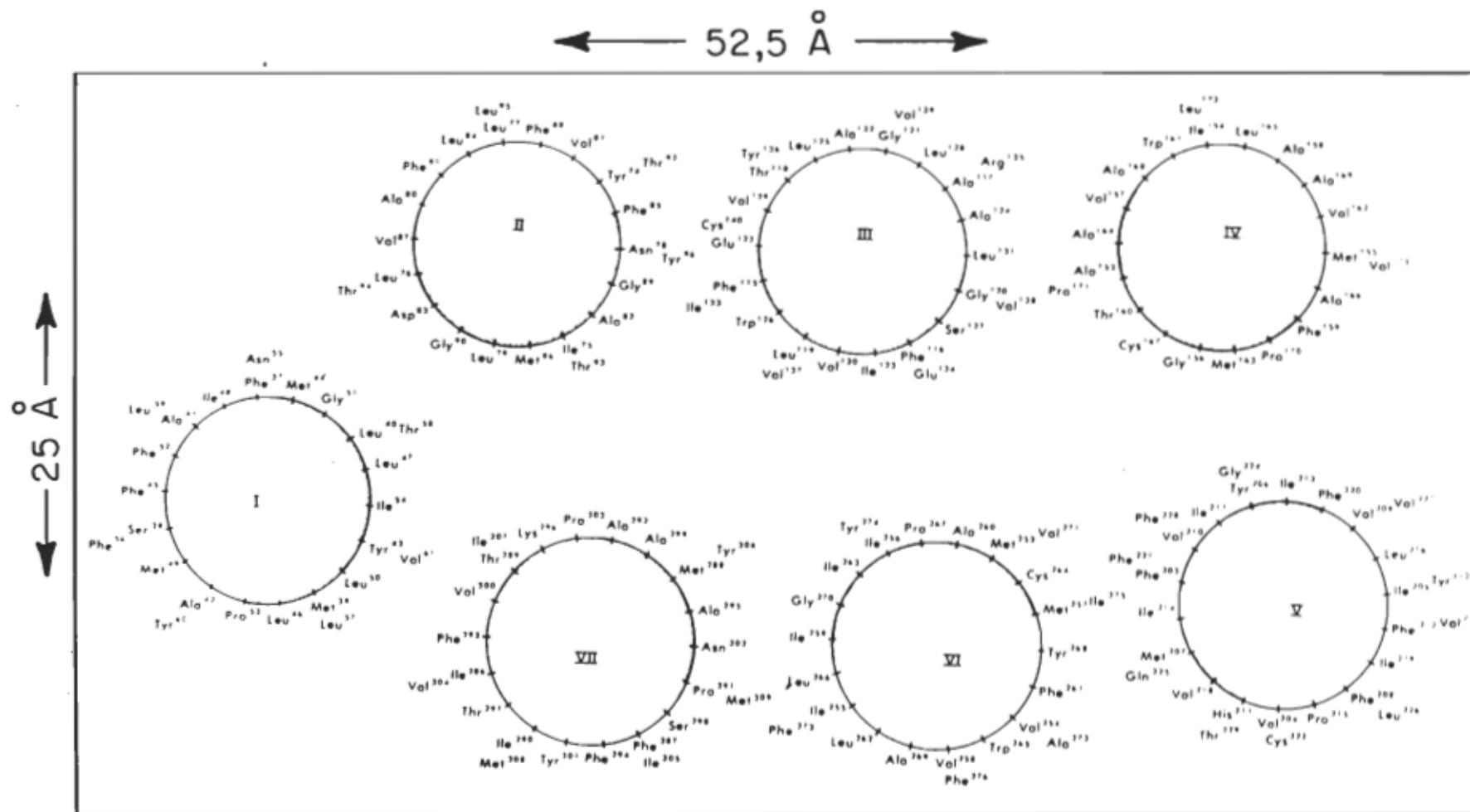


Figure 3. Arrangement hypothétique des hélices alpha de la rhodopsine (coupe transversale de la membrane) (Hargrave et al., 1984).

1.4.2 La distribution transmembranaire et asymétrique de la rhodopsine

Il est maintenant bien établi par une grande variété de techniques que la rhodopsine est une protéine transmembranaire asymétrique. Ainsi, la figure 1 montre que la chaîne du carboxyle terminal et ses sites de phosphorylation se trouvent du côté cytoplasmique de la membrane discale, alors que l'amine terminale et ses sucres se situent du côté intradiscal.

1.4.3 L'orientation et la position du 11-cis rétinal

Il a été déterminé que le moment dipolaire de transition du chromophore de la rhodopsine forme un angle de 16° avec la plan de la membrane discale (Liebman, 1962; Kawamura et al., 1977). Ainsi, comme montré en figure 1, l'orientation du 11-cis rétinal qui est presque parallèle au plan de la membrane, est à peu près idéale pour absorber, de façon optimale, la lumière passant le long du bâtonnet. En outre, on sait maintenant, que le site de liaison du rétinal est profondément enfoui dans la membrane (voir figure 1) (Thomas et Stryer, 1982).

1.4.4 La répartition asymétrique des phospholipides

Les résultats de Miljanich et al. (1981) ont permis de conclure que 73-87% de la PE et 77-88% de la PS se trouvait du côté cytoplasmique alors que 65-100% de la PC se situait du côté intradiscal.

Cependant, ces résultats ont contribué à maintenir la controverse entourant les travaux de Crain et al. (1978), Drenthe et al. (1980a et b), Sklar et Dratz (1980) et même, plus récemment, ceux de Miljanich et al. (1985).

Ainsi on peut conclure que la question de l'asymétrie des phospholipides de la membrane discale, n'est pas encore clairement résolue (Fliesler et Anderson, 1983).

1.5 Le mécanisme de transduction visuelle et la problématique de notre recherche

1.5.1 L'identité du messager interne: résolution d'une controverse

On sait, depuis longtemps, que l'absorption de la lumière par la rhodopsine résulte en la fermeture des canaux à sodium de la membrane plasmique, conduisant ainsi à un changement dans le potentiel membranaire du bâtonnet. On avait donc besoin d'un messager qui transmettait le signal de l'absorption de la lumière par la rhodopsine des disques jusqu'aux canaux sodiques de la membrane plasmique. Le premier candidat, en tant que messager interne, était l'ion calcium (Hagins, 1972). On postulait que les ions calcium étaient relargués à partir des disques, sous l'effet de la lumière, et diffusaient jusqu'à la membrane plasmique pour fermer les canaux à sodium.

Par la suite, des mesures biochimiques et électrophysiologiques ont remis en question l'hypothèse du calcium (Miller et Nichol, 1979; Miller, 1981). Ces mesures montraient que l'absorption de la lumière résultait en l'activation (via la G-protéine) d'une phosphodiestérase qui hydrolysait ensuite le GMP cyclique ($cGMP$). Il a donc été proposé que la diminution résultante dans la concentration en $cGMP$, provoquait la fermeture des canaux sodiques de la membrane plasmique.

Très récemment, une série de mesures par la méthode du "patch-clamp" a démontré, sans équivoque (Attwell, 1985), que le $cGMP$ est le messager interne alors que le calcium pourrait jouer un autre rôle (Cobbs et al., 1985; Cobbs et Pugh, 1985; Fesenko et al., 1985; Haynes et Yau, 1985; Matthews et al., 1985; Yau et Nakatani, 1985a et b; Zimmerman et al., 1985; Haynes et al., 1986; Zimmerman et Baylor, 1986).

1.5.2 La cascade enzymatique

A la lumière des conclusions citées ci-dessus, il est donc justifié de décrire uniquement, dans ce travail, la cascade enzymatique en tant que mécanisme de transduction visuelle, dont l'étape finale comporte l'hydrolyse du $cGMP$. Cependant, nous nous limiterons à une description relativement brève pour ensuite focaliser sur la problématique de notre recherche.

On montre, en figure 4, un schéma de la cascade enzymatique que l'on décrit comme un cycle d'amplification activé par la lumière. On visualise ce cycle comme suit:

i) A la noirceur, presque toute la G-protéine (GP) se trouve sous la forme GP-GDP. A ce moment, la GP-GDP et la phosphodiestérase (PD) sont des protéines périphériques membranaires liées à la surface cytoplasmique des disques. De plus, la GP-GDP n'interagit pas de façon appréciable avec la rhodopsine ou la PD.

ii) La photoisomérisation de la rhodopsine (R) résulte en la formation de métarhodopsine II en ~ 1 ms (Liebman et al., 1984). La métarhodopsine II est le photointermédiaire qui interagit avec la GP-GDP en tant que rhodopsine photoexcitée (R^*) (Emeis et Hofmann, 1981; Bennett et al., 1982; Liebman et Pugh, 1982; Hofmann et al., 1983; Cook et al., 1985; Schleicher et Hofmann, 1985). Il est donc évident que, pour interagir avec la G-protéine, la métarhodopsine II doit comporter des différences appréciables avec la rhodopsine dans la région cytoplasmique (extra-discale). En effet, il a été démontré récemment que, sous l'effet de la lumière, la rhodopsine subissait des changements conformationnels au niveau des boucles reliant les hélices alpha 3-4 et 5-6 (Pellicone et al., 1985a et b). Ces changements structurels permettent à la G-protéine de distinguer la R^* , rendant ainsi possible l'interaction R^* -GP-GDP (Kühn et Hargrave, 1981; Pellicone et al., 1985c). La sous-unité GP_α (voir tableau 1) de la G-protéine est responsable de cette interaction avec la R^* (Kühn, 1981; Fung, 1983; Kühn, 1984), alors que

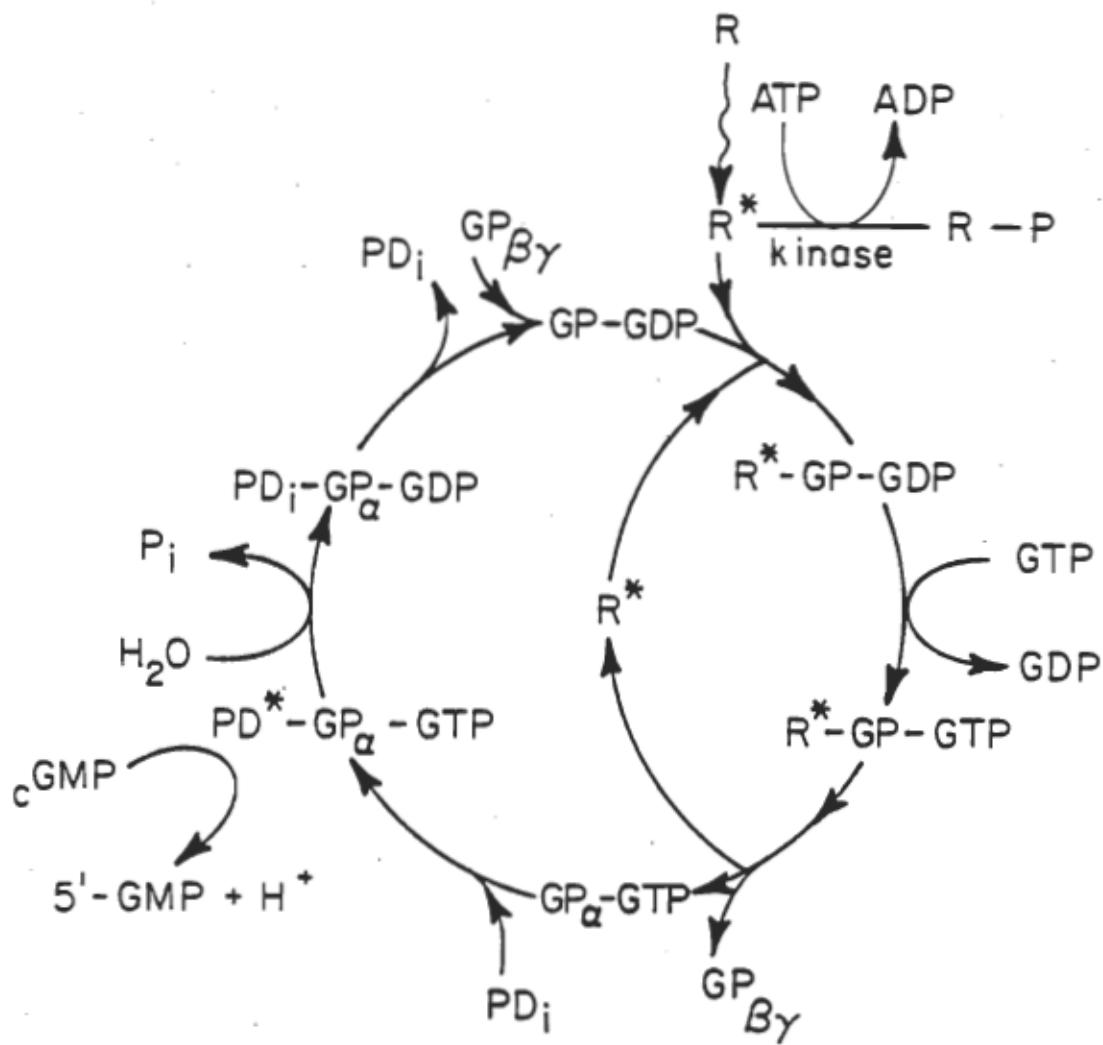


Figure 4. Schéma de la cascade enzymatique (Stryer, 1985).

la sous-unité fonctionnelle, $GP_{\beta\gamma}$ (Fung, 1983), est chargée de l'association de la G-protéine avec la membrane (Kühn, 1984). De plus, il semble que les trois groupements sulfhydryles accessibles de la GP_α sont essentiels pour permettre l'interaction GP_α -R* (Ho et Fung, 1984; Reichert et Hofmann, 1984; Hofmann et Reichert, 1985). Il est important de noter que cette liaison avec la rhodopsine nécessite une interaction coopérative entre les sous-unités GP_α et $GP_{\beta\gamma}$ (Fung, 1983; Fung, 1985).

iii) Le GDP, dans le complexe R*-GP-GDP, est alors rapidement échangé pour le GTP (Godchaux et Zimmerman, 1979; Fung et Stryer, 1980). On associe, à cet échange, un changement conformationnel important de la G-protéine (Fung et al., 1981; Fung, 1983; Fung et Nash, 1983). De plus, on sait que les sites de liaison de la sous-unité GP_α , avec le GTP (ou le GDP) et avec la rhodopsine, sont localisés dans des régions distinctes (Fung et Nash, 1983). L'interaction coopérative GP_α - $GP_{\beta\gamma}$ est encore nécessaire dans ce cas-ci (Fung, 1983; Fung, 1985).

iv) Ce changement conformationnel (ou l'échange du GTP pour le GDP) diminue l'affinité de la R* pour la GP (GP_α) et de la sous-unité GP_α pour la $GP_{\beta\gamma}$ (Fung et al., 1981). La R* ainsi libérée peut trouver une autre GP-GDP et agir ainsi de façon catalytique (Godchaux et Zimmerman, 1979; Fung et Stryer, 1980; Kühn et al., 1981; Bennett, 1982). C'est la première étape de l'amplification: une seule R* pourrait activer jusqu'à 500 molécules de GP en 0,5 s (Stryer, 1985).

v) La sous-unité GP_{α} -GTP se détache de la membrane (Kühn, 1981; Emeis et al., 1982) et représente donc l'intermédiaire transportant l'information dans la photoactivation de la PD (Stryer, 1985). La GP_{α} -GTP active la PD en dissipant la contrainte inhibitrice imposée par la sous-unité γ de la PD (Miki et al., 1975; Bitensky et al., 1981; Fung et al., 1981; Hurley et Stryer, 1982; Yamazaki et al., 1983). La PD ainsi activée hydrolyse très rapidement le $cGMP$: $4 \cdot 10^5$ $cGMP$ par seconde par photon lorsqu'une seule molécule est photolysée parmi les 10^5 molécules de rhodopsine d'un disque typique (Yee et Liebman, 1978; Liebman et Pugh, 1979; Liebman et al., 1984). On assiste donc ici à la seconde étape de l'amplification. Il est important de noter que le rapport du taux maximal de catalyse de la PD par rapport à sa constante de Michaelis, k_{cat}/K_M , est égal à $6 \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1}$. Cette valeur très élevée de k_{cat}/K_M est près de la limite supérieure fixée par la rencontre de l'enzyme et du substrat, dont la vitesse est contrôlée par la diffusion (Hurley et Stryer, 1982). L'intervalle de temps entre l'absorption d'un photon jusqu'à l'activation de la première PD est de moins que d'environ 30 ms. Donc, en moins de 100 ms après l'absorption d'un photon, il s'est produit une hydrolyse considérable de $cGMP$ (Vuong et al., 1984). Par conséquent, cette grande rapidité d'exécution confirme la cascade enzymatique en tant que mécanisme d'excitation visuelle, dont l'intervalle de temps est de ~ 2 s (Baylor et al., 1979).

vi) Par la suite, l'activité GTPase de la G-protéine convertit la GP_{α} -GTP en GP_{α} -GDP (Fung et Stryer, 1980). Cette hydrolyse se

produit en ~20-300 s (Wheeler et Bitensky, 1977; Baehr et al., 1982) et provoque l'inactivation de la PD. Par la suite, la sous-unité GP_{α} -GDP retourne lier la $GP_{\beta\gamma}$ (Stryer, 1985). De plus, il est maintenant bien accepté que cette activité GTPase de la GP_{α} ne requière pas la présence de $GP_{\beta\gamma}$ (Fung, 1983; Chabre, 1985; Fung, 1985; Stryer, 1985).

vii) Cette hydrolyse de la GP_{α} -GTP en GP_{α} -GDP semble être essentielle mais insuffisante pour rétablir l'inaktivité retrouvée à la noirceur. Si la R^* n'est pas rendue inactive, elle déclenchera un autre cycle d'amplification. L'isomérisation du rétinal tout-trans sous la forme 11-cis est trop lente pour jouer un rôle dans l'inactivation de la R^* . Ce problème a été résolu lorsqu'il a été démontré que la phosphorylation de la rhodopsine par une kinase (voir tableau 1) et de l'ATP, provoquaient l'inactivation rapide et complète de la R^* (Liebman et Pugh, 1980; Pfister et al., 1983; Sitaramayya et Liebman, 1983a et b; Arshavsky et al., 1985). La phosphorylation s'arrête après le transfert de 9-20 phosphates sur le segment carboxyle terminal de la rhodopsine (voir figure 2) (Wilden et Kühn, 1982). Il faut noter que la phosphorylation est complète en moins de 1 s (Liebman et al., 1984). De plus, Kühn et al. (1982) ont déterminé que le segment carboxyle terminal subissait un changement conformationnel détectable au stade métarhodopsine II, ce qui peut donc lui permettre d'interagir avec la kinase. Plus encore, Aton et Litman (1984) proposent un rôle de régulation de l'activité de la PD par le segment carboxyle terminal.

Un autre aspect intéressant de la cascade enzymatique, est que la R^* interagit premièrement avec la GP-GDP et puis avec la kinase.

La GP-GDP vient en premier lieu parce qu'elle est présente en concentration plus élevée (1 pour 10 rhodopsines) que la kinase (1 pour 1 000 rhodopsines). Par conséquent, la kinase ne trouve pas la R* jusqu'à ce qu'une proportion substantielle de G-protéines soient activées. Ainsi, la synchronisation de la réaction d'inactivation de la R* est déterminée, en partie, par les concentrations relatives de GP et de kinase. Si la quantité de kinase était, par exemple, 100 fois plus importante, la R* serait inactivée beaucoup plus rapidement et un niveau plus élevé de lumière serait nécessaire pour parvenir à activer complètement la PD. Il est évident que la quantité de chaque constituant et la nature des interactions de la cascade enzymatique, ont été optimisées.

En plus de la kinase, il existe une autre protéine soluble, la 48 K ou antigène S (Pfister et al., 1985) (voir tableau 1), qui lie spécifiquement la rhodopsine photoexcitée et phosphorylée (Kühn et al., 1984). On lui attribue donc un rôle probable dans la régulation de la cascade enzymatique.

1.5.3 La problématique de notre recherche: le mécanisme de la première étape de l'amplification

La première étape de l'amplification, c'est l'activation de plusieurs centaines de G-protéines par la rhodopsine photoexcitée (voir section 1.5.2, iv). Cependant, il n'est pas encore bien établi par quel mécanisme une seule R* va activer autant de G-protéines. Nous

présenterons donc les deux modèles postulés jusqu'à maintenant: i) le modèle de la diffusion et ii) le modèle du sautissement.

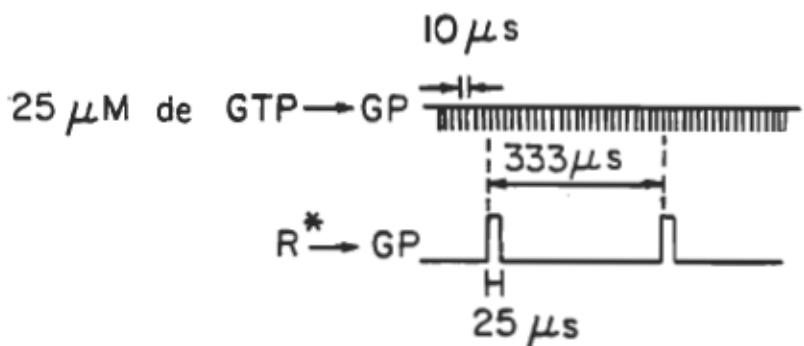
1.5.3.1 Le modèle de la diffusion

Ce modèle est basé sur le fait que la rhodopsine peut diffuser latéralement dans la membrane à une vitesse de $0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Liebman et Entine, 1974; Poo et Cone, 1973, 1974). Liebman (1975), Liebman et Pugh (1979) et Liebman et Sitaramayya (1984) ont déterminé que $1 \mu\text{m}^2$ de membrane, ce qui correspond à la surface d'un disque, contenait environ 30 000 rhodopsines, 3 000 G-protéines et 500 phosphodiesterases.

A partir de ces données, Liebman et Sitaramayya (1984) ont fait les suppositions suivantes. i) Si la rhodopsine et la G-protéine (associée à la surface de la membrane) diffusent à la même vitesse ($0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$) et que le temps de vie de leur collision (incluant la formation du complexe) est très bref, une seule rhodopsine photoexcitée (R^*) entrera en collision avec environ 3 000 G-protéines/s (Liebman et Pugh, 1981; Liebman et Pugh, 1982; Liebman et Sitaramayya, 1984; Liebman et al., 1984). ii) De plus, si chaque collision R^* -GP-GDP mène à un échange rapide de GDP pour du GTP (en solution), ce processus d'amplification engendrera donc 3 000 GP-GTP/s/ R^* . Ce taux de formation catalytique hautement amplifié est donc limité par la vitesse de diffusion latérale à l'intérieur de la membrane. iii) De plus, cela peut se produire uniquement lorsque l'intensité lumineuse blanchit une seule

molécule parmi les 10^5 rhodopsines d'un disque typique, provoquant ainsi la formation d'une seule R* par disque (Liebman et al., 1984). Par contre, si deux R* (ou plus) sont formées sur la même membrane discale, elles devront interagir avec le même réservoir de GP-GDP. Ainsi, l'amplification (par R*) sera réduite, alors que la vitesse nette de formation de GP-GTP augmentera proportionnellement (Liebman et Pugh, 1982).

Liebman et Sitaramayya (1984) ont ensuite procédé à des simulations par ordinateur pour établir leur modèle. Ils ont commencé par supposer qu'en présence de $3\ 000\ GP-GDP/\mu m^2$ de membrane discale, une seule R* rencontrera, en moyenne, une GP-GDP à toutes les $333\ \mu s$. Chaque complexe R*-GP-GDP doit exister seulement transitoirement et une collision efficace avec le GTP doit se produire rapidement durant ce couplage éphémère. Ils ont calculé que le temps le plus court pour qu'un tel couplage se produise, en absence de répulsion électrostatique, était de $25\ \mu s$. De plus, le temps de relaxation rotationnelle de la rhodopsine étant de $20\ \mu s$ (Cone, 1972), la rhodopsine pourrait donc tourner sur elle-même pour trouver le véritable site d'interaction durant le temps de vie du complexe. A partir de ce modèle, ils ont établi un diagramme de collisions qui donne la fréquence et le temps de vie des interactions à différentes concentrations de R* et de GTP. Ils montrent ainsi comment la production de GP-GTP à partir d'une collision R*-GP-GDP doit dépendre de la concentration en GTP et, à la fois, de la fréquence de collision et du temps de vie du complexe de R*-GP-GDP. On montre, en figure 5a, un exemple de cette simulation. Dans ce cas-ci,

A

10 μ s = intervalle de temps d'arrivée de GTP au site de liaison.

25 μ s = temps de vie du complexe R*-GP.

333 μ s = intervalle moyen d'inter-collision entre la R* et la GP.

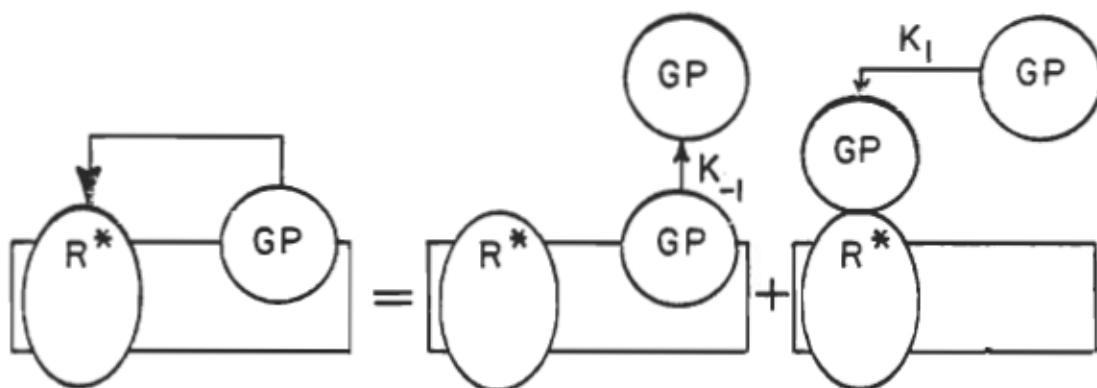
B

Figure 5. A: Modèle de la diffusion.
B: Modèle du sautissement.

le GTP (25 μ M) sature presque le site de liaison. Ainsi, le niveau intracellulaire de 1 mM en GTP (Robinson et Hagins, 1979) permet à ce modèle d'être valable. De plus, il est évident que si on augmente le nombre de R^* , on réduira l'intervalle d'inter-collision R^*-GP (333 μ s), fournissant ainsi plus d'opportunités d'ouverture des sites de liaison du GTP par la GP-GDP, catalysée par la rhodopsine.

Ce modèle pourrait expliquer, du moins partiellement, l'avantage d'avoir une membrane discale extrêmement fluide, puisqu'il n'existe pas d'autre membrane naturelle contenant autant d'acides gras polyinsaturés.

1.5.3.2 Le modèle du sautissement

Ce modèle est basé sur l'idée que la G-protéine, étant une protéine périphérique, peut être faiblement liée à la membrane. Donc, sa dissociation de cette membrane, jusque dans la phase cytoplasmique, pourrait survenir aisément. Par la suite, la diffusion de la G-protéine dans le milieu aqueux, beaucoup moins visqueux, devrait être environ 100 fois plus rapide que dans une membrane hautement visqueuse (voir figure 5b). Les évidences expérimentales supportant ce modèle, proviennent du fait que l'ajout de 1% de membranes photoréceptrices blanchies (sans protéines périphériques) à 99% de membranes photoréceptrices intactes (contenant la GP et la PD), entraîne la demi-activation de la PD (Keirns et al., 1975) ou l'activité maximale de la GP (Wheeler et al., 1977). De plus, Tyminski et O'Brien (1984)

ont observé une activité maximale de la PD en mélangeant des vésicules de phospholipides-rhodopsine sans activité enzymatique, après blanchiment de 4% de la rhodopsine, à des SEB intacts contenant de la PD et de la G-protéine. Ces résultats suggèrent donc que le modèle du sautillage (par la phase aqueuse) de la G-protéine jusqu'à la rhodopsine, doit être considéré comme une alternative au modèle de la diffusion latérale de la rhodopsine.

Cependant, des mesures de diffusion de la lumière suggèrent fortement que la G-protéine reste associée à la membrane avant et après blanchiment de la rhodopsine (Kühn, 1984). Ainsi, le modèle de la diffusion semble plus acceptable que celui du sautillage. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons simulé la surface cytoplasmique de la membrane discale en étalant chaque phospholipide des SEB à l'interface azote-eau. Par la suite, après avoir injecté la G-protéine dans la sous-phase, on mesure son adsorption sur la monocouche et sa possible désorption subséquente comme décrit ci-dessous.

1.5.4 La méthodologie utilisée pour résoudre la problématique de notre recherche

Pour élucider le mécanisme de la première étape de l'amplification du processus visuel, nous avons utilisé un système modèle, la méthode des monocouches. Il s'agit donc de permettre à la G-protéine de s'associer à la membrane (monocouche) et de vérifier si elle reste incorporée ou si elle est expulsée par la variation de la pression de

surface. La méthodologie consiste donc à préparer une monocouche avec un phospholipide des SEB, de compresser la monocouche jusqu'à 20 mN/m et d'injecter la G-protéine dans la sous-phase (sous la monocouche). On agite ensuite la sous-phase pour maximiser le contact entre la G-protéine et la monocouche. Par la suite, on décompresse la monocouche pour laisser plus d'espace à la G-protéine, lui permettant ainsi de s'insérer dans la monocouche. On recomprime alors le film jusqu'au collapse. Le comportement de la G-protéine dans ces films est observé par la mesure des isothermes de pression de surface et des isothermes ellipsométriques. La mesure est effectuée avec chacun des phospholipides des SEB (PE, PC et PS). Ainsi, si la G-protéine était éjectée du film à une pression de surface donnée, on pourrait alors conclure qu'elle peut se dissocier facilement de la membrane et que le modèle du sautilement est celui qui convient le mieux. Si, par contre, la G-protéine, une fois incorporée au film, lui reste toujours associée, il faudra en déduire que le modèle de la diffusion représente le mécanisme le plus réaliste. Cependant, pour s'assurer de la validité de ces conclusions, il faudrait connaître la pression latérale dans la membrane discale afin de déterminer l'état d'association de la G-protéine avec la monocouche à cette pression de surface donnée.

Il existe, dans la littérature, plusieurs estimations théoriques et expérimentales de la valeur de la pression latérale à l'intérieur d'une membrane de phospholipides (Hui et al., 1975; Albrecht et al., 1978; Blume, 1979; Gruen et Wolfe, 1982). Toutefois, on peut soulever trois objections quant à ces déterminations: i) il existe une

grande variabilité des résultats (12 à 50 mN/m), ii) elles ne tiennent pas compte de la contribution des protéines à cette mesure et iii) la valeur peut varier d'une membrane à l'autre, dépendant de la composition en protéines et en lipides. Ainsi, nous avons donc décidé de procéder à notre propre mesure.

1.5.5 Problématique secondaire à notre objectif principal: i) la détermination de l'orientation de la rhodopsine

La mesure de la pression latérale dans la membrane discale peut être estimée si on connaît l'orientation de la rhodopsine à l'interface azote-eau. Ainsi, il est justifié de croire que la pression de surface nécessaire pour maintenir l'orientation transmembranaire de la rhodopsine, correspond à la pression latérale dans la membrane discale. La détermination de l'orientation de la rhodopsine à l'interface azote-eau, peut être faite par la mesure de l'isotherme ellipsométrique. Cependant, avant de procéder à cette évaluation, il faut caractériser la mesure ellipsométrique pour bien comprendre les possibilités et les limites de cette technique.

Nous avons donc débuté notre travail par la mesure des isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométriques d'une série homologue de phospholipides. Donc, en gardant la même tête polaire, on a mesuré l'effet de l'augmentation de la longueur de chaîne (DMPC, DPPC, DSPC et DAPC) sur la mesure ellipsométrique. Par la suite, la présence d'une (POPC) et puis de deux chaînes grasses insaturées

(DOPC), nous a permis d'évaluer les conséquences de l'insaturation sur la mesure expérimentale (ellipsométrie).

Nous avons ensuite procédé à la mesure des isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométriques des membranes disciales et de ses constituants (PE, PC, PS et rhodopsine).

Cependant, avant d'entreprendre des mesures expérimentales avec les membranes disciales et ses composantes, il faut s'assurer de la pureté de l'échantillon biologique. Dans ce but, il est nécessaire d'utiliser des critères de pureté dont la valeur a déjà été éprouvée. Par contre, les divers critères de pureté n'ont jamais été confrontés, l'un par rapport à l'autre.

1.5.6 Problématique secondaire à notre objectif principal: ii) l'évaluation des critères de pureté pour les membranes photoréceptrices

Dans le cadre d'un travail de maîtrise, on s'est rendu compte que la pureté chimique des membranes photoréceptrices ne variait pas toujours parallèlement avec la pureté spectroscopique (Salesse, 1983; Salesse et al., 1983).

Nous avons donc purifié des SEB par différentes méthodes. La pureté des différentes fractions a été évaluée par trois méthodes distinctes: i) la spectroscopie d'absorption uv-visible permettant de

mesurer le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$, ii) une méthode chimique par laquelle on détermine le nombre de phospholipides par rhodopsine et la composition en acides gras des membranes purifiées, et iii) une méthode physico-chimique qui est basée sur les propriétés interfaciales de films monomoléculaires formés en étalant des SEB à l'interface gaz-eau (Salesse et al., 1984).

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Toutes les manipulations impliquant les photorécepteurs visuels et/ou la rhosopsine, se font en présence de lumière rouge atténuée ($\lambda > 650$ nm). De plus, on travaille toujours sous atmosphère d'azote ou d'argon pour empêcher l'oxydation des chaînes grasses polyinsaturées des phospholipides des SEB.

L'eau distillée utilisée est filtrée et déionisée (Cartouches à déminéraliser, Corning), puis distillée (Corning Mega-pure, LD-3). Cependant, l'eau utilisée pour la mesure de tous les isothermes (sections 2.12 à 2.14) est déionisée et prépurifiée par filtration (NANO pure-filter system, Barnstead), puis bidistillée sur quartz (Model Bi-18, Amerisil Inc.). Cette eau a une résistivité spécifique de 18 M Ω cm et une tension superficielle ≥ 71 mN/m. L'eau ainsi obtenue sera dénommée "eau pure".

On procède au lavage de la vaisselle en utilisant du "No Chromix Compound" (Godax Lab. Inc.) et/ou du HF (Fisher Sci. Co.) (4%, v/v). On rince ensuite quinze fois avec de l'eau distillée ou de l'eau pure selon l'utilisation subséquente.

On distille tous les solvants organiques et l'acide acétique glacial avec une colonne vigreux. On vérifie régulièrement leur pureté

par chromatographie en phase gazeuse, sur couche mince et par la mesure de leurs propriétés tensio-actives (Tancrède et al., 1981a).

2.1 La purification des segments externes des bâtonnets

Les détails concernant la méthode de dissection des yeux bovins et la purification des SEB sont donnés par Salesse (1983) et Salesse et al. (1984), respectivement. La purification des SEB consiste à détacher les SEB de la rétine par i) agitation magnétique ou ii) par tourbillonnement (voir section 2.1.1). On sépare ensuite, (i) les gros débris et les SEB ou, (ii) les rétines et les SEB, par flottation sur 40% de sucre (voir section 2.1.1). On atteint une plus grande pureté en sédimentant les SEB dans un gradient continu de concentration de sucre (voir section 2.1.2).

2.1.1 La flottation des SEB

Après la dissection des yeux, on détache les SEB des rétines par (i) agitation magnétique pendant 30 s dans du tampon A constitué de 10 mM de Hepes (Sigma Chem. Co.) (pH 7,5), de 0,15 mM de CaCl₂ (Fisher Sci. Co.) et de 10 mM de NaCl (Fisher Sci. Co.), à raison de 0,5 ml/rétine. On filtre la suspension résultante avec quatre épaisseurs de gaze. Par la suite, on dilue le filtrat avec un volume égal d'une solution de 80% (p/v) en sucre (Sigma Chem. Co.) pour ainsi atteindre une concentration finale de 40% en sucre.

Une méthode alternative (ii) pour détacher les SEB des rétines, consiste à utiliser un "vortex" (Fisher Sci. Co.) pour provoquer le tourbillonnement d'une suspension de rétines pendant 10 s. Plus précisément, il s'agit de compléter le volume de cinquante rétines jusqu'à 60 ml avec le tampon A et de faire tourbillonner 6 ml de cette suspension à la fois. On amène ensuite la solution à un volume final de 75 ml avec le tampon A et on dilue avec un volume égal d'une solution de 80% en sucre. Pour obtenir un rendement (quantité de SEB) et une pureté maxima, il est important de limiter, à cinquante, le nombre de rétines en suspension et de respecter le temps de tourbillonnement.

Après avoir versé l'une (i) ou l'autre (ii) des préparations dans les tubes à centrifuger que l'on recouvre avec 2 ml de tampon A, on centrifuge pendant 45 min à 12 000 rpm dans un rotor à godets oscillants (HB-4, Sorvall Instruments). Par la suite, les SEB flottant à la surface du sucre sont soigneusement récupérés avec une pipette (ouverture de 3 mm), puis dilués 1/3 avec du tampon A et sédimentés à 19 000 rpm pendant 10 min (rotor SS-34, Sorvall Instruments). On répète ce cycle de flottation/sédimentation deux fois.

2.1.2 La sédimentation des SEB dans un gradient continu de concentration de sucre

Immédiatement après le cycle de flottation/sédimentation, on remet les SEB (l'équivalent de vingt-cinq rétines) en suspension dans le tampon A, puis on les étale à la surface d'un gradient continu de

concentration de sucre (26-36%, p/v) qui est tamponné (tampon A) ou non tamponné (voir section 3.1). On centrifuge ensuite les gradients pendant deux heures à 24 000 rpm dans un rotor à godets oscillants (SB-110, Damon/IEC Division). On récupère alors les SEB de chaque bande qui est ensuite lavée deux fois par centrifugation (10 min, 19 000 rpm, rotor SS-34) après dilution avec le tampon A.

2.2 Les méthodes d'évaluation de la pureté des SEB

2.2.1 L'analyse par spectrométrie d'absorption et la détermination du contenu en rhodopsine

On mesure les spectres d'absorption avec un spectrophotomètre Pye-Unicam (modèle SP8-100). Cet appareil a la particularité de posséder un porte-cellules très près du photomultiplicateur, ce qui permet de minimiser les pertes de lumière du faisceau d'analyse qui sont dues à la lumière diffusée. L'utilisation du porte-cellules standard de ce spectrophotomètre ou celui d'un autre appareil (v.g. Cary 17D), résulterait en une perte importante de lumière incidente due à la lumière diffusée par les SEB solubilisés dans le détergent.

A partir de nos mesures expérimentales et celles de McConnell et al. (1981), il apparaît évident que la centrifugation des SEB solubilisés dans l'Ammonyx L0 (Onyx Chemical Co.), même dans le cas des SEB flottés, n'amène qu'une augmentation minime de la clarification de la solution. Plus précisément, mentionnons que la centrifugation

n'affecte pas l'absorbance à 500 nm avant et après blanchiment (ΔA_{500} , voir figure 6a), alors qu'on assiste à une réduction d'environ 4% de l'absorbance à 280 nm (A_{280}). On décida donc, puisque le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ diminue très peu, d'éliminer l'étape de centrifugation avant les mesures spectroscopiques.

Pour effectuer les mesures spectroscopiques, chaque échantillon de SEB est remis en suspension dans le tampon A de façon à obtenir une concentration finale en rhodopsine de ca. $1,0 \cdot 10^{-4}$ M. Ensuite, on solubilise un aliquot de 100 μ l de SEB en ajoutant 900 μ l de tampon A contenant 3% (v/v) d'Ammonyx L0 (AL0) et 0,1 M d'hydroxylamine (pH 7,0) (Fisher Sci. Co.). On mesure alors le spectre d'absorption de 650 à 250 nm contre un témoin (tampon A + AL0 + hydroxylamine). La courbe 1 de la figure 6a montre un spectre typique. On utilise ce spectre en tant que contrôle (échantillon C) pour déterminer l'ordre de grandeur de l'absorbance à 280 nm en absence de rétinal extrinsèque. La courbe 2 de la figure 6a présente le spectre d'absorption de cet échantillon C qui a été blanchi en l'exposant, pendant 2 min, à la lumière d'une lampe au tungstène d'une intensité de 530 W m^{-2} . On filtre cette lumière avec un filtre de chaleur et un filtre en verre coloré passe-haut ($\lambda = 500 \text{ nm}$; 65-1315, Rolyn).

Les membranes photoréceptrices sont toujours partiellement blanchies et contiennent donc une certaine quantité d'opsine régénérable. On peut déterminer précisément le contenu en rhodopsine par la spectroscopie d'absorption. Cependant, pour atteindre ce but, on doit

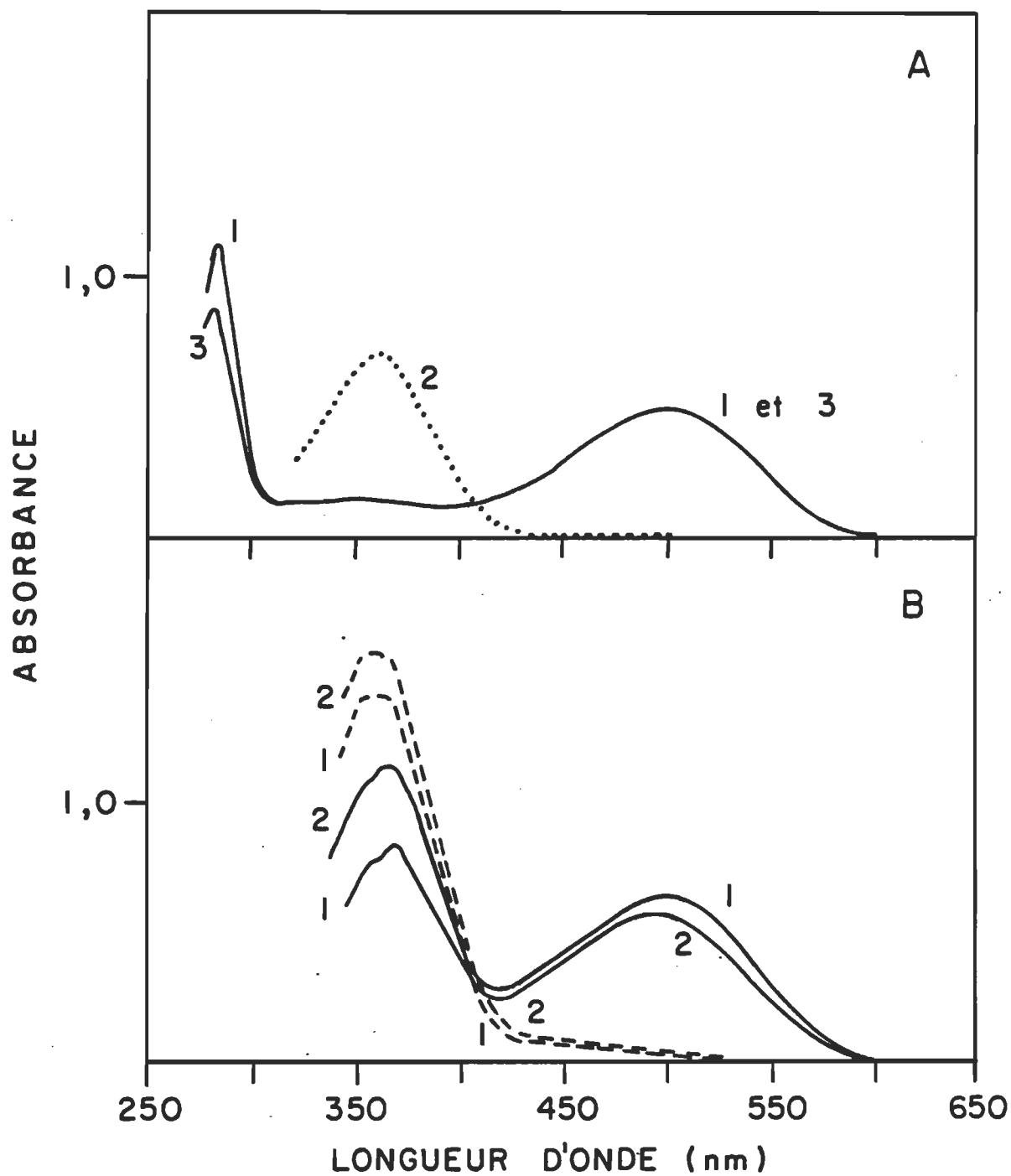


Figure 6. A: Spectres d'absorption de l'échantillon C avant (courbes 1 et 3) et après (courbe 2) blanchiment; SEB incubés à 4°C avant solubilisation (courbe 3).
 B: Spectres d'absorption avant (—) et après (---) blanchiment de l'échantillon Re (courbes 1) et de l'échantillon BR (courbes 2).

pouvoir mesurer la quantité et la régénérabilité de l'opsine. On utilise donc, à cette fin, une méthode modifiée de Raubach et al. (1974) et Miljanich (1978) pour faire cette détermination (Salesse et al., 1984). On commence par régénérer un échantillon C (courbe 1, figure 6a) en ajoutant, au 100 μ l de C, 4 μ l de 11-cis rétinal (Hofmann-Laroche) ($\sim 5 \cdot 10^{-3}$ M) suivi d'une incubation de 90 min à la noirceur et à 37°C. On présente le spectre d'absorption de cet échantillon régénéré (échantillon Re) en figure 6b, courbe 1. On peut ainsi remarquer que le processus de régénération augmente le ΔA_{500} de l'échantillon C (courbe 1, figure 6a) d'environ 20%. Par la suite, pour évaluer la régénérabilité de l'opsine (Raubach et al., 1974; Miljanich, 1978), on régénère l'échantillon C blanchi (courbe 2, figure 6a) comme décrit ci-dessus. On montre le spectre d'absorption de cet échantillon blanchi-régénéré (échantillon BR) en figure 6b (courbe 2). Plus de 85% de l'opsine est régénérable dans toutes les fractions. Toutes ces mesures sont répétées au moins deux fois.

