

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

THÈSE PRÉSENTÉE À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
À L'OBTENTION DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
MICHÈLE JACOB

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX TYPES DE
PHOSPHOLIPASES A2 DANS DEUX FRACTIONS SUBRÉTINIENNES
AUTRES QUE LES SEGMENTS EXTERNES DE BÂTONNETS

MARS 1998

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.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont appuyé dans la réalisation de cette thèse de doctorat.

Plus spécifiquement, je veux remercier les Drs Christian Salesse et Philip K. Weech pour avoir eu confiance en mes capacités de mener à bien ce projet, pour m'avoir supportée dans les moments difficiles, et pour m'avoir permis de tirer profit de leur expérience.

Je remercie également le Dr François Boucher dont l'implication, à chacune des étapes clé de mon doctorat, m'a été très bénéfique. Merci aussi à M. Jean Désilets dont l'expertise en microscopie électronique m'a été très précieuse au moment d'évaluer la qualité du matériel biologique utilisé.