On calcule le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ en utilisant la valeur de A_{280} de l'échantillon C (courbe 1, figure 6a) et celle du A_{500} de l'échantillon Re (courbe 1, figure 6b). On détermine la concentration en rhodopsine (échantillon Re) en se servant d'un coefficient d'extinction molaire de $42\ 000\ l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ pour le ΔA_{500} (Matthews et al., 1963; Daemen et al., 1970; Bridges, 1971; Rotmans et al., 1972; Harosi, 1975).

2.2.2 La détermination du contenu en phospholipides

Pour évaluer le nombre de phospholipides par rhodopsine, nous devons déterminer le contenu en phospholipides dans les échantillons dont nous connaissons la concentration en rhodopsine, i.e. les échantillons C, Re et BR (voir section 2.2.1). A partir de chacun de ces échantillons, on prélève un ou deux aliquots de 400 µl. Un témoin de 400 µl est aussi retranché de la cellule de référence utilisée pour les mesures spectroscopiques. Suite à l'ajout de huit gouttes d'un mélange d'acide sulfurique (Anachemia Canada Inc.) et d'acide perchlorique concentré (J.T. Baker Chem. Co.) (1/1, v/v) à chacun des aliquots de 400 µl, on chauffe les échantillons à 210°C (appareil micro-Kjeldhal, Lab. Con. Co.) pendant deux heures et on dose ensuite le phosphore par la méthode de "American Society for Testing and Materials" (1977) dont les modifications ont déjà été décrites en détail (Salesse, 1983). Dans le but de vérifier une interférence possible d'origine non-lipidique, le contenu en phospholipides a aussi été évalué à partir de l'extrait organique (méthode d'extraction décrite dans la section suivante) d'un aliquot (40 µl) de membranes photoréceptrices. On n'a pu détecter aucune interférence. Il est important de noter que pour chaque fraction des SEB (voir section 3.1), on effectue au moins 6-10 dosages du phosphore.

2.2.3 La détermination de la composition en acides gras

On utilise une méthode modifiée de Morrison et Smith (1964) pour déterminer la composition en acides gras (Salesse, 1983;

Salesse et al., 1983; Salesse et al., 1984; N'Soukpoé-Kossi et al., 1985). On sédimente deux aliquots de 200 μ l de chaque fraction de membranes photoréceptrices (\sim 10 mg de membranes/ml) en les centrifugeant pendant 20 min à 19 000 rpm (rotor SS-34). On extrait ensuite les lipides totaux de chaque culot en les homogénéisant une fois avec du méthanol (Anachemia Canada Inc.) et ensuite deux fois avec du chloroforme (Anachemia Canada Inc.)/méthanol (1/1, v/v) (Miljanich, 1978; Salesse et al., 1984). On regroupe alors les extraits de chaque fraction que l'on évapore séparément avec un roto-évaporateur (R110, Brinkmann) sous atmosphère d'azote. Les échantillons sont réduits à sec avec un faible jet d'argon.

Par la suite, on procède à la trans-méthylation des acides gras en ajoutant 1 ml de BF_3 -méthanol (14%, p/v) (Chromatographic Specialities Ltd) à chacun des échantillons. On inclut aussi une quantité précise de diheptadécanoyl phosphatidylcholine (Sigma Chem. Co.) en tant que standard interne. On chauffe les échantillons pendant 15 min à 100°C. On extrait ensuite les esters de méthyl d'acides gras en ajoutant deux volumes de n-hexane (Anachemia Canada Inc.) et un volume d'eau pure. Puis, on ré-extrait la phase aqueuse deux fois avec du n-hexane. On sèche ensuite les extraits avec du Na_2SO_4 anhydre (J.T. Baker Chem. Co.) et on les concentre par évaporation sous argon. On analyse alors la composition des esters de méthyl d'acides gras dans le n-hexane par chromatographie en phase gazeuse (Varian, modèle 3700) en utilisant une colonne de 2 mm X 2,5 m contenant 10% de SP-2330 sur du Chromosorb 100/120 W AW (Chromatographic Specialities Ltd.). On maintient la

température de l'injecteur et du détecteur à 260 et 300°C, respectivement. La programmation de température pour la colonne est soit isotherme à 200°C ou soit comme suit: 15 min à 170°C suivi d'une augmentation de température, jusqu'à 200°C, à raison de 2°C/min et puis on maintient cette température pendant 25 min. On identifie les pics en les comparant avec les mélanges d'esters de méthyl d'acides gras appelés PUFA 1 et 2 (Supelco Inc.). On obtient le pourcentage relatif en poids de chaque acide gras en intégrant le chromatogramme (Varian, modèle CDS-111).

2.2.4 La mesure des isothermes de pression de surface

On consacre cette section uniquement à exposer cette méthode en tant que critère de pureté des SEB (Salesse et al., 1984). On présente donc, ici, uniquement la technique d'étalement et la sous-phase utilisée puisqu'elles représentent les deux différences majeures avec la section 2.12 où l'on décrit, en détail, la méthodologie pour mesurer les propriétés interfaciales de diverses molécules. Suite à la détermination précise de la concentration en rhodopsine (voir section 2.2.1), on dilue les SEB afin d'obtenir une concentration en rhodopsine de ca. 10^{-5} M. On étale ensuite un aliquot de 80 μ l directement à la surface d'un tampon phosphate (J.T. Baker Chem. Co.), 10^{-3} M, pH 7,8. On mesure les isothermes 15 min après l'étalement des SEB.

2.3 La purification des membranes discales intactes

On procède à la purification des membranes discales en modifiant la méthode de Smith et Litman (1982). On prépare les disques à partir de SEB purifiés, non seulement par flottation sur sucre (voir section 2.1.1), comme dicté par Smith et Litman (1982), mais aussi par séparation dans un gradient continu tamponné de sucre (voir section 2.1.2). Après le gradient, on récupère les SEB que l'on dilue 1/4 avec de l'eau pure. On sédimente ensuite cette suspension (1 hr, 19 000 rpm, rotor SS-34). Puis, on rince les parois du tube à centrifuger avec de l'eau pure. On remet alors le culot en suspension avec de l'eau pure et on sédimente une autre fois de la même façon. Par la suite, on reprend le culot (l'équivalent de vingt-cinq rétines) dans 30 ml d'eau pure contenant 5% (p/v) de Ficoll (Sigma Chem. Co.). La suspension résultante est recouverte d'eau pure et laissée à 4°C, sous argon, pendant toute une nuit pour provoquer le bris de la membrane plasmique des SEB par choc osmotique. On procède ensuite à la centrifugation pendant 2 hr dans un rotor à godets oscillants (SB-110, Damon/IEC Division) à 24 000 rpm (79 000 g). Les disques intacts se retrouvent ainsi à l'interface 5% de Ficoll-eau pure. On recueille les disques et on les lave deux fois par séparation (1 hr, 19 000 rpm, rotor SS-34) après une dilution de 1/5 avec le tampon B (5 mM de Tris-HCl, pH 7,4).

Les disques ne se conservent pas plus que deux semaines au réfrigérateur. Après ce délai, ils s'agrègent de façon irréversible malgré le fait que des milieux hypertoniques, isotoniques, hypotoniques à faible,

moyenne ou forte densité aient été essayés. Ainsi, nous avons décidé de les emmagasiner pendant, au plus, deux semaines dans le tampon B.

2.4 Les méthodes d'évaluation de la pureté et de l'intégrité des membranes discales intactes

2.4.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption et la détermination du contenu en rhodopsine

On procède à cette mesure exactement comme décrit pour les SEB dans la section 2.2.1 excepté que l'on remplace le tampon A pour le tampon B.

2.4.2 La détermination du contenu en phospholipides

On effectue cette détermination en suivant fidèlement la méthode décrite dans la section 2.2.2 pour les SEB.

2.4.3 La détermination de la composition en acides gras

Pour déterminer la composition en acides gras des membranes discales, on suit exactement la méthode présentée dans la section 2.2.3 pour les SEB.

2.4.4 La mesure des isothermes de pression de surface

Dans la section 2.12.2, on présente en détail la méthodologie utilisée pour la mesure des propriétés monomoléculaires des membranes disciales.

2.4.5 L'estimation qualitative du contenu en protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

On procède à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon une méthode modifiée de Laemmli (1970). A partir de solutions mères de 10% (p/v) de sodium dodécyl sulfate (SDS) (Fisher Sci. Co.), de 30% (p/v) d'acrylamide (Bio-Rad Lab.) contenant 0,8% (p/v) de N,N'-bis-méthylène acrylamide (Bio-Rad Lab.), de 1,0 M de Tris-HCl (Aldrich Chem. Co.) (pH 8,8) et de 1% (p/v) de persulfate d'ammonium anhydre (Bio-Rad Lab.), on prépare le gel de séparation en prélevant les volumes nécessaires de chaque solution pour obtenir les concentrations finales suivantes: 0,1% (v/v) de SDS, 10% (v/v) d'acrylamide, 0,375 M de Tris-HCl et 0,05% (v/v) de persulfate d'ammonium. On polymérise ensuite le gel en ajoutant 50 µl de TEMED (Bio-Rad Lab.).

On utilise un système maison pour faire l'électrophorèse sur plaques dont le gel a les dimensions suivantes: 8 cm de large, 11 cm de long et 3 mm d'épais. Le tampon de la cuve de l'électrode négative contient 0,025 M de Tris-HCl (pH 8,5), 0,0625 M de glycine (Bio-Rad Lab.) et 0,1% (p/v) de SDS, alors que celui de la cuve de l'électrode positive comporte les mêmes éléments à l'exception de la glycine.

On ajoute, aux échantillons de protéines, un volume égal de solution de digestion. Cette solution de digestion contient 4% (p/v) de SDS, 10 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 60% (v/v) de glycérol (Fisher Sci. Co.) et 0,2% (p/v) de vert de malachite (Fisher Sci. Co.). On incube ensuite les protéines pendant deux heures à 37°C. Dans nos conditions expérimentales, le volume d'échantillon à prélever pour l'électrophorèse ne doit pas excéder 20 µl et doit contenir au moins 30 µg de rhodopsine. La migration des protéines se fait en appliquant ensuite, sur le gel de polyacrylamide, un courant constant (Source de tension, Modèle 500/ 200, Bio-Rad Lab.) de 50 mA pendant 4 hr ou 12 mA pendant 15 hr, i.e. lorsque le vert de malachite atteint une distance d'environ 1 cm de l'extrémité anodique du gel. Par la suite, on immerge le gel dans la solution fixative pendant au moins dix heures (Sigma, 1983). La solution fixative comporte les solvants suivants: 40% (v/v) de méthanol (Anachemia Canada Inc.) et 7% (v/v) d'acide acétique glacial (Fisher Sci. Co.) dans de l'eau. On colore ensuite les gels pendant toute une nuit avec le réactif suivant: 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie (Bio-Rad Lab.) dans la solution fixative. Puis, on décolore par diffusion dans la solution fixative pendant au moins 15 hr et au plus 25 hr. On poursuit alors la décoloration avec le réactif suivant qui sert aussi à emmagasiner le gel: 5% (v/v) de méthanol et 7,5% (v/v) d'acide acétique glacial dans de l'eau.

2.4.6 L'évaluation de l'intégrité des membranes discales par microscopie électronique

Après la purification des membranes discales (section 2.3), on prépare une suspension de 0,1 mg de membranes/ml. On en prélève ensuite une goutte que l'on dépose sur une grille à microscopie électronique. Puis, on chasse l'excès de solvant par capillarité. Par la suite, on procède à la coloration négative de l'échantillon avec de l'acéteate d'uranyl. L'échantillon est alors prêt pour l'observation par microscopie électronique.

2.5 Le traitement enzymatique de la rhodopsine des membranes discales avec la thermolysine

2.5.1 Le traitement enzymatique

Immédiatement après leur purification, les disques sont régénérés (voir section 2.4.1) pour connaître précisément leur contenu en rhodopsine. Par la suite, on procède à la digestion à court terme ou à long terme de la rhodopsine des disques avec de la thermolysine (Cal-biochem Behring). On incube donc les disques avec la thermolysine à un rapport rhodopsine/thermolysine de 12,5/1 (p/p) pendant 5 min (court terme) ou 13 hr (long terme) comme dicté par la méthode de Kühn et Hargrave (1981). Suite à l'arrêt de la digestion avec de l'EDTA, on centrifuge l'échantillon pendant 20 min à 37 000 rpm (50 000 g) (rotor A-321, Damon/IEC Division) pour éliminer l'enzyme soluble dans le

surnageant. On répète alors cette opération deux fois en reprenant le culot avec une solution contenant 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4) et 1 mM de dithiothréitol (Sigma Chem. Co.). On remet ensuite les disques en suspension avec un volume précis de tampon B qui doit être suffisant pour obtenir une concentration de $1,0 \cdot 10^{-5}$ M en rhodopsine. On mesure ensuite les propriétés monomoléculaires de ces disques traités, à court ou long terme, avec la thermolysine (voir section 2.12.2).

2.5.2 L'évaluation du traitement enzymatique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

On vérifie l'efficacité de la digestion enzymatique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (voir section 2.4.5).

2.6 La purification de la G-protéine

La méthode de purification de la G-protéine tire avantage de sa liaison, induite par la lumière, avec la rhodopsine des membranes photoréceptrices et de sa subséquente élution spécifique avec du GTP (Kühn, 1980; Kühn, 1982). On présente donc brièvement la méthode décrite par Kühn (1982).

On détache les SEB (120-150 mg de rhodopsine) par la méthode du tourbillonnement et on les purifie par gradient continu (voir section 2.1). Par la suite, dans le but d'extraire quantitativement les protéines solubles des SEB, on doit provoquer le bris de la membrane

plasmique et, de plus, rompre l'empilement des disques en les séparant les uns des autres. Pour y parvenir, on homogénéise (Broyeur Ten-Broeck, Fisher Sci. Co.) fortement les SEB (0,2 - 0,5 mg de rhodopsine/ml) dans 100 mM de Tris-HCl (pH 7,4) contenant 1 mM de $MgCl_2$ (Fisher Sci. Co.) et 1 mM de dithiothréitol (DTT). Juste avant la centrifugation, on augmente la concentration de $MgCl_2$ jusqu'à 3 mM afin de minimiser les pertes de G-protéine. On centrifuge alors la suspension pendant 30 min à 19 500 rpm (rotor SS-34). On relave ensuite le culot de la même façon. Ces deux lavages sont normalement suffisants pour enlever les protéines solubles telles que la 48 K et la kinase. Après le deuxième lavage, on rince les parois des tubes à centrifuger avec de l'eau pure pour éliminer l'excès de tampon. On remet ensuite le culot en suspension (3 mg de rhodopsine/ml) dans 1 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de DTT. La G-protéine et la phosphodiesterase qui étaient associées à la membrane deviennent alors solubilisées par ce traitement à faible force ionique et à la noirceur. Par la suite, on photolyse la suspension pendant 300 s. On interrompt la photolyse après chaque portion de 100 s pour permettre au filtre coloré de refroidir et pour brasser la suspension. On filtre cette lumière d'une intensité de 660 W m^{-2} avec un filtre de chaleur et un filtre en verre coloré passe-haut ($\lambda = 515 \text{ nm}$; OG-515, Shoot Opt. Glass Inc.). De plus, on maintient la température des SEB à 20°C en plongeant le tube dans un grand bécher d'eau (à 20°C) servant aussi de second filtre de chaleur. On refroidit ensuite les SEB jusqu'à 0°C et on les centrifuge pendant 45 min à 20 000 rpm (rotor SS-34). Ainsi, le surnageant contient la PD pratiquement pure, alors que le culot renferme la G-protéine grâce à sa liaison, induite par la

lumière avec la rhodopsine. Dans le but d'éliminer toute trace de PD, on lave ensuite deux fois le culot avec 5 mM de Tris-HCl (pH 7,4) et 1 mM de DTT (1 mg de rhodopsine/ml). Par la suite, on élue la G-protéine en homogénéisant doucement le culot avec une solution incluant 5 mM de Tris- HCl, 1 mM de DTT et 80 μ M de GTP (Pharmacia Fine Chem.) (3 mg de rhodopsine/ml). Après la centrifugation (79 000 g, 45 min, rotor SB-110), on retrouve donc la G-protéine dans le surnageant.

On concentre la G-protéine par ultrafiltration avec une membrane PM-10 (Diaflo Ultrafilters, Amicon Canada Ltd.). On élimine ensuite l'excès de GTP par chromatographie sur gel de Séphadex G25 (Pharmacia Fine Chem.) à 4°C (colonne de 24 X 1,5 cm) que l'on équilibre avec du Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) contenant 1 mM de DTT (volume de l'échantillon: 2 ml). En mesurant leur spectre d'absorption (350 à 200 nm), on s'aperçoit que les toutes premières fractions (volume de 4 ml chacune) contiennent la G-protéine, alors que le GTP est élué plusieurs fractions plus tard. On peut aussi exclure l'excès de GTP par des cycles de dilution (1/10)/ultrafiltration (PM-10, voir ci-dessus). La mesure des spectres d'absorption avant et pendant le déroulement de cette opération, montre bien que cinq cycles sont suffisants pour atteindre l'exclusion complète du GTP de l'échantillon de G-protéine. On procède ensuite au dosage de la G-protéine par la méthode de Bradford (1976) modifiée par Bio-Rad (Instruction manual, Bio-Rad protein assay). BRIÈVEMENT, on prépare plusieurs dilutions (1 à 25 μ g/ml) d'un étalon de protéines (Protein standard I, Bio-Rad Lab.). On prélève 0,8 ml des étalons, des échantillons et du témoin, auxquels on ajoute 0,2 ml du

réactif concentré (Bio-Rad Lab.). On mélange et après une période d'attente de 5 min, on mesure l'absorbance à 595 nm dans des cellules en plastique (semi-micro, Sarstedt). Ce dosage nous permet d'évaluer le rendement qui varie entre 8 et 12 mg de G-protéine pour 100 mg de rhodopsine et d'ajuster la concentration de G-protéine à 1,0 mg/ml pour les mesures d'adsorption (voir section 2.12.3).

On emmagasine la G-protéine au congélateur dans une solution contenant 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT et 50% (v/v) de glycérol. De cette façon, on peut conserver la protéine pendant des mois sans perte d'activité enzymatique (A. Yamazaki, communication personnelle).

2.7 Les méthodes d'évaluation de la pureté de la G-protéine

2.7.1 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse de la G-protéine se fait comme décrit à la section 2.4.5. Dans nos conditions expérimentales, l'aliquot de 20 μ l doit contenir au moins 40 μ g de G-protéine.

2.7.2 La mesure de l'activité GTPase de la G-protéine

On effectue la mesure de l'activité GTPase de la G-protéine par la détermination du phosphore inorganique (^{32}P) libéré à partir du [$\gamma - ^{32}P$] GTP (New England Nuclear Res. Products), en utilisant

exactement les modifications apportées par Kühn et Hargrave (1981) à la méthode de Neufeld et Levy (1969).

2.8 L'extraction et la purification des phospholipides des SEB

2.8.1 L'extraction des phospholipides des SEB

La méthode utilisée pour extraire les phospholipides des SEB a déjà été décrite en détail (Salesse, 1983); nous présentons donc seulement les modifications apportées à cette méthodologie. Il est important de noter que pour l'extraction et la purification des phospholipides, on utilise des SEB préparés par gradient continu (SEB-TGT, voir section 3.1) ou ceux photolysés lors de la purification de la G-protéine.

Lors de l'extraction, on centrifuge les SEB et les extraits organiques à 10 000 rpm (rotor SS-34) pendant 20 min. On photolyse les SEB avec une lumière filtrée d'une intensité de 660 W m^{-2} (comme décrit dans la section 2.6).

2.8.2 La purification des phospholipides des SEB

Tous les détails de la méthode de purification des phospholipides des SEB ont déjà été publiés (Salesse, 1983; Salesse et al., 1983). On se limitera donc à une description brève orientée vers les modifications apportées à la technique de purification.

2.8.2.1 La chromatographie sur DEAE-cellulose

Lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose (Eastman Kodak), le volume des solvants d'élution varie en fonction de la compacité de la colonne, donc de l'élution plus ou moins rapide des lipides. Voici donc une séquence d'élution plus réaliste: 200 - 300 ml de CHCl₃, 75 ml de CHCl₃/CH₃OH (99/1, v/v), 200 - 300 ml de CHCl₃/CH₃OH (1/1, v/v) (élution de PE et PC), 200 - 300 ml de CHCl₃/CH₃COOH (3/1, v/v) et 200 - 250 ml de CH₃COOH (PS). Il faut cependant exercer beaucoup de vigilance en suivant constamment l'élution par chromatographie sur couche mince (CCM; voir section 2.9.1), puisqu'un trop grand volume d'un solvant donné peut entraîner l'élution pré-maturée d'un phospholipide donné. De plus, la première fraction de CH₃COOH (environ 50 ml) contient généralement des impuretés, alors que les 80 ml suivants comportent plus de 90% de la PS pure.

Lors de l'étape de l'extraction de la PS, on procède à l'évaporation du CHCl₃ avec le roto-évaporateur, alors que celle du CH₃COOH résiduel se fait avec une pompe mécanique (Edwards, Leeson Elec. Corp.) munie d'une trappe à solvants que l'on branche directement au roto-évaporateur. De plus, notons que l'on utilise du NaCl purifié par la méthode décrite dans la section 2.12.2.

2.8.2.2 La chromatographie sur acide silicique

Pour la chromatographie sur acide silicique (J.T. Baker Chem. Co.) - célite (Fisher Sci. Co.), il faut diminuer le rapport phospholipide/adsorbant jusqu'à 3 mg de phospholipides/g d'acide silicique afin de séparer quantitativement la PE et la PC. On obtient cette séparation en procédant à la séquence d'élution suivante dont les volumes varient en fonction de la quantité de BHT, de rétinal et de cholestérol résiduels: 300 - 600 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (98/2, v/v), 200 - 300 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (95/5, v/v), 300 - 400 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (4/1, v/v) (PE) et 300 - 500 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (3/2, v/v) (PC). Comme dans le cas de la DEAE-cellulose, un grand volume de solvant peut entraîner l'élution prématuée d'un phospholipide; il faut donc suivre l'élution par CCM (voir section 2.9.1).

2.9 Les méthodes d'évaluation de la pureté des phospholipides des SEB

2.9.1 La chromatographie sur couche mince

La procédure utilisée pour effectuer la chromatographie sur couche mince des phospholipides, a déjà été publiée (Salesse, 1983; Salesse et al., 1983).

2.9.2 La détermination de la composition en acides gras

On détermine la composition en acides gras en prélevant environ 300 µg de chaque phospholipide et en exécutant la trans-méthylation et la chromatographie en phase gazeuse comme décrit dans la section 2.2.3 et par Salesse et al. (1983), Salesse et al. (1984) et N'Soukpoé-Kossi et al. (1985).

2.9.3 La détermination des coefficients d'extinction molaire

On estime les coefficients d'extinction molaire selon la méthode décrite par Salesse (1983) et N'Soukpoé-Kossi et al. (1985).

2.9.4 La mesure des isothermes de pression de surface

Cette mesure s'effectue comme présentée dans la section 2.12.1 et aussi par Salesse (1983), Salesse et al. (1983), Robert et al. (1983) et Ducharme et al. (1985).

2.10 La purification de la rhodopsine intacte ou hydrolysée

On purifie la rhodopsine par chromatographie d'affinité sur concanavaline A-sépharose 4B en modifiant la méthode de Litman (1982). La concanavaline A est une lectine qui, immobilisée sur une matrice solide (des billes de sépharose 4B), peut lier spécifiquement la rhodopsine puisque celle-ci comporte surtout des hexosaccharides de mannose et de

N-acétylglucosamine (voir section 1.2.2). On élue ensuite la rhodopsine en ajoutant une forte concentration d'un ligand compétiteur pour la lectine.

2.10.1 La préparation de l'échantillon

On purifie la rhodopsine à partir de i) SEB détachés par la méthode du tourbillonnement et préparés par gradient continu (rhodopsine intacte) (voir section 2.1) ou ii) de membranes discales hydrolysées à court terme (rhodopsine hydrolysée) (voir section 2.5). On regénère ensuite la rhodopsine des SEB (~ 50 mg) ou des membranes discales hydrolysées (~ 50 mg) avec du 11-cis rétinal comme décrit dans la section 2.2.1. Par la suite, on sémente les SEB ou les membranes discales hydrolysées (19 000 rpm, 10 min, rotor SS-34) et on solubilise le culot avec 14 ml de tampon C (100 mM de Tris-HCl, pH 7,3, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MnCl₂ (Fisher Sci. Co.), 1 mM de MgCl₂ et 0,5 M de NaCl) contenant 3% (v/v) d'Ammonyx LO (ALO). On centrifuge une autre fois comme décrit ci-dessus pour enlever le matériel non solubilisé dans le détergent.

2.10.2 La chromatographie de la rhodopsine intacte ou hydrolysée

On monte une colonne (Pharmacia Fine Chem.) de 15 X 1,5 cm avec le gel de concanavaline A-sépharose 4B (Sigma Chem. Co.). On conditionne ensuite la colonne avec le tampon C jusqu'à ce que le pH de l'eluat devienne égal à 7,3 (~400 ml). Par la suite, on pompe (Modèle

603, Scientific Industries Inc.), sur la colonne, le surnageant de la centrifugation des SEB solubilisés (ou des membranes discales hydrolysées) (voir section 2.10.1).

On lave ensuite la colonne avec ~ 400 ml de tampon D (Tris-HCl, 50 mM, pH 7,3) contenant 1% (v/v) de ALO à un débit d'environ 0,5 ml/min à 4°C jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm devienne négligeable. On change ensuite de détergent en éluant 100 ml de tampon D incluant, cette fois-ci, 30 mM d'octylglucoside (OG) (Sigma Chem. Co.) à un débit d'environ 0,3 ml/min. En conservant le même débit, on élue la rhodopsine intacte ou hydrolysée en ajoutant 0,45 M de alpha-méthyl-D-mannopyrannoside (Aldrich Chem. Co.) au tampon D contenant 30 mM de OG. On récolte des fractions de 3 ml jusqu'à ce que l'absorbance à 500 nm devienne négligeable en rhodopsine. On regroupe ensuite les fractions en fonction de leur concentration. Par la suite, on exclut le alpha-méthyl-D-mannopyrannoside en dialysant les échantillons de rhodopsine intacte ou hydrolysée pendant 36-48 hr (4°C), contre un volume vingt fois plus grand de tampon D (incluant 30 mM de OG). On change le tampon de dialyse après 18-24 hr. De plus, le milieu de dialyse est constamment barbotté à l'azote.

2.11 Les méthodes d'évaluation de la pureté de la rhodopsine intacte ou hydrolysée

2.11.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption

On évalue la pureté de la rhodopsine intacte ou hydrolysée en mesurant le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ comme décrit dans la section 2.2.1. On connaît le coefficient d'extinction molaire de la rhodopsine à 500 nm ($42\ 000\ 1\ mol^{-1}\ cm^{-1}$, voir section 2.2.1) et celui à 280 nm déterminé théoriquement ($57\ 000\ 1\ mol^{-1}\ cm^{-1}$) en utilisant dix-huit tyrosines (Hargrave et al., 1984) ($\epsilon \sim 1\ 500\ 1\ mol^{-1}\ cm^{-1}$; Sober, 1970) et cinq tryptophanes (Hargrave et al., 1984) ($\epsilon \sim 6\ 000\ 1\ mol^{-1}\ cm^{-1}$; Sober, 1970). On peut ainsi calculer le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ minimal que l'on peut obtenir (i.e. 1,4) et le comparer avec la mesure expérimentale.

2.11.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine

On sait maintenant que l'on peut caractériser une préparation de membranes photoréceptrices par son nombre de phospholipides par rhodopsine (voir les sections 2.2.2, 2.4.2, 3.1.2 et 3.2.2). De la même façon, on peut définir la pureté de la rhodopsine intacte ou hydrolysée par le nombre de phospholipides par rhodopsine. Ainsi, moins il y a de phospholipides associés à la rhodopsine purifiée, plus elle est pure. Cependant, la méthode décrite dans la section 2.2.2 n'est pas assez sensible puisqu'elle nécessiterait l'utilisation de 30 à 40 mg de

rhodopsine (pour un rapport de un phospholipide/ cinq rhodopsines) pour chaque dosage du phosphore. Donc, pour un seul dosage, on utiliserait la majeure partie de la rhodopsine purifiée, puisque le rendement d'une purification de 50 mg est de 70-80%. Nous avons donc mis au point une micro-méthode de dosage du phosphore en modifiant celle de Chen et al. (1956).

On prépare une solution étalon de phosphore (100 mg de phosphore/0,1 ml) à partir d'une solution mère (Sigma Chem. Co.). On pré-lève ensuite sept étalons de 200-1 400 ng de phosphore. Pour les échantillons, on doit utiliser 1,5 à 3,0 mg de rhodopsine intacte ou hydrolysée pour un rapport de phospholipide/rhodopsine variant de 1/5 à 1/10. Il est évident que l'on doit connaître précisément la concentration en rhodopsine par la mesure du ΔA_{500} (voir section 2.11.1). On évapore ensuite complètement le solvant des échantillons, des étalons et du témoin en les chauffant à 120°C pendant toute une nuit. Par la suite, on ajoute, respectivement, aux étalons, au témoin et aux échantillons, 65 (0,84 N), 65 (0,84 N) et 75 μ l (1,0 N) d'un mélange d'acide sulfurique et d'acide perchlorique (40/25, v/v). La concentration en acide est extrêmement critique dans cette micro-méthode de dosage du phosphore. En effet, nous avons confirmé l'étude de Chen et al. (1956) montrant que, à une concentration en acide en deçà de 0,6 N, l'acide ascorbique, même en absence de phosphore, réduit le molybdate d'ammonium et colore fortement la solution. Par contre, au-dessus de 1,0 N, le molybdate d'ammonium n'est pas réduit, même en présence de phosphore. Donc, il faut travailler entre 0,6 et 1,0 N d'acide pour que l'absorbance soit

proportionnelle à la concentration. Cependant, il est absolument essentiel d'ajouter une quantité substantielle d'acide aux échantillons de phospholipides, puisqu'une certaine portion de cet acide sert à hydrolyser les phospholipides et ne contribue donc pas à l'acidité de la solution.

Par la suite, on chauffe les échantillons, les étalons et le témoin à 210°C pendant environ deux heures. Puis, on ajoute 1,0 ml de chacune des deux solutions suivantes: 0,5% (p/v) de molybdate d'ammonium (Fisher Sci. Co.) et 2% (p/v) d'acide ascorbique (Fisher Sci. Co.). On les incube ensuite à 37°C pendant 90 min et on mesure leur absorbance respective à 825 nm.

2.11.3 La mesure des isothermes de pression de surface

La méthode pour mesurer les isothermes de pression de surface de la rhodopsine, est présentée dans la section 2.12.2.

2.11.4 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

On procède à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la rhodopsine intacte ou hydrolysée comme décrit pour les membranes disciales (voir section 2.4.5).

2.12 La mesure des isothermes de pression de surface

On mesure toutes les isothermes de pression de surface par la

méthode de Langmuir en utilisant de l'eau pure. Les bains de Langmuir utilisés ont été décrits en détail par Munger (1979). On a modifié le système de détection de la pression de surface en utilisant un transducteur magnétique linéaire(modèle 24 DCDT, Hewlett-Packard). Donc, le déplacement du flotteur crée une variation de potentiel à l'intérieur du transducteur. Ainsi, dans le calcul de la pression de surface, on doit remplacer la valeur de l'angle par la mesure du voltage,

$$P = V S. \quad (1)$$

où P est la pression de surface (mN/m), V le voltage (V) et S la sensibilité ($\text{mN/V}\cdot\text{m}$). Il est donc évident que dans l'équation servant à déterminer la sensibilité (Munger, 1979), on doit remplacer, là aussi, l'angle par le voltage. Cependant, dans la mesure de l'angle, on ramène le flotteur à sa position originale, alors qu'en utilisant le transducteur, on ne peut effectuer cette manipulation. On doit donc apporter la correction suivante à l'équation servant à calculer l'aire moléculaire (A , $\text{\AA}^2/\text{molécule}$),

$$\frac{[D + (C E)] L}{n} \quad (2)$$

où D représente la distance (cm) entre la barrière mobile et le flotteur, à laquelle on ajoute la correction, $C E$ (cm), où C est la pente

(cm/V) du graphique du déplacement du flotteur (cm) en fonction du voltage (V) du transducteur et E le voltage (V) du transducteur à la distance donnée, D. De plus, L correspond à la largeur (cm) du bain de Langmuir et n le nombre de molécules étalées (molécules). On peut consulter d'autres ouvrages (Munger, 1979; Salesse, 1983) pour plus de détails concernant la compression des molécules et le calcul des résultats.

2.12.1 Les phospholipides

Les phospholipides saturés ont été étalés avec le mélange n-hexane/éthanol (9/1, v/v) alors que l'on a utilisé le benzène pour les phospholipides insaturés.

Toutes les isothermes ont été mesurées avec une sous-phase contenant du tampon phosphate de 10^{-3} M à pH 7,2 (Fisher Sci. Co.), sous atmosphère d'azote. La vitesse de compression des phospholipides insaturés est de $4,7 \text{ \AA}^2/\text{molécule}\cdot\text{min}$ et de $2,8 \text{ \AA}^2/\text{molécule}\cdot\text{min}$ pour les phospholipides saturés.

2.12.2 La rhodopsine intacte ou hydrolysée et les membranes discates intactes ou traitées avec la thermolysine

On étale les membranes discales intactes ou traitées et la rhodopsine intacte ou hydrolysée à l'interface azote-eau par une méthode modifiée de Trurnit (1960). Parmi les différentes méthodes modifiées

mises à l'essai, la plus efficace consiste à étaler $\sim 100 \mu\text{l}$ de ca. $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de membranes discales intactes ou traitées (en termes de rhodopsine régénérée) ou de ca. $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de rhodopsine intacte ou hydrolysée le long d'une tige de verre. Cette tige de verre doit avoir une forme cylindrique (5 X 25 mm) dont le tiers supérieur est aminci (3 mm de diamètre) et le bout arrondi. La portion supérieure de cette tige doit dépasser le niveau d'eau du bain par au moins 3 mm. De plus, la figure 7a montre comment cette tige de verre se rattache au prisme. Après l'étalement, on rince la tige avec 200 μl d'eau pure et on l'enlève immédiatement. Il est important de noter qu'on remise les tiges de verre dans de l'eau pure dont on les retire juste avant utilisation.

Comme démontré par Pattus et al. (1981), la sous-phase doit contenir 0,1 M de NaCl pour obtenir un rendement élevé lors de l'étalement de membranes biologiques. En accord avec ces auteurs, à plus faible force ionique, on obtient des rendements très faibles et non reproductibles lors de l'étalement des membranes discales intactes ou traitées et de la rhodopsine intacte ou hydrolysée. Notre sous-phase se compose donc de tampon phosphate 10^{-3} M (pH 7,2) contenant 0,1 M de NaCl.

Le NaCl contient des impuretés que l'on doit éliminer avant de procéder aux mesures des propriétés interfaciales. On lave donc une solution saturée de NaCl en procédant à huit extractions avec du CHCl₃ à raison de 20% (v/v) du volume de NaCl. On chauffe ensuite la solution de NaCl pour faire évaporer le CHCl₃ résiduel. Après refroidissement,

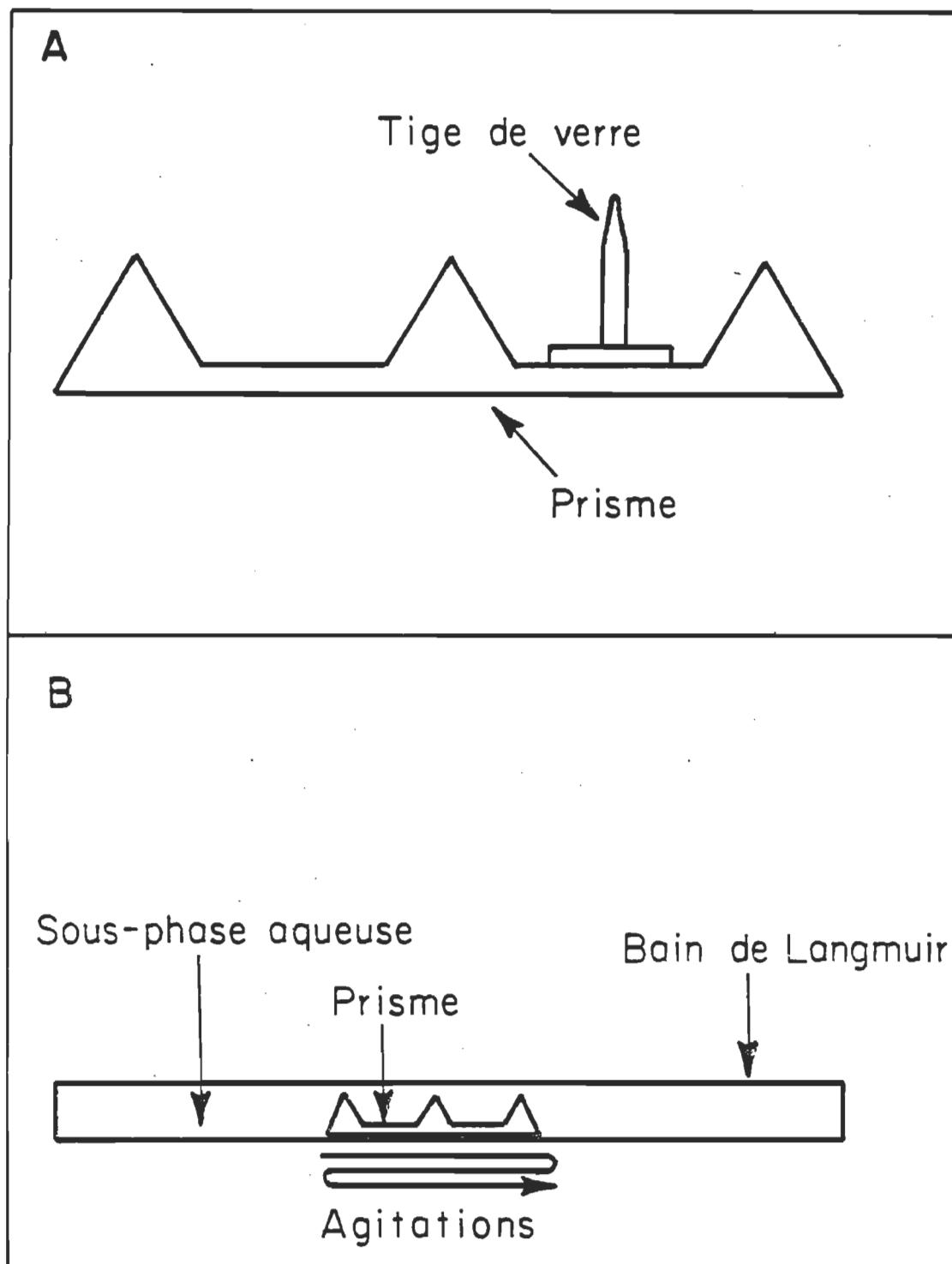


Figure 7. A: Schéma du prisme et du système d'étalement (vue de côté).
 B: Schéma du prisme dans le bain de Langmuir (vue de côté).

on détermine la concentration de la solution de NaCl en mesurant son indice de réfraction que l'on compare avec une courbe d'étalonnage.

Après l'étalement, on débute immédiatement la compression pour exercer une pression latérale sur la rhodopsine, le plus rapidement possible. On arrête la compression à 2 mN/m et on procède à l'agitation de la sous-phase avec le prisme (voir figures 7a et 7b). Après dix agitations, on décompresse la monocouche de rhodopsine intacte ou hydrolysée, de membranes discales intactes ou traitées jusqu'à une pression de surface nulle. On recommence ensuite la compression de la monocouche. On compresse la rhodopsine intacte ou hydrolysée et les membranes discales intactes ou traitées à une vitesse de $250 \text{ \AA}^2/\text{molécule} \cdot \text{min}$ et $350 \text{ \AA}^2/\text{molécule} \cdot \text{min}$, respectivement.

2.12.3 L'adsorption de la G-protéine

La mesure de l'adsorption d'une protéine soluble sur une monocouche de phospholipides peut se faire de différentes façons. Nous effectuons cette mesure pendant la compression et la décompression du film.

Suite à l'étalement (voir section 2.12.1) d'un phospholipide des SEB, on comprime le film jusqu'à 20 mN/m. Par la suite, on injecte, dans la sous-phase, 1,0 mg de G-protéine (le volume du bain de Langmuir est environ égal à $1\ 500 \text{ cm}^3$ avec un rapport surface/volume de 0,5). Cette injection se fait, si possible, de chaque côté du bain en

déplaçant l'aiguille le long de la bordure du bain de Langmuir. On procède ensuite à dix agitations de la sous-phase en utilisant un prisme. Comme on peut le voir en figure 7b, ce prisme a la particularité, tout en homogénéisant la sous-phase, de forcer la protéine à se rapprocher de l'interface et ainsi, à augmenter les probabilités d'interaction, dans un délai plus court, avec la monocouche de phospholipides. On décompresse ensuite le film jusqu'à pression de surface nulle et on recomprime immédiatement jusqu'au collapse (région du "close-packed"). Toutes les isothermes ont été mesurées avec une sous-phase contenant du tampon phosphate (10^{-3} M, pH 7,2) et 10^{-1} M de NaCl purifié (voir section 2.12.2). Toutes les autres conditions expérimentales sont décrites dans la section 2.12.1.

2.13 La mesure des isothermes de potentiel de surface

On mesure les isothermes de potentiel de surface simultanément aux isothermes de pression de surface. Donc, les conditions expérimentales exprimées dans la section 2.12 s'appliquent aussi dans ce type de mesure. On effectue cette mesure en positionnant une électrode de ^{241}Am (Nuclear Radiation Development) à 2-3 mm au-dessus de l'interface et une électrode de référence en platine derrière le flotteur.

2.14 La mesure des isothermes ellipsométriques

On mesure les isothermes ellipsométriques simultanément aux isothermes de pression et de potentiel de surface. Donc, les conditions

expérimentales décrites dans la section 2.12 prévalent aussi pour cette mesure. Par ailleurs, le bain de Langmuir et l'ellipsomètre sont décrits en détail dans la thèse de M. Daniel Ducharme (1986). On ne traitera donc pas de cet aspect technique de la méthode. Cependant, la figure 8 présente un diagramme de l'ellipsomètre afin de permettre au lecteur de mieux comprendre les trois sections suivantes.

2.14.1 Le principe de la méthode

L'ellipsométrie est une méthode qui permet de mesurer le changement de l'état de polarisation de la lumière suite à sa réflexion sur un milieu transparent.

Plus précisément, la lumière produite par la source lumineuse (laser He-Ne, voir figure 8) est rendue circulaire par une lame quart-d'onde placée à la sortie de ce faisceau (non-montrée). Par la suite, on polarise linéairement (polariseur, voir figure 8) ce faisceau incident et puis, elliptiquement, avec une seconde lame quart-d'onde. La surface réfléchissante (eau, bain de Langmuir) modifie ensuite l'état de polarisation de la lumière incidente. Ainsi, en gardant fixe l'azimuth de la lame quart-d'onde, on peut varier l'azimuth du polariseur pour obtenir une lumière réfléchie polarisée linéairement. De cette façon, l'analyseur peut éteindre cette lumière réfléchie.

L'ellipsométrie, à intensité nulle, est donc basée sur la recherche d'azimuths du polariseur, de la lame quart-d'onde et de

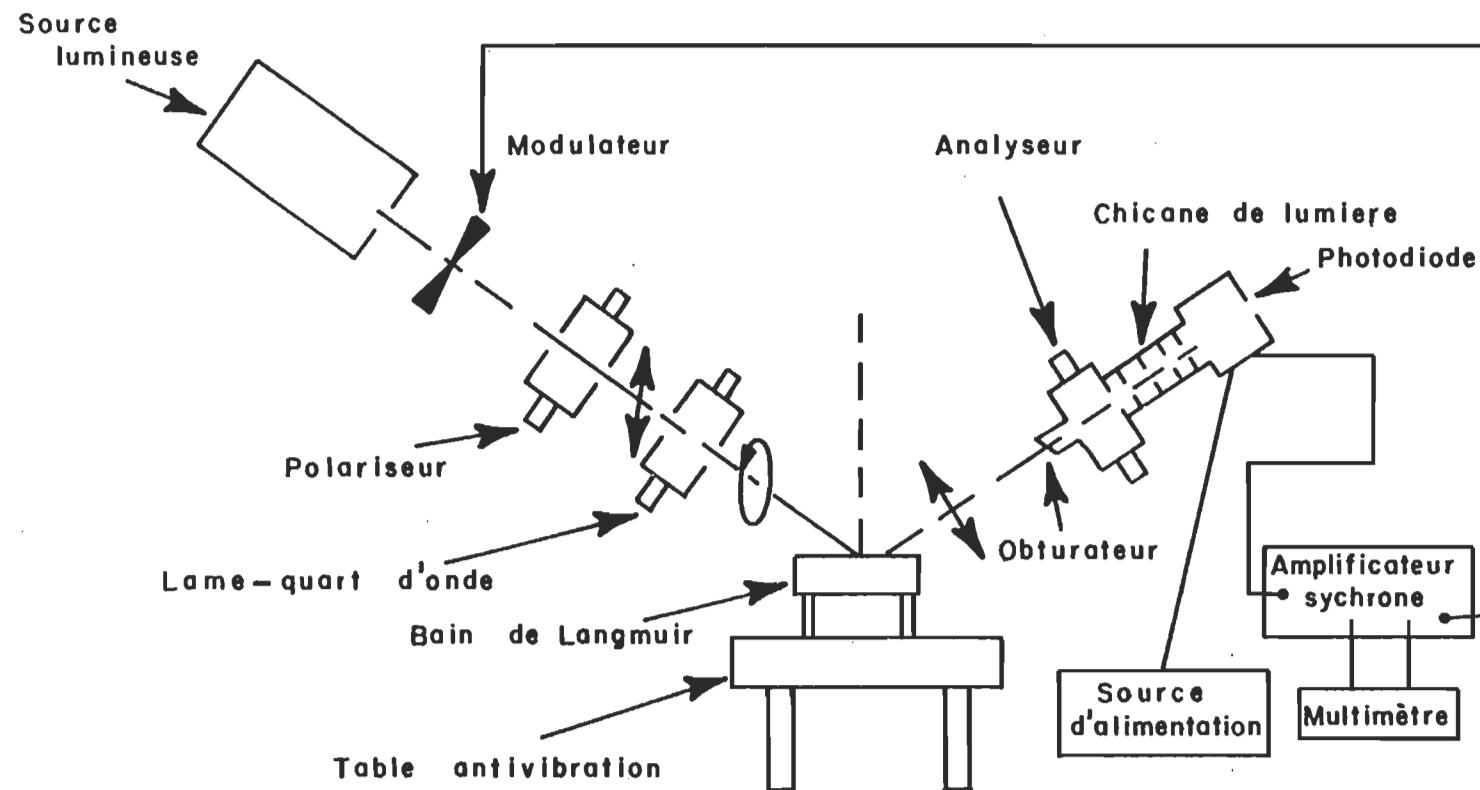


Figure 8. Diagramme de l'ellipsomètre.

l'analyseur, pour lesquels l'intensité de la lumière du faisceau réfléchi, détecté par la photodiode (voir figure 8), est minimale. Les positions de ces composantes optiques à l'extinction, définissent le changement d'ellipticité produit par la surface réfléchissante. Sur une surface propre, isotrope et non absorbante, ce changement est fonction de divers paramètres (voir équation 3, section 2.14.2).

2.14.2 L'aspect théorique

En remplaçant les coefficients de réflexion de Fresnel dans l'équation fondamentale en ellipsométrie (Engelsen et Koning, 1974a), il est possible de démontrer que pour un film mince, le seul paramètre ellipsométrique pertinent, $\delta\Delta$, est donné par l'expression suivante après avoir séparé la partie réelle de la partie imaginaire (Engelsen et Koning, 1974b),

$$\delta\Delta = \Delta - \bar{\Delta} = - \left(\frac{4\pi d}{\lambda} \right) \left[\frac{\sin \phi_0 \tan \phi_0 n_0}{1 - \left(\frac{n_0}{n_2} \right)^2 \tan^2 \phi_0} \right] \left[\frac{\frac{n_x^2 - n_2^2}{n_0^2 - n_2^2}}{\frac{n_2^2 - n_0^2}{n_0^2 - n_2^2}} \right] \left[1 - \frac{n_0^2}{\alpha_3 n_x^2} \right] \quad (3)$$

$$\alpha_3 = \left(\frac{n_z^2}{n_x^2} \right) \left(\frac{\frac{n_x^2 - n_2^2}{n_0^2 - n_2^2}}{\frac{n_z^2 - n_2^2}{n_0^2 - n_2^2}} \right)$$

où Δ et $\bar{\Delta}$ représentent, respectivement, le changement de phase relatif introduit par la réflexion sur le film et sur la sous-phase, d , l'épaisseur du film, λ , la longueur d'onde, ϕ_0 , l'angle d'incidence, n_0 et

n_2 sont, respectivement, les indices de réfraction du milieu incident et de la sous-phase, n_x et n_z représentent, respectivement, les indices de réfraction du film parallèle et perpendiculaire à l'axe optique (ou, respectivement, perpendiculaire et parallèle à la surface).

Le développement mathématique de cette équation est présenté en détail dans la thèse de M. Daniel Ducharme (1986).

2.14.3 La mesure ellipsométrique

La mesure ellipsométrique implique l'ajustement du polariseur pour polariser linéairement le faisceau réfléchi. Par la suite, l'ajustement de l'analyseur amène l'extinction presque complète du faisceau réfléchi. Les mesures expérimentales correspondent à la position d'extinction ($^\circ$) de P, le polariseur, et de A, l'analyseur. On détermine l'azimuth de l'analyseur et du polariseur à l'extinction dans deux zones (McCrackin, 1970) que l'on nomme, P_1 et A_1 dans la première zone, P_2 et A_2 dans la deuxième zone. Les paramètres ellipsométriques Δ et ψ sont reliés aux positions de l'analyseur et du polariseur par les relations suivantes (McCrackin, 1970),

$$\Delta = 180^\circ - (P_1 + P_2) \quad (4)$$

$$\psi = 90^\circ - \frac{A_2 - A_1}{2} \quad (5)$$

Une mesure expérimentale consiste en deux étapes, i.e. la détermination de $\bar{\psi}$ et $\bar{\Delta}$ pour la sous-phase et en présence du film (ψ et Δ). On procède à cette mesure à différentes aires moléculaires. Chaque mesure prend environ 12 min à effectuer et une isotherme environ 4 hr. Il est important de noter que pour des films minces qui n'absorbent pas la lumière, les seuls paramètres ellipsométriques applicables sont $\delta\Delta = \Delta - \bar{\Delta}$ (voir équation 3) puisque, dans ce cas-ci, les valeurs de ψ ne varient pas.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 L'évaluation des critères de pureté pour les segments externes des bâtonnets

La purification des SEB résulte en plusieurs fractions dont on doit analyser la pureté. On obtient la première fraction après le cycle de flottation/sédimentation (SEB-FS). La purification subséquente de ces SEB-FS par un gradient tamponné de concentration de sucrose, résulte en deux bandes (les bandes I et II, SEB-GT) que l'on retrouve à des densités de 1,12 et 1,14 g/ml, contenant 74 et 26% de la rhodopsine, respectivement. Il est important de noter que le changement du tampon Hepes pour le tampon Tris-HCl, n'amène aucune modification de la position ni de la composition des bandes. Lorsque l'on ne tamponne pas le gradient (gradient non tamponné), on sépare encore les SEB-FS en deux bandes (les bandes I et II, SEB-GNT). Cependant, la bande I, dans le haut du gradient (densité de 1,11 g/ml), ne contient plus que 28% de la rhodopsine alors que la bande II, localisée à une densité de 1,13 g/ml, comporte 72% de la rhodopsine. Les SEB détachés par la méthode du tourbillonnement produisent une bande principale dans le gradient tamponné (SEB-TGT) à une densité de 1,14 g/ml. De façon occasionnelle, on retrouve aussi, dans la partie supérieure du gradient, une faible bande ne comportant pas plus que 4% de la rhodopsine.

La quantité de rhodopsine contenue dans les différentes fractions correspond à un rendement de 0,95 mg de rhodopsine/rétine pour les SEB-FS et 0,85 à 0,90 mg de rhodopsine/rétine pour les SEB-GT, -GNT et -TGT.

3.1.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption

On présente, dans le tableau 2, les valeurs des rapports $A_{280}/\Delta A_{500}$ pour les différentes fractions. On remarque que la plus basse valeur reproductible de 1,85 correspond à la bande II des SEB-GNT alors que la bande II des SEB-GT montre une valeur aussi élevée que 9,4. De plus, il est important de remarquer que les SEB-FS exhibent aussi une valeur de 1,85.

Par ailleurs, le spectre 3 de la figure 6a correspond à des SEB emmagasinés à 4°C dont l'absorbance à 280 nm est immanquablement plus faible que celle des SEB solubilisés immédiatement après leur incubation à 37°C (spectre 1, figure 6a). Ainsi, on peut voir que l'entreposage à 4°C pendant au moins une heure, avant leur solubilisation dans le détergent, diminue de 25% l'absorbance à 280 nm des SEB incubés à 37°C. De plus, si on calcule le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ en utilisant l'absorbance à 280 nm de l'échantillon refroidi, les meilleures préparations de SEB montrent un rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ de 1,44. Il est évident que cette valeur est nettement en deçà des plus basses données expérimentales déterminées jusqu'à maintenant.

Tableau 2

LA PURETÉ OPTIQUE ET LE CONTENU EN PHOSPHOLIPIDES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DES SEB

	SEB-FS	SEB-GT		SEB-GNT		SEB-TGT
		BANDE I	BANDE II	BANDE I	BANDE II	
% total de rhodopsine	100	74	26	28	72	100
$A_{280}/\Delta A_{500}$	$1,85 \pm 0,05$	2,4	9,4	$2,25 \pm 0,05$	$1,85 \pm 0,05$	1,9
Moles de phospholipides/ mol de rhodopsine	132 ± 2	77	287	89 ± 2	71 ± 2	65
Nombre de préparations	2	2	2	3	3	2

3.1.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine

On présente aussi, dans le tableau 2, le nombre de moles de phospholipides par mol de rhodopsine pour les différentes fractions des SEB. Ainsi, on voit que les SEB-GT (bande I), les SEB-GNT (bande II) et les SEB-TGT comportent les plus basses valeurs (77, 71 et 65, respectivement). De plus, deux fractions ayant des caractéristiques spectrales identiques ($A_{280}/\Delta A_{500} = 1,85$), les SEB-FS et les SEB-GNT (bande II), présentent presque 100% de différence quant à leur contenu en phospholipides.

3.1.3 La détermination de la composition en acides gras

Le tableau 3 montre la composition en acides gras des différentes fractions des SEB. Dans toutes les fractions, l'acide docosahexaénoïque (22:6ω3) est le plus important. Comme on peut le prévoir à partir du tableau 2, les fractions des SEB ayant le plus bas rapport de phospholipides par rhodopsine, comportent aussi le pourcentage le plus élevé en acide docosahexaénoïque et en acides gras polyinsaturés.

3.1.4 La mesure des isothermes de pression de surface

En figure 9, on présente les isothermes de pression de surface de quelques fractions des SEB. On exprime les isothermes en termes de pression de surface en fonction de l'aire par molécule de rhodopsine. Ces courbes représentent une moyenne de trois différentes mesures faites

Tableau 3

LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS (POIDS %) DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DES SEB

	SEB-FS	SEB-GT		SEB-GNT		SEB-TGT
		BANDE I	BANDE II	BANDE I	BANDE II	
16:0	15,3	14,0	18,9	13,6	13,6	13,0
16:1	1,9	0,2	1,2	1,5	0,4	0,2
18:0	17,8	19,4	22,9	18,0	19,2	19,0
18:1w9	6,5	3,5	10,6	4,7	3,5	3,1
18:2w6	1,2	0,9	0,7	0,9	0,7	0,7
20:3w6	1,0	0,7	0,7	0,9	0,6	0,7
20:4w6	5,3	4,6	6,0	4,4	4,0	5,1
22:4w6	1,9	2,1	5,7	1,8	1,3	2,1
22:5w6	1,8	2,3	2,5	1,6	1,2	2,5
22:5w3	1,9	1,7	1,4	2,3	1,9	1,7
22:6w3	33,8	43,7	24,6	39,4	47,8	45,0
24:4	1,4	2,4	1,5	1,7	1,4	3,1
24:5	2,2	2,3	0,7	2,3	2,7	2,8
% AGPI	50,5	60,3	43,8	55,3	61,6	63,7
% Inconnu	8,0	2,2	2,6	6,9	1,7	1,0

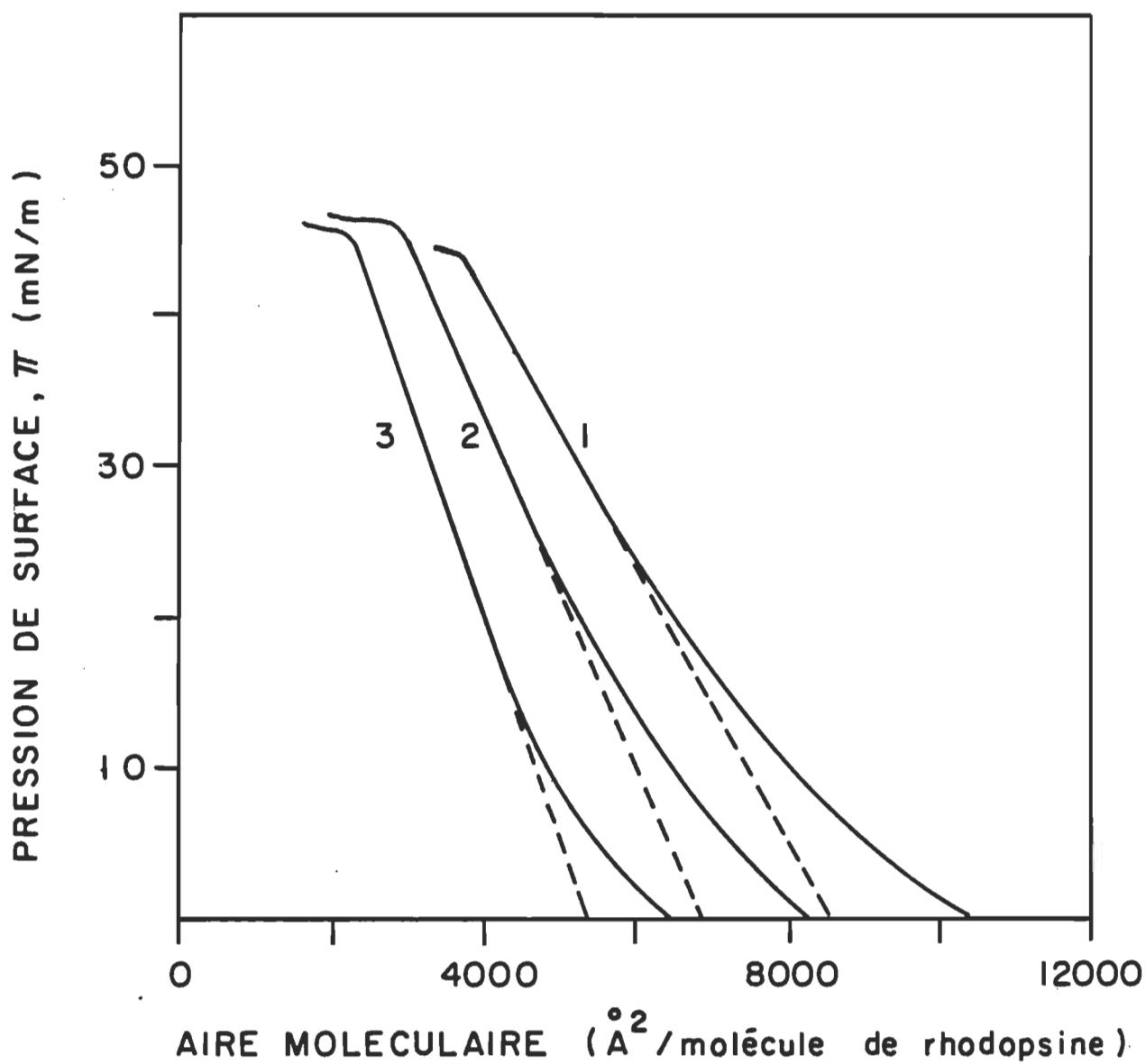


Figure 9. L'isotherme de pression de surface des SEB-FS (courbe 1), des SEB-GNT bande I (courbe 2) et des SEB-GNT bande II (courbe 3) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

indépendamment à partir de deux préparations différentes. La forme générale des isothermes est caractéristique d'une monocouche dans une phase liquide expansé. On note la même observation dans le cas des isothermes de pression de surface de PE, PC et PS des SEB (voir figures 21, 22 et 23) (Robert et al., 1983; Salesse, 1983; Salesse et al., 1983; Ducharme et al., 1985). La courbe 1 correspond aux SEB-FS et les courbes 2 et 3 aux SEB-GNT (bandes I et II, respectivement). Toutes les isothermes présentent un *collapse* ("close-packed region") autour de 45 mN/m. Cependant, l'aire limite extrapolée (ligne pointillée) diffère passablement d'une fraction à l'autre. On observe, respectivement, pour les SEB-FS, les bandes I et II des SEB-GNT, une aire limite apparente de $8\ 600 \pm 1\ 000$, $6\ 800 \pm 1\ 000$ et $5\ 400 \pm 500\ \text{\AA}^2/\text{molécule de rhodopsine}$. Cette surface correspond à l'aire occupée par une molécule de rhodopsine entourée par ses phospholipides. Les membranes des SEB forment des monocouches très stables puisqu'on peut compresser et décompresser ces monocouches trois fois (durant 2 hr) sans changement significatif de l'aire limite apparente. L'incertitude relativement élevée de l'aire limite apparente ne peut être reliée au manque de reproductibilité de ces mesures. Pour un échantillon donné, on observe une précision meilleure que $\pm 200\ \text{\AA}^2$ ($\pm 4\%$). On note une plus grande variation lorsque l'on compare différentes préparations.

3.2 L'évaluation de la pureté et de l'intégrité des membranes discales intactes

La méthode originale de Smith et al. (1975) et Smith et Litman (1982), suggère la purification des membranes discales à partir de SEB

purifiés uniquement par deux flottations sur sucre (45% et 40% de sucre, respectivement). Ces SEB ont une pureté équivalente aux SEB-FS (voir section 3.1). Nous avons donc comparé la pureté de ces membranes discales (MEMB-FS) avec celle de membranes discales purifiées à partir de SEB-TGT (voir section 2.3), i.e. les MEMB-F (voir ci-dessous).

Par ailleurs, la membrane plasmique et les membranes discales comportent, respectivement, 6 et 94% de toutes les membranes des SEB (Kamps et al., 1982). Cependant, lors de la purification des membranes discales, on retrouve toujours un culot dans le 5% de Ficoll (voir section 2.3) qui comprend beaucoup plus que le pourcentage donné de membrane plasmique (6%). Ainsi, pour comprendre l'origine de ce surplus de membranes dans le culot, nous avons évalué la pureté des membranes du culot (MEMB-C) et de celles flottant sur Ficoll (MEMB-F).

Nous avons donc évalué la pureté des MEMB-F, des MEMB-C et des MEMB-FS avec les trois critères de pureté suivants: la spectroscopie d'absorption, la détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine et la composition en acides gras (Salesse et al., 1986c). De plus, on a aussi estimé la pureté des MEMB-F par leur isotherme de pression de surface et leur contenu en protéines (électrophorèse sur gel de polyacrylamide), puisque ces membranes sont celles utilisées pour effectuer les mesures biophysiques. Plus encore, on a vérifié l'intégrité de ces MEMB-F par microscopie électronique.

3.2.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption

On présente, dans le tableau 4, les valeurs des rapports $A_{280}/\Delta A_{500}$ pour les MEMB-F, les MEMB-C et les MEMB-FS. Les MEMB-F, les MEMB-C et les MEMB-FS montrent, de façon reproductible, des rapports $A_{280}/\Delta A_{500}$ similaires. Il est important de noter que la régénérabilité (voir section 2.2.1) de l'opsine des MEMB-F et des MEMB-C est de 95% alors que celle des MEMB-FS est égale à 91%. Les MEMB-F et les MEMB-C comportent, respectivement, 80 et 20% de toute la rhodopsine.

3.2.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine

On présente aussi dans le tableau 4 le nombre de phospholipides par rhodopsine pour les MEMB-F, les MEMB-C et les MEMB-FS. Ainsi, on voit qu'il n'y a pas de différence significative entre la valeur des MEMB-F et celle des MEMB-C. Par contre, on note une valeur beaucoup plus élevée pour les MEMB-FS. Il est important de noter que le nombre de phospholipides par rhodopsine des MEMB-F et des MEMB-C est similaire aux meilleures préparations de SEB (voir section 3.1.2).

3.2.3 La détermination de la composition en acides gras

Le tableau 5 montre la composition en acides gras des différentes fractions de la purification des membranes discales. Comme pour les SEB, le 22:6 ω 3 représente l'acide gras le plus important. De plus, on s'aperçoit que les MEMB-F et les MEMB-C qui comportent un rapport

Tableau 4

LA PURETÉ OPTIQUE ET LE CONTENU EN PHOSPHOLIPIDES DES DIFFÉRENTES
 FRACTIONS DE LA PURIFICATION DES MEMBRANES DISCALES

	MEMB-F	MEMB-C	MEMB-FS
% total de rhodopsine	80 ± 5	20 ± 5	---
$A_{280} / \Delta A_{500}$	1,90 ± 0,05	2,00 ± 0,10	2,10 ± 0,05
Moles de phospholipides/ mol de rhodopsine	68 ± 4	72 ± 3	107 ± 3
Nombre de préparations	4	4	2

Tableau 5

LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS (POIDS %) DES DIFFÉRENTES FRACTIONS DE LA
PURIFICATION DES MEMBRANES DISCALES

	MEMB-F	MEMB-C	MEMB-FS
16:0	12,6	15,3	15,6
16:1	0,2	0,2	0,2
18:0	18,4	18,5	19,9
18:1 ω 9	3,5	3,9	5,6
18:2 ω 6	0,6	0,9	0,9
20:3 ω 6	1,1	0,7	0,9
20:4 ω 6	3,8	4,1	5,4
22:4 ω 6	2,3	2,0	2,2
22:5 ω 6	2,0	1,7	2,4
22:5 ω 3	2,4	2,0	1,8
22:6 ω 3	48,9	45,7	36,8
24:4	0,9	2,7	2,4
24:5	2,6	2,2	1,6
% AGPI	64,6	62,0	54,4
% Inconnu	0,7	0,2	4,3

phospholipide/rhodopsine semblable, présentent aussi une composition en acides gras similaire. Les MEMB-FS se distinguent par leur plus faible contenu en 22:6ω3, ce que l'on pouvait prévoir à partir de leur rapport phospholipide/rhodopsine (tableau 4).

3.2.4 La mesure des isothermes de pression de surface

Ce critère de pureté est utilisé uniquement pour caractériser la pureté des MEMB-F d'une préparation à l'autre. On présente l'isotherme de pression de surface des membranes discales dans la section 3.8.3 (figure 27).

3.2.5 L'estimation qualitative du contenu en protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La figure 12 montre l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de membranes discales intactes (MD) et traitées à long terme (LT) (voir section 3.3). Ainsi, on peut voir, pour les MD, une bande inférieure très intense et une bande supérieure très faible que l'on attribue, respectivement, à la rhodopsine et au dimère de rhodopsine. On sait que la rhodopsine a tendance à s'agréger après solubilisation dans le SDS (De Grip, 1982) et que cette tendance augmente si on incube l'échantillon (voir section 2.4.5) avant l'électrophorèse (Albert et Litman, 1978).

3.2.6 L'évaluation de l'intégrité par microscopie électronique

On présente, en figure 10, une photographie des MEMB-F par microscopie électronique (agrandissement de 13 200). Ainsi, on peut voir que, par le choc osmotique, les membranes discales prennent la forme d'une sphère et semblent intactes. Ce résultat confirme celui de Smith et al. (1975) et Smith et Litman (1982).

3.3 L'évaluation du traitement enzymatique de la rhodopsine des membranes discales

Nous avons procédé à l'hydrolyse enzymatique, à court et à long terme de la rhodopsine des membranes discales. Il est important de noter que ces membranes discales ont la même pureté que les MEMB-F (voir section 3.2). La figure 11 montre l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la rhodopsine intacte (RI) et des membranes discales traitées à court terme (CT). Les deux premières migrations (RI) correspondent à la rhodopsine intacte (voir section 3.6.4) et les trois suivantes (CT), aux membranes discales traitées à court terme. On s'aperçoit que la rhodopsine des membranes discales CT migre plus rapidement que la rhodopsine intacte (RI) (bande CT plus basse que RI). Cela s'explique par le fait que la digestion à court terme enlève les douze derniers acides aminés (no. 336-348, voir figure 2) du carboxyle terminal de la rhodopsine (Hargrave et Fong, 1977; Hargrave et al., 1980; Kühn et Hargrave, 1981; Hargrave, 1982; Kühn et al., 1982; Kühn, 1984). Cependant, comme l'ont démontré Hargrave et Fong (1977), Hargrave (1982) et Kühn et al.

Figure 10. Photographie de membranes discales par microscopie électronique (agrandissement de 13 200).

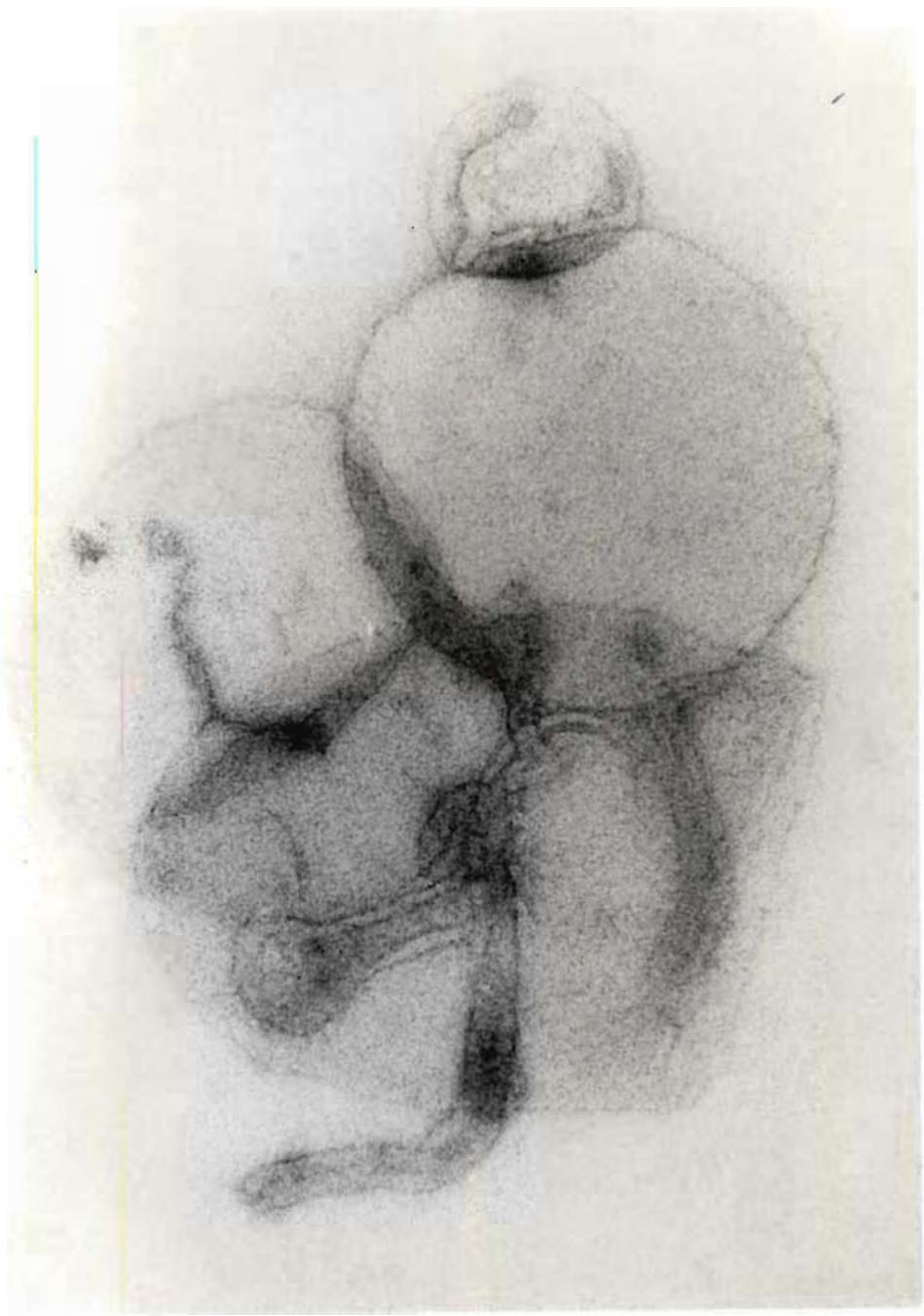
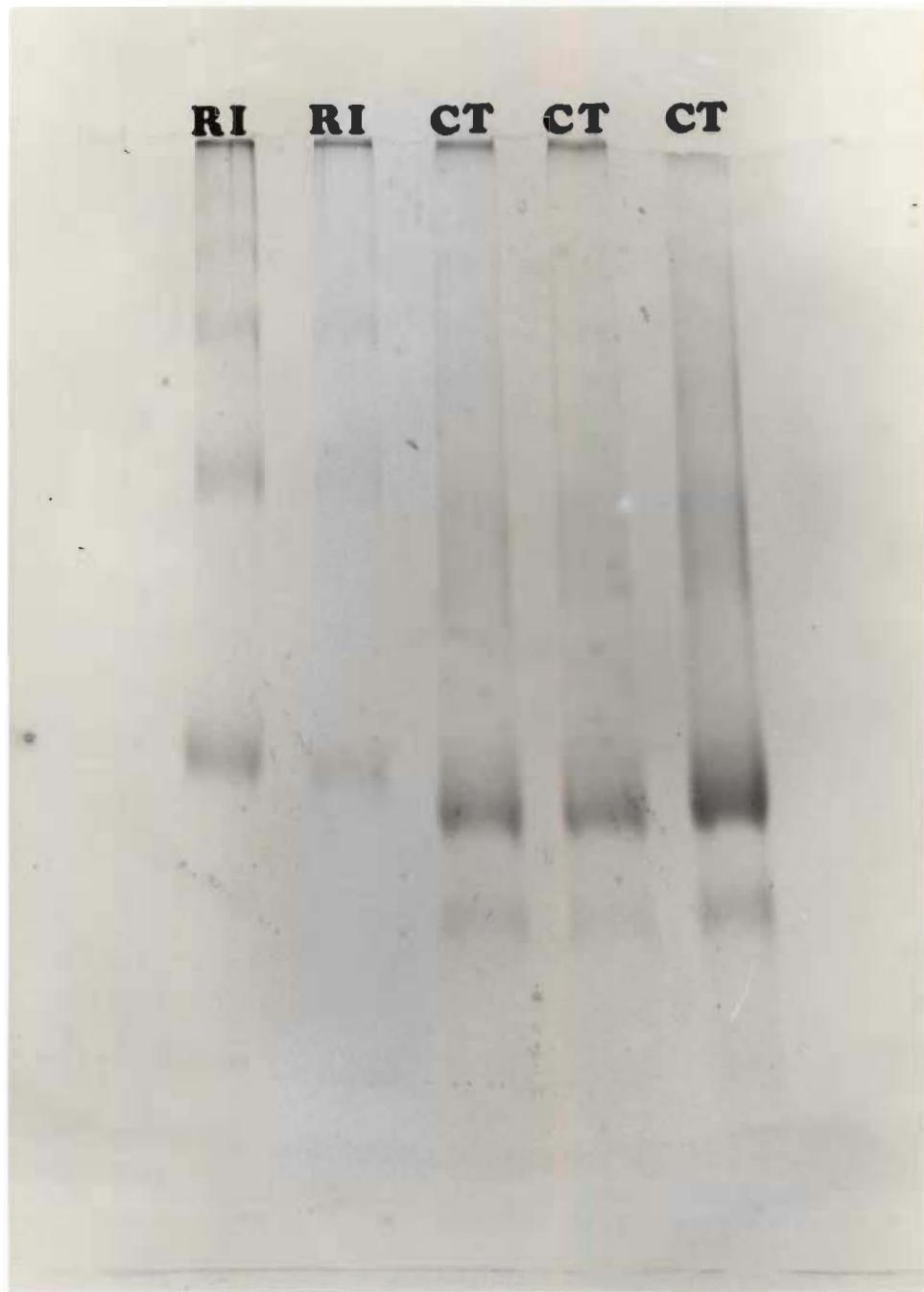


Figure 11. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la rhodopsine intacte (RI) et des membranes discales traitées à court terme (CT).



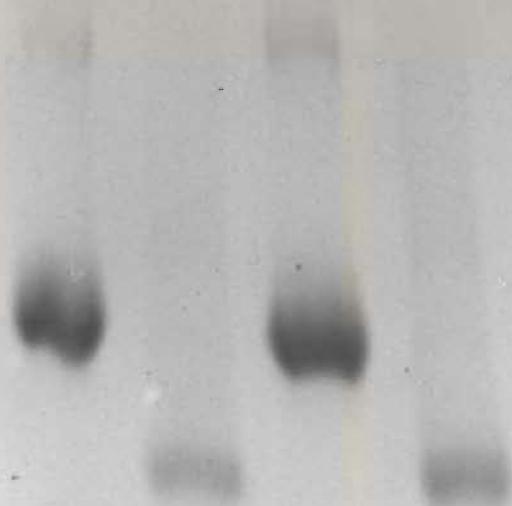
(1982), le patron d'électrophorèse des membranes discales CT semble montrer une diminution de poids moléculaire de $\sim 5\ 000$ d alors que le changement réel du poids moléculaire pour la perte de douze acides aminés n'est que de 1 200 d. Il faut noter que la position relative de la rhodopsine des membranes discales CT par rapport à la rhodopsine intacte (RI) correspond bien aux mesures de Hargrave et Fong (1977) et Kühn et Hargrave (1981). Par ailleurs, on retrouve aussi une faible deuxième bande dans les migrations de CT (en dessous de la bande principale). Cette bande provient du fait que nous avons procédé au traitement enzymatique pendant 15 min au lieu de 5 min comme prescrit (voir section 2.5.1). Nous avons allongé le traitement puisque ces 5 min n'étaient pas suffisantes pour hydrolyser toute la rhodopsine (résultat non montré, voir Kühn et Hargrave, 1981). Cependant, ce traitement pendant 15 min a provoqué l'apparition de cette faible deuxième bande. On attribue cette bande au début de l'hydrolyse à long terme (voir la correspondance avec la bande principale de LT, figure 12; voir Kühn et Hargrave, 1981).

La figure 12 présente le patron de l'électrophorèse des membranes discales intactes (MD, voir section 3.2.5) et traitées à long terme (LT). Comme on peut le voir, le traitement à long terme (13 hr, voir section 2.5.1) avec la thermolysine enlève les vingt et un derniers acides aminés du carboxyle terminal (no. 328-348, voir figure 2) et sépare la boucle reliant les hélices alpha 5 et 6 (entre les acides aminés 240 et 241, voir figure 2), du côté cytoplasmique (Hargrave et al., 1982). Ce clivage produit deux gros fragments associés de façon non-covalente et liés à la membrane, que l'on appelle F_1 et F_2 (résidus 1-420 et

Figure 12. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de membranes discates intactes (MD) et traitées à long terme (LT).

MD LT MD LT

J



241-327, respectivement) (Pober et Stryer, 1975; Hargrave et Fong, 1977; Kühn et Hargrave, 1981; Hargrave, 1982; Kühn, 1984). La bande principale des membranes discales LT (figure 12) correspond donc au fragment F_1 , alors que cette photographie (figure 12) ne montre pas très bien la bande F_2 située un peu plus bas. Nos résultats reproduisent ceux obtenus par Pober et Stryer (1975) et Kühn et Hargrave (1981).

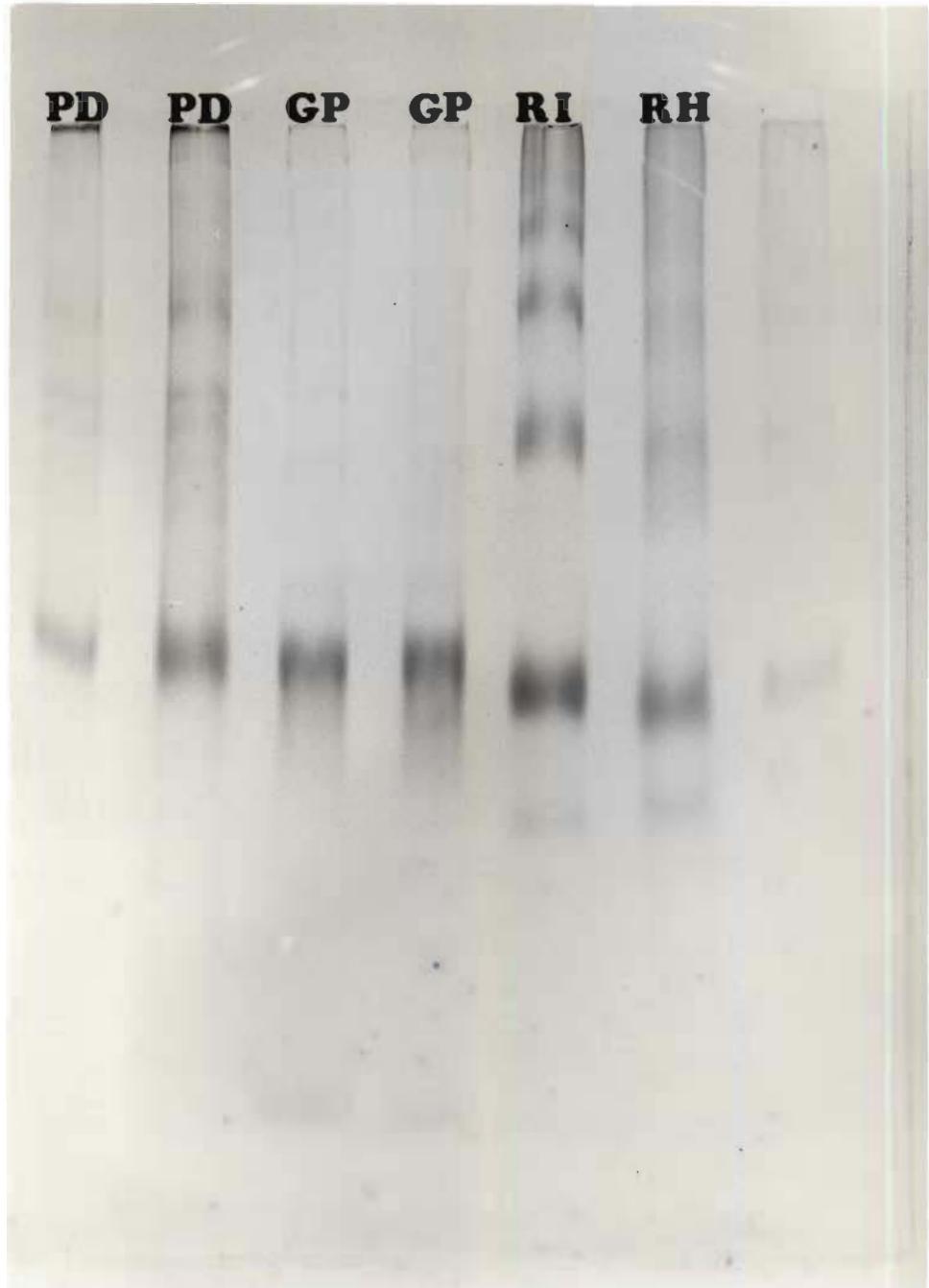
3.4 L'évaluation de la pureté de la G-protéine

3.4.1 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la G-protéine (GP, figure 13) montre une seule bande comprenant les polypeptides de 37-40 kd (GP_α) et 35-37 kd (GP_β) qui lui sont caractéristiques (Kühn, 1980; Fung et al., 1981). De plus, comme montré par Kühn (1980) et Kühn (1984), la rhodopsine intacte (RI, figure 13, voir section 3.6.4) migre plus rapidement (bande plus basse) que les sous-unités GP_α et GP_β . Cette figure montre aussi que, lors de la purification de la G-protéine, i.e. avant son élution avec le GTP (voir section 2.6), on obtient des fractions contenant de la G-protéine et d'autres protéines (PD). Cependant, la G-protéine purifiée (GP) (éluée avec le GTP) ne montre aucune contamination par d'autres protéines. Par ailleurs, la sous-unité GP_γ de 6-10 kd (Kühn, 1980; Fung et al., 1981) migre avec le front de solvant dans les gels. Par contre, il est possible de visualiser cette sous-unité en effectuant l'électrophorèse selon la méthode de Swank et Munkres (1971).

Figure 13. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la phosphodiestérase (PD), la G-protéine (GP), la rhodopsine intacte (RI) et la rhodopsine hydrolysée (RH).

PD **PD** **GP** **GP** **RI** **RH**



3.4.2 La mesure de l'activité GTPase

On obtient une valeur de 39 p mol de P_i /min à 30°C/10 μ l de surnageant. Cette valeur reproduit celles mesurées par Kühn (1980) et Kühn et Hargrave (1981). Cette mesure a été faite pour trois des cinq purifications de G-protéine, avec une reproductibilité de $\pm 5\%$.

3.5 L'évaluation de la pureté des phospholipides des SEB

On caractérise la pureté des phospholipides des SEB à l'aide de quatre critères. Les résultats de ces critères ont déjà fait l'objet de mon mémoire de maîtrise (Salesse, 1983) et de plusieurs publications (Robert et al., 1983; Salesse et al., 1983; N'Soukpoé-Kossi et al., 1985; Ducharme et al., 1985). On se limitera donc, dans cette section, à référer à la littérature en faisant des commentaires, s'il y a lieu.

3.5.1 La chromatographie sur couche mince

Les résultats de ce critère de pureté ont déjà été publiés en détail par Salesse (1983) et Salesse et al. (1983).

3.5.2 La détermination de la composition en acides gras

La composition en acides gras de chacun des phospholipides des SEB a été publiée par Salesse (1983), Salesse et al. (1983) et N'Soukpoé-Kossi et al. (1985). Le pourcentage de 22:6 ω 3 de chacun des

phospholipides, rapporté par N'Soukpoé-Kossi et al. (1985) est plus élevé que celui présenté par Salesse (1983) et Salesse et al. (1983). Cela s'explique facilement puisque les SEB ont été purifiés, dans un cas (N'Soukpoé-Kossi et al., 1985), par gradient continu (SEB-TGT, voir section 2.1.2) et dans l'autre cas (Salesse, 1983; Salesse et al., 1983), par flottation sur sucre (SEB-FS, voir section 2.1.1). On a démontré (Salesse et al., 1984; voir sections 3.1 et 4.1) que les SEB-FS représentaient une purification grossière à comparer aux SEB-TGT.

3.5.3 La détermination des coefficients d'extinction molaire

Les coefficients d'extinction molaire de la PE, la PC et la PS des SEB sont présentés par Salesse (1983) et N'Soukpoé-Kossi et al. (1985).

3.5.4 La mesure des isothermes de pression de surface

On montre les isothermes de pression de surface de la PE, la PC et la PS des SEB dans les figures 21, 22 et 23 (voir section 3.8.1) et aussi dans les publications suivantes: Robert et al. (1983), Salesse (1983), Salesse et al. (1983) et Ducharme et al. (1985).

3.6 L'évaluation de la pureté de la rhodopsine intacte ou hydrolysée

3.6.1 L'analyse par spectroscopie d'absorption

Le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ de toutes les fractions de rhodopsine

purifiée, intacte ou hydrolysée, varie de 1,66 à 1,70. Ce rapport, qui est significativement plus élevé que le rapport théorique (1,4; voir section 2.11.1), est quand même la plus basse valeur obtenue dans la littérature avec l'octyl glucoside.

3.6.2 La détermination du nombre de phospholipides par rhodopsine

La rhodopsine intacte et la rhodopsine hydrolysée ne comprennent pas plus que un phospholipide pour dix rhodopsines. Ce résultat corrobore la mesure de Jackson et Litman (1985) qui utilisent le même détergent (OG) et une méthode de purification dont nous nous sommes fortement inspirés (voir section 2.10) (Litman, 1982).

3.6.3 La mesure des isothermes de pression de surface

Les isothermes de pression de surface de la rhodopsine intacte et de la rhodopsine hydrolysée sont présentées dans la section 3.8.2.

3.6.4 L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La figure 14 présente le patron d'électrophorèse de la rhodopsine intacte (RI) et de la rhodopsine hydrolysée (RH). Comme dans le cas des membranes discales hydrolysées à court terme (CT, figure 11) par rapport aux membranes discales intactes (MD, figure 12), on se rend compte que la rhodopsine hydrolysée (RH) migre plus rapidement que la

Figure 14. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la rhodopsine intacte (RI) et la rhodopsine hydrolysée (RH).

RI RI RH RH

rhodopsine intacte (RI) (bande de RH plus basse que celle de RI). Cette similitude dans leur comportement était prévisible puisque la RH est purifiée à partir de membranes discales hydrolysées à court terme (voir section 2.10). Donc, comme exprimé dans la section 3.3, la RH migre plus rapidement parce qu'elle compte 12 acides aminés de moins que la RI (figure 11).

Par ailleurs, on avait noté, pour les membranes discales intactes (voir section 3.2.5, figure 12), la présence de dimères de rhodopsine. On note en figure 14 que la rhodopsine intacte (RI), comporte, en plus de la bande du dimère, une bande pour le trimère et une faible bande pour le tétramère de rhodopsine. De Grip (1982) a clairement démontré que la purification de la rhodopsine augmente, encore plus, sa tendance à s'agréger après solubilisation dans le SDS. C'est donc pour cette raison que la rhodopsine purifiée (RI, figure 14), s'agrège de façon plus marquée que la rhodopsine des membranes discales (MD, figure 12). De plus, il faut noter que la RH ne montre pas (RH, figure 14) ou peu (RH, figure 13) de tendances à s'agréger.

3.7 La caractérisation de la mesure ellipsométrique

Pour bien comprendre cette section, il faut commencer par définir les différents états physiques qui caractérisent les molécules utilisées.

On dit d'un phospholipide qu'il est dans l'état liquide cristallin, lorsqu'il se trouve à une température plus élevée que sa température de transition de phase. Dans cet état, les chaînes ont une assez grande liberté de changement conformationnel. Par ailleurs, lorsque ce même phospholipide se trouve à une température plus basse que sa température de transition de phase, on dit qu'il est dans l'état gel. Dans l'état gel, les chaînes grasses ont une liberté de mouvement beaucoup plus restreinte que dans l'état liquide cristallin. Ce formalisme est utilisé surtout lorsqu'on travaille en calorimétrie différentielle à balayage. En monocouche, on a adopté un formalisme différent. On appelle, liquide expansé, l'état physique correspondant à l'état liquide cristallin et, solide condensé, l'état gel. De plus, durant la compression, un phospholipide donné peut passer de l'état liquide expansé à solide condensé par le biais d'un état appelé transition de phase. Il existe aussi, en monocouche, un état que l'on dit gazeux, parce que les molécules sont très diluées à l'interface azote-eau (pour voir des schémas de ces différents états physiques, consulter Albrecht et al., 1978).

3.7.1 La mesure des propriétés de surface d'une série homologue de phospholipides saturés

Les figures 15, 16, 17 et 18 présentent respectivement les isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique des phosphatidylcholines suivantes: DMPC, DPPC, DSPC et DAPC (de poids moléculaire égal à 677,6, 734, 801,1 et 846,3, respectivement). Ces

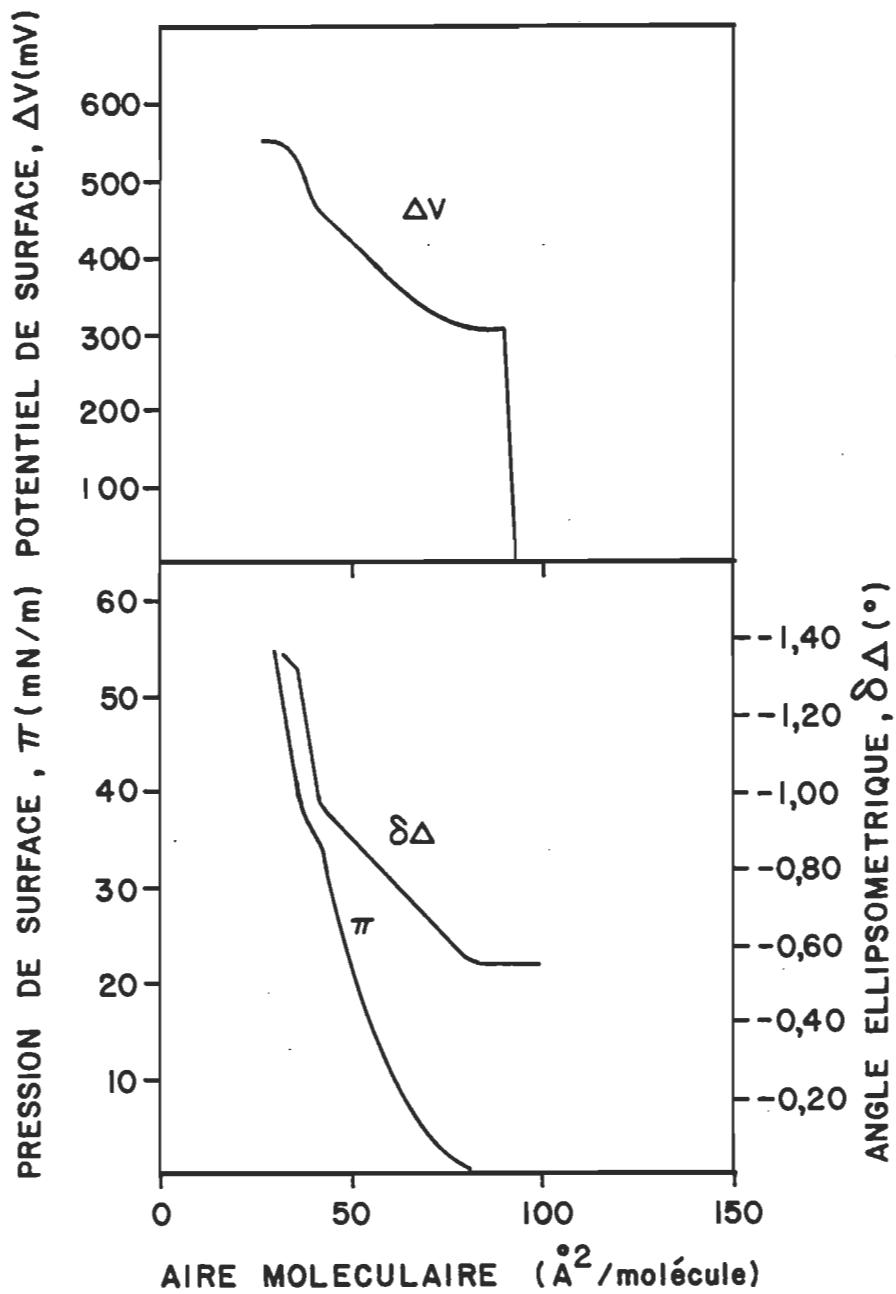


Figure 15. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DMPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $17,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$.

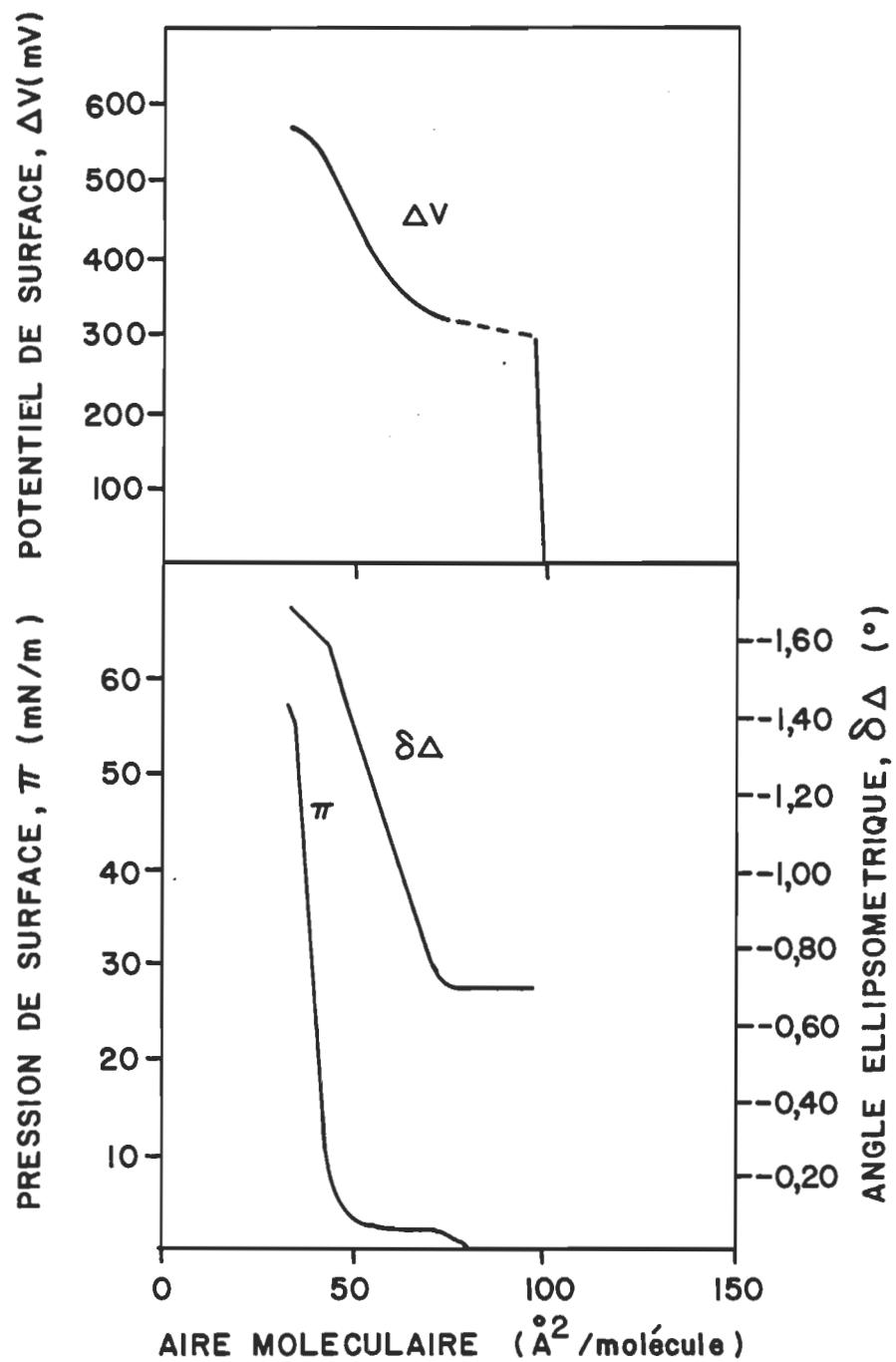


Figure 16. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DPPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $17,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$.

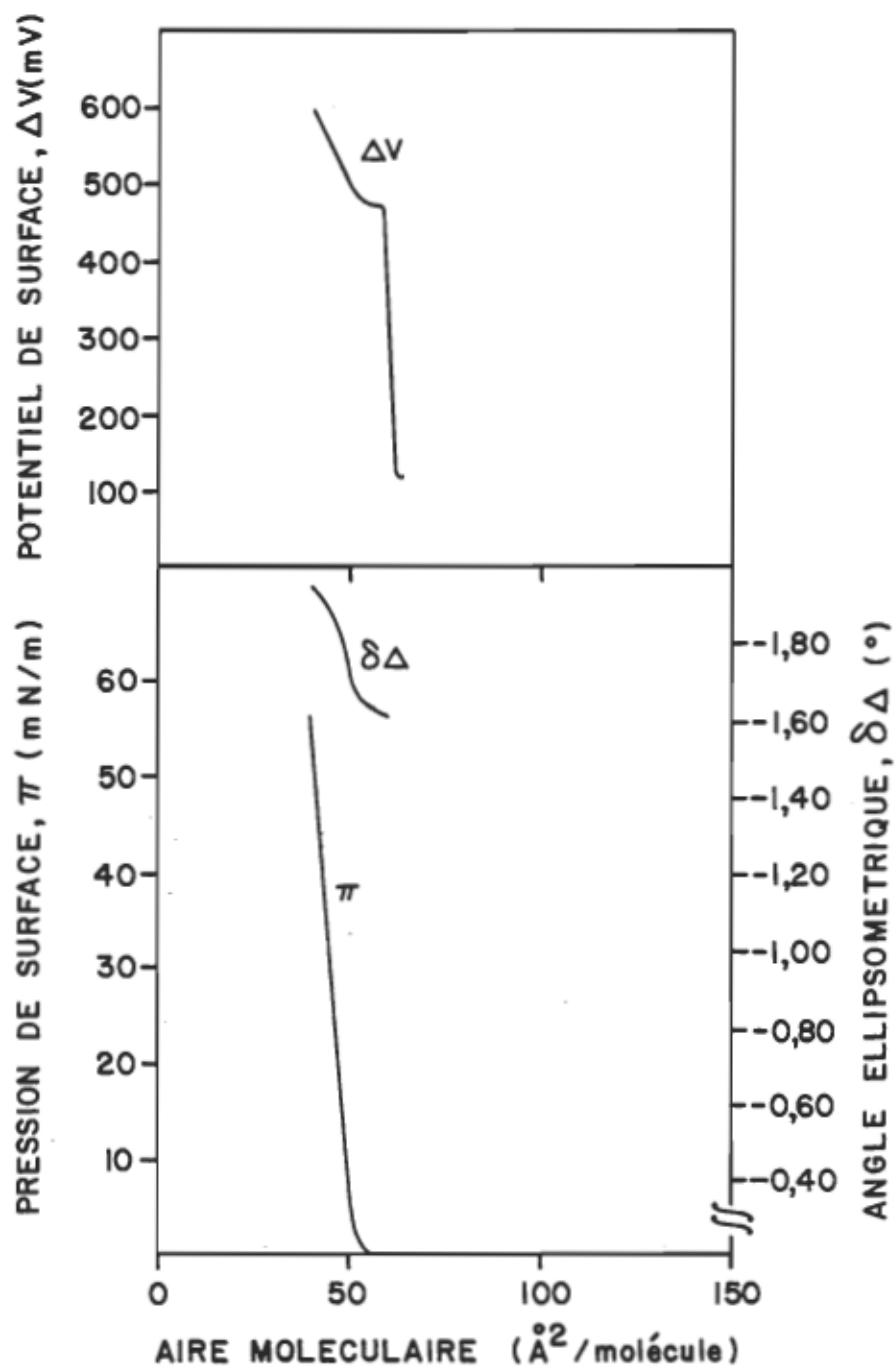


Figure 17. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DSPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $18,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

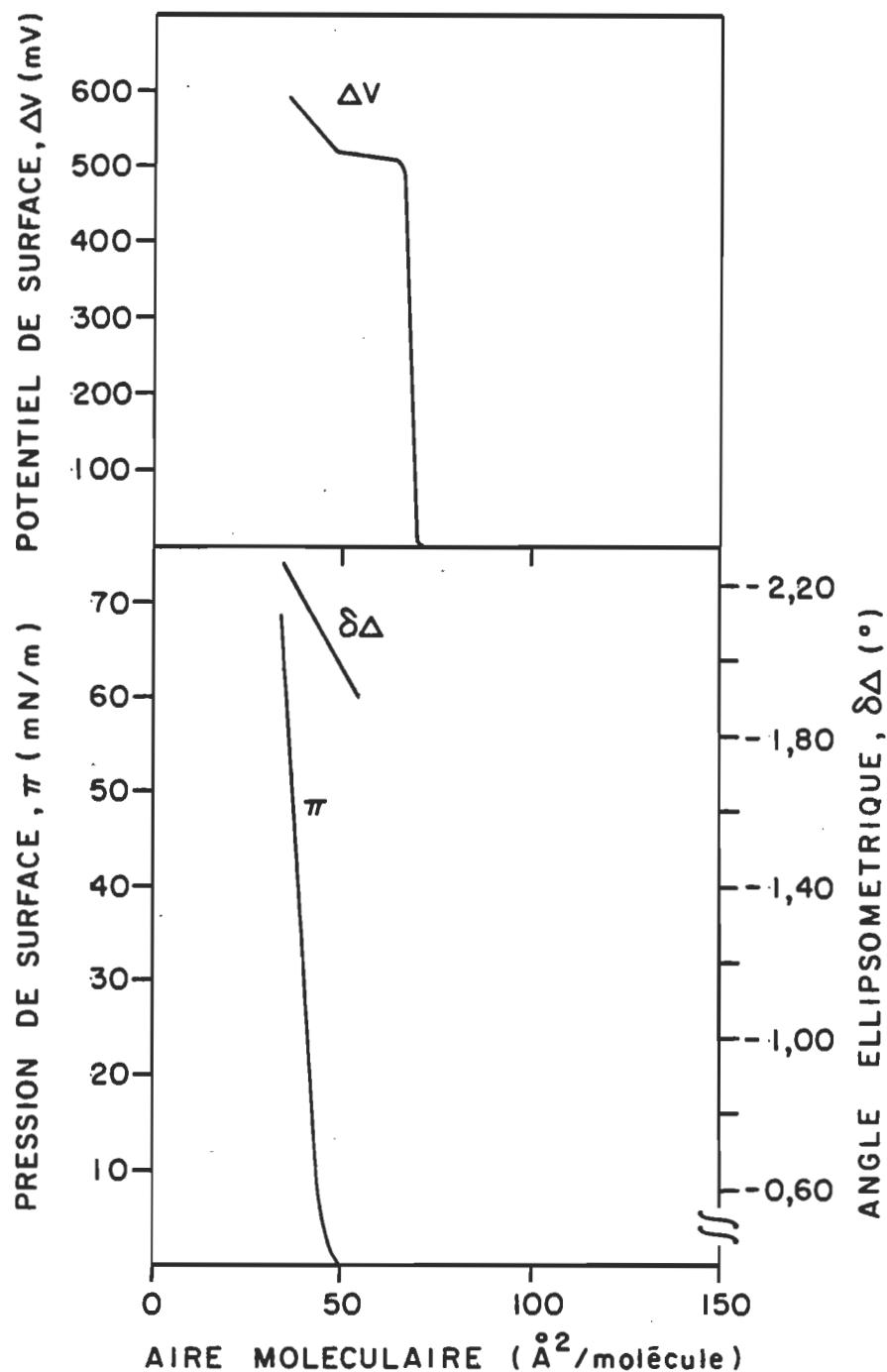


Figure 18. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DAPC à l'interface air-eau. La température est maintenue à $16,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$.

isothermes représentent le résultat moyen d'au moins six mesures indépendantes faites avec au moins trois solutions différentes de chaque composé.

Une des particularités les plus saisissantes de la méthode des monocouches, c'est la possibilité d'induire une transition de phase en appliquant une pression de surface sur la monocouche. On peut noter ce phénomène en observant les isothermes de pression de surface de la DMPC et de la DPPC (voir figures 15 et 16). Par contre, ce phénomène est possible seulement lorsque la température de transition de phase du phospholipide, n'est pas trop élevée par rapport à la température à laquelle on travaille. Par conséquent, la température élevée de transition de phase de la DSPC ($> 50^{\circ}\text{C}$) et de la DAPC ($> 60^{\circ}\text{C}$), par rapport à celle de la DMPC (25°C) et de la DPPC (42°C), ne nous permettent pas d'observer leur transition de phase (DSPC et DAPC) à $\sim 17^{\circ}\text{C}$. Ainsi, comme le montrent les figures 17 et 18, la DSPC et la DPAC se trouvent dans l'état solide condensé du début jusqu'à la fin de l'isotherme.

En observant la figure 15 et le tableau 6, on s'aperçoit que les trois isothermes (π , $\delta\Delta$ et ΔV) de la DMPC montrent qu'elle passe d'un état physique liquide expansé à solide condensé. De plus, un fait encore plus surprenant, c'est que ce passage d'un état physique à l'autre prend place à peu près à la même aire moléculaire pour les trois isothermes. Ainsi, de l'état liquide expansé ($82-42 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$), la DMPC subit ensuite une transition de phase ($42-35 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) jusqu'à l'état solide condensé ($35-31 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Il est important de noter

Tableau 6

LA VARIATION DE L'AIRE MOLÉCULAIRE (ΔA), DE L'ANGLE ELLIPSOMÉTRIQUE ($\delta\Delta$) ET DU POTENTIEL DE SURFACE (ΔV)
POUR LES DIFFÉRENTS ÉTATS PHYSIQUES DES PHOSPHOLIPIDES SATURÉS.

	ΔA			$ \delta\Delta $			ΔV		
	$(\text{Å}^2/\text{molécule})$			$(^\circ)$			(mV)		
	LE*	TP	SC	LE	TP	SC	LE	TP	SC
DMPC	82-42	42-35	35-31	0,55-0,96	0,96-1,32	1,32-1,37	310-470	470-535	535-550
DPPC	80-71	71-46	46-33	0,64	0,64-1,58	1,58-1,68	300-350	350-550	550-575
DSPC			55-40			1,58-1,95			475-600
DAPC			50-33			1,90-2,25			525-600

*LE (liquide expansé)

TP (transition de phase)

SC (solide condensé)

les observations expérimentales suivantes: i) une mesure stable en ellipsométrie et en potentiel de surface est détectée avant la mesure de pression de surface, ii) l'angle ellipsométrique montre un plateau au début de l'isotherme tout comme le potentiel de surface, iii) lors de la transition de phase, on note une variation importante et linéaire de l'angle ellipsométrique (- 0,96 à - 1,32°) pour une faible variation de l'aire moléculaire ($7 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Par ailleurs, il est difficile de comparer notre isotherme de pression de surface avec celles de la littérature, puisque la forme de l'isotherme varie beaucoup avec la température. Cependant, on peut tenter de comparer notre isotherme avec celles de Albrecht et al. (1978) puisqu'ils ont fait la mesure à six températures différentes, dont l'une se situe au-dessus (18,3°C) et une autre au-dessous (15,8°C) de notre température de mesure (17,2°C). Les deux isothermes de Albrecht et al. (1978) débutent à $93 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ comparativement à $82 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour notre isotherme. De plus, la pression de surface du début de la transition de phase de notre isotherme à 17,2°C (35 mN/m) est plus élevée que celle de Albrecht et al. (1978) à 18,3°C (30 mN/m), alors que cette valeur devrait augmenter avec la température.

Notre DMPC (Sigma Chem. Co.) est pure à 99,9% (par chromatographie en phase gazeuse, CPG; voir section 2.9.2) et montre un seul spot en chromatographie sur couche mince (CCM). Albrecht et al. (1978) ont purifié leur DMPC par CCM et vérifié sa pureté uniquement par cette méthode. Donc, tous ces résultats expérimentaux nous permettent de supposer que notre DMPC est plus pure que celle de Albrecht et al. (1978).

Comme dans le cas de la DMPC, la figure 16 et le tableau 6 nous montrent que les isothermes de la DPPC (π , $\delta\Delta$ et ΔV) passent de l'état liquide expansé à solide condensé, par le biais d'une transition de phase, à des aires moléculaires similaires pour les trois isothermes. Il est important de noter les observations expérimentales suivantes: i) une mesure stable en ellipsométrie et en potentiel de surface est détectée, tout comme la DMPC, avant la mesure de pression de surface, ii) l'angle ellipsométrique montre un plateau au début de l'isotherme, iii) la transition de phase montre une très grande variation linéaire de l'angle ellipsométrique (- 0,64 à - 1,58°) pour une variation assez importante de l'aire moléculaire (74 à 43 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$). On a tenté de comparer notre isotherme de pression de surface avec celles de Hui et al. (1975) et de Albrecht et al. (1978). Leur isotherme de pression de surface débute à 87 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ (15,5 et 19,0°C; Hui et al., 1975) et à 92 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ (12,5 et 20,5°C; Albrecht et al., 1978) comparativement à 80 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ (17,2°C) pour notre isotherme. Même si ces isothermes sont mesurées à des températures différentes, elles devraient toutes débuter à la même aire moléculaire. Ces deux auteurs ont vérifié la pureté de leur DPPC uniquement par chromatographie sur couche mince. Par contre, la pureté de notre DPPC (Sigma Chem. Co.) a été vérifiée par CPG (pureté de 99,8%) et par chromatographie sur couche mince (un seul spot). Nos résultats expérimentaux nous permettent de supposer que notre DPPC est la plus pure.

Les trois isothermes (π , $\delta\Delta$ et ΔV) de la DSPC montrent que, à cette température (18,0°C), elle se trouve dans l'état solide condensé

du début jusqu'à la fin de l'isotherme (voir figure 17 et tableau 6). De plus, on peut noter que, au début de l'isotherme, la valeur de l'angle ellipsométrique de la DSPC ($-1,58^\circ$) est beaucoup plus élevée que dans le cas de la DMPC ($-0,55^\circ$) et de la DPPC ($-0,64^\circ$). Notre DSPC (Serdary Res. Co.) contient 98,5% de 18:0 (CPG) et montre un seul spot en CCM. De plus, notre isotherme de pression de surface reproduit très bien celles de Demel et al. (1967), Phillips et Chapman (1968), Phillips et al. (1970) et Demel et al. (1972).

L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DAPC (figure 18 et tableau 6) montrent les mêmes caractéristiques que pour la DSPC. La DAPC qui se trouve dans l'état solide condensé, montre une valeur de $\delta\Delta$, au début de l'isotherme, encore plus élevée ($-1,90^\circ$) que pour la DSPC ($-1,58^\circ$). Il n'existe pas, à notre connaissance, de mesure d'isotherme de pression de surface de la DAPC, dans la littérature. Notre DAPC (Sigma Chem. Co.) contient 89,5% de 20:0, 5,1% de 18:0 et 4,6% de 16:0 par CPG. De plus, par chromatographie sur couche mince (CCM), on a observé un spot principal et un autre spot, mais de faible intensité.

3.7.2 La mesure des propriétés de surface d'un phospholipide contenant une ou deux chaînes grasses insaturées

Les figures 19 et 20 présentent les isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique d'une phosphatidylcholine contenant une (POPC) ou deux (DOPC) chaînes grasses insaturées,

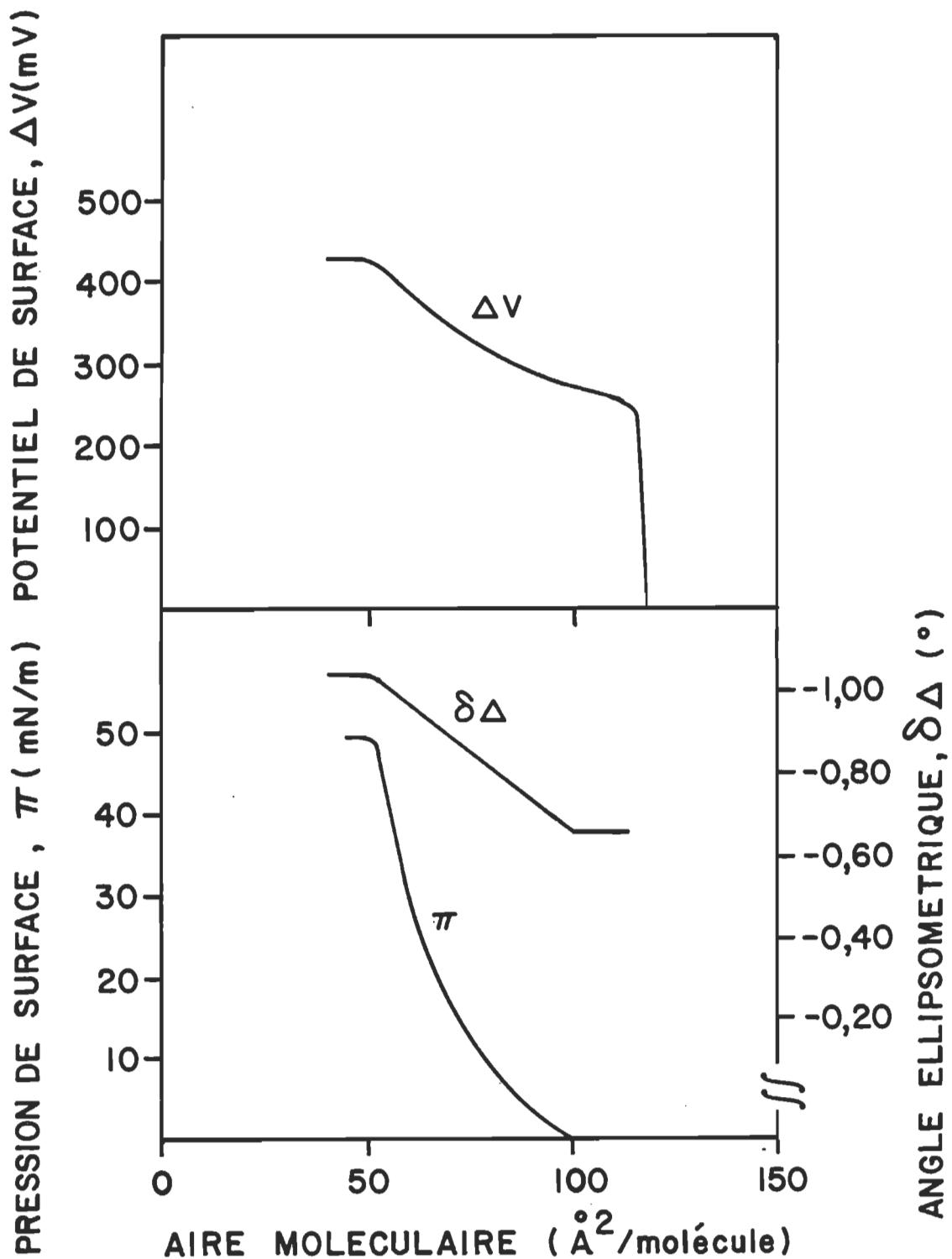


Figure 19. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la POPC à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

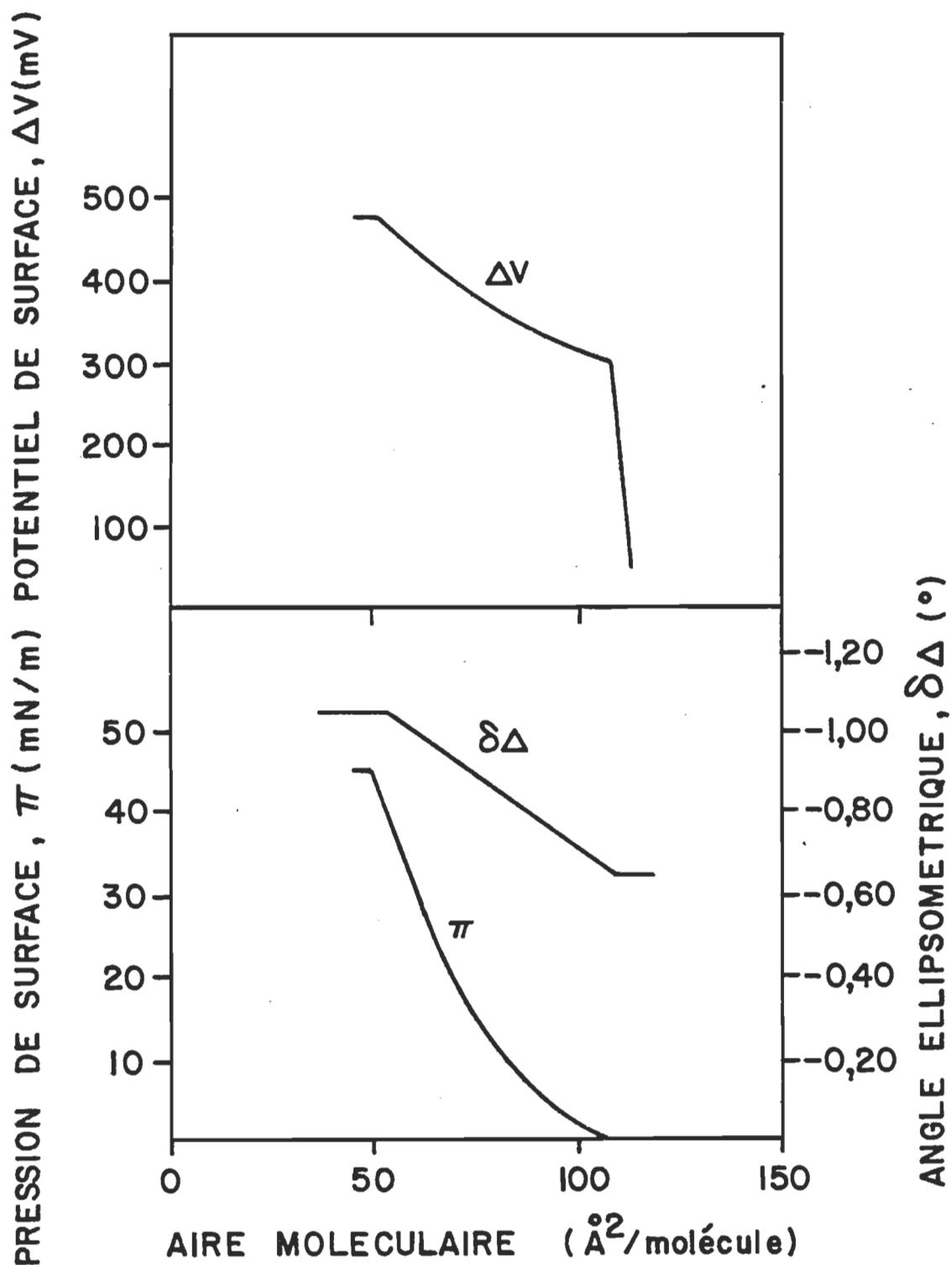


Figure 20. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la DOPC à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

respectivement. Ces isothermes représentent le résultat moyen d'au moins six mesures indépendantes faites avec au moins trois solutions différentes de POPC et DOPC. Nous avons utilisé un poids moléculaire de 760,1 d pour la POPC et de 806,1 d pour la DOPC. Les isothermes de pression de surface de ces deux phospholipides sont très similaires. Elles débutent à 100 (POPC) et 105 (DOPC) $\text{Å}^2/\text{molécule}$. La pression de surface au collapse est de 48 et 45 mN/m pour la POPC et la DOPC, respectivement. Les trois isothermes (π , $\delta\Delta$ et ΔV) de la POPC et de la DOPC montrent qu'elles sont dans l'état liquide expansé du début jusqu'à la fin de l'isotherme. Ainsi, la présence d'une seule chaîne grasse insaturée (POPC) est suffisante pour donner des caractéristiques similaires à la DOPC, qui a deux chaînes grasses insaturées.

Les isothermes de potentiel de surface et ellipsométrique de la POPC (et de la DOPC) arborent des caractéristiques similaires. De plus, on note aussi une correspondance étroite entre les isothermes de la POPC et celles de la DOPC. On note les observations expérimentales suivantes pour les isothermes de $\delta\Delta$ et ΔV pour la POPC et la DOPC: i) on mesure toujours un angle ellipsométrique et un potentiel de surface stables, avant le début de la pression de surface, ii) on observe ensuite une diminution linéaire (devient de plus en plus négatif) de l'angle ellipsométrique et une augmentation régulière du potentiel de surface, en fonction de la diminution de l'aire moléculaire et iii) on obtient ensuite des plateaux en potentiel de surface et en ellipsométrie qui coïncident, en termes d'aire moléculaire, avec celui mesuré en pression de surface.

Notre isotherme de pression de surface de la DOPC reproduit celle de Tancrède et al. (1981b). Cette DOPC (P.L. Biochemicals) est pure à 98,5% par CPG et montre, par CCM, en plus du spot principal, un autre spot, mais de faible intensité. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'isotherme de pression de surface de la POPC dans la littérature. Cependant, Ghosh et Tinoco (1972) ont rapporté l'aire moléculaire de la POPC à deux pressions de surface différentes. Ces valeurs d'aire moléculaire sont environ $10 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ plus élevées que les nôtres. On explique cette différence par la pureté de l'échantillon. On a évalué, par CPG, la pureté de notre échantillon à 99,5 mol% en comparaison à la valeur de 97 mol% mesurée par Ghosh et Tinoco (1972).

3.8 La détermination de l'orientation de la rhodopsine à l'interface azote-eau

Dans le but de déterminer l'orientation de la rhodopsine à l'interface azote-eau, nous avons procédé à la mesure des isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique des membranes discales et de ses constituants (PE, PC, PS et rhodopsine).

3.8.1 La mesure des propriétés de surface des phospholipides des SEB

Les isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométriques de la PE, la PC et la PS des SEB sont présentées en figures 21, 22 et 23, respectivement. Ces isothermes représentent le

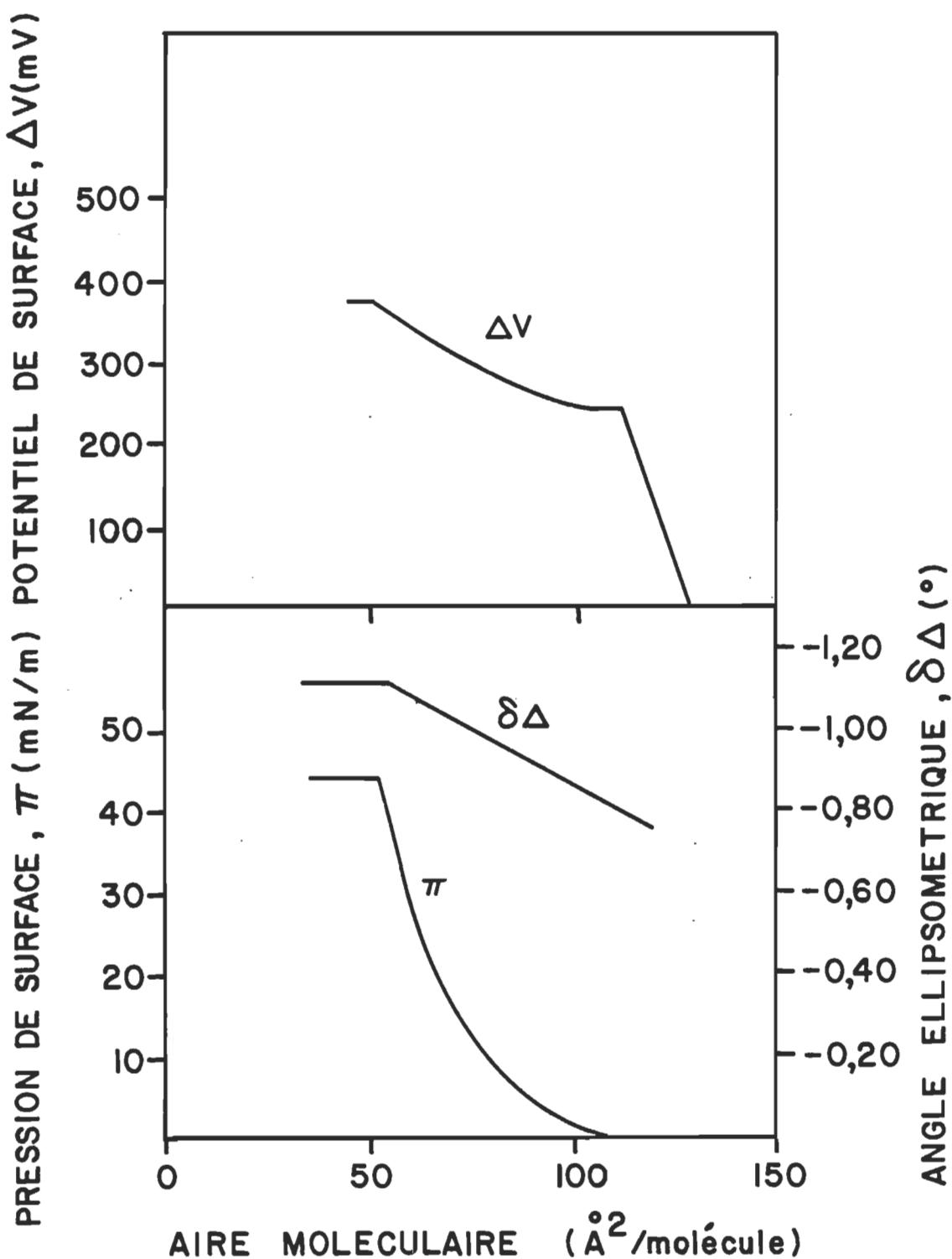


Figure 21. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la PE des SEB à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

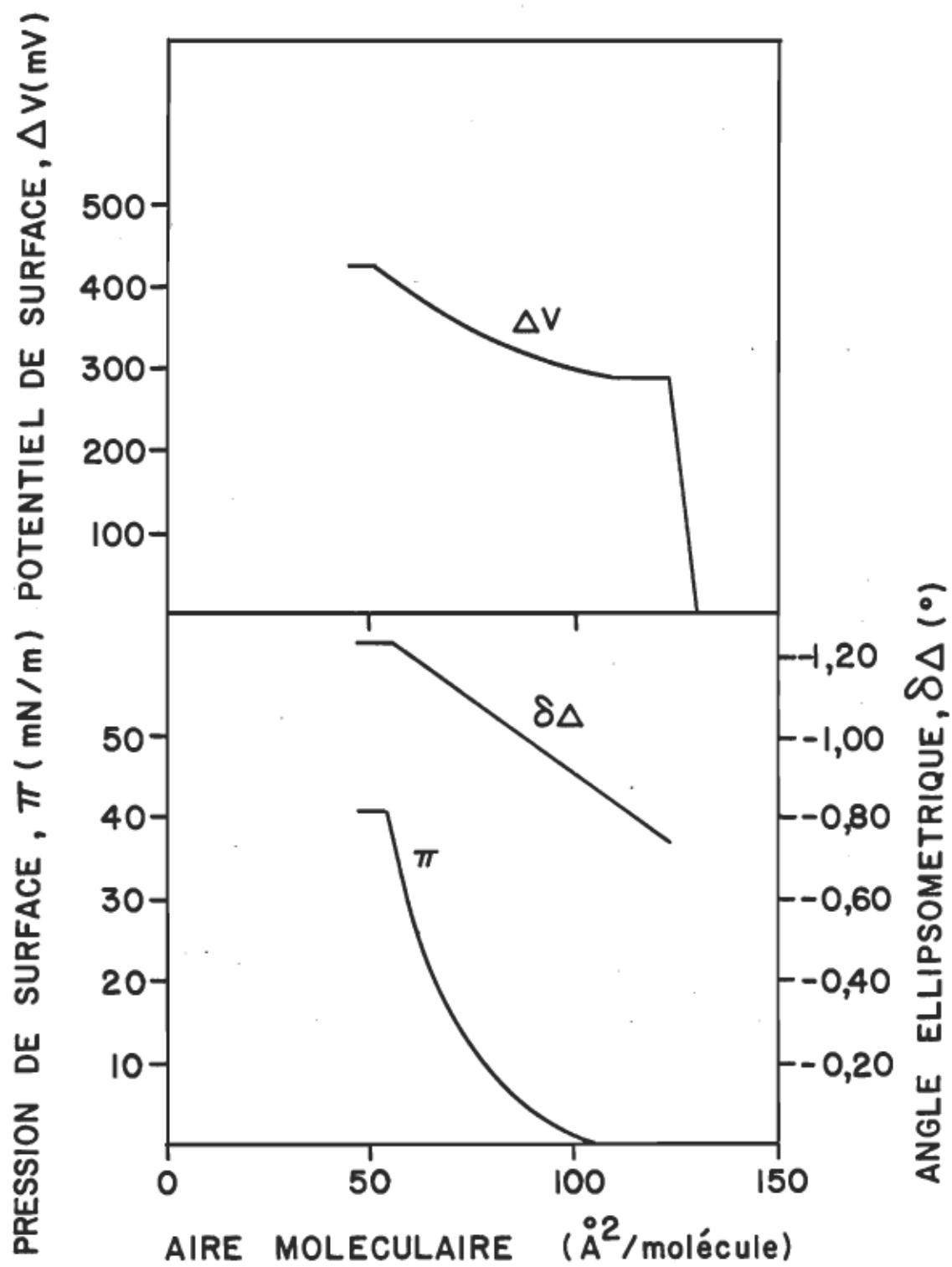


Figure 22. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la PC des SEB à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

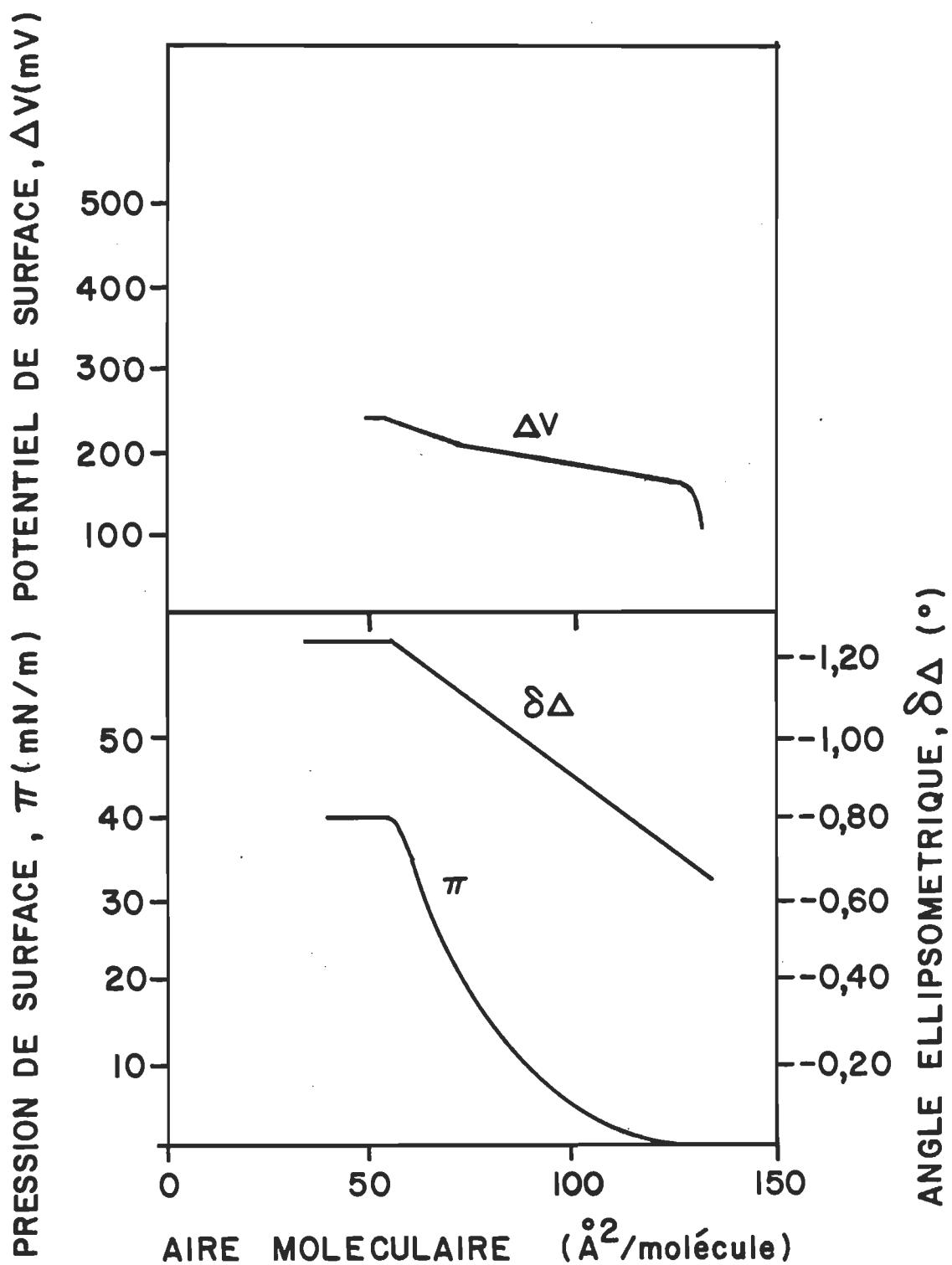


Figure 23. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la PS des SEB à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

résultat moyen d'au moins six mesures indépendantes faites avec au moins trois solutions différentes de chaque composé. Il est important de noter que ces résultats ont déjà été publiés (Ducharme et al., 1985).

Les isothermes π , $\delta\Delta$ et ΔV montrent que les phospholipides des SEB se trouvent dans l'état liquide expansé du début jusqu'à la fin de l'isotherme. Comme l'indique la faible variation de l'aire limite apparente de ces molécules ($75-80 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$), le degré d'insaturation ou de polyinsaturation (voir Salesse, 1983; Salesse et al., 1983; N'Soukpoé-Kossi et al., 1985) des chaînes grasses, n'affecte pas beaucoup leur compacité. L'isotherme de pression de surface de la PE, la PC et la PS débute à, respectivement, 105, 105 et $122 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. La pression de surface au collapse de ces phospholipides varie entre 40 et 45 mN/m. Les résultats de ces isothermes reproduisent ceux de la littérature (Robert et al., 1983; Salesse, 1983; Salesse et al., 1983; Ducharme et al., 1985).

Les isothermes de potentiel de surface des phospholipides des SEB présentent des particularités intéressantes: i) le début de la mesure stable du potentiel de surface se produit toujours à une aire moléculaire légèrement plus élevée que le début de la pression de surface, ii) pour toutes les isothermes, on observe une augmentation régulière du potentiel de surface lorsque l'aire moléculaire diminue, iii) toutes les isothermes présentent un plateau (collapse) qui coïncide avec celui mesuré en pression de surface. La région du plateau varie entre 375 et $475 \pm 10 \text{ mV}$ pour la PE et la PC alors qu'on retrouve 235 mV pour la PS.

Comme pour les autres phospholipides (voir sections 3.7.1 et 3.7.2), les isothermes ellipsométriques montrent des caractéristiques similaires aux isothermes de potentiel de surface, i.e. i) on obtient un signal ellipsométrique stable légèrement avant le début de la pression de surface, ii) on note une diminution linéaire (de plus en plus négative) de l'angle ellipsométrique en fonction de la diminution de l'aire moléculaire et iii) on observe, pour tous les phospholipides, un plateau qui coïncide avec celui mesuré en pression et en potentiel de surface. Cette région du plateau varie entre $-1,11$ et $-1,23^\circ$.

3.8.2 La mesure des propriétés de surface de la rhodopsine intacte ou hydrolysée

On présente en figure 24 les isothermes de pression (π), de potentiel de surface (ΔV et $\Delta V/N$) et ellipsométrique ($\delta\Delta$) de la rhodopsine intacte. Ces isothermes correspondent à la moyenne de huit mesures différentes et de deux purifications indépendantes de rhodopsine intacte. Ces isothermes sont très reproductibles ($\pm 50 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$).

L'isotherme de pression de surface débute à $\sim 6\ 500 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. De plus, on note un changement de pente à $\sim 1\ 750 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ ($\sim 49 \text{ mN/m}$). La forme très évasée de l'isotherme est caractéristique d'un film dans l'état liquide expansé.

L'isotherme ellipsométrique montre un plateau de $9\ 350$ à $7\ 500 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ dont la valeur est égale à $-0,80^\circ$. Par la suite et

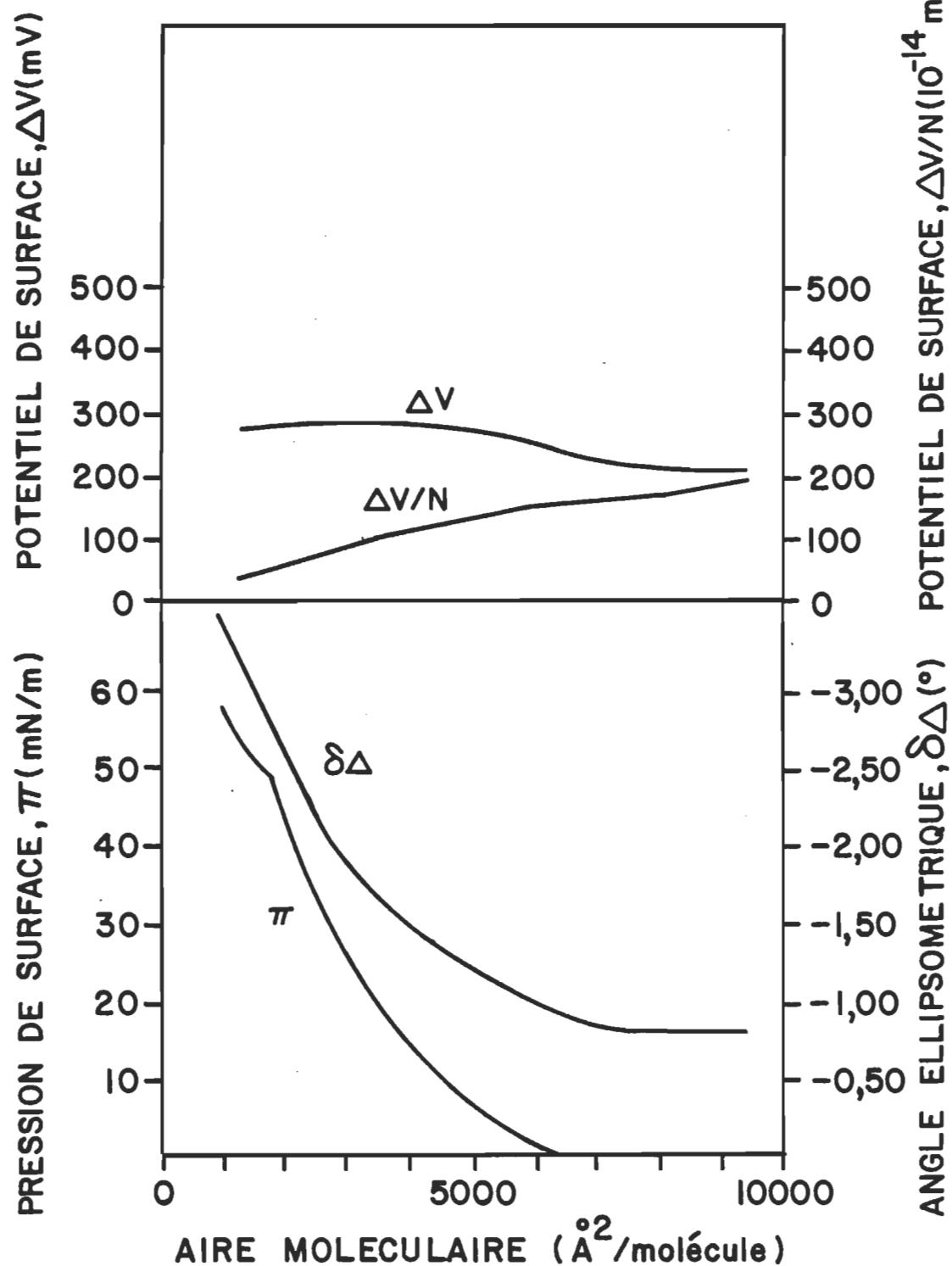


Figure 24. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la rhodopsine intacte à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

donc peu avant le début de la mesure de pression de surface, on assiste à une augmentation de l'angle ellipsométrique. Cette augmentation prend une forme quasi-exponentielle au fur et à mesure que l'on diminue l'aire moléculaire. Cette relation est valable de 7 500 à 2 300 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ (- 0,80 à - 2,30°). Par contre, à partir de 2 300 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ et jusqu'à la fin de l'isotherme, on constate qu'il existe alors une relation linéaire entre l'angle ellipsométrique et l'aire moléculaire (2 300 à 1 000 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$; - 2,30 à - 3,50°).

La mesure du potentiel de surface (ΔV) montre un plateau dans le début de l'isotherme qui correspond approximativement, en termes d'aire moléculaire, à celui mesuré en ellipsométrie. Par la suite, on observe une augmentation très lente de la mesure (7 500 à 4 000 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$) suivie d'un plafonnement (4 000 - 2 500 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$) et ensuite d'une légère diminution (2 500 - 1 250 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$). Le calcul de $\Delta V/N$ normalise la mesure en rendant égale la concentration de surface du nombre de dipôles tout au long de l'isotherme. Cette isotherme ($\Delta V/N$) montre essentiellement une première portion où on assiste à une diminution relativement lente du potentiel de surface (9 350 à 5 500 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$) et une seconde partie où on note un changement de pente important (5 500 - 1 250 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$).

Il est important de noter que lors de l'étalement de la rhodopsine à l'interface azote-eau, on retrouve toujours une pression de surface positive (1,1 à 3,3 mN/m), quelle que soit l'aire ou la quantité étalée. Or, l'étalement de l'octyl glucoside pur nous a démontré que ce détergent n'était pas tensio-actif.

L'isotherme de pression de surface de la rhodopsine hydrolysée (RH) (figure 25) possède à peu près la même isotherme de pression de surface que la rhodopsine intacte (RI). La seule différence notable est que le changement de pente se produit à 51 mN/m (RH) au lieu de 49 mN/m (RI).

Pour comparer les isothermes ellipsométriques et de potentiel de surface de RH et RI, on peut consulter la figure 26. On se rend compte que les isothermes ellipsométriques coïncident parfaitement jusqu'à $\sim 2\ 300\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$ ($-2,30^\circ$; 38 mN/m). Il est important de noter que cette aire moléculaire de $2\ 300\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$ correspond à la fin de la relation quasi-exponentielle et au début de la relation linéaire entre l'angle ellipsométrique et l'aire moléculaire. A partir de cette aire moléculaire, la rhodopsine hydrolysée montre un angle ellipsométrique moins grand, pour une même aire moléculaire, que la rhodopsine intacte. La différence entre les deux isothermes, dans cette zone, varie de $-0,10 \pm 0,02^\circ$ à $-0,20 \pm 0,02^\circ$ du début jusqu'à la fin, respectivement.

Les isothermes de potentiel de surface (ΔV et $\Delta V/N$) de la RH et la RI sont à peu près identiques, sauf pour le plateau du début.

3.8.3 La mesure des propriétés de surface des membranes discales intactes

On montre en figure 27 l'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique des membranes discales intactes.

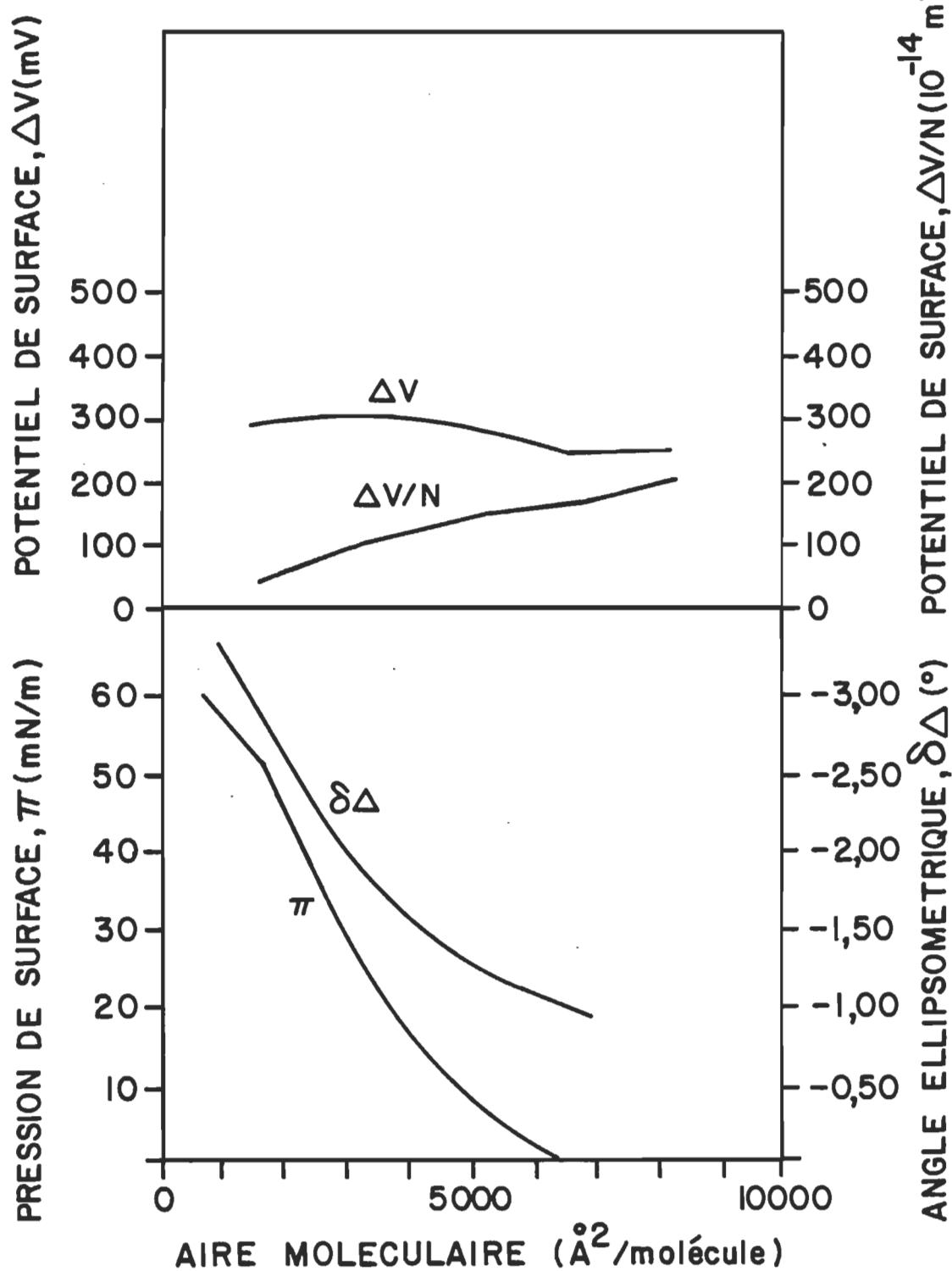


Figure 25. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la rhodopsine hydrolysée à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

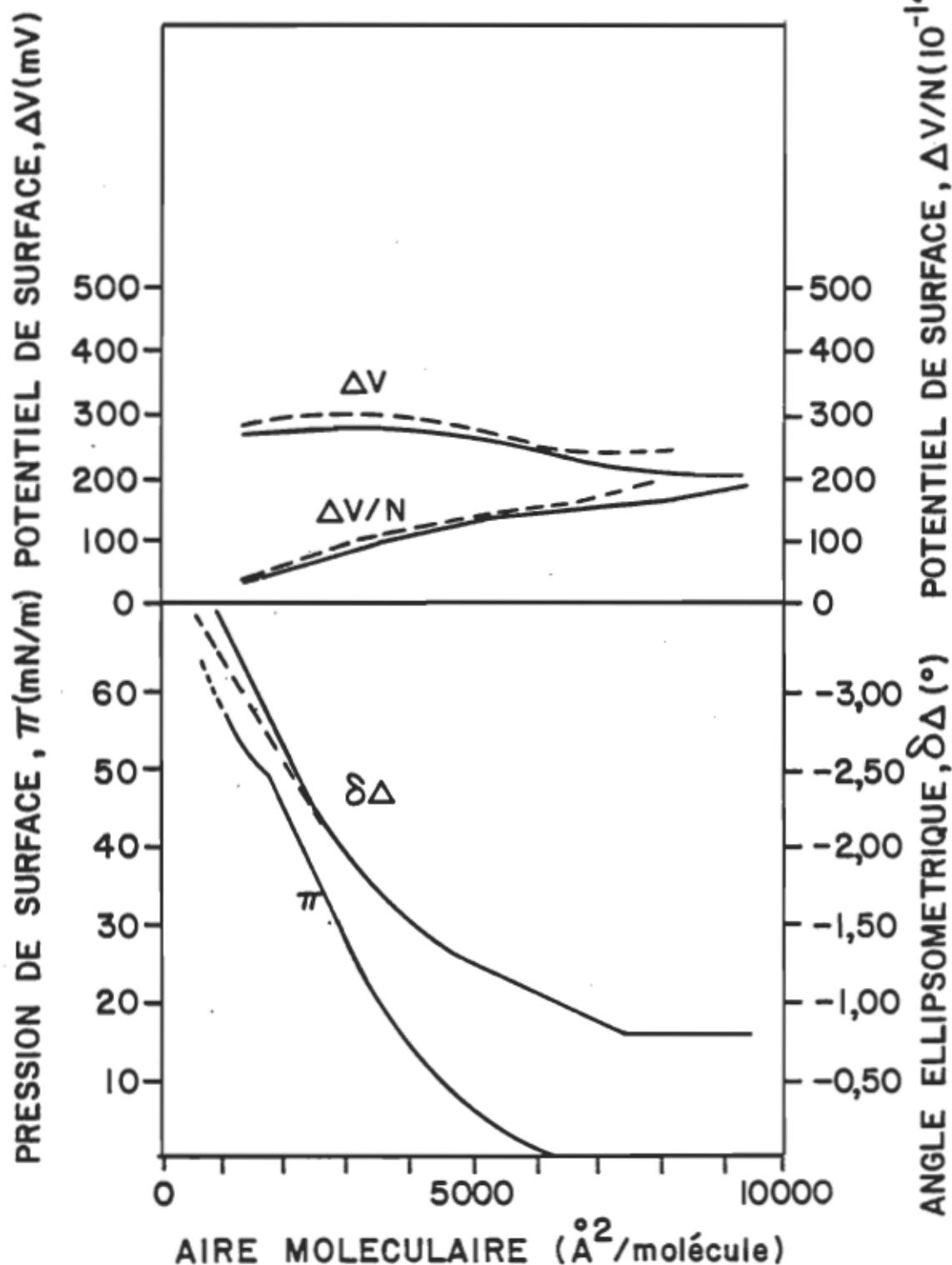


Figure 26. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de la rhodopsine intacte (—) et de la rhodopsine hydrolysée (---). Conditions expérimentales données dans les figures 24 et 25.

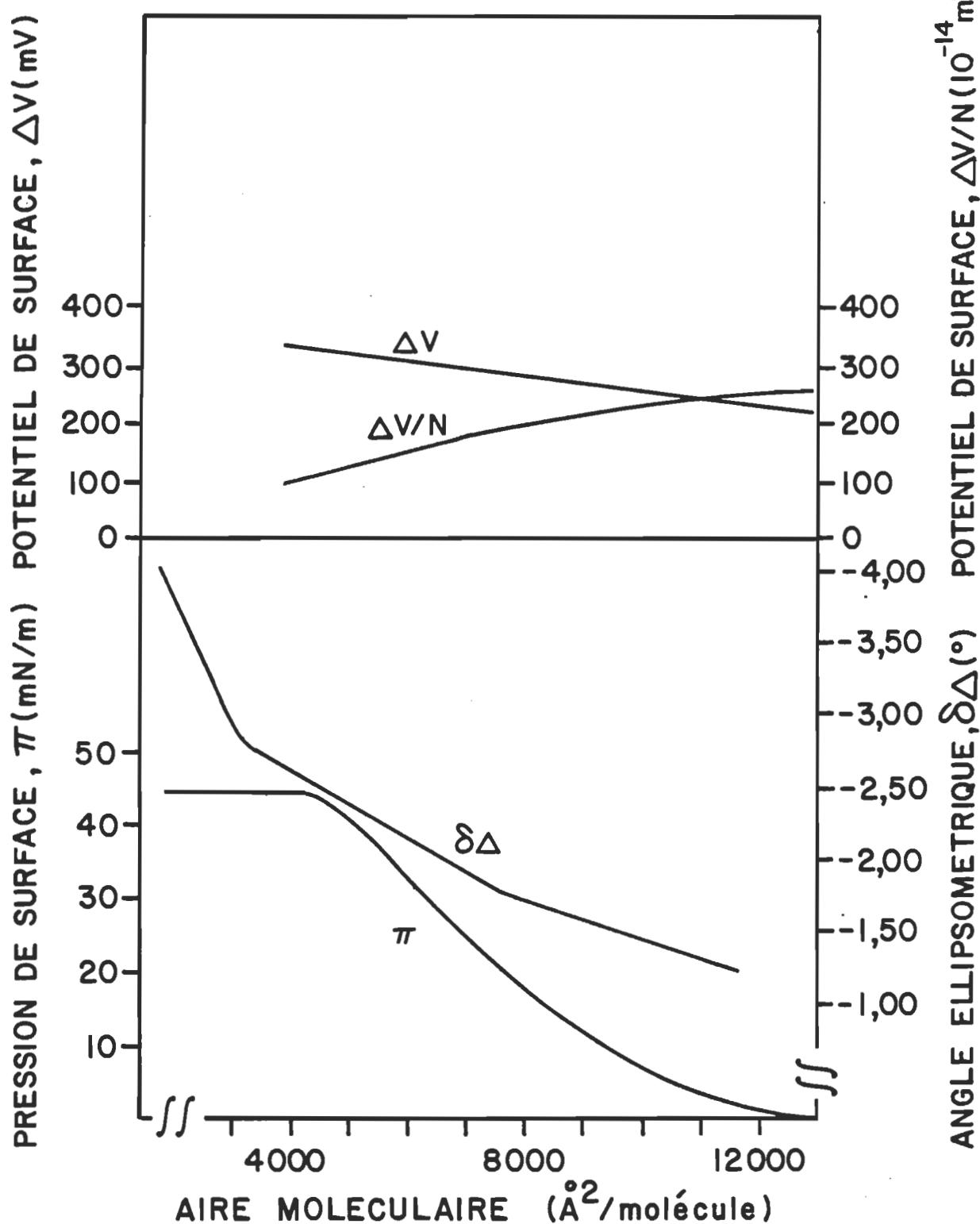


Figure 27. L'isotherme de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique des membranes discales intactes à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

L'isotherme de pression de surface a été obtenue en agitant la sous-phase dix fois suite à la compression jusqu'à ~ 2 mN/m que l'on fait suivre d'une décompression et d'une recompression. Il faut noter que dix agitations supplémentaires lors de la recompression ne modifient plus l'aire moléculaire du film. De plus, cette isotherme a été obtenue à partir de trois purifications indépendantes pour chacune desquelles on a procédé à au moins deux mesures différentes. Cette isotherme est reproductible à ± 100 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$. L'isotherme de pression de surface débute à $12\ 500$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ de rhodopsine et collapse à $\sim 4\ 000$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ ($44,8$ mN/m). On observe aussi un changement de pente dans l'isotherme qui prend place à $5\ 750$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ (36 mN/m). Ce film possède nettement les caractéristiques d'un film dans l'état liquide expansé.

L'isotherme ellipsométrique des membranes discales (figure 27) présente une très grande reproductibilité des mesures ($\pm 0,02^\circ$). Cette isotherme est une moyenne de onze mesures différentes et de trois purifications indépendantes. Le saut ellipsométrique se produit à $\sim 13\ 000$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ ($-1,12^\circ$). Par la suite, on remarque une augmentation presque linéaire de l'angle ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire avec un léger changement de pente ($\sim 7\ 750$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$; $-1,70^\circ$). Au début du collapse ($\sim 4\ 500$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$; $-2,50^\circ$), on ne note aucun changement dans la forme de l'isotherme ellipsométrique. Cependant, bien au-delà du début du collapse ($1\ 250$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ plus loin), on aperçoit un changement de pente très important prenant place à partir de $\sim 3\ 250$ $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ ($-2,76^\circ$). Dans cette zone, l'augmentation de l'angle ellipsométrique est très rapide et correspond à une relation linéaire avec l'aire moléculaire.

L'isotherme de potentiel de surface ($\Delta V/N$) montre un comportement semblable à la première portion de l'isotherme ellipsométrique. Ainsi, on note un changement de pente dans la même région que l'isotherme ellipsométrique. Nous n'avons pas de mesure de potentiel de surface dans la zone où on a observé un changement important de l'angle ellipsométrique ($\sim 3 250 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) puisque l'on doit enlever l'électrode de potentiel de surface qui, à ce point, empêche le déplacement de la barrière mobile. De plus, on ne peut repositionner l'électrode plus près du flotteur puisqu'elle pourrait nuire au faisceau laser de l'ellipsomètre. Ainsi, la mesure du potentiel de surface ne peut corroborer la mesure ellipsométrique au-delà de $4 000 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Cependant, la mesure de l'autre angle ellipsométrique (ψ), montrée en figure 28, corrobore bien la mesure de $\delta\Delta$. Ainsi, on assiste donc à un changement de pente important dans la mesure de ψ ($\sim 3 500 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) qui prend place à une aire moléculaire similaire à celui noté en $\delta\Delta$ ($\sim 3 250 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$).

3.8.4 La mesure des propriétés de surface des membranes discales traitées

La figure 29 présente l'isotherme de pression de surface et ellipsométrique des membranes discales intactes (MD), traitées à court terme (CT) et à long terme (LT), avec la thermolysine.

L'aire moléculaire des membranes discales CT et LT est non reproductible d'une mesure à l'autre. Ainsi, pour comparer les

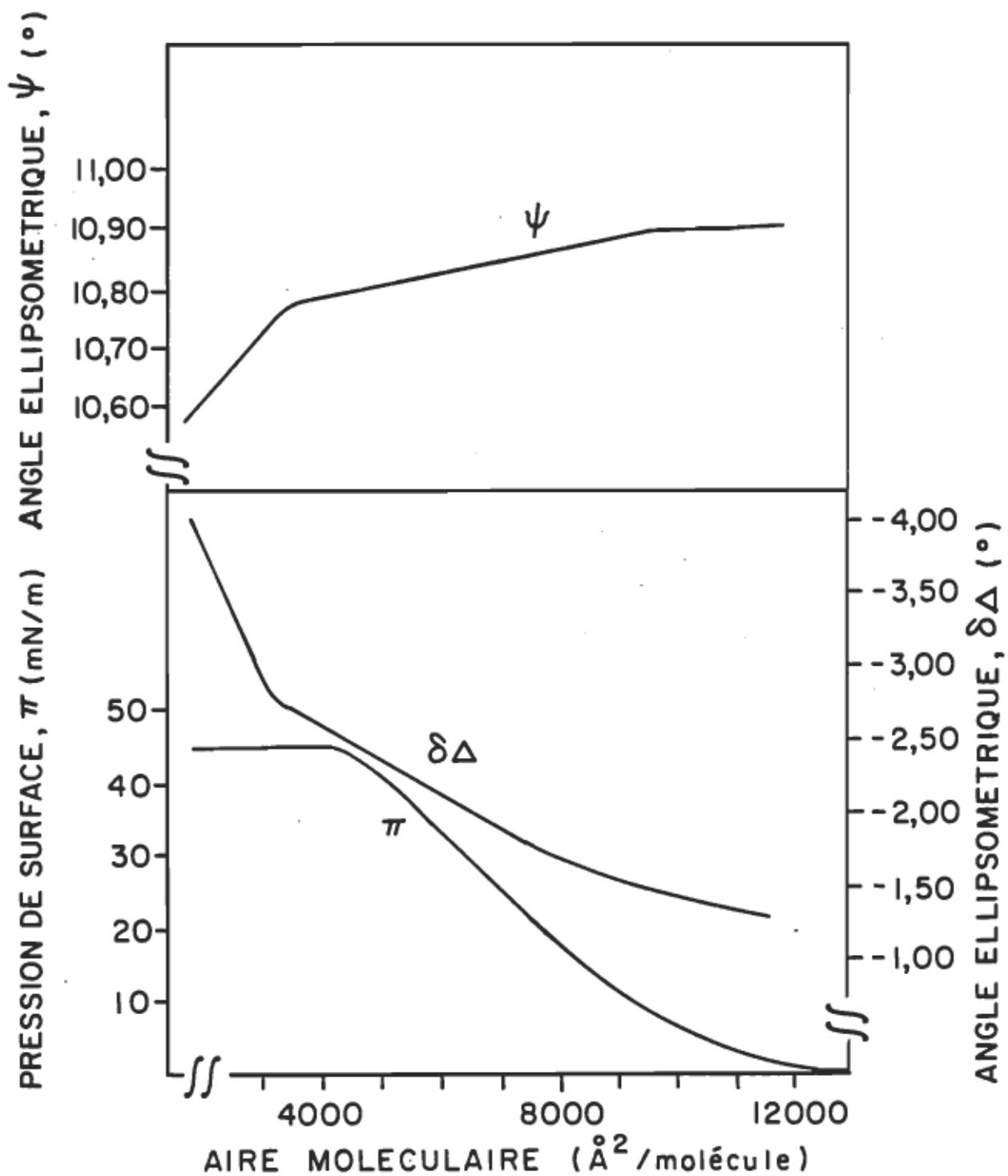


Figure 28. L'isotherme de pression de surface (π) et ellipsométrique ($\delta\Delta$ et ψ) des membranes discales intactes à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

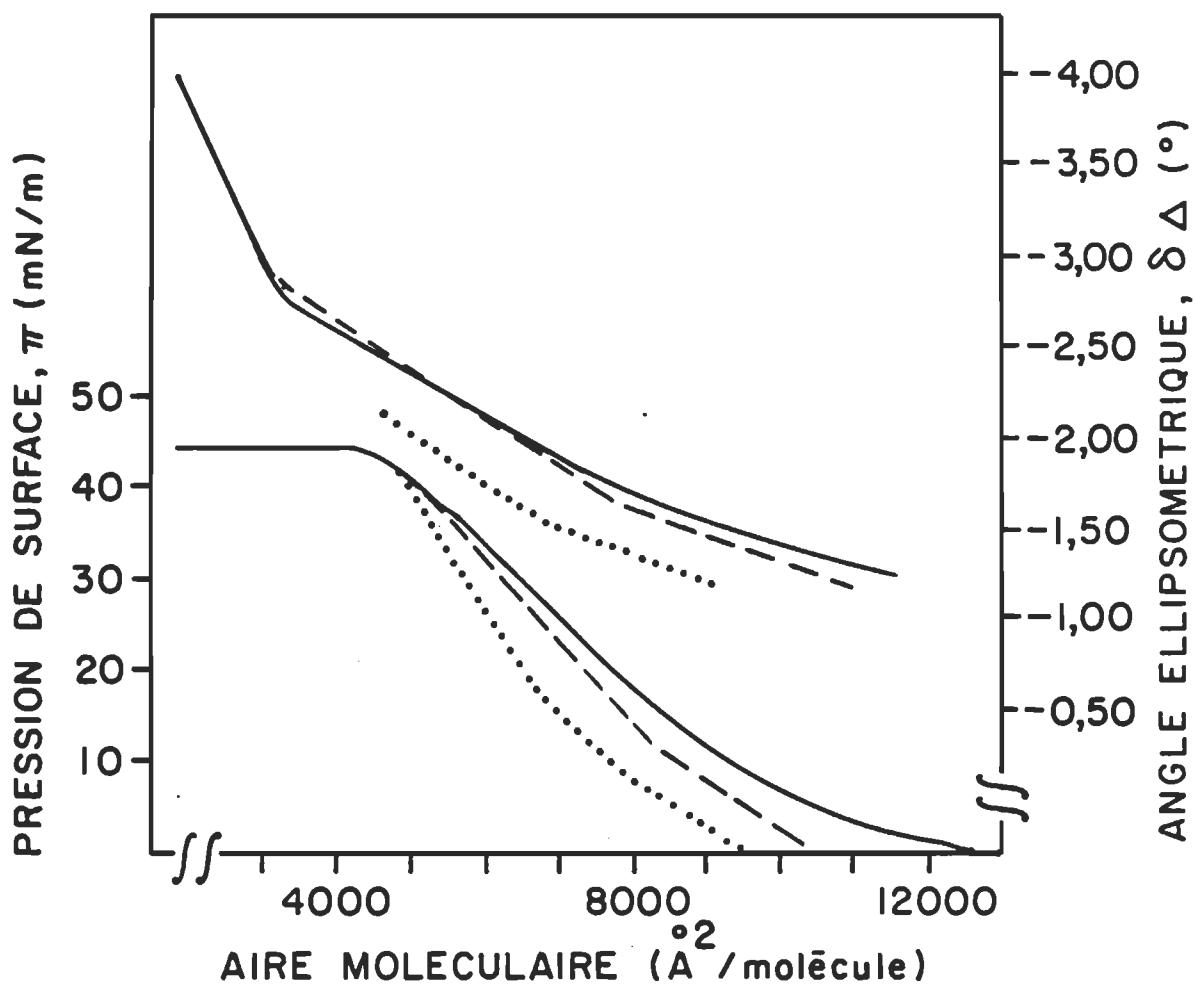


Figure 29. L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique des membranes discales intactes (—), traitées à court terme (---) et à long terme (····), à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $17,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

membranes discales CT et LT avec les membranes discales intactes, on a décidé de faire coïncider l'aire moléculaire du début du collapse de toutes les isothermes de CT et LT avec l'aire moléculaire du début du collapse des membranes discales intactes. Pour faire cela, nous avons supposé que toutes les molécules du film auraient une orientation et une aire moléculaire similaires, au début du collapse. Pour les membranes discales CT, on justifie cette supposition par le fait que le traitement à court terme coupe seulement les douze derniers acides aminés du carboxyle terminal (voir section 3.3). Ainsi, ce traitement, comme pour la rhodopsine hydrolysée (voir figure 26), ne devrait pas avoir d'effet majeur sur l'isotherme de pression de surface de ces membranes discales CT. L'isotherme de pression de surface de ces membranes discales CT est cependant passablement différente de celle des membranes discales intactes. Ainsi, on note que la forme de l'isotherme n'est pas aussi évasée que celle des membranes discales intactes. De plus, on remarque un changement de pente à $\sim 8\ 500\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$ ($\sim 12\ \text{mN/m}$). Cependant, l'isotherme ellipsométrique de ces membranes discales CT est très similaire à celle des membranes discales intactes.

Pour les membranes discales LT, on justifie cette supposition de la façon suivante. Le traitement à long terme de la rhodopsine des membranes discales produit deux fragments, F_1 et F_2 (voir section 3.3). Il est important de noter que ces deux fragments restent associés, à la noirceur ou à la lumière, lorsqu'ils se trouvent dans la membrane discale. Cette rhodopsine traitée ($F_1 + F_2$) maintient son spectre d'absorption et sa capacité de se régénérer après photolyse. De

plus, si on solubilise ces membranes dans un détergent, ces deux fragments restent encore associés. Cependant, dans le détergent, ces deux fragments se dissocient sous l'effet de la lumière (Pober et Stryer, 1975; Hargrave et Fong, 1977; Albert et Litman, 1978; Hargrave et al., 1980; Kühn et Hargrave, 1981; Hargrave, 1982; Hargrave et al., 1982; Corless et McCaslin, 1984; Kühn, 1984). On peut donc supposer que la rhodopsine des disques traités à long terme, conserve une organisation moléculaire semblable à celle de la rhodopsine des disques intacts. Toutefois, la forme de l'isotherme de pression de surface des membranes discales LT est très différente de celle des membranes discales intactes. On note, ici aussi, un changement de pente à ~ 10 mN/m ($\sim 7\ 750\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$). De plus, l'isotherme ellipsométrique des membranes discales LT est complètement déphasée en comparaison à celle des deux autres (MD et CT).

3.9 Le mécanisme de la première étape de l'amplification du processus visuel: la mesure de l'adsorption de la G-protéine sur une monocouche de chaque phospholipide des SEB

Les figures 30a, 31a et 32a présentent la mesure de l'adsorption de la G-protéine (π et $\delta\Delta$) sur une monocouche de PE, PC et PS des SEB, respectivement. Ces figures montrent que la G-protéine s'adsorbe sur une monocouche de chaque phospholipide des SEB. Cependant, on note des particularités, dans l'adsorption, qui sont spécifiques à chaque phospholipide. Après l'agitation de la sous-phase, on remarque une augmentation de la pression de surface dans le cas de la PE (20 à 24 mN/m) et de la

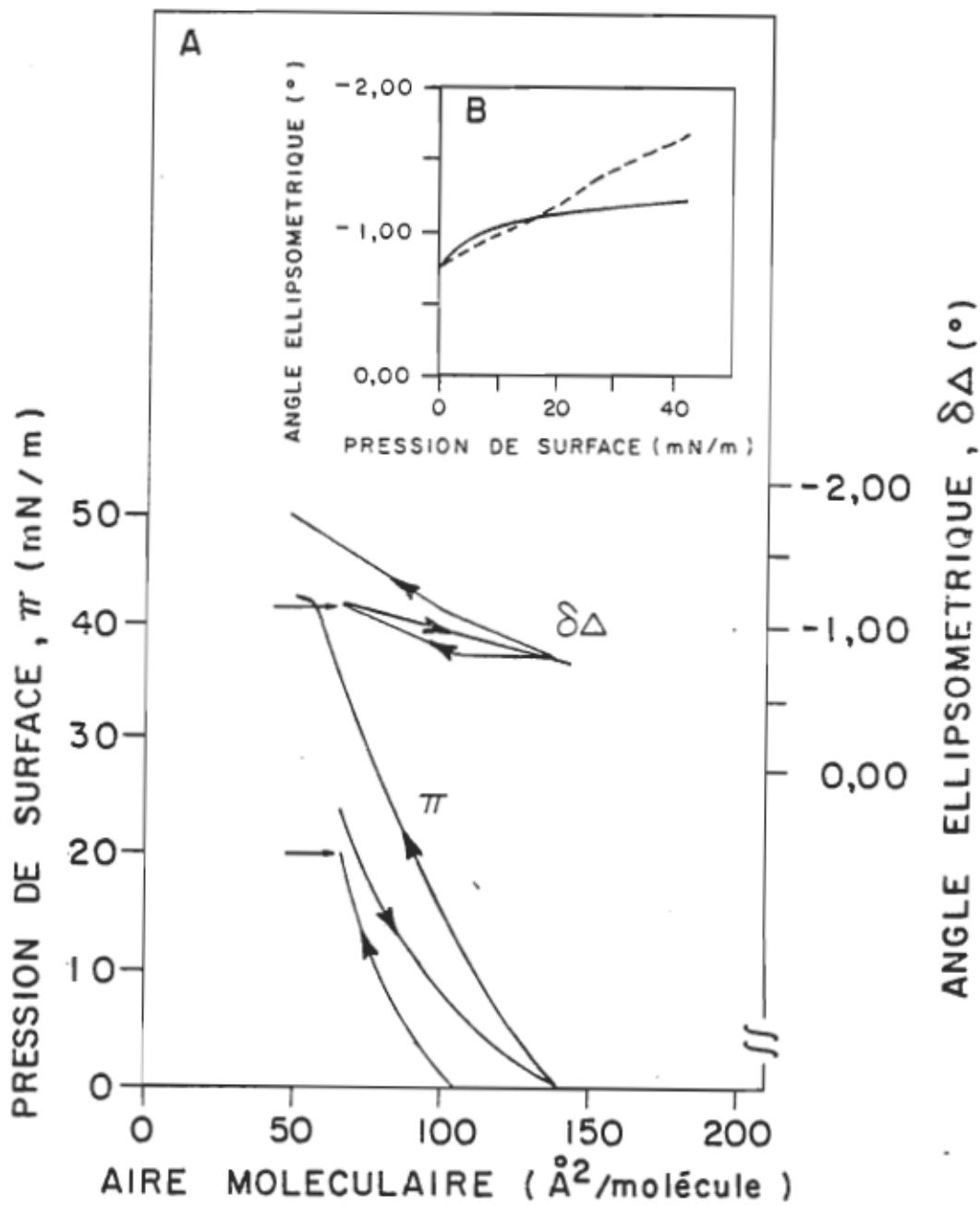


Figure 30. A: L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique de la PE des SEB en absence (compression) et en présence de G-protéine (décompression et recompression) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
 B: Le graphique de l'angle ellipsométrique en fonction de la pression de surface pour la PE des SEB (—) et pour la recompression du film de PE des SEB-G-protéine (---).

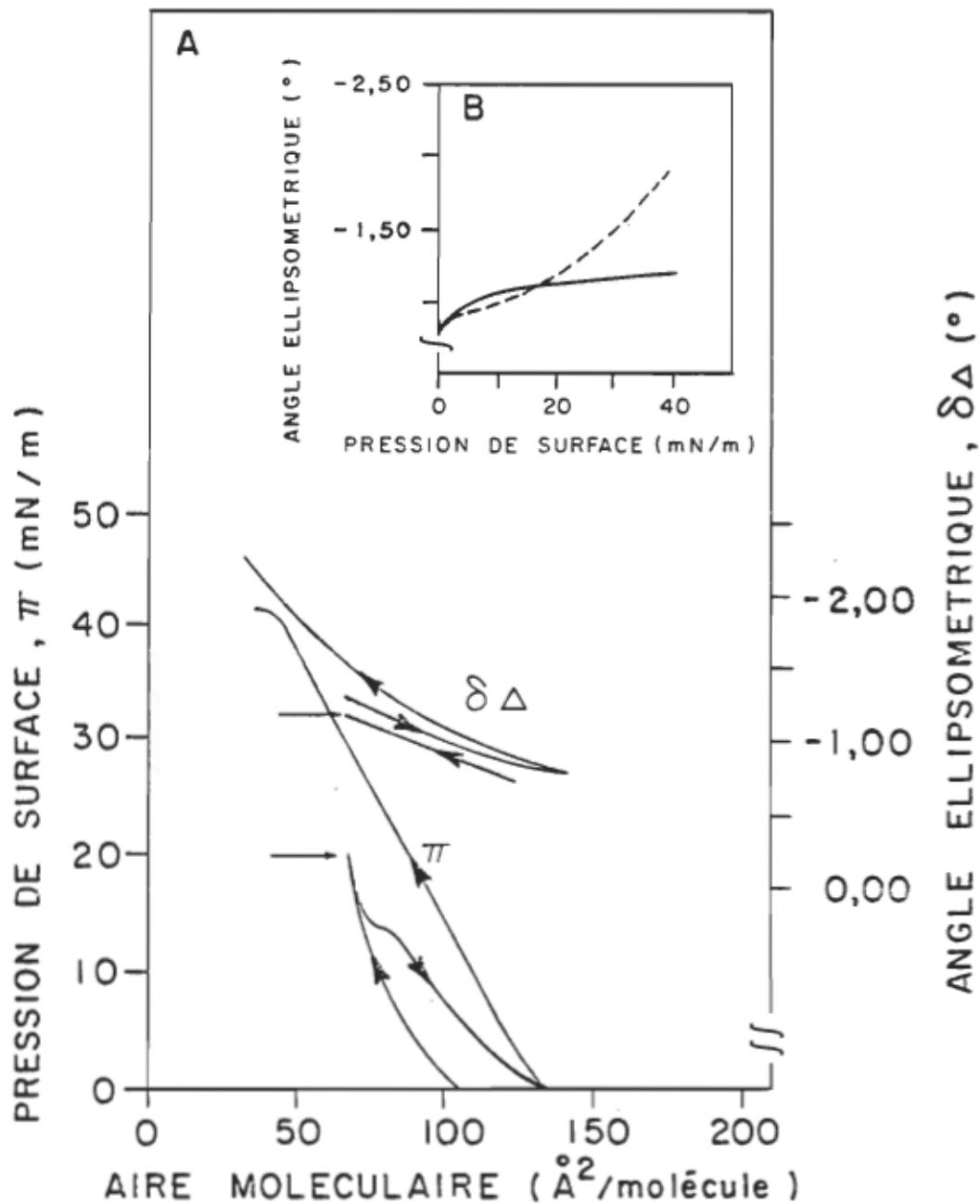


Figure 31. A: L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique de la PC des SEB en absence (compression) et en présence de G-protéine (décompression et recompression) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
 B: Le graphique de l'angle ellipsométrique en fonction de la pression de surface pour la PC des SEB (—) et pour la recompression du film de PC des SEB-G-protéine (---).

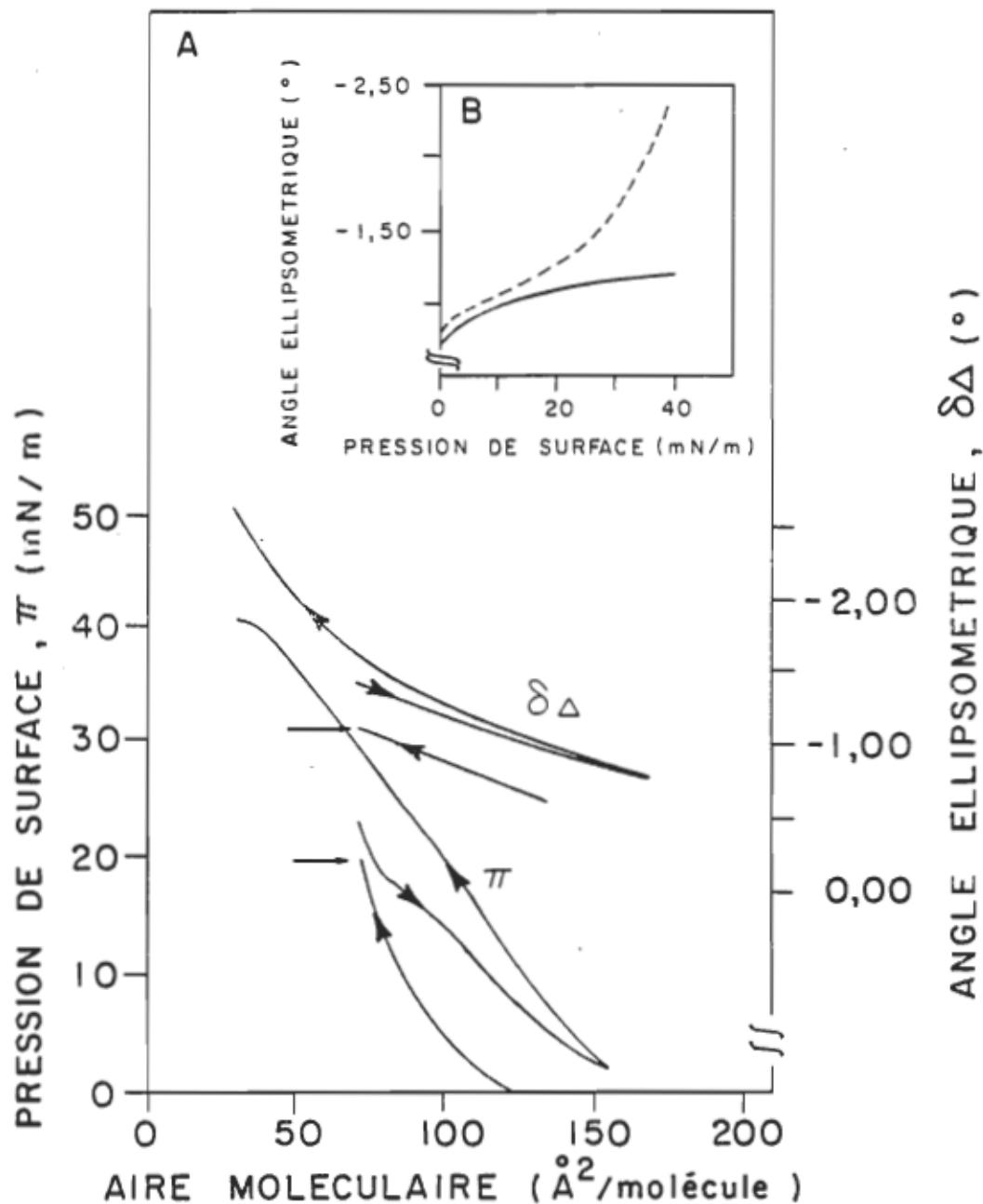


Figure 32. A: L'isotherme de pression de surface et ellipsométrique de la PS des SEB en absence (compression) et en présence de G-protéine (décompression et recompression) à l'interface azote-eau. La température est maintenue à $19,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
 B: Le graphique de l'angle ellipsométrique en fonction de la pression de surface pour la PS des SEB (—) et pour la recompression du film de PS des SEB-G-protéine (---).

PS (20 à 23 mN/m) mais non pour la PC. De plus, on se rend compte que, en décompression, l'isotherme de pression de surface se détache significativement de l'isotherme mesurée en compression et cela, à partir de 18 et 17 mN/m pour la PS et la PC, respectivement. Par contre, la G-protéine s'adsorbe de façon continue sur la monocouche de PE, à mesure que l'on diminue la pression de surface (ou augmente l'aire moléculaire). En recompression, l'isotherme de pression de surface de chaque phospholipide montre un changement de pente plus ou moins bien défini (π).

On observe, après la compression et l'agitation de la sous-phase, une augmentation de l'angle ellipsométrique de la PS et la PC, mais non de la PE. En décompression, l'isotherme ellipsométrique de chaque phospholipide se trouve à un angle ellipsométrique plus négatif que l'isotherme mesurée en compression. La recompression d'une monocouche comprenant un phospholipide des SEB et la G-protéine, montre, entre 0 et 15 mN/m, une isotherme ellipsométrique presque identique à celle du phospholipide pur (figures 30b, 31b et 32b). En poursuivant la recompression au-delà de 15 mN/m, on s'aperçoit que l'isotherme ellipsométrique du mélange (phospholipide SEB-G-protéine) se détache significativement de celle du phospholipide pur (figures 30b, 31b et 32b) (Salesse et al., 1986b). De plus, il est important de remarquer que ces isothermes, en recompression, ne montrent pas de plateau, mais la valeur finale (-1,76°:PE; -2,08°:PC; -2,60°:PS) de l'angle ellipsométrique est beaucoup plus élevée que la valeur du plateau pour le phospholipide pur (-1,11°:PE; -1,22°:PC; -1,23°:PS).

Il est important de noter que, après le premier cycle de compression-expansion, les cycles subséquents ne changent pas les propriétés du film.

Il est bien connu que les tampons, à faible force ionique, solubilisent la G-protéine (Kühn, 1980 et 1982). De la même façon, la mesure de l'adsorption de la G-protéine dans une sous-phase à faible force ionique (tampon phosphate, 10^{-3} M) donne des isothermes de pression de surface et ellipsométrique qui sont identiques à celles des phospholipides purs.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 L'évaluation des critères de pureté des SEB

D'après les résultats, il apparaît évident que la fraction SEB-FS représente une purification grossière des SEB. Lorsqu'on poursuit la purification de cette fraction par gradient continu de concentration de sucre, on sépare ces SEB-FS en deux bandes. Stone et al. (1979) et Godchaux et Zimmerman (1979) ont aussi séparé les SEB en deux bandes par gradient continu et tamponné de concentration de sucre. Les SEB de leurs deux bandes flottent à des densités de sucre équivalentes à celles rapportées dans notre étude (voir section 3.1). De plus, ils ont démontré que les bandes I et II correspondent, respectivement, à des SEB brisés et intacts. Nous croyons donc que nos gradients séparent les SEB de la même façon, si toutefois, il n'est pas nécessaire d'appliquer les SEB sous le gradient, dans une solution très dense, pour obtenir une meilleure séparation (Stone et al., 1979).

Contrairement aux résultats de Krebs et Kühn (1977), on n'a observé aucun changement dans la position et la composition des bandes lorsqu'on change le tampon du gradient de sucre. Cependant, lorsqu'on utilise un gradient non tamponné, on produit une inversion de la composition du gradient. Nous n'avons pas d'évidence expérimentale nous indiquant

qu'il s'agit d'une inversion des bandes de SEB intacts et brisés ou d'une rétention plus importante de SEB intacts dans le gradient non-tamponné. Néanmoins, cela a peu d'importance puisque les SEB détachés par la méthode du tourbillonnement ne montrent qu'une seule bande dans le gradient tamponné de sucrose. Ce résultat suggère que la bande I est un artefact provoqué par la filtration sur gaze (voir section 2.1.1).

Lorsqu'on utilise la spectroscopie d'absorption en tant que critère de pureté, on se rend compte que les SEB-FS, les SEB-GNT (bande II) et les SEB-TGT sont très purs alors les SEB-GNT (bande I) et les SEB-GT (bandes I et II) présentent un rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ plus élevé, s'étalant de 2,2 à 9,4. Si on classe ces SEB dans un ordre décroissant de pureté apparente, on obtient la séquence suivante: SEB-FS = SEB-GNT (bande II) > SEB-TGT > SEB-GNT (bande I) > SEB-GT (bande I) > SEB-GT (bande II). Cependant, cette séquence n'est plus valable si on considère le nombre de phospholipides par rhodopsine. Conformément à ce critère de pureté, l'ordre décroissant de la pureté est le suivant: SEB-TGT > SEB-GNT (bande II) > SEB-GT (bande I) > SEB-GNT (bande I) > SEB-FS > SEB-GT (bande II). Selon ce critère de pureté, notre meilleure préparation (SEB-TGT, 65 phospholipides/rhodopsine) contient moins de phospholipides que rapporté par Stone et al. (1979) (71 phospholipides/rhodopsine) et Miljanich et al. (1978, 1981) (75 phospholipides/rhodopsine). Cependant, dans le cas de ces auteurs (Miljanich, 1978; Stone et al., 1979), la pureté optique varie en parallèle avec le contenu en phospholipides. Par ailleurs, le même ordre décroissant de pureté prévaut, lorsqu'on considère la composition en acides gras des différentes

fractions. Les meilleures fractions de SEB présentent le pourcentage le plus élevé en acides gras polyinsaturés et, plus particulièrement, l'acide decosahexaenoïque (22:6ω3). On peut donc conclure qu'un plus grand nombre de phospholipides par rhodopsine amène automatiquement un plus faible contenu en 22:6ω3. De la même façon, dans les mesures des propriétés monomoléculaires, les fractions de SEB ayant le plus faible contenu en phospholipides, correspondent à la plus faible aire limite apparente.

Donc, tous les critères de pureté, excepté la pureté optique, varient de la même façon d'une fraction à l'autre. On représente ce comportement en figure 33, où on trace la pureté relative des différentes fractions de SEB, conformément à chaque critère de pureté, en fonction du nombre de phospholipides par rhodopsine pour les mêmes fractions. Cette figure montre que, parmi tous les critères de pureté, le contenu en phospholipides présente le plus grand pourcentage de variation d'une fraction à l'autre. Ainsi, il devrait être considéré comme étant le critère de pureté le plus sensible. Par ailleurs, le contenu en acides gras (% de 22:6ω3) et les isothermes de pression de surface sont aussi de bons critère de pureté même s'ils sont un peu moins sensibles que le contenu en phospholipides. Ces deux critères de pureté varient de façon très parallèle l'un à l'autre. Par contre, on ne peut, dans aucun cas, considérer la spectroscopie d'absorption en tant que critère de pureté digne de confiance. Premièrement, il est peu probable que des protéines, d'origine extrinsèque aux SEB, contaminent sérieusement des SEB détachés des rétines par une méthode douce. On observe,

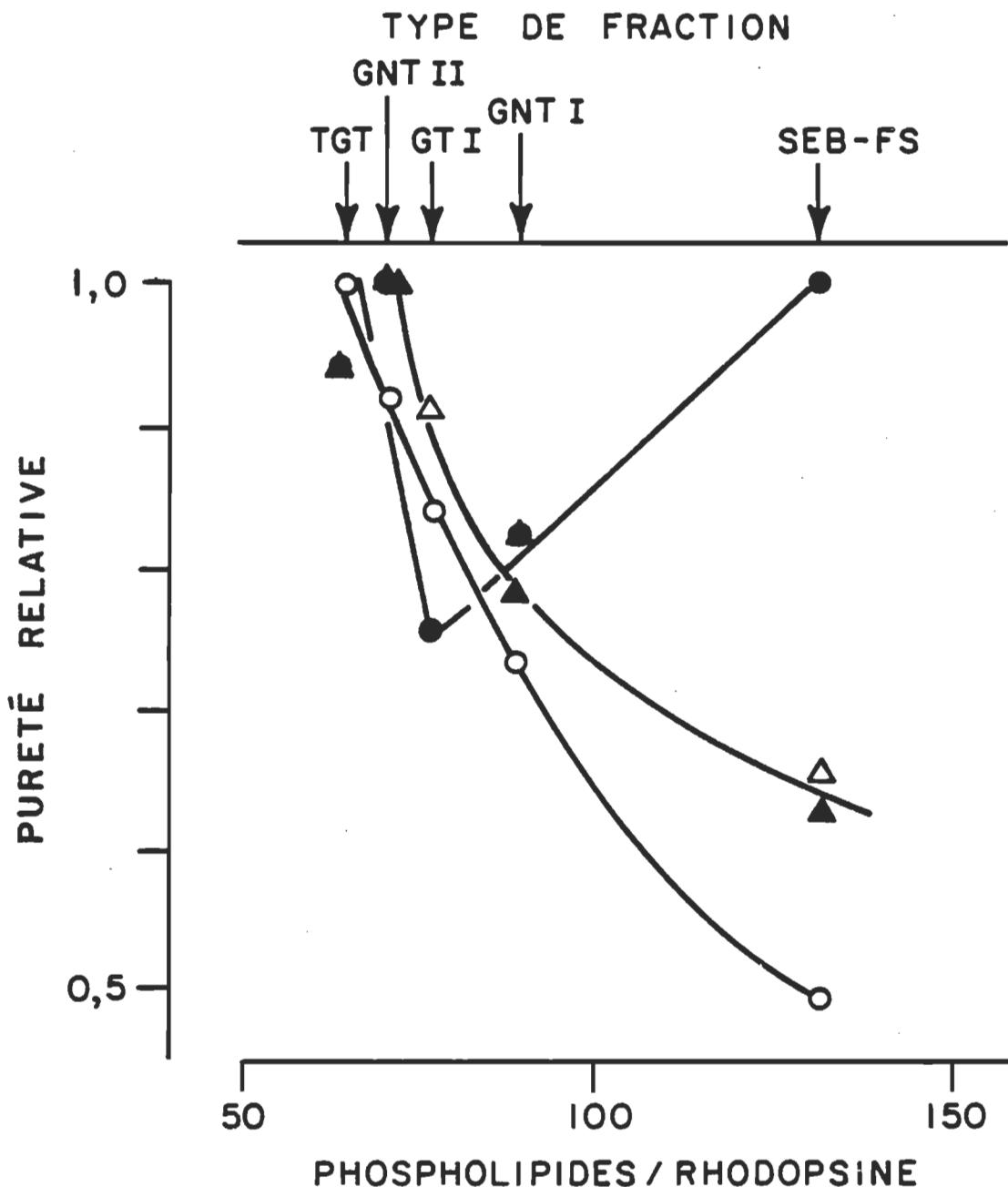


Figure 33. Le graphique de la pureté relative de chaque fraction des SEB en fonction du rapport phospholipides/rhodopsine. La pureté relative est exprimée, pour chaque critère de pureté, comme étant (la valeur de la meilleure fraction)/(la valeur d'une fraction donnée), excepté pour le % 22:6w3 où le rapport est inversé. Les critères de pureté sont: pureté optique (●—●); rapport phospholipides/rhodopsine (○—○); % 22:6w3 (△—△); isotherme de pression de surface (▲—▲).

selon le rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$, une contamination importante en protéines uniquement dans le cas des SEB-GT (bande II) ou lorsque les SEB sont détachés par une homogénéisation énergique des rétines (Stone et al., 1979). On peut expliquer le fait que des fractions passablement pures, comme les SEB-GT (bande I) et les SEB-GNT (bande I), montrent un rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ plus élevé que les SEB-FS, par l'association de protéines solubles avec ces fractions. De plus, si ces fractions étaient très contaminées par des protéines membranaires extrinsèques, on s'attendrait à ce que leur aire limite apparente soit plus grande que celle mesurée (voir figure 9). Deuxièmement, en plus de l'inconsistance des valeurs du rapport $A_{280}/\Delta A_{500}$ obtenues dans différents détergents (McConnell et al., 1980), on doit être conscient de la dépendance de A_{280} envers les changements brusques de température (voir figure 6a). Donc, on ne peut utiliser uniquement la spectroscopie d'absorption pour caractériser la pureté des SEB. Ainsi, grâce à sa fiabilité, sa sensibilité et sa facilité d'exécution, il est évident que le rapport phospholipide/rhodopsine est le meilleur critère de pureté. Par contre, si le protocole expérimental ne nécessite pas l'estimation de la concentration précise en rhodopsine (pas de régénération), la composition en acides gras apparaît alors comme étant le critère de pureté le plus valable. De plus, l'utilisation de la méthode du tourbillonnement pour détacher les SEB, suivie du cycle de flottation/sédimentation et du gradient continu tamponné de sucre (SEB-TGT, voir section 2.1) représente la meilleure méthode de purification pour deux raisons: i) la meilleure conservation de leur intégrité (peu ou pas de bande I) et ii) leur grande pureté (voir tableaux 2 et 3). Donc, toutes les purifications subséquentes ont été

entreprises avec des SEB-TGT en caractérisant leur pureté par le nombre de phospholipides/rhodopsine et la composition en acides gras.

4.2 L'évaluation de la pureté des différentes fractions de la purification des membranes discales

Les résultats montrent bien que les MEMB-FS correspondent à une purification grossière des membranes discales. Donc, à l'opposé de la méthode de Smith et al. (1975) et Smith et Litman (1982), il ne faut pas purifier des membranes discales à partir de SEB-FS. Par ailleurs, les MEMB-F, purifiées à partir de SEB-TGT, montrent une excellente pureté.

Dans le but d'expliquer le pourcentage élevé de MEMB-C, nous avons soulevé l'hypothèse que, en plus de la membrane plasmique, on retrouverait aussi les vieux disques de la portion apicale des SEB n'ayant pu résister au choc osmotique. Si cette hypothèse est valable, on peut supposer i) que l'opsine des vieux disques est moins régénérable que celle des disques plus récemment formés. De plus, ii) les vieux disques devraient aussi contenir une quantité appréciable de phospholipides oxydés. Cependant, il n'existe pas de différence significative entre la régénérabilité, la composition en acides gras et le nombre de phospholipides par rhodopsine des MEMB-F et des MEMB-C. Ainsi, on peut croire que cette méthode de purification ne fait pas la partition entre les jeunes et les vieux disques, sauf si nos suppositions i) et ii) sont irréelles (Salesse et al., 1986c).

On peut donc conclure qu'il est essentiel de purifier les membranes discales à partir de SEB-TGT.

4.3 La caractérisation de la mesure ellipsométrique

La section biochimique de ce travail a démontré que nous avons une méthode fiable pour purifier des SEB et estimer leur pureté (voir section 4.1). A partir de ces SEB, nous avons purifié des membranes discales (voir sections 3.2 et 4.2) de grande pureté, de la G-protéine pure (voir section 3.4), des phospholipides purs (voir section 3.5) et de la rhodopsine pure (voir section 3.6). Nous sommes donc prêts à procéder aux mesures biophysiques.

La méthode des monocouches est un excellent système modèle qui nous permet de mimer, en deux dimensions, différents phénomènes membranaires. De plus, l'ellipsométrie représente un outil très puissant puisqu'elle nous permet d'ajouter une dimension à ce système, i.e. l'épaisseur. Cependant, comme montré dans l'équation 3, la mesure expérimentale, $\delta\Delta$, dépend de trois paramètres (n_x , n_z et d). Ainsi, avant de procéder aux mesures impliquant les diverses composantes du photorécepteur visuel, il apparaît essentiel de s'assurer que l'on comprend bien la mesure ellipsométrique. Pour y arriver, nous avons commencé par établir un modèle en utilisant des phospholipides synthétiques. Nous avons utilisé quatre phosphatidylcholines saturées avec différentes longueurs de chaînes (DMPC, DPPC, DSPC et DAPC) avec les objectifs suivants: i) estimer, pour une même tête polaire, l'effet de l'augmentation de la

longueur de chaîne sur la mesure ellipsométrique et, ii) évaluer l'importance de l'état physique de la molécule sur la mesure ellipsométrique. De plus, nous avons aussi utilisé deux phosphatidylcholines comportant une chaîne grasse insaturée (POPC) et deux chaînes grasses insaturées (DOPC) avec l'objectif suivant: i) déterminer l'importance de l'insaturation dans la mesure ellipsométrique. L'objectif global poursuivi était d'établir la pondération de chaque paramètre (n_x , n_z et d) dans la mesure ellipsométrique.

4.3.1 L'isotherme ellipsométrique d'une série homologue de phospholipides saturés et insaturés

Nous avons effectué, en premier lieu, des simulations de l'équation 3 (voir section 2.14.2) par ordinateur, en faisant varier un seul paramètre à la fois. Ainsi, on a pu se rendre compte que lorsque n_x et n_z , deviennent plus grands que n_3 , la valeur de $\delta\Delta$ devient négative. De plus, si on change l'anisotropie (passage d'une orientation parallèle à perpendiculaire par rapport à l'interface azote-eau) en faisant augmenter n_z et diminuer n_x , on tend à rendre la valeur de $\delta\Delta$ plus positive. Cependant, cet effet est compensé par une augmentation de l'épaisseur (d) qui fait devenir $\delta\Delta$ plus négatif. Ainsi, une valeur de $\delta\Delta$ de plus en plus négative peut provenir uniquement de deux origines: i) une augmentation de d et ii) une augmentation simultanée des deux indices de réfraction (n_x et n_z). Ces deux phénomènes sont bien illustrés par les isothermes de DMPC, DPPC, DSPC, DAPC, POPC et DOPC. Nous avons donc procédé à la simulation de l'isotherme

ellipsométrique de ces phospholipides en supposant que la tête polaire n'est pas détectée par cette technique (voir le modèle proposé en 4.3.1.1). La manipulation consiste, à partir d'une épaisseur réaliste (modèle moléculaire CPK de chaque phospholipide), à trouver des indices de réfraction qui correspondent à la mesure expérimentale ($\delta\Delta$). On suppose alors que, au début et à la fin de l'isotherme, le phospholipide est orienté, respectivement, parallèle et perpendiculaire à l'interface. Ainsi, au début de l'isotherme, n_x est plus grand que n_z alors qu'à la fin de l'isotherme, n_x devient plus petit que n_z puisque la polarisabilité parallèle à l'axe moléculaire, est plus grande que la polarisabilité normale à cet axe. De plus, on a pris les indices de réfraction comme étant des vecteurs, donc la valeur de n_x au début de l'isotherme est égale à la valeur de n_z à la fin de l'isotherme et vice versa (en fait, il faut les considérer comme des tenseurs, voir équation 4 dans la description du modèle en 4.3.1.1).

Le tableau 7 montre une simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DMPC. Le plateau au début de l'isotherme ellipsométrique (figure 15) peut être simulé de deux façons: i) en gardant constants les deux indices de réfraction et l'épaisseur ou ii) en augmentant lentement la valeur de l'épaisseur et de n_z tout en diminuant très peu la valeur de n_x . Par la suite, on simule la relation linéaire entre $\delta\Delta$ et l'aire moléculaire en augmentant plus rapidement l'épaisseur tout en conservant de faibles variations de l'anisotropie (augmentation de n_z et diminution de n_x). Vient ensuite la transition de phase que l'on peut simuler de deux façons (voir tableau 7): (façon i) augmenter

Tableau 7

LA SIMULATION DE L'ISOTHERME ELLIPSOMÉTRIQUE DE LA DMPC

	d (Å)	n _x	n _z	δΔ (°)
Début	7,1	1,475	1,457	-0,54
	7,3	1,474	1,458	-0,54
	7,5	1,473	1,459	-0,55
	7,9	1,472	1,460	-0,56
	9,0	1,471	1,462	-0,64
	11,0	1,470	1,463	-0,76
	12,0	1,469	1,464	-0,81
	13,0	1,468	1,465	-0,86
	14,0	1,467	1,466	-0,91
	15,0	1,466	1,467	-0,95
Façon i	16,0	1,498	1,503	-1,32
Façon ii	25,0	1,457	1,475	-1,32
	16,5	1,497	1,504	-1,34
	17,0	1,496	1,505	-1,36
Fin	17,5	1,495	1,506	-1,36

beaucoup les deux indices de réfraction et très peu l'épaisseur ou (façon ii) augmenter beaucoup l'épaisseur avec un faible changement de l'anisotropie. La faible variation de l'aire moléculaire ($5 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$) lors de la transition de phase, suggère fortement que l'augmentation prépondérante des deux indices de réfraction (façon i, voir tableau 7), convient le mieux pour simuler cette portion de l'isotherme de la DMPC. De plus, l'épaisseur obtenue (façon ii, voir tableau 7) est trop grande lorsqu'on considère la dimension de la molécule (modèle CPK). Après la transition de phase, on simule le changement de pente par une faible variation de l'anisotropie et de l'épaisseur.

La DPPC, différemment de la DMPC (voir figure 15) montre une transition de phase immédiatement après le plateau au début de l'isotherme ellipsométrique (voir figure 16). Ce plateau de l'isotherme de DPPC peut être simulé comme dans le cas de la DMPC (voir ci-dessus et le tableau 7). Toutefois, contrairement à la DMPC, la transition de phase de la DPPC peut être simulée uniquement par une augmentation simultanée et linéaire des deux indices de réfraction et de l'épaisseur (voir tableau 8) pour les raisons suivantes: i) en augmentant seulement l'épaisseur, on doit dépasser largement les dimensions de la molécule (modèle CPK) pour satisfaire aux mesures expérimentales, ii) en augmentant uniquement les deux indices de réfraction, on obtient une épaisseur, à la fin de l'isotherme, qui est bien en deçà de la dimension de la molécule (modèle CPK) et iii) la variation importante de l'aire moléculaire ($31 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$), lors de cette transition de phase (voir figure 16), implique qu'une variation de l'épaisseur doit aussi prendre

Tableau 8

LA SIMULATION DE L'ISOTHERME ELLIPSOMÉTRIQUE DE LA DPPC

	d (Å)	n _x	n _z	δΔ (°)
Transition de phase (début)				
	8,0	1,486	1,470	-0,65
	9,0	1,488	1,473	-0,74
	10,5	1,490	1,475	-0,88
	12,0	1,492	1,480	-1,00
	13,5	1,493	1,485	-1,12
Transition de phase (fin)				
	15,0	1,494	1,490	-1,23
	16,5	1,495	1,495	-1,34
	18,0	1,496	1,500	-1,45
	19,5	1,497	1,505	-1,56
	20,5	1,496	1,506	-1,61
	21,5	1,495	1,507	-1,66

place. Le changement de pente subséquent à la transition de phase est simulé, comme pour la DMPC, par une faible variation de l'anisotropie et de l'épaisseur.

La DPPC et la DMPC qui étaient dans l'état liquide expansé au début de l'isotherme, ont ensuite subi une transition de phase jusqu'à l'état solide condensé. La DSPC et la DAPC montrent un comportement fort différent: elles sont, du début jusqu'à la fin de l'isotherme, dans l'état solide condensé (voir figures 17 et 18). Le tableau 9 montre trois essais différents pour simuler l'isotherme ellipsométrique de la DSPC. On peut donc voir, dans l'essai A, que si on suppose que les deux chaînes grasses sont couchées sur l'eau au début de l'isotherme ($4,5 \text{ \AA}$, modèle CPK), on obtiendra une épaisseur de 6 \AA à la fin de l'isotherme avec ces indices de réfraction. Il est donc évident que l'utilisation de ces paramètres est erronée. Dans l'essai B, nous avons supposé que les deux chaînes grasses, parallèles à l'interface, sont superposées (épaisseur de $8,5 \text{ \AA}$) au début de l'isotherme. Encore ici, la valeur de l'épaisseur à la fin de l'isotherme est irréaliste par rapport à la longueur totale de la DSPC (orientée perpendiculairement à l'interface). Pour que la simulation soit réaliste, il a fallu supposer que la DSPC était déjà orientée au début de l'isotherme (essai C). Les indices de réfraction de l'essai C ont été suggérés de l'étude théorique de Huang et Levitt (1977). La simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DAPC nous a aussi obligé à supposer qu'elle était déjà orientée au début de l'isotherme (voir tableau 10).

Tableau 9

LA SIMULATION DE L'ISOTHERME ELLIPSOMÉTRIQUE DE LA DSPC

	d (Å)	n _x	n _z	δΔ (°)
<u>Essai A</u>				
Début	4,5	1,825	1,810	-1,58
Fin	6,0	1,810	1,825	-1,95
<u>Essai B</u>				
Début	8,5	1,640	1,630	-1,58
Fin	11,0	1,630	1,640	-1,95
<u>Essai C</u>				
Début	19,5	1,512	1,543	-1,60
	20,5	1,511	1,544	-1,66
	21,5	1,510	1,545	-1,71
	22,5	1,509	1,546	-1,76
	23,5	1,508	1,547	-1,81
	24,5	1,507	1,548	-1,85
	25,5	1,506	1,549	-1,90
Fin	26,5	1,505	1,550	-1,94

Tableau 10

LA SIMULATION DE L'ISOTHERME ELLIPSOMÉTRIQUE DE LA DAPC

	d (Å)	n _x	n _z	δΔ (°)
Début	25	1,508	1,545	-1,90
	26	1,507	1,546	-1,98
	27	1,506	1,547	-2,03
	28	1,505	1,548	-2,07
	29	1,504	1,549	-2,10
	30	1,503	1,550	-2,14
	31	1,502	1,551	-2,17
	32	1,501	1,552	-2,20
Fin	33	1,500	1,553	-2,23

Le tableau 11 présente la simulation de l'isotherme ellipsométrique de la DOPC qui donne le même résultat que la POPC (non montré). Ainsi, la POPC et la DOPC montrent des isothermes ellipsométriques similaires, mais passablement différentes des phospholipides saturés. La POPC et la DOPC se trouvent dans l'état liquide expansé du début jusqu'à la fin de l'isotherme (voir figures 19 et 20). Le plateau au début de l'isotherme de la POPC et de la DOPC peut être simulé comme dans le cas de la DMPC (voir tableau 7). On observe, par la suite, une relation linéaire entre $\delta\Delta$ et l'aire moléculaire qui correspond à une augmentation assez rapide de l'épaisseur et à une faible variation de l'anisotropie (voir tableau 11). On assiste ensuite à un autre plateau qui correspond à une région mal connue, appelée collapse. Nos simulations nous permettent de croire qu'il n'y a pas de formation de bibouche dans cette région de l'isotherme. Cependant, cela n'exclut pas la possibilité de l'élaboration d'une structure organisée au-dessous de l'interface (Ries et Swift, 1982).

A partir de ces simulations et des mesures expérimentales, on note les observations suivantes: i) lorsque tous ces phospholipides sont dans l'état gazeux, l'angle ellipsométrique est égal à zéro ou montre un signal instable. Dans cet état, on suppose que ces molécules sont couchées sur l'eau. A ces grandes aires moléculaires, l'indice de réfraction du film est presque égal à celui de la sous-phase. ii) A partir d'une aire moléculaire donnée, on observe un saut dans l'angle ellipsométrique qui correspond à la transition de l'état gazeux à l'état

Tableau 11

LA SIMULATION DE L'ISOTHERME ELLIPSOMÉTRIQUE DE LA DOPC

	d (Å)	n _x	n _z	δΔ (°)
Début	8,0	1,486	1,470	-0,64
	8,5	1,485	1,471	-0,68
	9,0	1,484	1,472	-0,71
	9,5	1,483	1,473	-0,74
	10,0	1,482	1,474	-0,76
	10,5	1,481	1,475	-0,79
	11,0	1,480	1,476	-0,81
	11,5	1,479	1,477	-0,83
	12,0	1,478	1,478	-0,85
	12,5	1,477	1,479	-0,87
	13,0	1,476	1,480	-0,89
	13,5	1,475	1,481	-0,91
	14,5	1,474	1,482	-0,95
	15,5	1,473	1,483	-1,00
	16,0	1,472	1,484	-1,01
	16,5	1,471	1,485	-1,02
Fin	17,0	1,470	1,486	-1,04

liquide expansé (DMPC, DPPC, POPC et DOPC) ou solide condensé (DSPC et DAPC). On associe ce saut à une augmentation significative des deux indices de réfraction et de l'épaisseur. Plus les deux indices de réfraction sont élevés et plus l'épaisseur est grande, plus le saut dans l'angle ellipsométrique sera important. Le tableau 12 montre bien cette conclusion. De plus, ce saut prend toujours place avant le début de l'isotherme de pression de surface. On explique cette différence en supposant qu'il existe une pression de surface dans cette zone, mais que notre système n'est pas assez sensible pour la détecter (voir Munger, 1979). iii) La valeur du saut dans l'angle ellipsométrique est fonction de l'état physique; les phospholipides dans l'état solide condensé (DSPC et DAPC) montrent un saut beaucoup plus important que dans l'état liquide expansé (DMPC, DPPC, POPC, DOPC) (voir tableau 12). De plus, les phospholipides dans l'état solide condensé (DSPC et DAPC) doivent être orientés au début de l'isotherme, si on veut faire correspondre les données expérimentales (voir tableau 12). iv) Pour tous les phospholipides dans l'état liquide expansé au début de l'isotherme, on remarque la présence d'un plateau où il se produit peu de changement dans les paramètres (n_x , n_z et d). La relation linéaire entre $\delta\Delta$ et l'aire moléculaire qui suit le plateau, implique une augmentation relativement rapide de d et une faible variation de l'anisotropie. v) La transition de phase amène inévitablement une augmentation des deux indices de réfraction. Donc, cette variation des deux indices de réfraction est reliée directement à un changement dans l'état physique du film. vi) Si on trace le graphique de la valeur de l'angle ellipsométrique à la fin de l'isotherme (voir tableau 12), en fonction du nombre de carbones de

Tableau 12

LA VALEUR DE L'ANGLE ELLIPSOMÉTRIQUE ($\delta\Delta$) AU DÉBUT ET
A LA FIN DE L'ISOTHERME

	Début ($\delta\Delta$, °)	Fin ($\delta\Delta$, °)
DMPC	-0,55 (7,1 Å; 1,475)*	-1,37
DPPC	-0,68 (8,0 Å; 1,486)	-1,68
DSPC	-1,58 (19,5 Å; 1,512)	-1,95
DAPC	-1,90 (25,0 Å; 1,508)	-2,25
POPC	-0,64 (8,0 Å; 1,486)	-1,04
DOPC	-0,64 (8,0 Å; 1,486)	-1,04

* La valeur respective de l'épaisseur (d) et d'un indice de réfraction (n_x) déterminés lors des simulations (voir tableaux 7, 8, 9, 10 et 11) (d; n_x)

chaque chaîne aliphatique pour la DMPC, la DPPC, la DSPC et la DAPC, on obtient une relation linéaire (voir figure 34). Cela implique que, pour un même état physique, l'angle ellipsométrique augmente linéairement avec la longueur de chaîne. vii) Une seule double liaison sur une seule chaîne aliphatique (la POPC) est suffisante pour que la molécule se trouve dans l'état liquide expansé, du début jusqu'à la fin de l'isotherme. viii) Il n'existe qu'un nombre restreint de combinaisons réalistes de n_x , n_z et d pour satisfaire les mesures expérimentales. ix) L'ellipsométrie nous permet de déterminer la fin de la transition de phase, ce que les autres techniques ne parviennent pas à faire avec autant de précision.

Malgré ce choix restreint de combinaisons, il y existe tout de même un choix. La seule façon de régler ce problème, c'est d'établir la relation entre l'aire moléculaire et la mesure ellipsométrique. Pour y arriver, nous avons élaboré un modèle présenté ci-dessous.

4.3.1.1 Le modèle proposé

Pour échafauder ce modèle, nous avons supposé les conditions réalistes suivantes que nous avons utilisé comme hypothèse de travail: i) le film est uniaxial et anisotrope, ii) la polarisabilité le long de l'axe moléculaire est supérieure à la polarisabilité perpendiculaire à cet axe, iii) le groupement polaire, hydrophile, est fortement hydraté, donc son indice de réfraction est approximativement égal à celui de la sous-phase, iv) la variation des indices de réfraction,

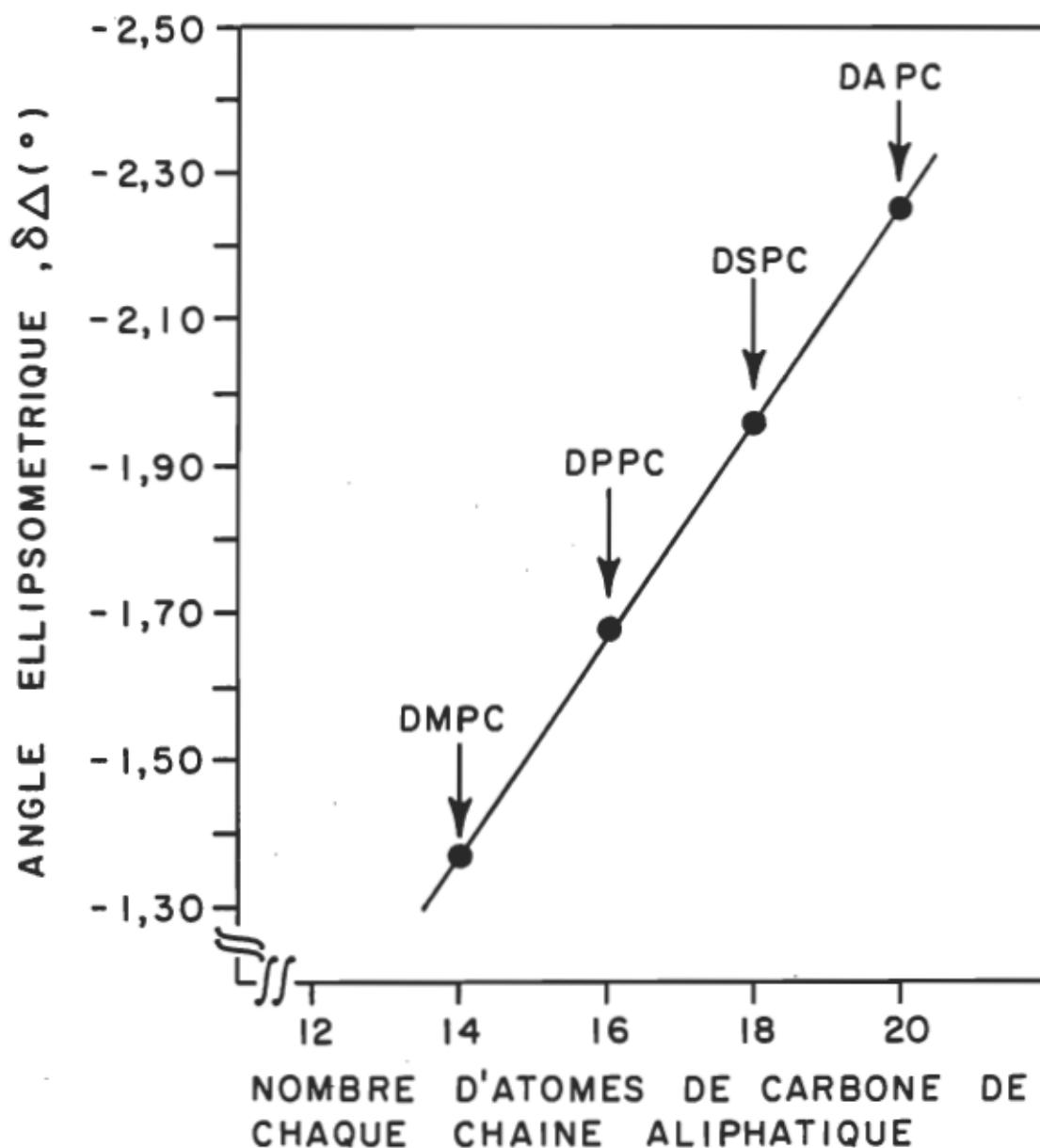


Figure 34. Le graphique de la valeur de l'angle ellipsométrique à la fin de l'isotherme de DMPC, DPPC, DSPC et DAPC en fonction du nombre de carbones de chaque chaîne aliphatique.

selon l'orientation θ (voir figure 35), des chaînes aliphatiques par rapport à l'axe vertical, z , est donnée par les équations suivantes (Engelsen et Koning, 1974a),

$$n_x = n_y = \left(\frac{1}{2} \left\{ (1 + \cos^2 \theta) \epsilon_x + \epsilon_z \sin^2 \theta \right\} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

$$n_z = (\epsilon_x \sin^2 \theta + \epsilon_z \cos^2 \theta)^{\frac{1}{2}}$$

où ϵ_x et ϵ_z représentent les constantes diélectriques perpendiculaire et parallèle à l'axe moléculaire ($\epsilon = n^2$).

Ce modèle suppose qu'à de grandes aires moléculaires, les molécules sont étalées, à plat, sur le substrat. Au fur et à mesure de la compression, elles tendent à s'orienter mais peuvent le faire seulement au-delà d'un angle minimum donné. A partir de cet angle, elles s'orientent de plus en plus à la verticale.

Comme montré en figure 35, notre modèle associe les chaînes aliphatiques à des parallélépipèdes de largeur d_0 . De plus, on suppose que la tête polaire, d_2 (voir figure 36), a la même largeur, d_0 , que les chaînes aliphatiques. On définit, la dimension d_1 , comme étant la longueur totale de la molécule (voir figures 35 et 36).

A l'aide de ce modèle, on effectue le calcul des paramètres suivants: i) l'angle minimum à partir duquel l'orientation des molécules peut commencer, ii) l'aire moléculaire en fonction de l'angle θ ,

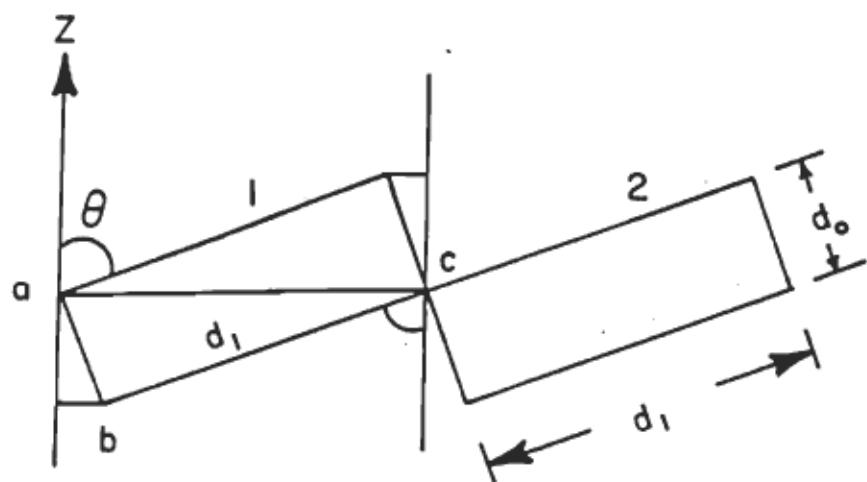


Figure 35. Le modèle montrant l'importance du θ_{\min} dans l'orientation des phospholipides.

iii) la variation de l'épaisseur, d , en fonction de l'angle θ . Par la suite, on dresse un tableau comprenant l'angle θ , n_x , n_z , l'épaisseur (d), $\delta\Delta$ et l'aire moléculaire qui sont tous obtenus par simulation pour une valeur donnée de d_0 , d_1 , d_2 , $n_x(\theta)$ et $n_z(\theta)$. On compare ensuite graphiquement ces résultats à ceux obtenus expérimentalement.

On calcule les paramètres i, ii et iii (voir ci-dessus) de la façon suivante:

i) Calcul de l'angle minimum à partir duquel les molécules peuvent commencer à s'orienter

Pour que la molécule 1 puisse glisser sur la molécule 2 (voir figure 36), il faut que,

$$d_1 \cos \theta \geq d \sin \theta \quad (5)$$

d'où, l'angle minimum requis, θ_{\min} , est:

$$\theta_{\min} = \tan^{-1} \frac{d_1}{d_0} \quad (6)$$

Donc, les molécules ne peuvent pas s'orienter lorsqu'elles se trouvent entre 90° et θ_{\min} . Dans cette configuration, l'aire moléculaire, A , d'une chaîne aliphatique est égale à la projection du triangle abc sur la surface multipliée par la largeur d_0 (voir figure 35),

$$A = d_0 (d_1 \sin \theta + d_0 \cos \theta) \quad (7)$$

mais puisque nous avons deux chaînes aliphatiques par molécule de PC, on doit multiplier l'équation 7 par deux:

$$A = 2d_o (d_1 \sin \theta + d_o \cos \theta) \quad (8)$$

ii) Calcul de l'aire moléculaire pour $\theta < \theta_{\min}$

Comme montré à la figure 36, la tête polaire (d_2) ayant la même largeur (d_o) que les chaînes aliphatiques, l'aire moléculaire (A) est obtenue par la projection de d_o sur un plan parallèle à la surface, quelle que soit la pénétration du groupement polaire dans la sous-phase. Puisqu'il y a deux chaînes aliphatiques par phospholipide, nous obtenons,

$$A = \frac{2 d_o^2}{\cos \theta} \quad (9)$$

Cette équation est identique à celle proposée par Hauser (1985).

iii) Calcul de l'épaisseur (d) en fonction de l'angle θ

La longueur de la molécule, d_1 , est constituée de la tête polaire, d_2 , et de la chaîne aliphatique, d_1-d_2 (voir figure 36). On considère ensuite que le groupement polaire (d_2), pour un angle donné (θ), se situe sous le niveau aqueux (AA') et ne peut donc pas être détecté selon la supposition iii de l'hypothèse de travail du

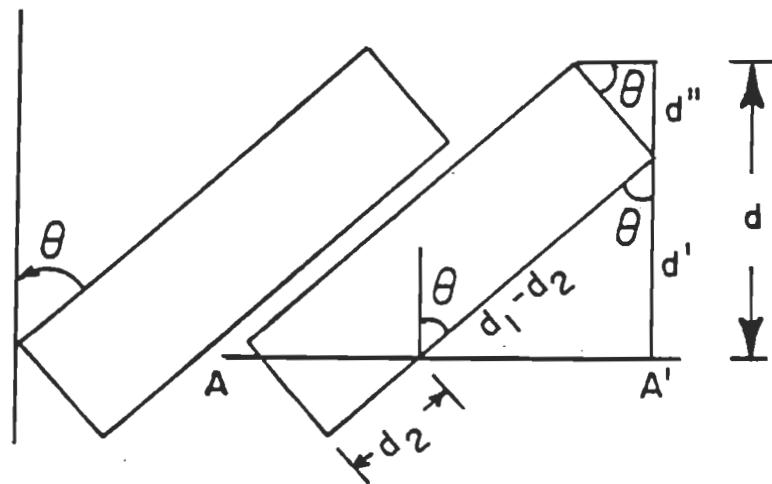


Figure 36. Le modèle pour calculer l'aire moléculaire à $\theta < \theta_{\min}$.

modèle (voir ci-dessus). Nous obtenons donc, selon la figure 36, pour le calcul de l'épaisseur (d), l'expression suivante,

$$d = d' + d'' = (d_1 - d_2) \cos \theta + d_0 \sin \theta \quad (10)$$

On procède ensuite à la simulation de l'isotherme en suivant les étapes décrites ci-dessous. Les paramètres considérés pour la simulation sont les suivants: d_0 , d_1 , d_2 , $n_x(\theta)$ et $n_z(\theta)$. Nous avons donc proposé des valeurs initiales de $n_x(\theta)$ et $n_z(\theta)$ ($\theta = 0^\circ$) pour une valeur donnée de d_0 , d_1 et d_2 . Puis, à l'aide de l'équation 4, nous avons obtenu les indices de réfraction en fonction de θ que nous avons fait varier de 0 à 70° (angle minimum). La valeur de $d(\theta)$ est calculée à l'aide de l'équation 10. L'aire moléculaire et $\delta\Delta$ sont calculés en utilisant, respectivement, l'équation 9 et 3 (voir section 2.14.2). Il s'agit donc, tout en se limitant à des valeurs réalistes (modèle CPK), de faire varier d_0 , d_1 et d_2 de même que $n_x(\theta)$ et $n_z(\theta)$ ($\theta = 0^\circ$) jusqu'à ce que l'isotherme simulée corresponde le mieux possible avec l'isotherme expérimentale.

On montre, dans les tableaux 13 et 14, les données respectives de la simulation de la DSPC et de la DOPC qui sont comparées graphiquement avec leur isotherme expérimentale respective (voir figures 37 et 38). Ainsi, dans les deux cas, on peut voir que l'isotherme simulée et expérimentale montrent une très bonne correspondance. Les tableaux 13 et 14 indiquent que si on considère les indices de réfraction comme des tenseurs (voir équation 4) et non comme des vecteurs, la

Tableau 13

LA SIMULATION DE L'ISOTHERME ELLIPSOMÉTRIQUE DE LA DSPC EN
FONCTION DE L'AIRE MOLÉCULAIRE

$d_0 = 4,5 \text{ \AA}^\circ$; $d_1 = 35,5 \text{ \AA}^\circ$; $d_2 = 13 \text{ \AA}^\circ$; $n_x(\theta) = 1,500$ et
 $n_z(\theta) = 1,507$ pour $\theta = 0^\circ$

$\theta (^\circ)$	n_x	n_z	$d (\text{\AA}^\circ)$	$\delta\Delta (^\circ)$	$A (\text{\AA}^2 / \text{molécule})$
0	1,500	1,507	22,5	-1,85	41
5	1,500	1,507	22,8	-1,87	41
10	1,500	1,507	22,9	-1,89	41
15	1,500	1,507	22,9	-1,89	42
20	1,500	1,506	22,7	-1,88	43
25	1,501	1,506	22,3	-1,85	45
30	1,501	1,505	21,7	-1,81	47
35	1,501	1,505	21,0	-1,76	49
40	1,501	1,504	20,1	-1,70	53
45	1,502	1,504	19,1	-1,62	57
50	1,502	1,503	17,9	-1,53	63
55	1,502	1,502	16,6	-1,42	71
60	1,503	1,502	15,1	-1,31	81
65	1,503	1,501	13,6	-1,18	96
70	1,503	1,501	11,9	-1,04	118

Tableau 14

LA SIMULATION DE L'ISOTHERME ELLIPSOMÉTRIQUE DE LA DOPC EN
FONCTION DE L'AIRE MOLÉCULAIRE

$d_0 = 4,7 \text{ \AA}$; $d_1 = 35,5 \text{ \AA}$; $d_2 = 13 \text{ \AA}$; $n_x(\theta) = 1,440$ et
 $n_z(\theta) = 1,447$ pour $\theta = 0^\circ$

$\theta(\text{ }^\circ)$	n_x	n_z	$d \text{ (}\text{\AA}\text{)}$	$\delta\Delta(\text{ }^\circ)$	$A \text{ (}\text{\AA}^2\text{ /molécule)}$
0	1,440	1,447	22,5	-1,05	44
5	1,440	1,447	22,8	-1,07	44
10	1,440	1,447	23,0	-1,08	45
15	1,440	1,447	22,9	-1,08	46
20	1,440	1,446	22,8	-1,08	47
25	1,441	1,446	22,4	-1,07	49
30	1,441	1,445	21,8	-1,05	51
35	1,441	1,445	21,1	-1,03	54
40	1,441	1,444	20,3	-1,00	58
45	1,442	1,444	19,2	-0,96	62
50	1,442	1,443	18,1	-0,91	69
55	1,442	1,442	16,8	-0,85	77
60	1,443	1,442	15,3	-0,78	88
65	1,443	1,441	13,8	-0,71	105
70	1,443	1,441	12,1	-0,63	129

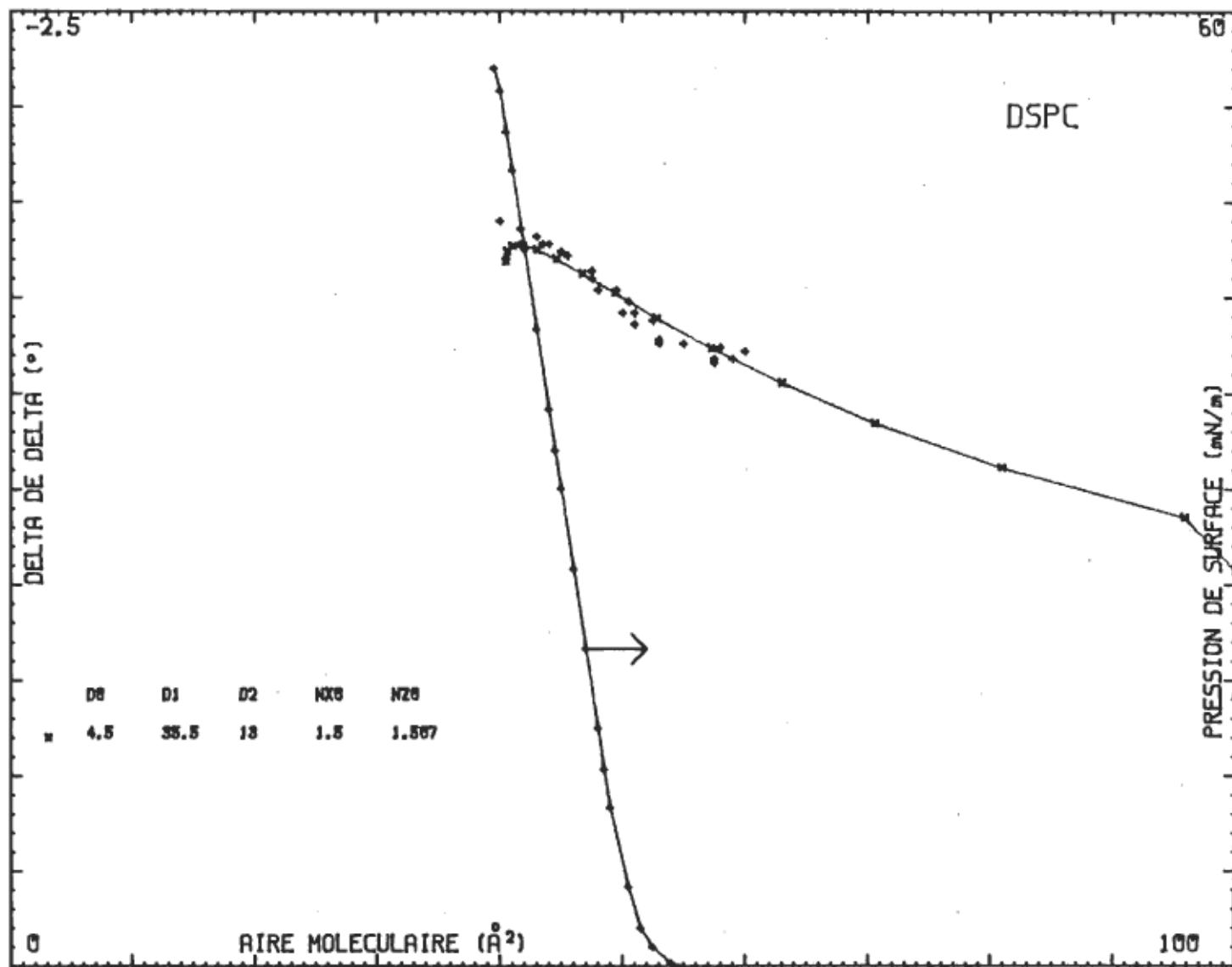


Figure 37. La comparaison entre l'isotherme ellipsométrique simulée (x—x) et expérimentale (+) de la DSPC.

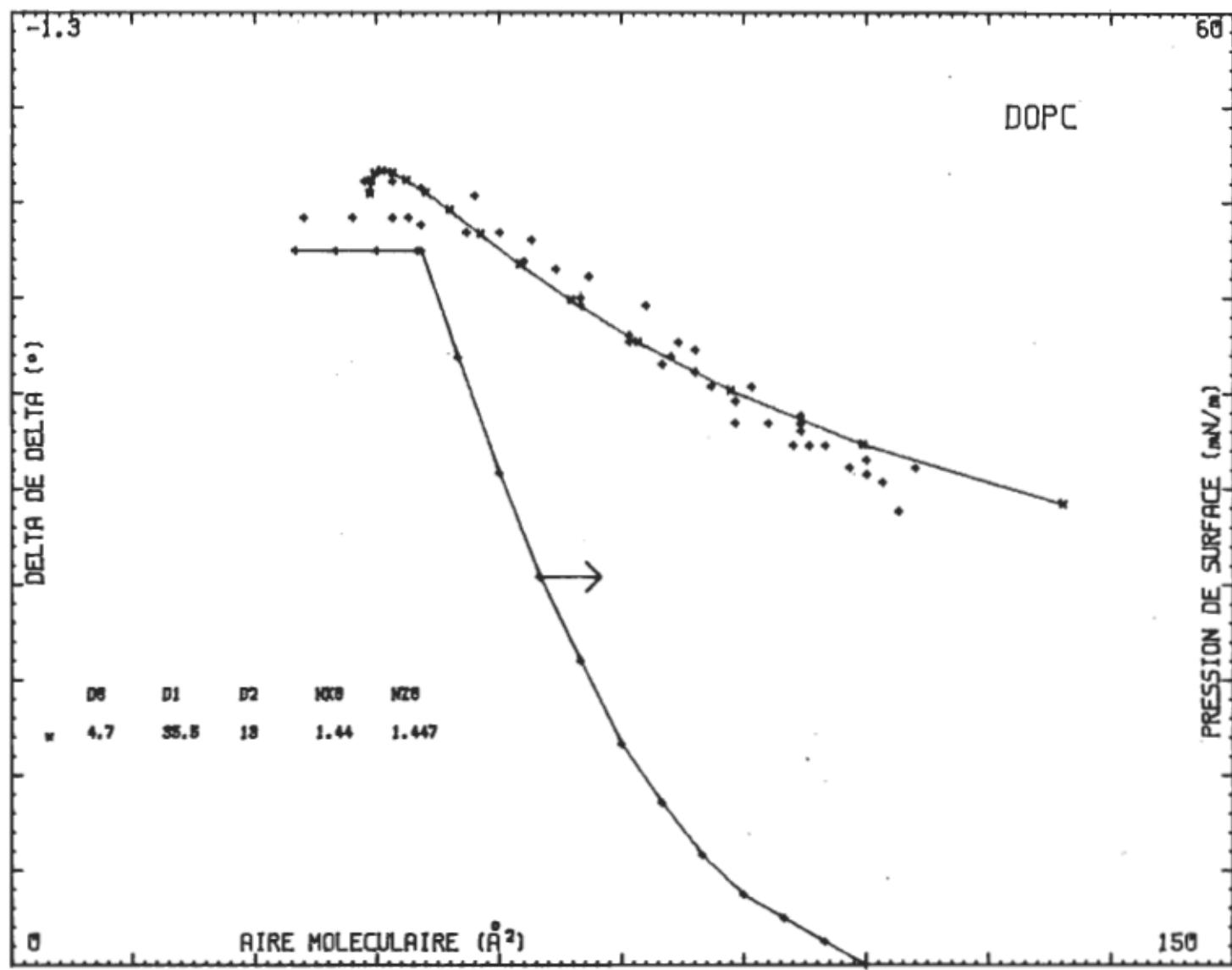


Figure 38. La comparaison entre l'isotherme ellipsométrique simulée (x---x) et expérimentale (+) de la DOPC.

valeur de n_x , à la fin de l'isotherme, égalera la moitié de la valeur de n_z au début de l'isotherme. Par contre, cela a peu d'effet sur le résultat final. De plus, pour obtenir la meilleure correspondance, la biréfringence à la fin de l'isotherme (0,007) simulée de DSPC et DOPC (voir tableaux 13 et 14), est identique. Ce résultat est surprenant puisque les deux films se trouvent dans un état physique différent. En observant les figures 37 et 38, on s'aperçoit que l'isotherme simulée de la DOPC correspond bien aux mesures expérimentales, du début jusqu'à la fin de l'isotherme. Cependant, l'isotherme simulée de la DSPC débute bien avant l'isotherme expérimentale. Il faut donc reconsidérer la figure 36 si le phospholipide est dans l'état solide condensé au début de l'isotherme. Néanmoins, la conclusion la plus importante est la suivante: ces résultats nous permettent de corroborer les observations faites à partir des simulations précédentes qui ne tenaient pas compte de l'aire moléculaire (voir section 4.3.1).

4.3.2 L'isotherme de pression et de potentiel de surface de la série homologue de phospholipides et la relation avec leur isotherme ellipsométrique

Il est intéressant de comparer l'isotherme de pression de surface de la DPPC, la POPC et la DOPC lorsqu'elles sont dans l'état liquide expansé. Dans ce but, nous utilisons l'isotherme de pression de surface de Hui et al. (1975) à 44°C pour la DPPC et notre mesure expérimentale de la POPC (figure 19) et de la DOPC (figure 20). Ainsi, à 20 20 mN/m, on trouve $66 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour la DPPC et la POPC et

69 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ pour la DOPC alors qu'à 30 mN/m, on obtient, respectivement, 59, 60 et 61 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ pour la DPPC, la POPC et la DOPC. Donc, si on échange une chaîne grasse mono-insaturée (18:1) pour une chaîne grasse saturée (16:0) (POPC par rapport à DPPC), on obtient la même aire moléculaire. De plus, si on remplace la dernière chaîne grasse saturée (16:0) pour une autre chaîne grasse insaturée (18:1) (DOPC par rapport à POPC), on ne change pas significativement l'aire moléculaire. Par conséquent, c'est l'état physique de la molécule qui joue le rôle prépondérant dans la détermination de l'aire moléculaire.

L'isotherme de potentiel de surface de tous les phospholipides montre un comportement similaire aux isothermes ellipsométriques correspondants. Dans l'état gazeux, le potentiel de surface est égal à zéro ou montre un signal instable. On détecte ensuite un saut en potentiel de surface, tout comme en ellipsométrie, qui correspond à la transition de l'état gazeux à l'état liquide expansé. On interprète ce saut par l'orientation simultanée de tous les dipôles. A partir de ce point, on observe, dans presque tous les cas, un plateau qui correspond à celui mesuré en ellipsométrie. Par la suite, lorsque débute l'isotherme de pression de surface, on note une augmentation régulière du potentiel de surface, tout comme l'angle ellipsométrique. De plus, lors de la transition de phase dans l'isotherme de pression de surface de la DMPC et la DPPC, on s'aperçoit que l'isotherme de potentiel de surface et ellipsométrique montrent le même comportement. Donc, on peut conclure que, même si le potentiel de surface (mesure du moment dipolaire global dont la composante principale provient du groupement polaire) et l'ellipsométrie (mesure de la portion hydrophobe de la molécule) sondent des

parties différentes de la molécule, elles montrent un comportement similaire. Par conséquent, ces deux portions de la molécule sont influencées de la même façon par la compression.

4.4 La détermination de l'orientation de la rhodopsine à l'interface azote-eau

4.4.1 Les phospholipides des SEB

Les isothermes de pression, de potentiel de surface et ellipsométrique de chaque phospholipide des SEB (voir figures 21, 22 et 23) montrent les mêmes caractéristiques que celles de la POPC et la DOPC. Ainsi, les conclusions relatives aux isothermes de la POPC et la DOPC, exprimées dans la section précédente (section 4.3), sont aussi valables dans le cas des phospholipides des SEB.

4.4.2 La rhodopsine intacte ou hydrolysée

La rhodopsine purifiée, hautement délipidée, doit comporter une quantité suffisante de détergent pour conserver ses propriétés originales. Avec notre méthode, on retrouve, après purification, environ 475 molécules de OG par molécule de rhodopsine. Cependant, pour effectuer la mesure des isothermes de pression de surface, on doit diluer la rhodopsine en gardant constante la concentration de OG. Ainsi, on obtient un rapport final de 2 500 molécules de OG par rhodopsine. Cet excès de détergent cause toujours une pression de surface positive suite

à l'étalement de la rhodopsine à l'interface azote-eau. Par contre, les faibles propriétés tensio-actives de OG, amènent vraisemblablement la solubilisation de l'excès de OG dans la sous-phase, à partir du début de la compression. Cette affirmation est appuyée par les observations expérimentales suivantes: i) on ne mesure pas d'isotherme de pression de surface lorsque l'on étale de l'octyl glucoside pur; ii) la pression positive de départ reste constante (ou diminue) jusqu'au début de l'isotherme de pression de surface de la rhodopsine (pendant 150 à 250 cm²); iii) après la compression jusqu'au début de l'isotherme de pression de surface, on peut décompresser et retrouver une pression de surface nulle ou tout près de zéro. La recompression subséquente nous ramène sur la même isotherme que lors de la compression originale; iv) les isothermes en compression et en recompression sont très reproductibles si l'on ne dépasse pas une pression de surface de 38 mN/m (voir ci-dessous, discussion).

Il reste sûrement, malgré tout, une quantité appréciable de détergent au début de l'isotherme de pression de surface de la rhodopsine. On peut vérifier cette hypothèse en calculant l'aire moléculaire maximum que peut occuper la rhodopsine. Si on suppose que le grand axe de la grande (70 Å) et de la petite (52,5 Å) ellipse de la rhodopsine (voir section 1.4.1 et les figures 1 et 3), sont parallèles à l'interface avant le début de l'isotherme, on peut calculer une surface de ~ 2 900 Å²/rhodopsine. Cette surface représente donc un peu moins que la moitié de l'aire moléculaire mesurée expérimentalement (6 500 Å²/rhodopsine). Ainsi, il est indéniable qu'une certaine quantité de

détergent se retrouve à l'interface, en association avec la rhodopsine, au début de l'isotherme de pression de surface. De plus, il est justifié de supposer le grand axe de la grande et de la petite ellipse de la rhodopsine, comme étant parallèles à l'interface pour les raisons suivantes: i) comme démontré ci-dessus, l'aire moléculaire expérimentale au début de l'isotherme est au moins deux fois plus grande que l'aire moléculaire calculée; ii) la rhodopsine comporte deux extrémités hydrophiles (cytoplasmique et intradiscale) qui peuvent interagir avec l'eau; iii) le détergent n'a sûrement pas des propriétés tensio-actives suffisantes pour maintenir la rhodopsine sur sa plus faible surface (orientation transmembranaire, $\sim 1\ 030\ \text{\AA}^2/\text{rhodopsine}$), sans exercer une pression latérale (pression de surface) au moins équivalente à celle retrouvée dans la membrane discale; iv) le détergent est sûrement en quantité suffisante pour cacher la région hydrophobe (les hélices alpha) de la rhodopsine et lui permettre ainsi d'être entourée d'eau.

Par ailleurs, le début de l'isotherme ellipsométrique de la rhodopsine intacte montre un plateau. Comme dans le cas des phospholipides, ce plateau représente une zone où il n'y a aucune (ou une faible) variation des indices de réfraction et de l'épaisseur. Donc, la rhodopsine conserve à peu près la même orientation avant le début de l'isotherme de pression de surface. De plus, en utilisant un indice de réfraction de 1,410 (Sidman, 1957; Blaurock et Wilkins, 1969; Enoch et al., 1973), une biréfringence ($n_x - n_z$) de 0,005 (Lieberman, 1975) et en supposant $n_x > n_z$ (voir le modèle proposé pour les phospholipides, section 4.3.1), on peut calculer l'épaisseur du film pour un

$\delta\Delta = -0,80^\circ$ (plateau). On obtient ainsi 22°\AA , ce qui correspond bien avec la dimension du petit axe de la petite ellipse de la rhodopsine (25°\AA , voir figure 3). Donc, si l'indice de réfraction et la biréfringence utilisés sont exacts, cette mesure concorde bien avec l'hypothèse que le grand axe de la grande et de la petite ellipse de la rhodopsine, sont parallèles à l'interface. Il est important de noter que l'indice de réfraction utilisé a été déterminé pour des membranes discales. Considérant le fait que la membrane discale comporte, en poids sec, autant de rhodopsine que de lipides et que l'indice de réfraction des phospholipides (voir section 4.3.1) est plus élevé que celui des membranes discales, il est donc justifié de supposer que la rhodopsine contribue majoritairement à l'indice de réfraction déterminé par Liebman (1975). De plus, il est évident que l'isotherme ellipsométrique de la rhodopsine est beaucoup plus rapprochée de celle des membranes discales (figure 27) que de celle des phospholipides des SEB (figures 21, 22 et 23). Encore plus, Bonting et al. (1984) ont déterminé que les cristaux de rhodopsine ont une si faible biréfringence (tout comme celle des membranes discales, i.e. 0,005), que leur observation avec la lumière polarisée apporte peu d'informations. Ainsi, il est probablement acceptable d'utiliser l'indice de réfraction et la biréfringence des membranes discales pour calculer l'épaisseur de la rhodopsine.

Dans le but de déterminer la pression latérale dans la membrane discale, il faut connaître l'orientation de la rhodopsine dans notre système modèle. De plus, en connaissant la pression latérale, on peut déterminer, à partir de notre isotherme de pression de surface,

l'aire moléculaire occupée par la rhodopsine dans la membrane discale. L'isotherme ellipsométrique peut nous permettre de déterminer l'orientation de la rhodopsine. Cependant, il fallait s'assurer que l'augmentation quasi-exponentielle de l'angle ellipsométrique (voir figure 24), était due à une augmentation d'épaisseur et non à une augmentation des deux indices de réfraction. Nous avons déjà démontré qu'il fallait que les deux indices de réfraction augmentent pour que l'angle ellipsométrique devienne plus négatif (voir section 4.3.1). De plus, pour que les deux indices de réfraction augmentent, il faut que l'état physique du film change (transition de phase). L'isotherme de pression et de potentiel de surface de la rhodopsine, différemment de celles de la DPPC ou de la DMPC, ne montrent aucune indication qu'un changement physique du film se produit en cours de compression. Ainsi, il est fort plausible d'affirmer que notre isotherme est indicatif d'une augmentation de l'épaisseur. On assiste alors, comme dans le cas de la DSPC, la DAPC, la POPC et la DOPC, à une augmentation de n_z et une diminution de n_x . Toutefois, afin qu'aucun doute ne subsiste, nous avons procédé à la mesure des propriétés interfaciales d'une rhodopsine partiellement hydrolysée. On sait que la seule différence entre la rhodopsine intacte et la rhodopsine hydrolysée, c'est qu'il lui manque seulement les douze derniers acides aminés du carboxyle terminal (voir la section 3.6.4 et la figure 14). Cette différence étant très minime, leur pureté (voir section 3.6) et leur isotherme de pression de surface étant identiques, il est très justifié de supposer que les indices de réfraction de ces deux rhodopsines sont égaux.

Les résultats expérimentaux montrent que i) les isothermes ellipsométriques des deux rhodopsines se recouvrent presque parfaitement jusqu'à $\sim -2,30^\circ$ ($\sim 2\ 300\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$) alors que ii) à partir de $2\ 300\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$ (début de la relation linéaire entre l'angle ellipsométrique et l'aire moléculaire), plus on diminue l'aire moléculaire, plus l'isotherme ellipsométrique de la rhodopsine hydrolysée s'écarte de celle de la rhodopsine intacte. Puisque les indices de réfraction des deux rhodopsines sont présumés identiques, il est donc évident que, à partir de $2\ 300\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$ ($-2,30^\circ$), la différence d'épaisseur, provenant des douze acides aminés hydrolysés, se manifeste de façon croissante. Ainsi, le signal provenant du carboxyle terminal devient de plus en plus proéminent. Cela implique que le carboxyle terminal doit se détacher de plus en plus de la masse pour que la différence entre les deux isothermes devienne de plus en plus grande. On peut donc se demander par quel mécanisme ce phénomène peut se produire. On peut envisager une première éventualité où, à partir de $2\ 300\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$, la rhodopsine change son orientation: le grand axe de la grande ellipse qui est parallèle à l'interface, devient perpendiculaire à l'interface. Pour que cette hypothèse soit plausible, il faut que l'orientation de l'extrémité du carboxyle terminal soit stabilisée, de façon à ce que, au moins les douze derniers acides aminés du carboxyle terminal surplombent le reste de la molécule tout au long de la compression. Il existe trois arguments contre cette hypothèse: i) il est difficile d'imaginer que ces douze acides aminés peuvent être thermodynamiquement stables dans cette orientation, ii) la rhodopsine occupe $2\ 900\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$ (voir calcul ci-dessus) lorsqu'elle est parallèle à l'interface (le grand axe

de la grande ellipse) alors que cette différence se manifeste à partir de $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ et iii) il est alors difficile d'expliquer la première portion de l'isotherme ellipsométrique ($6\ 500$ à $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$) et encore plus ardu d'interpréter pourquoi la relation entre $\delta\Delta$ et l'aire moléculaire devient linéaire seulement à partir de $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Dans la deuxième hypothèse, on suppose que le carboxyle terminal maintient des interactions avec le reste de cette portion hydrophile (surface cytoplasmique, voir figures 1 et 2) de la molécule tout au long de sa réorientation. Ainsi, la rhodopsine intacte et hydrolysée montrent la même isotherme de $6\ 500$ à $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$, même si la rhodopsine, qui était parallèle à l'interface, devient perpendiculaire à l'interface à $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$. On explique la correspondance entre le début de la relation linéaire entre $\delta\Delta$ et l'aire moléculaire et le commencement de l'écart entre l'isotherme ellipsométrique de la rhodopsine intacte et celle de la rhodopsine hydrolysée, à partir de $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$, de la façon suivante. On suppose que la rhodopsine est perpendiculaire à l'interface à $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Ainsi, l'augmentation subséquente de la pression de surface (ou la diminution de l'aire moléculaire) force ensuite les hélices alpha à se rapprocher, ce qui a tendance à repousser les boucles et le carboxyle terminal vers le haut. Ainsi, plus ce phénomène s'accentue, plus la différence d'épaisseur entre les deux rhodopsines devient significative. De plus, ce rapprochement des hélices alpha devrait amener progressivement l'exclusion complète du détergent et finalement, l'agrégation de la rhodopsine. Ce processus occasionne donc un changement dans les propriétés physiques du film, ce qui peut expliquer l'établissement de la relation linéaire à

partir de $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$. La possibilité de former des agrégats de rhodopsine lorsqu'on compresse le film au-delà de 38 mN/m , est illustrée par la figure 39. Cette figure montre que la compression de la rhodopsine au-delà de 40 mN/m , entraîne une diminution de l'aire moléculaire en décompression et en recompression. Par contre, la compression jusqu'à 35 mN/m n'amène aucun changement dans l'aire moléculaire des isothermes en décompression et en recompression. Ainsi, il y a une certaine portion de rhodopsine agrégée (au-delà de 40 mN/m) qui ne reprend pas son organisation originale après décompression.

Les résultats suggèrent donc fortement qu'à $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ ($-2,30^\circ$), la rhodopsine a pris une orientation transmembranaire. On peut calculer l'épaisseur du film à $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$. On utilise donc le même indice de réfraction (1,410) et la même biréfringence (0,005) que pour le calcul au plateau ($-0,80^\circ$), sauf que l'on doit changer les valeurs de n_x et de n_z comme dicté par l'équation 4 (voir section 4.3.1.1), puisque l'on présume que la rhodopsine a changé d'orientation par 90° . Donc, pour une valeur de $\delta\Delta = -2,30^\circ$ ($2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$), on obtient une épaisseur de 73 \AA qui concorde bien avec la dimension du grand axe de la grande ellipse de la rhodopsine (voir section 1.4.1). Si toutes ces conclusions sont exactes, la pression de surface nécessaire pour maintenir l'orientation transmembranaire de la rhodopsine est de 38 mN/m ($2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Cette pression de surface pourrait donc être reliée à la pression latérale dans la membrane discale. De plus, cette aire moléculaire de

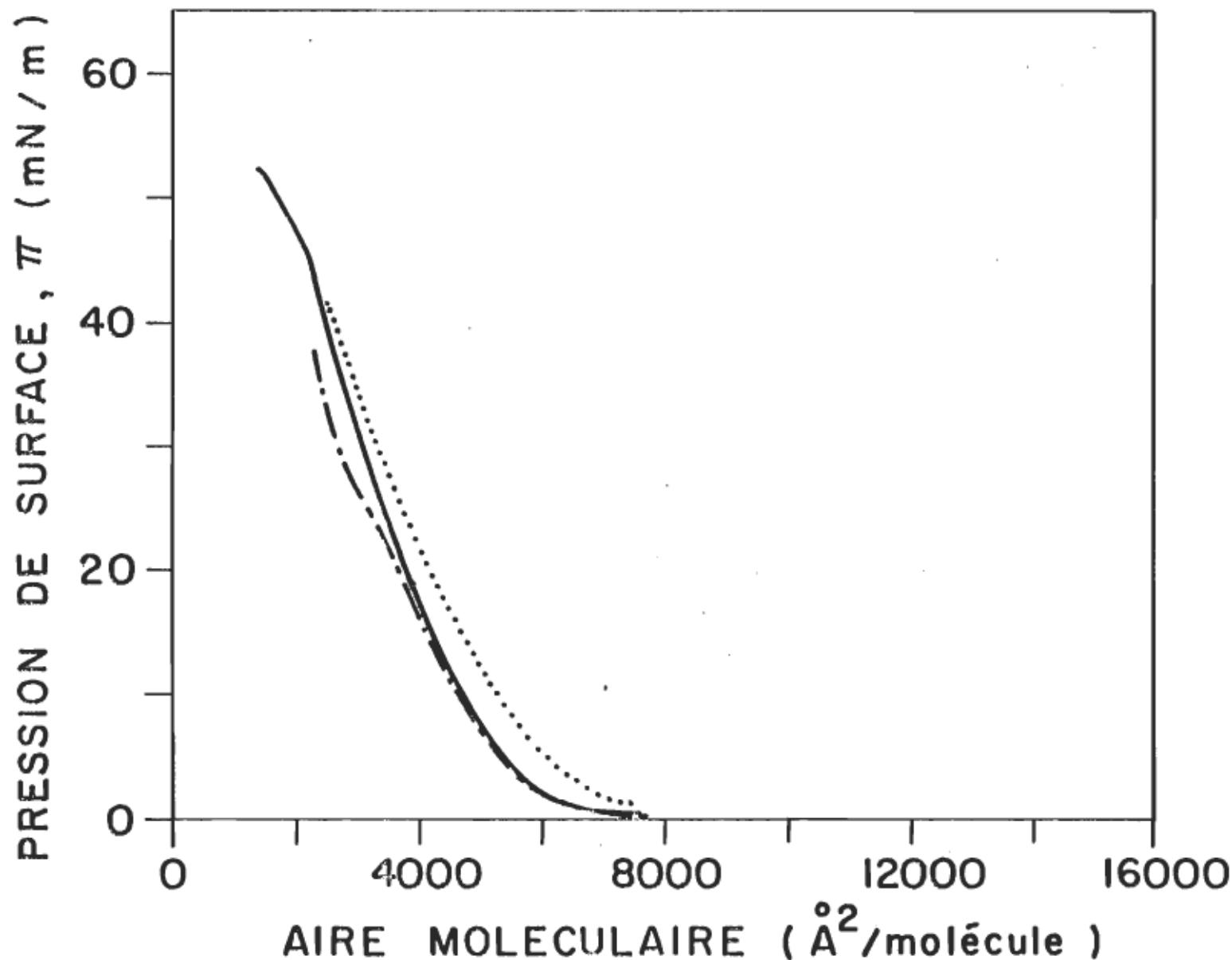


Figure 39. L'isotherme de pression de surface de la rhodopsine intacte: compression (·····), décompression (----) et recompression (—).

2 300 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ devrait correspondre à l'aire occupée par la rhodopsine dans la membrane discale. Si on calcule l'aire moléculaire de la rhodopsine dans la même orientation, en supposant des dimensions respectives de 25 et 52,5 \AA pour le petit et le grand axe de la petite ellipse (voir figure 3), on obtient 1 030 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$. Comme pour l'estimation de l'aire moléculaire au début de l'isotherme de pression de surface, cette valeur représente un peu moins que la moitié de la surface mesurée expérimentalement (2 300 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$). Le rapport semblable entre l'aire moléculaire expérimentale et calculée au début de l'isotherme (6 500/2 900 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$) et à 38 mN/m (2 300/1 030 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$), suggère que peu de détergent a été exclu en cours de compression (jusqu'à 38 mN/m).

On peut comparer uniquement notre isotherme de pression de surface à celle de N'Soukpoé-Kossi et Leblanc (1985) (voir cette publication pour une revue). Ces auteurs obtiennent une aire moléculaire de $\sim 1\ 100$ (concentration en protéines) ou 1 500 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ (concentration en rhodopsine) à 38 mN/m. Ces valeurs sont très différentes des nôtres. On peut expliquer cet écart par les raisons suivantes: i) leur rapport $A_{280} / \Delta A_{500}$ est égal à $2,0 \pm 0,2$ alors que nous obtenons $1,68 \pm 0,02$; ii) ils ont mesuré dix phospholipides par rhodopsine comparativement à un phospholipide pour dix rhodopsines dans notre cas; iii) ils ont travaillé sur une sous-phase contenant 10^{-3} M de tampon, alors que nous avons ajouté, au tampon, 10^{-1} M de NaCl pour augmenter le rendement lors de l'étalement (Pattus et al., 1981); iv) ils ont utilisé un détergent (Triton X-100) beaucoup plus tensio-actif que le

nôtre (octyl glucoside); v) leur nombre de molécules de détergent par molécule de rhodopsine est peut-être plus faible que le nôtre. De plus, nous avons vérifié, par agitation de la sous-phase, qu'il n'y avait pas de perte détectable de rhodopsine dans la sous-phase. Nous avons aussi vérifié la pureté de la rhodopsine par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. On peut donc conclure que l'aire moléculaire de notre isotherme est peut-être plus près de la réalité que dans le cas de N'Soukpoé-Kossi et Leblanc (1985).

4.4.3 Les membranes discales intactes ou traitées

Il a été suggéré que l'étalement de bicouches lipidiques à l'interface air-eau, était suivi de la transformation de la structure bi-lipidique en une monocouche (Pattus et al., 1978a). Nous avons confirmé ce résultat par ellipsométrie en préparant des vésicules unilamellaires de DOPC par la méthode de Jackson et Litman (1985) et en les étalant à l'interface azote-eau. Les mesures expérimentales ont révélé que l'isotherme ellipsométrique des vésicules de DOPC (Salesse et al., 1986a), était identique à celle de la DOPC étalée dans un solvant organique (Ducharme et al., 1985). Cependant, il n'est pas aussi évident que l'étalement de membranes biologiques, incorporant une protéine intrinsèque, mène à la formation d'une monocouche (Verger et Pattus, 1976; Pattus et al., 1978b; Pattus et al., 1981; Kanno et al., 1983). Dans le cas des membranes discales, la valeur de l'angle ellipsométrique au saut, est beaucoup plus élevée ($-1,12^\circ$) que pour la rhodopsine ($-0,80^\circ$) et chaque phospholipide des SEB ($-0,64$ à $-0,75^\circ$). Si on

utilise, comme pour la rhodopsine (voir section 4.4.2), un indice de réfraction de 1,410 et une biréfringence de 0,005, on obtient une épaisseur de 31 \AA , différemment de 22 \AA pour la rhodopsine et $\sim 12 \text{\AA}$ pour les phospholipides des SEB (voir tableau 14). Si ces valeurs des indices de réfraction sont exacts, on peut supposer que i) la rhodopsine prend une certaine orientation après l'étalement lorsqu'elle est entourée de phospholipides, ou ii) la rhodopsine est couchée sur l'eau et la couche de phospholipides qui l'entoure, augmente son épaisseur. La forme de l'isotherme ellipsométrique des membranes discales intactes (voir figure 27) est très différente de celle de la rhodopsine (voir figure 26). Celle de la rhodopsine intacte ou hydrolysée est quasi-exponentielle alors que celle des membranes discales comporte trois portions linéaires. Ainsi, la rhodopsine ne se comporte pas de la même façon lorsqu'elle est entourée de détergent (RI ou RH) ou de phospholipides (MD). En observant l'isotherme de pression de surface des membranes discales (voir figure 27), on s'aperçoit que la rhodopsine, entourée de phospholipides, a des propriétés similaires à un film de phospholipides dans l'état liquide expansé puisque, différemment de la rhodopsine intacte, son isotherme montre un plateau dans la région du collapse. Par contre, différemment de ces phospholipides (voir figures 19, 20, 21, 22 et 23), l'isotherme ellipsométrique des membranes discales présente un changement draconien de pente après le collapse. De plus, ce changement de pente correspond, en termes d'aire moléculaire, à un changement de pente, tout aussi important, de la valeur de ψ (voir figure 28). Des simulations de l'équation de ψ (voir Engelsen et Koning, 1974b) nous ont montré que ce changement de pente correspondait à une augmentation

significative de l'épaisseur. On n'a pas détecté de variation de ψ pour la rhodopsine intacte, ni pour aucun phospholipide. On peut donc croire que, après le collapse, les membranes discales forment une multicoche et que cette propriété est inhérente à ce film. De plus, on peut supposer que cette propriété qui permet aux membranes discales, seulement, de former une multicoche après le collapse, est que la rhodopsine est entourée d'une double couche de phospholipides du début de l'isotherme jusqu'au collapse. On peut corroborer cette hypothèse avec la figure 29, où, pour une même aire moléculaire, les membranes discales LT montrent une épaisseur moins grande que les membranes discales intactes, du début jusqu'à la fin de l'isotherme, en supposant que leurs indices de réfraction sont identiques (voir section 3.8.3). De plus, pour qu'une différence d'épaisseur soit détectée, il faut que la rhodopsine, dans les deux cas, aie déjà une orientation au début de l'isotherme. Il est logique de croire qu'une double couche de phospholipides pourrait permettre à la rhodopsine d'avoir une certaine orientation au début de l'isotherme. Cependant, il faut être très prudent quant aux conclusions tirées à partir de ce résultat (membranes discales LT) parce qu'il a fallu faire coïncider les isothermes.

Par ailleurs, les résultats de Korenbrot et Pramik (1977) confirment notre hypothèse de la formation de multicoches après le collapse. Ces auteurs ont démontré, par microscopie électronique de films prélevés par la technique de Langmuir-Blodgett, que, après le collapse, les films de rhodopsine-phospholipide étaient constitués de fragments membranaires entourés d'un monocouche de phospholipides. De plus,

Korenbrot et Jones (1979) ont mesuré le dichroïsme linéaire de films de rhodopsine-phospholipide qui ont été prélevés, à 38 mN/m, par la technique de Langmuir-Blodgett. Ils ont montré que, à 38 mN/m, l'orientation de la rhodopsine est similaire à celle retrouvée dans les membranes discales intactes (le chromophore forme un angle de 15° avec le plan de la membrane, voir section 1.4.3). A 38 mN/m, nous obtenons -2,25° pour les membranes discales intactes (voir figure 27). Ainsi, considérant nos conclusions quant à l'orientation de la rhodopsine intacte à l'interface azote-eau (voir section 4.4.2) et en supposant que la conclusion de Korenbrot et Jones (1979) est valable pour nos films de membranes discales intactes, on peut suggérer que, puisqu'on obtient respectivement, à 38 mN/m, -2,25° et -2,30° pour les membranes discales intactes et pour la rhodopsine intacte, la rhodopsine a la même orientation à cette pression de surface, quelque soit son environnement.

Dans le but de déterminer l'aire moléculaire de la rhodopsine à 38 mN/m, on a extrait quantitativement les lipides totaux de membranes discales dont on connaît précisément la concentration en rhodopsine régénérée. On a ensuite mesuré leur isotherme de pression de surface, en termes de molécules de rhodopsine (voir figure 40). On peut ainsi soustraire la contribution des lipides totaux à l'isotherme des membranes discales intactes pour obtenir l'aire moléculaire de la rhodopsine. A 38 mN/m (voir figure 40), on a 5 450 et 4 325 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ pour les membranes discales intactes et les lipides totaux, respectivement. On obtient donc 1 125 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$ pour la rhodopsine, à 38 mN/m. Cette aire moléculaire est équivalente à l'aire moléculaire

calculée à partir des dimensions de la rhodopsine ($1\ 030\text{ \AA}^2/\text{molécule}$, voir section 4.4.2). Cependant, cette valeur correspond environ à la moitié de l'aire moléculaire expérimentale de la rhodopsine à 38 mN/m ($2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Dans le but de trouver l'origine de cette différence, nous avons estimé l'aire moléculaire des lipides totaux à 38 mN/m à partir de l'isotherme de pression de surface de chaque phospholipide (voir figures 21, 22 et 23) et de leur rapport molaire avec la rhodopsine (Miljanich et al., 1981). En additionnant la contribution de chaque lipide, on obtient $4\ 700\text{ \AA}^2/\text{molécule de rhodopsine}$. On considère ici l'hypothèse d'une miscibilité idéale des phospholipides, i.e. l'absence d'interaction entre l'un et l'autre des phospholipides dans le mélange. En tenant compte de l'erreur expérimentale dans la détermination du rapport molaire de chaque lipide avec la rhodopsine ($\pm 200\text{ \AA}^2/\text{molécule de rhodopsine}$), on peut considérer que ces deux valeurs sont les mêmes ($4\ 325 \pm 100$ et $4\ 700 \pm 200\text{ \AA}^2/\text{molécule de rhodopsine}$). Par ailleurs, si on estime qu'il faut environ vingt phospholipides pour chaque monocouche de la bicoche entourant la rhodopsine et que cette bicoche n'est pas détruite lors de l'étalement des membranes discales, on peut supposer qu'il y aura vingt phospholipides qui ne contribueront pas à l'aire moléculaire des membranes discales. Il est important de noter qu'il est logique de croire que la transition entre la bicoche entourant la rhodopsine et la monocouche environnante, devrait se faire de façon progressive. Donc si on ajoute $1\ 140$ ($20 \times 57\text{ \AA}^2/\text{molécule à }38\text{ mN/m} = 1\ 140\text{ \AA}^2/\text{molécule}$) à $5\ 450\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (membranes discales) et que l'on refait la soustraction des lipides totaux ($4\ 325\text{ \AA}^2/\text{molécule}$), on obtient alors $2\ 265\text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Cette valeur est très près

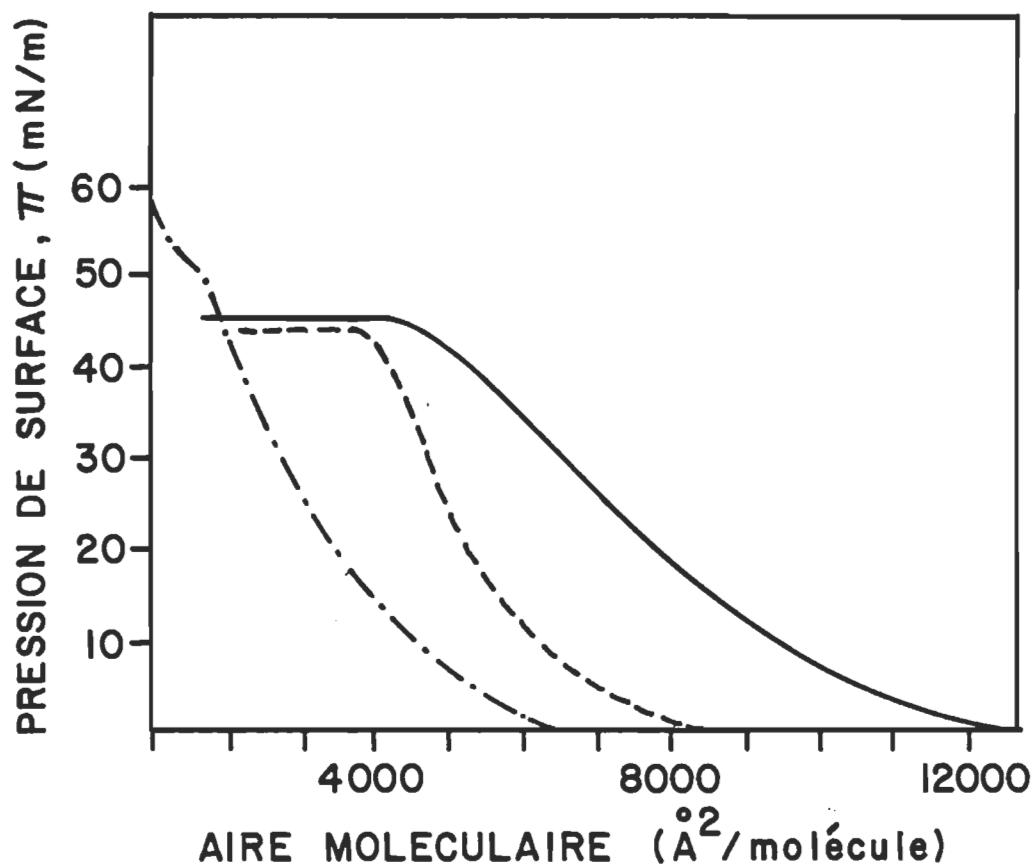


Figure 40. L'isotherme de pression de surface de la rhodopsine intacte (----), des lipides totaux (---) et des membranes discates intactes (—) en termes de $\text{Å}^2/\text{molécule}$ de rhodopsine.

de notre mesure expérimentale ($2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Par ailleurs, la figure 40 montre qu'à $1\ 030\text{ \AA}^2/\text{molécule}$, la rhodopsine est probablement agrégée. Ainsi, les résultats suggèrent que l'aire moléculaire de la rhodopsine purifiée, à 38 mN/m , est de l'ordre $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ et que celle de la rhodopsine dans la membrane discale est égale à environ $4\ 500\text{ \AA}^2/\text{molécule}$, i.e. $2\ 300\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (rhodopsine) plus $2\ 200\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (lipides: $4\ 325\text{ \AA}^2/\text{molécule} \div 2$ puisqu'ils sont en bicouche dans la membrane discale).

Dratz et al. (1979) ont tenté de calculer l'aire moléculaire que pourrait occuper la rhodopsine de grenouille. A partir d'une valeur d'épaisseur de la région hydrocarbonée de la membrane et du volume d'un lipide donné, ils ont estimé l'aire moléculaire de chaque lipide. Ces auteurs ont ensuite calculé l'aire moléculaire des lipides par molécule de rhodopsine (par section de membrane) comme étant égale à $2\ 580\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (pour une double couche), comparativement à $2\ 200\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ dans notre cas. Ils ont ensuite évalué l'aire moléculaire de cette rhodopsine en utilisant son poids moléculaire, sa densité et l'approximation que 50% de sa masse se trouve dans la région hydrocarbonée. Ils obtiennent ainsi 800 \AA^2 d'aire dans la région hydrocarbonée. Par la suite, ils ont comparé la somme de l'aire moléculaire de la rhodopsine de grenouille et de ses lipides ($3\ 400\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ de rhodopsine) avec l'estimé de Liebman (1975) déterminé à partir du diamètre du disque et de la concentration en rhodopsine par disque ($3\ 230\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ de rhodopsine). Par contre, Amis et al. (1981) et Krebs et Kühn (1977) ont calculé, respectivement, $4\ 000$ et $5\ 000\text{ \AA}^2/\text{molécule}$ de rhodopsine

bovine par la même méthode que Liebman (1975). Il existe donc une différence importante entre les estimés de ces différents auteurs. Cependant, il est intéressant de remarquer que notre valeur de $4\ 500\ \text{\AA}^2/\text{molécule}$ pour la rhodopsine dans la membrane discale, se trouve à mi-chemin entre celle de Amis et al. (1981) et celle de Krebs et Kühn (1977) qui ont effectué leur calcul pour la rhodopsine bovine.

4.5 Le mécanisme de la première étape de l'amplification du processus visuel: évidences contre le modèle du saut illement

La mesure de l'adsorption de la G-protéine sur une monocouche de chaque phospholipide des SEB, permet de simuler l'association de cette protéine avec la surface cytoplasmique de la membrane discale. La force de cette association peut alors être estimée en exerçant une pression de surface (voir recompression, figures 30a, 31a et 32a) sur la monocouche du mélange phospholipide-G-protéine.

Lors de la recompression entre 0 et 15 mN/m, l'obtention d'un angle ellipsométrique similaire (phospholipide pur par rapport au mélange phospholipide-G-protéine, figures 30b, 31b et 32b) peut être expliquée de trois façons différentes. i) La G-protéine a une plus petite épaisseur et des indices de réfraction plus élevés que ceux trouvés pour les phospholipides purs (Ducharme et al., 1985). ii) La G-protéine et les phospholipides ont des valeurs similaires d'indices de réfraction et d'épaisseur. iii) La G-protéine a une plus grande épaisseur et de plus petits indices de réfraction que dans le cas des phospholipides purs.

La différence significative entre l'isotherme ellipsométrique du phospholipide pur et du mélange phospholipide-G-protéine, notée en poursuivant la recompression au-delà de 15 mN/m (figures 30b, 31b et 32b), peut être expliquée par la répartition sélective des acides aminés polaires et non-polaires (MacRitchie, 1977). Ainsi, les acides aminés polaires se solubilisent dans la sous-phase de façon à permettre aux acides aminés non-polaires d'établir des interactions hydrophobes avec les chaînes grasses des phospholipides. Il en résulte donc une augmentation des indices de réfraction et/ou de l'épaisseur qui rendent plus négative la valeur de l'angle ellipsométrique.

Durant la recompression du mélange phospholipide-G-protéine, on pourrait croire, a priori, qu'il peut exister un équilibre dynamique entre les formes dissoute et adsorbée de la G-protéine. Cependant, il a été démontré que l'adsorption de protéines à l'interface lipide-eau est un processus difficilement réversible (Dervichian et al., 1973; Rietsch et al., 1977). Dervichian et al. (1973) ont même démontré qu'il n'existe pas d'équilibre entre l'enzyme adsorbée sur le film lipidique et l'enzyme en solution. De plus, Jönsson et al. (1985) ont démontré qu'il existait une relation linéaire entre la quantité de protéines adsorbées (déterminée par radioactivité de surface) et l'angle ellipsométrique. Ainsi, s'il existait un équilibre dynamique GP adsorbée - GP dissoute, on pourrait le détecter par ellipsométrie puisque les vitesses d'adsorption et de désorption de protéines sont plus lentes que le temps de réponse de l'ellipsomètre.

Lamarche et al. (1987) ont mesuré, par ellipsométrie, l'équilibre entre les formes dissoute et adsorbée du cytochrome c. L'adsorption du cytochrome c sur une monocouche de dioleoyl phosphatidylcholine déplace l'isotherme du phospholipide vers de plus grandes aires moléculaires. Ce comportement est similaire à celui de la G-protéine. Lors de la recompression du film DOPC-cytochrome c, l'isotherme ellipsométrique change de pente aux alentours de 16 mN/m et retombe ensuite sur celle du phospholipide pur. Cette observation expérimentale est interprétée comme étant une désorption du cytochrome c du film de DOPC. Ce comportement du cytochrome c est très différent de la G-protéine. Il apparaît donc qu'un tel équilibre (dissoute-adsorbée) ne peut être mesurée dans le cas de la G-protéine.

Donc, quelle que soit l'explication juste pour cette augmentation importante dans l'isotherme ellipsométrique du mélange phospholipide-G-protéine par rapport à l'isotherme du phospholipide pur, il est évident que, une fois incorporée au film, la G-protéine ne quitte plus l'environnement lipidique même si on diminue ou on augmente la pression de surface. Ainsi, ces évidences expérimentales suggèrent fortement que le modèle du sautillement est improbable (Salesse et al., 1986b).

Nous avons déterminé que la pression latérale dans les membranes discales était d'environ 38 mN/m (voir section 4.4). Comme on peut le voir à partir des isothermes ellipsométriques (figures 30-32), la G-protéine est encore associée au film phospholipidique à cette pression de surface de 38 mN/m. Par conséquent, dans des conditions physiologiques,

on peut supposer que la surface cytoplasmique de la membrane discale inclut la G-protéine en tant que composante intégrale et que son interaction avec la rhodopsine se fait par le biais de leur diffusion latérale respective dans la membrane.

L'association G-protéine-phospholipide des SEB est tellement favorable qu'il est nécessaire de les soumettre à des conditions hypotoniques pour empêcher leur interaction (voir section 3.9).

Étant donné que la G-protéine fait augmenter seulement la pression de surface de la monocouche de PE et de PS (suite à l'agitation), on peut croire que la G-protéine a plus d'affinité pour ces groupements que pour la PC. On peut avancer deux hypothèses pour expliquer cette observation expérimentale. (i) La polarité de ces phospholipides varie de la façon suivante: PS > PE > PC. Il est donc possible que l'interaction entre la G-protéine et les phospholipides soit de type ionique. (ii) L'organisation de la tête polaire de ces phospholipides à l'interface air-eau, à 20 mM/m, peut être différente d'un phospholipide à l'autre. Ainsi, un encombrement stérique donné (monocouche de PC) pourrait empêcher l'adsorption de la G-protéine immédiatement après l'agitation de la sous-phase. L'explication juste peut évidemment être aussi une combinaison de ces deux hypothèses.

De plus, si l'asymétrie postulée par Miljanich et al. (1981) était valable (voir section 1.4.4), la membrane discale serait idéalement organisée pour interagir avec la G-protéine.

4.6 Le potentiel de la technique

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la méthode des monocouches pour déterminer l'orientation des phospholipides et de la rhodopsine à l'interface azote-eau et pour évaluer l'association entre la G-protéine et les phospholipides des SEB. Les conclusions relatives à l'organisation des différents constituants des photorécepteurs visuels à l'interface azote-eau, résultent de l'interprétation des isothermes de pression de surface (π), de potentiel de surface (ΔV) et d'ellipsométrie de surface ($\delta\Delta$ et ψ). Ces techniques, appliquées aux monocouches, nous ont donc permis d'étudier des phénomènes biologiques associés aux membranes.

Ainsi, il est évident que la méthode des monocouches peut être utilisée pour simuler d'autres phénomènes biologiques reliés à des membranes d'autres sources et que les techniques utilisées au cours de ce travail (π , ΔV , $\delta\Delta$, ψ) peuvent permettre d'examiner ces processus membranaires.

4.7 La poursuite de ce travail

Pour continuer ce travail, on propose trois projets de recherche. L'objectif du premier projet de recherche (4.7.1) est de vérifier notre estimation de la pression latérale (38 mN/m), en comparant des mesures d'hydrolyse enzymatique des phospholipides des membranes discales en solution et à l'interface azote-eau. L'objectif du deuxième projet de

recherche (4.7.2) est de mesurer l'adsorption de chaque sous-unité de la G-protéine sur une monocouche de membranes discales. L'objectif du troisième projet de recherche (4.7.3) est de déterminer si l'adsorption de la G-protéine sur un film de membranes discales, est une étape essentielle dans la formation du complexe R*-G-protéine.

4.7.1 La vérification de notre estimation de la pression latérale

Demel et al. (1975) ont estimé la pression latérale des membranes d'érythrocytes en comparant l'action de phospholipases sur des films monomoléculaires à diverses pressions de surface, avec leur action sur les membranes d'érythrocytes. Ainsi, dans notre cas, en utilisant des phospholipases qui ne peuvent pas hydrolyser les phospholipides de la membrane discale intacte, il sera possible de déterminer quelle pression de surface sera nécessaire pour les empêcher d'hydrolyser un film monomoléculaire de membranes discales. Cette pression de surface limitant l'action enzymatique des phospholipases, pourra alors être associée à la pression latérale dans les membranes discales.

4.7.2 L'adsorption des sous-unités de la G-protéine

La G-protéine est constituée des sous-unités α , β et γ (voir Tableau 1). Les travaux de Kühn (1984) suggèrent que la sous-unité β est responsable de l'association de la G-protéine avec la membrane. Nous proposons donc de vérifier cette détermination et d'évaluer aussi l'affinité des sous-unités α et γ avec la membrane en utilisant la

méthode des monocouches. Il s'agit donc de purifier chaque sous-unité et de mesurer leur adsorption sur un film de membranes discales à l'interface azote-eau.

4.7.3 La formation du complexe R*-G-protéine

On sait que, sous l'effet de la lumière, la G-protéine forme un complexe avec la rhodopsine. Le GDP, dans ce complexe R*-GP-GDP, est alors rapidement échangé pour le GTP. Cependant, on ne sait pas si la G-protéine doit être associée à la membrane discale pour que ce complexe se forme. La méthode des monocouches peut être utilisée pour effectuer cette vérification. Il s'agit donc d'adsorber la G-protéine marquée avec du ^{14}C (en utilisant du GDP ^{14}C) sur un film de membranes discales, d'illuminer ce film et d'injecter du GTP non marqué dans la sous-phase. Une diminution dans la mesure de la radioactivité de surface indiquera que le complexe R*-G-protéine s'est formé, puisque le GDP (^{14}C) sera échangé pour le GTP. Par la suite, on procèdera aux mêmes mesures mais en absence de G-protéine adsorbée. On empêchera l'adsorption de la G-protéine en appliquant une pression de surface élevée sur le film de membranes discales.

Ces projets de recherche permettront donc de poursuivre le travail de recherche déjà amorcé afin d'améliorer nos connaissances des phénomènes biologiques associés aux membranes discales.

BIBLIOGRAPHIE

Abdulaev, N.G., Artamonov, I.D., Bogachuk, A.S., Feigina, M. Yu., Kostina, M.B., Kudelin, A.B., Martynov, V.I., Miroshnikov, A.I., Zolotarev, A.S. and Ovchinnikov, Yu.A. (1982). "Structure of light-activated proteins: visual rhodopsin". *Biochem. Int.* 5, 693-703.

Albert, A.D. and Litman, B.J. (1978). "Independent structural domains in the membrane protein bovine rhodopsin". *Biochemistry* 17, 3893-3900.

Albrecht, O., Gruler, H. and Sackmann, E. (1978). "Polymorphism of phospholipid monolayers". *Le Journal de Physique* 39, 301-313.

Amis, E.J., Davenport, D.A. and Yu, H. (1981). "Photopigment content of isolated bovine disk membrane vesicles". *Anal. Biochem.* 114, 85-91.

American Society for Testing and Materials (ASTM) (1977). "Method A-Colorimetric ascorbic acid reduction method". In "Annual book of ASTM standards" (edit. by ASTM), part 31, pp. 449-451. ASTM, Philadelphia.

Arshavsky, V.Yu., Dizhoor, A.M., Shestakova, I.K. and Philippov, P.P. (1985). "The effect of rhodopsin phosphorylation on the light-dependent activation of phosphodiesterase from bovine rod outer segments". *FEBS Lett.* 181, 264-266.

Aton, B. and Litman, B. J. (1984). "Activation of rod outer segment phosphodiesterase by enzymatically altered rhodopsin. A regulatory role for the carboxyl terminus of rhodopsin". *Exp. Eye Res.* 38, 547-559.

Attwell, D. (1985). "Phototransduction changes focus". *Nature* 317, 14-15.

Baehr, W., Morita, E.A., Swanson, R.J. and Applebury, M.L. (1982). "Characterization of bovine rod outer segment G-protein". *J. Biol. Chem.* 257, 6452-6460.

Baldwin, P.A. and Hubbell, W.L. (1985a). "Effects of lipid environment on the light-induced conformational changes of rhodopsin. I. Absence of metarhodopsin II production in dimyristoylphosphatidylcholine recombinant membranes". *Biochemistry* 24, 2624-2632.

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

Balogh-Nair, V. and Nakanishi, K. (1982). "Structural prediction of membrane-bound proteins". *Eur. J. Biochem.* 128, 565-575.

Baroin, A., Thomas, D.D., Osborne, B. and Devaux, P.F. (1977). "Saturation transfer electron paramagnetic resonance on membrane-bound proteins. I-Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 442-447.

Baroin, A., Bienvenue, A. and Devaux, P.F. (1979). "Spin-label studies of protein-protein interactions in retinal rod outer segment membranes. Saturation transfer electron paramagnetic resonance spectroscopy". *Biochemistry* 18, 1151-1155.

Baylor, D.A., Lamb, T.D. and Yau, K.-W. (1979). "Response of retinal rods to single photon". *J. Physiol.* 288, 613-634.

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

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

Bitensky, M.W., Wheeler, G.L., Yamazaki, A., Rasenick, M.M. and Stein, P.J. (1981). "Cyclic-nucleotide metabolism in vertebrate photoreceptors: a remarkable analogy and an unraveling enigma". In "Current Topics in Membranes and Transport", vol. 15 (edit. by W.H. Miller), pp. 237-271. Academic Press, New York.

Blaurock, A.E. and Wilkins, M.H.F. (1969). "Structure of frog photoreceptor membranes". *Nature* 223, 906-909.

Blume, A. (1979). "A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers". *Biochim. Biophys. Acta* 557, 32-44.

Bonting, S.L., Van Breugel, P.J.G.M. and Daemen, F.J.M. (1977). "Influence of the lipid environment on the properties of rhodopsin in the photoreceptor membrane". In "Advances in experimental medicine and biology. Function and biosynthesis of lipids", vol. 83 (edit. by N.G. Bazan, R.R. Brenner and N.M. Giusto), pp. 175-189. Plenum Press, New York.

Bonting, S.L., De Grip, W.J. and Daemen, F.J.M. (1984). "Crystallization of the membrane protein rhodopsin". In "Protein single growth under microgravity" (edit. by L.M. Van de Laar), pp. 9-13. Freiburg-im-Brisgau, Freiburg.

Bownds, M.D. (1981). "Molecular mechanisms of visual transduction". *Neurosciences* 4, 214-217.

Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Bridges, C.D.B. (1971). "Molar absorbance coefficient of rhodopsin". *Nature* 227, 1258-1259.

Brown, P.K. (1972). "Rhodopsin rotates in the visual receptor membrane". *Nature New Biol.* 236, 35-38.

Chabre, M. (1978). "Diamagnetic anisotropy and orientation of α helix in frog rhodopsin and meta II intermediate". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5471-5474.

Chabre, M. (1985). "Trigger and amplification mechanisms in visual phototransduction". *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14, 331-360.

Chen, P.S., Toribara Jr., T.Y. and Warner, H. (1956). "Microdetermination of phosphorus". *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.

Cobbs, W.H., Barkdull III, A.E. and Pugh Jr., E.N. (1985). "Cyclic GMP increases photocurrent and light sensitivity of retinal cones". *Nature* 317, 64-66.

Cobbs, W.H. and Pugh Jr., E.N. (1985). "Cyclic GMP can increase rod outer segment light-sensitive current 10-fold without delay of excitation". *Nature* 313, 585-587.

Cohen. A.I. (1972). "Rods and cones". In "Physiology of photoreceptor organs" (edit. by M.G.F. Fuortes) pp. 63-110. Springer-Verlag, Berlin.

Cone, R.A. (1972). "Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane". *Nature New Biol.* 236, 39-43.

Cook, N.J., Pellicone, C. and Virmaux, N. (1985). "Investigation of rhodopsin catalysed G-protein GTP-binding using [³⁵S] GTP S. Effects of regeneration and hydroxylamine". *Biochem. Int.* 10, 647-653.

Corless, J.M. and McCaslin, D.R. (1984). "Vertebrate visual photoreceptors". In "The receptors", vol. 1 (edit. by P.M. Conn), pp. 315-376. Academic Press, New York.

Corless, J.M., McCaslin, D.R. and Scott, B.L. (1982). "Two-dimensional rhodopsin crystals from disk membranes of frog retinal rod outer segments". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1116-1120.

Crain, R.C., Marinetti, G.V. and O'Brien, D.F. (1978). "Topology of amino phospholipids in bovine retinal rod outer segment disk membranes". *Biochemistry* 17, 4186-4192.

Daemen, F.J.M., Borggreven, J.M.P.M. and Bonting, S.L. (1970). "Molar absorbance of cattle rhodopsin". *Nature* 227, 1259-1260.

Daemen, F.J.M. and De Grip, W.J. (1984). "Photoreceptor membranes: models for excitable membranes?" In "Biomembranes: Dynamics and biology", vol. 76 (edit. by R.M. Burton and F.C. Guerra), pp. 225-249. Plenum Press, New York.

De Grip, W.J. (1982). "Thermal stability of rhodopsin and opsin in some novel detergents". In "Methods in enzymology", vol. 81 (edit. by L. Packer), pp. 256-265. Academic Press, New York.

De Grip, W.J., Olive, J. and Bovee-Geurts, P.H.M. (1983). "Reversible modulation of rhodopsin photolysis in pure phosphatidylserine membranes". *Biochim. Biophys. Acta* 734, 168-179.

Demel, R.A., Geurts Van Kessel, W.S.M. and Van Deenen, L.L.M. (1972). "The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol". *Biochim. Biophys. Acta* 266, 26-40.

Demel, R.A., Geurts Van Kessel, W.S.M., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B. and Van Deenen, L.L.M. (1975). "Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers". *Biochim. Biophys. Acta* 406, 97-107.

Demel, R.A., Van Deenen, L.L.M. and Pethica, B.A. (1967). "Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol". *Biochim. Biophys. Acta* 135, 11-19.

Dervichian, D.G., Préhu, C. et Barque, J.P. (1973). "Démonstration de la fixation d'une enzyme sur une couche superficielle de lipide". C.R. Acad. Sci. Paris, ser. D, 276, 839-841.

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

Dratz, E.A. and Hargrave, P.A. (1983). "The structure of rhodopsin and the rod outer segment disk membrane". Trends Biochem. Sci. 8, 128-131.

Drenthe, E.H.S., Bonting, S.L. and Daemen, F.J.M. (1980a). "Transbilayer distribution of phospholipids in photoreceptor membrane studied with various phospholipases". Biochim. Biophys. Acta 603, 117-129.

Drenthe, E.H.S., Klompmakers, A.A., Bonting, S.L. and Daemen, F.J.M. (1980b). "Transbilayer distribution of phospholipids in photoreceptor membrane studied with trinitrobenzenesulfonate alone and in combination with phospholipase D". Biochim. Biophys. Acta 603, 130-141.

Drenthe, E.H.S., Klompmakers, A.A., Bonting, S.L. and Daemen, F.J.M. (1981). "Transbilayer distribution of phospholipid fatty acyl chains in photoreceptor membrane". Biochim. Biophys. Acta 641, 377-385.

Ducharme, D. (1986). "Construction, mise au point d'un ellipsomètre et étude ellipsométrique de phospholipides à l'interface gaz-eau". Thèse de doctorat, Université Laval.

Ducharme, D., Salesse, C. and Leblanc, R.M. (1985). "Ellipsometric studies of rod outer segment phospholipids at the nitrogen-water interface". *Thin Solid Films* 132, 83-90.

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

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

Engelsen, D.D. and Koning, B.D. (1974a). "Ellipsometric study of organic monolayers". *J.C.S. Faraday Transac. I*, 70, 1603-1614.

Engelsen, D.D. and Koning, B.D. (1974b). "Ellipsometry of spread monolayers". *J.C.S. Faraday Transac. I*, 70, 2100-2112.

Enoch, J.M., Scandrett, J. and Tobey Jr, F.L. (1973). "A study of the effects of bleaching on the width and index of refraction of frog rod outer segments". *Vision Res.* 13, 171-183.

Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. and Lyubarsky, A.L. (1985). "Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment". *Nature* 313, 310-313.

Fliesler, S.J. and Anderson, R.E. (1983). "Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina". *Prog. Lipid Res.* 22, 79-131.

Fukuda, M.N. and Papermaster, D.S. (1979). "Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH₂ terminus". *J. Biol. Chem.* 254, 8201-8207.

Fung, B.K.-K. (1983). "Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits". *J. Biol. Chem.* 258, 10495-10502.

Fung, B.K.-K. (1985). "The light-activated cyclic GMP phosphodiesterase system in retinal rods". In "Molecular mechanisms of transmembrane signalling: molecular aspects of cellular regulation" (edit. by P. Cohen and M.D. Houslay), pp. 183-214. Elsevier Science Publishers, New York.

Fung, B.K.-K., Hurley, J.B. and Stryer, L. (1981). "Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 152-156.

Fung, B.K.-K. and Nash, C.R. (1983). "Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. II. Evidence for distinct binding sites and conformational changes revealed by limited proteolysis with trypsin". *J. Biol. Chem.* 258, 10503-10510.

Fung, B.K.-K. and Stryer, L. (1980). "Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2500-2504.

Ghosh, D. and Tinoco, J. (1972). "Monolayer interactions of individual lecithins with natural sterols". *Biochim. Biophys. Acta* 266, 41-49.

Godchaux, W. III and Zimmerman, W.F. (1979). "Membrane-dependent guanine nucleotide binding and GTPase activities of soluble protein from bovine rod cell outer segments". *J. Biol. Chem.* 254, 7874-7884.

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

Hagins, W.A. (1972). "The visual process: Excitation in the primary receptor cells". *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1, 131-158.

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

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

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

Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Feldmann, R.J., Arkinson, P.H., Rao, J.K.M. and Argos, P. (1984). "Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects". *Vision Res.* 24, 1487-1499.

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

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

Harosi, F.I. (1975). "Absorption spectra and linear dichroism of some amphibian photoreceptors". *J. Gen. Physiol.* 66, 357-382.

Hauser, H. (1985). "Phospholipid-from model membrane to industrial application". *Chimia* 39, 252-264.

Haynes, L.W. and Yau, K.-W. (1985). "Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones". *Nature* 317, 61-64.

Haynes, L.W., Kay, A.R. and Yau, K.-W. (1986). "Single cyclic GMP-activated channel activity in excised patches of rod outer segment membrane". *Nature* 321, 66-70.

Heller, J. (1968). "Structure of visual pigments. I. Purification, molecular weight, and composition of bovine visual pigment 500". *Biochemistry* 1, 2906-2920.

Ho, Y.-K. and Fung, B.K.-K. (1984). "Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. The role of sulphhydryl groups". *J. Biol. Chem.* 259, 6694-6699.

Hofmann, K.P., Emeis, D. and Schnetkamp, P.P.M. (1983). "Interplay between hydroxylamine, metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes". *Biochim. Biophys. Acta* 725, 60-70.

Hofmann, K.P. and Reichert, J. (1985). "Chemical probing of the light-induced interaction between rhodopsin and G-protein". *J. Biol. Chem.* 260, 7990-7995.

Hollyfield, J.G., Rayborn, M.E., Verner, G.E., Maude, M.B. and Anderson, R.E. (1982). "Membrane addition to rod photoreceptor outer segments: light stimulates membrane assembly in the absence of increased membrane biosynthesis". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 417-427.

Huang, W.-T. and Levitt, D.G. (1977). "Theoretical calculation of the dielectric constant of a bilayer". *Biophys. J.* 17, 111-128.

Hui, S.W., Cowden, M., Papahadjopoulos, D. and Parsons, P.F. (1975). "Electron diffraction study of hydrated phospholipid single bilayers. Effects of temperature, hydration and surface pressure of the precursor monolayer". *Biochim. Biophys. Acta* 382, 265-275.

Hurley, J.B. and Stryer, L. (1982). "Purification and characterization of the gamma regulatory subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase from retinal rod outer segments". *J. Biol. Chem.* 257, 11094-11099.

Jackson, M.L. and Litman, B.J. (1985). "Rhodopsin-egg phosphatidylcholine reconstitution by an octyl glucoside dilution procedure". *Biochim. Biophys. Acta* 812, 369-376.

Jönsson, U., Malmqvist, M. and Rönnberg, I. (1985). "Adsorption of immunoglobulin G, protein A, and fibronectin in the submonolayer region evaluated by a combined study of ellipsometry and radiotracer techniques". *J. Colloid Interface Sci.* 103, 360-372.

Kamps, K.M.P., De Grip, W.J. and Daemen, F.J.M. (1982). "Use of a density modification technique for isolation of the plasma membrane of rod outer segments". *Biochim. Biophys. Acta* 687, 296-302.

Kanno, T., Setaka, M., Hongo, T. and Kwan, T. (1983). "Spontaneous formation of a monolayer membrane from sarcoplasmic reticulum at an air-water interface". *J. Biochem.* 94, 473-477.

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

Keirns, J.J., Miki, N., Bitensky, M.W. and Keirns, M. (1975). "A link between rhodopsin and disc membrane cyclic nucleotide phosphodiesterase action spectrum and sensitivity to illumination". *Biochemistry* 14, 2760-2766.

Korenbrot, J.I. and Jones, O. (1979). "Linear dichroism of rhodopsin in air-water interface films". *J. Membrane Biol.* 46, 239-254.

Korenbrot, J.I., and Pramik, M.-J. (1977). "Formation, structure and spectrophotometry of air-water interface films containing rhodopsin". *J. Membrane Biol.* 37, 235-262.

Krebs, W. and Kühn, H. (1977). "Structure of isolated bovine rod outer segment membranes". *Exp. Eye Res.* 25, 511-526.

Kühn, H. (1980). "Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes". *Nature* 283, 587-589.

Kühn, H. (1981). "Interactions of rod cell proteins with the disk membrane: Influence of light, ionic strength and nucleotides". In "Current Topics in Membranes and Transport", vol. 15 (edit. by W.H. Miller), pp. 171-201. Academic Press, New York.

Kühn, H. (1982). "Light-regulated binding of proteins to photoreceptor membranes and its use for the purification of several rod cell proteins". In "Methods in enzymology", vol. 81 (edit. by L. Packer), pp. 556-564. Academic Press, New York.

Kühn, H. (1984). "Interactions between photoexcited rhodopsin and light-activated enzymes in rods". In "Progress in retinal research", vol. 3 (edit. by N. Osborne and J. Chader), pp. 123-156. Pergamon Press, New York.

Kühn, H., Bennett, N., Michel-Villaz, M. and Chabre, M. (1981). "Interaction between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: kinetic and stoichiometric analyses from light-scattering changes". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6873-6877.

Kühn, H., Hall, S.W. and Wilden, V. (1984). "Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin". FEBS Lett. 176, 473-478.

Kühn, H. and Hargrave, P.A. (1981). "Light-induced binding of guanosinetriphosphatase to bovine photoreceptor membranes: effect of limited proteolysis of the membranes". Biochemistry 20, 2410-2417.

Kühn, H., Mommertz, O. and Hargrave, P.A. (1982). "Light-dependent conformational change at rhodopsin's cytoplasmic surface detected by increased susceptibility to proteolysis". *Biochim. Biophys. Acta* 679, 95-100.

Kusumi, A., Ohnishi, S., Ito, T. and Yoshizawa, T. (1978). "Rotational motion of rhodopsin in the visual receptor membrane as studied by saturation transfer spectroscopy". *Biochim. Biophys. Acta* 507, 539-543.

Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227, 680-685.

Lamarche, F., Téchy, F., Aghion, J. and Leblanc, R.M. (1987). "Surface pressure, surface potential and ellipsometric study of cytochrome c binding to dioleoylphosphatidylcholine monolayer at the air-water interface". *Colloids and Surfaces* (soumis).

Laties, A.M. and Liebman, P.A. (1970). "Cones of living amphibian eyes: selective staining". *Science* 168, 1475-1477.

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

Liebman, P.A. (1962). "In situ microspectrophotometric studies on the pigments of single retinal rods". *Biophys. J.* 2, 161-178.

Liebman, P.A. (1975). "Birefringence, dichroism and rod outer segment structure". In "Photoreceptor optics" (edit. by A.W. Snyder and R. Menzel), pp. 199-214, Springer-Verlag, Berlin.

Liebman, P.A. and Entine, G. (1974). "Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membrane". Science 183, 457-459.

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

Liebman, P.A. and Pugh Jr., E.N. (1980). "ATP mediates rapid reversal of cyclic GMP phosphodiesterase activation in visual receptor membranes". Nature 287, 734-736.

Liebman, P.A. and Pugh Jr., E.N. (1981). "Control of rod disk membrane phosphodiesterase and a model for visual transduction". In "Current topics in membranes and transport", vol. 15 (edit. by W.H. Miller), pp. 157-170. Academic Press, New York.

Liebman, P.A. and Pugh Jr., E.N. (1982). "Gain, speed and sensitivity of GTP binding vs PDE activation in visual excitation". Vision Res. 22, 1475-1480.

Liebman, P.A. and Sitaramayya, A. (1984). "Role of G-protein-receptor interaction in amplified phosphodiesterase activation of retinal rods". Adv. Cyclic Nucl. Prot. Phosphorylation Res. 17, 215-225.

Liebman, P.A., Sitaramayya, A., Parkes, J.H. and Buzdygon, B. (1984). "Mechanism of cGMP control in retinal rod outer segments". *Trends Pharm. Sci.* 5, 293-296.

Litman, B.J. (1982). "Purification of rhodopsin by concanavalin A affinity chromatography". In "Methods in enzymology", vol. 81 (edit. by L. Packer), pp. 150-153. Academic Press, New York.

MacRitchie, F. (1977). "Desorption of protein monolayers". *J. Colloid Interface Sci.* 61, 223-226.

Mason, W.T. (1973). "Ultrastructure of the photoreceptors of the bovine retina". In "Biochemistry and physiology of visual pigments" (edit. by H. Langer), pp. 295-298. Springer-Verlag, Berlin.

Matthews, R.G., Hubbard, R., Brown, P.K. and Wald, G. (1963). "Tautomeric forms of metarhodopsin". *J. Gen. Physiol.* 47, 215-240.

Matthews, H.R., Torre, V. and Lamb, T.D. (1985). "Effects on the photoresponse of calcium buffers and cyclic GMP incorporated into the cytoplasm of retinal rods". *Nature* 313, 582-585.

McConnell, D.G., Daugler, C.A., Eadie, D.M. and Litman, B.J. (1981). "The effect of detergent selection on retinal outer segment A /A ratios". *J. Biol. Chem.* 256, 4913-4918.

McCrackin, F.L. (1970). "Analyses and corrections of instrumental errors in ellipsometry". *J. Opt. Soc. Am.* 60, 57-63.

Michel-Villaz, M., Saibil, H.R. and Chabre, M. (1979). "Orientation of rhodopsin -helices in retinal rod outer segment membranes studied by infrared linear dichroism". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4405-4408.

Miki, N., Baraban, J.M., Keirns, J.J., Boyce, J.J. and Bitensky, M.W. (1975). "Purification and properties of light-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase of rod outer segments". *J. Biol. Chem.* 250, 6320-6327.

Miljanich, G.P. (1978). "Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane". Ph.D. Dissertation, University of California, Santa Cruz.

Miljanich, G.P., Brown, M.F., Mabrey-Gaud, S., Dratz, E.A. and Sturtevant, J.M. (1985). "Thermotropic behavior of retinal rod membranes and dispersions of extracted phospholipids". *J. Membrane Biol.* 85, 79-86.

Miljanich, G.P., Nemes, P.P., White, D.L. and Dratz, E.A. (1981). "The asymmetric transmembrane distribution of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and fatty acids of the bovine retinal rod outer segment disk membrane". *J. Membrane Biol.* 60, 249-255.

Miljanich, G.P., Sklar, L.A., White, D.L. and Dratz, E.A. (1979). "Disaturated and dipolyunsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane". *Biochim. Biophys. Acta* 552, 294-306.

Miller, W.H. (1981). *Current topics in membranes and transport*, vol. 15. Academic Press, New York.

Miller, W.H. (1983). "Does cyclic GMP hydrolysis control visual transduction in rods?". *Trends Pharm. Sci.* 4, 509-511.

Miller, W.H. and Nichol, G.D. (1979). "Evidence that cyclic GMP regulates membrane potential in rod photoreceptors". *Nature* 280, 64-66.

Molday, R. (1985). "Structural organization of proteins in rod outer segment membranes using monoclonal antibodies". FASEB summer research conference on biology and chemistry of vision, Saxton River.

Morrison, W.R. and Smith, L.M. (1964). "Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol". *J. Lipid Res.* 5, 600-608.

Munger, G. (1979). "Détermination du poids moléculaire de protéine à l'interface air-eau par un nouveau système à faible pression de surface". Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.

Nathans, J. and Hogness, D.S. (1983). "Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin". *Cell* 34, 807-814.

Neufeld, A.H. and Levy, H.M. (1969). "A second ouabain-sensitive sodium-dependent adenosine triphosphatase in brain microsomes". *J. Biol. Chem.* 244, 6493-6497.

Nir, I. and Hall, M.O. (1979). "Ultrastructural localization of lectin binding sites on the surface of retinal photoreceptors and pigment epithelium". *Exp. Eye Res.* 29, 181-194.

N'Soukpoé-Kossi, C.N. and Leblanc, R.M. (1985). "Selective photoinduced Ca^{2+} diffusion in rhodopsin-lipid bilayers: an internal transmitter hypothesis". *Can. J. Chem.* 63, 2026-2031.

N'Soukpoé-Kossi, C.N., Salesse, C., Leblanc, R.M. and Boucher, F. (1985). "Molar absorptivities of bovine retina rod outer segment phospholipids in n-hexane". *Anal. Biochem.* 151, 409-417.

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

Ovchinnikov, Yu.A. (1982). "Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships". *FEBS Lett.* 148, 179-191.

Ovchinnikov, Yu.A. (1983a). "Structure-functional relationships in visual rhodopsin". In "Structure and function of membrane proteins", vol. 6 (edit. by E. Quagliariello and F. Palmieri), pp. 261-270. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Ovchinnikov, Yu.A. (1983b). "Structure-function relationship in retinal-containing transport proteins". In "Physical chemistry of transmembrane ion motions" (edit. by G. Spach), pp. 437-455. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Ovchinnikov, Yu.A. (1984). "Bioorganic chemistry of rhodopsins". In "Chemistry of peptides and proteins", vol. 2 (edit. by W. Voelter, E. Bayer, Yu.A. Ovchinnikov and E. Wünsch), pp. 241-248. Walter de Gruyter & Co., Berlin.

Ovchinnikov, Yu.A. and Abdulaev, N.G. (1985). "Bacteriorhodopsin and rhodopsin structure and function". In "The enzymes of biological membranes", vol. 4 (edit. by A.N. Martonosi), pp. 555-577, Plenum Press, New York.

Ovchinnikov, Yu.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Yu., Artamonov, I.D., Zolotarev, A.S., Miroshinikov, A.I., Martynov, V.I., Kostina, M.B., Kudelin, A.B. and Bogachuk, A.S. (1982). "The complete amino acid sequence of visual rhodopsin". *Bioorg. Khim.* 8, 1011-1014.

Parkes, J.H. and Liebman, P.A. (1984). "Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I - metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions". *Biochemistry* 23, 5054-5061.

Pattus, F., Desnuelle, P. and Verger, R. (1978a). "Spreading of liposomes at the air-water interface". *Biochim. Biophys. Acta* 507, 62-70.

Pattus, F., Piovant, M.C.L., Lazdunski, C.J., Desnuelle, P. and Verger, R. (1978b). "Spreading of biomembranes at the air-water interface". *Biochim. Biophys. Acta* 507, 71-82.

Pattus, F., Rothen, C., Streit, M. and Zahler, P. (1981). "Further studies on the spreading of biomembranes at the air-water interface. Structure, composition, enzymatic activities of human erythrocyte and sarcoplasmic reticulum membrane films". *Biochim. Biophys. Acta* 647, 29-39.

Pellicone, C., Nullans, G., Cook, N.J. and Virmaux, N. (1985a). "Light-induced conformational changes in the extradiscal regions of bovine rhodopsin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 816-821.

Pellicone, C., Nullans, G. and Virmaux, N. (1985b). "Localization of light-induced conformational changes in bovine rhodopsin". *FEBS Lett.* 181, 179-183.

Pellicone, C., Cook, N.J., Nullans, G. and Virmaux, N. (1985c). "Light-induced conformational changes in rhodopsin detected by modification of G-protein binding, GTP γ S binding and c GMP phosphodiesterase activation". *FEBS Lett.* 181, 184-188.

Pfister, C., Kühn, H. and Chabre, M. (1983). "Interaction between photoexcited rhodopsin and peripheral enzymes in frog retinal rods. Influence on the postmetarhodopsin II decay and phosphorylation rate of rhodopsin". *Eur. J. Biochem.* 136, 489-499.

Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, U.V., De Kozak, Y., Faure, J.P. and Kühn, H. (1985). "Retinal S antigen identified as the 48 K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods". *Science* 228, 891-893.

Phillips, M.C. and Chapman, D. (1968). "Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylcholine (lecithins) and phosphatidyl-ethanolamine at the air-water interface". *Biochim. Biophys. Acta* 163, 301-313.

Phillips, M.C., Ladbroke, B.D. and Chapman, D. (1970). "Molecular interactions in mixed lecithin systems". *Biochim. Biophys. Acta* 196, 35-44.

Pober, J.S. and Stryer, L. (1975). "Light dissociates enzymatically-cleaved rhodopsin into two different fragments". *J. Mol. Biol.* 95, 477-481.

Poo, M.-M. and Cone, R.A. (1973). "Lateral diffusion of rhodopsin in *Necturus* rods". *Exp. Eye Res.* 17, 503-510.

Poo, M.-M. and Cone, R.A. (1974). "Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane". *Nature* 247, 438-441.

Puckett, K.L., Aronson, E.T. and Goldin, S.M. (1985). "ATP-dependent calcium uptake activity associated with a disk membrane fraction isolated from bovine retinal rod outer segments". *Biochemistry* 24, 390-400.

Raubach, R.A., Franklin, L.K. and Dratz, E.A. (1974). "A rapid method for the purification of rod outer segment disk membranes". *Vision Res.* 14, 335-337.

Reichert, J. and Hofmann, K.P. (1984). "Sulphydryl group modification of photoreceptor G-protein prevents its light-induced binding to rhodopsin". *FEBS Lett.* 168, 121-124.

Ries, H.E. Jr. and Swift, H. (1982). "Monolayers of mitochondrial cardiolipin and cerebronic acid and their equimolar mixture". *J. Colloid Interface Sci.* 89, 245-256.

Rietsch, J., Pattus, F., Desnuelle, P. and Verger, R. (1977). "Further studies of mode of action of lipolytic enzymes". *J. Biol. Chem.* 252, 4313-4318.

Robert, S., Tancrede, P., Salesse, C. and Leblanc, R.M. (1983). "Interactions in mixed monolayers between distearoyl-L-phosphatidylethanolamine, rod outer segment phosphatidylethanolamine and all-trans-retinal. Effect of pH". *Biochim. Biophys. Acta* 730, 217-225.

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

Rothschild, K.J., Sanches, R., Hsiao, T.L. and Clark, N.A. (1980). "A spectroscopic study of rhodopsin alpha-helix orientation". *Biophys. J.* 31, 53-64.

Rotmans, J.P., Van de Laar, G.L., Daemen, F.J.M. and Bonting, S.L. (1972). "Molar absorbance of rhodopsin". *Vision Res.* 12, 1297-1300.

Ruppel, H. and Hagins, W.A. (1973). "Spatial origin of the fast voltage in retinal rods". In "Biochemistry and physiology of visual pigments" (edit. by H. Langer), pp. 257-261. Springer-Verlag, Berlin.

Salesse, C. (1983). "Caractérisation des phospholipides des segments externes des bâtonnets rétiniens". Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.

Salesse, C., Boucher, F. et Leblanc, R.M. (1983). "Propriétés interfaciales des phospholipides de la membrane des bâtonnets rétiniens". *Rev. Can. Biol. Exptl.* 42, 123-130.

Salesse, C., Boucher, F. and Leblanc, R.M. (1984). "An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes". *Anal. Biochem.* 142, 258-266.

Salesse, C., Ducharme, D. and Leblanc, R.M. (1986a). "Direct evidence for the formation of a monolayer from a bilayer. An ellipsometric study at the nitrogen-water interface (Submitted to *Biophys. J.*)".

Salesse, C., Lamarche, F. and Leblanc, R.M. (1986b). "Evidence against the hopping model as a mechanism for the first stage of amplification: rhodopsin catalysed GDP-GTP exchange. (Submitted to *Nature*)".

Salesse, C., Leblanc, R.M. and Kito, Y. (1986c). "Lipid contamination of discal membranes depends on rod outer segment purity". (Submitted to *Exp. Eye Res.*)".

Schleicher, A. and Hofmann, K.P. (1985). "Proton uptake by light induced interaction between rhodopsin and G-protein". *Z. Naturforsch.* 40c, 400-405.

Shichi, H., Lewis, M.S., Irreverre, F. and Stone, A.L. (1969). "Biochemistry of visual pigments. I. Purification and properties of bovine rhodopsin". *J. Biol. Chem.* 244, 529-536.

Shichi, H., Adams, A.J. and Kobata, A. (1980). "The oligosaccharide moiety of rhodopsin: its structure and cellular location". *Neurochem. Int.* 1, 245-253.

Sidman, R.L. (1957). "The structure and concentration of solids in photoreceptor cells studied by refractometry and interference microscopy". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 15-30.

Sigma (1983). "SDS molecular weight markers". Technical bulletin No. MWS-877.

Sitaramayya, A. and Liebman, P.A. (1983a). "Mechanisms of ATP quench of phosphodiesterase activation in rod disc membranes". *J. Biol. Chem.* 258, 1205-1209.

Sitaramayya, A. and Liebman, P.A. (1983b). "Phosphorylation of rhodopsin and quenching of cyclic GMP phosphodiesterase activation by ATP at weak bleaches". *J. Biol. Chem.* 258, 12106-12109.

Sklar, L.A. and Dratz, E.A. (1980). "Analysis of membrane bilayer asymmetry using parinaric acid fluorescent probe". *FEBS Lett.* 118, 308-310.

Smith, H.G. and Litman, B.J. (1982). "Preparation of osmotically intact rod outer segment disks by Ficoll flotation". In "Methods in enzymology", vol. 81 (edit. by L. Packer), pp. 57-61. Academic Press, New York.

Smith, H.G., Stubbs, G.W. and Litman, B.J. (1975). "The isolation and purification of osmotically intact discs from retinal rod outer segments". *Exp. Eye Res.* 20, 211-217.

Sober, H.A. (Edit.) (1970). CRC Handbook of Biochemistry, Second ed., The Chemical Rubber Co., Cleveland.

Steinberg, R.H., Fisher, S.K. and Anderson, D.H. (1980). "Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors". J. Comp. Neurol. 190, 501-518.

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

Stryer, L. (1985). "Molecular design of an amplification cascade in vision". In "Biopolymers", vol. 24 (edit. by A.G. Walton and J. Blackwell), pp. 29-47, John Wiley and Sons, New York.

Swank, R.T. and Munkres, K.D. (1971). "Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate". Anal. Biochem. 39, 462-477.

Tancrede, P., Chauvette, G. and Leblanc, R.M. (1981a). "General method for the purification of lipids for surface pressure studies. Application to monogalactosyldiglyceride". J. Chromatogr. 207, 387-393.

Tancrede, P., Parent, L., Paquin, P. and Leblanc, R.M. (1981b). "Interactions in mixed monolayers between dioleoyl-L-phosphatidylcholine and all-trans retinal". J. Colloid Interface Sci. 83, 606-613.

Thomas, D.D. and Stryer, L. (1982). "Transverse location of the retinal chromophore of rhodopsin in rod outer segment disc membranes". *J. Mol. Biol.* 154, 145-157.

Trurnit, H.J. (1960). "The spreading of protein monolayers". *J. Colloid Sci.* 15, 1-13.

Tyminski, P.N. and O'Brien, D.F. (1984). "Rod outer segment phosphodiesterase binding and activation in reconstituted membranes". *Biochemistry* 23, 3986-3993.

Uhl, R., Borys, T. and Abrahamson, E.W. (1979a). "Evidence for a magnesium dependent ATPase in bovine rod outer segment disk membranes". *Photochem. Photobiol.* 29, 703-706.

Uhl, R., Borys, T. and Abrahamson, E.W. (1979b). "Evidence for structural changes in the photoreceptor disk membrane, enabled by magnesium ATPase activity and triggered by light". *FEBS Lett.* 107, 317-322.

Uhl, R. and Abrahamson, E.W. (1981). "Dynamic processes in visual transduction". *Chem. Rev.* 81, 291-312.

Verger, R. and Pattus, F. (1976). "Spreading of membranes at the air-water interface". *Chem. Phys. Lipids* 16, 285-291.

Vuong, T.M., Chabre, M. and Stryer, L. (1984). "Millisecond activation of transducin in the cyclic nucleotide cascade of vision". *Nature* 311, 659-661.

Wang, J.K., McDowell, J.H. and Hargrave, P.A. (1980). "Site of attachment of 11-cis-retinal in bovine rhodopsin". *Biochemistry* 19, 5111-5117.

Wey, C.-L., Cone, R.A. and Edidin, M.A. (1981). "Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor cells measured by fluorescence photobleaching after recovery". *Biophys. J.* 33, 225-232.

Wheeler, G.L. and Bitensky, M.W. (1977). "A light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors: regulation of light-activated cyclic GMP phosphodiesterase". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4238-4242.

Wheeler, G.L., Matuo, Y. and Bitensky, M.W. (1977). "Light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors". *Nature* 269, 822-824.

Wilden, U. and Kühn, H. (1982). "Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites". *Biochemistry* 21, 3014-3022.

Wolken, J.J. (1966). "Vision-Biophysics and biochemistry of the retinal photoreceptors". Charles C. Thomas, Springfield.

Yamazaki, A., Stein, P.J., Chernoff, N. and Bitensky, M.W. (1983).

"Activation mechanism of rod outer segment cyclic GMP phosphodiesterase: release of inhibitor by the GTP/GTP binding protein". J. Biol. Chem. 258, 8188-8194.

Yau, K.-W. and Nakatani, K. (1985a). "Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment". Nature 313, 579-582.

Yau, K.-W. and Nakatani, K. (1985b). "Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment". Nature 317, 252-255.

Yee, R. and Liebman, P.A. (1978). "Light-activated phosphodiesterase of the rod outer segment. Kinetics and parameters of activation and deactivation". J. Biol. Chem. 253, 8902-8909.

Zimmerman, A.L. and Baylor, D.A. (1986). "Cyclic GMP-sensitive conductance of retinal rods consists of aqueous pores". Nature 321, 70-72.

Zimmerman, A.L., Yamanaka, G., Eckstein, F., Baylor, D.A. and Stryer, L. (1985). "Interaction of hydrolysis-resistant analogs of cyclic GMP with the phosphodiesterase and light-sensitive channel of retinal rod outer segments". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 8813-8817.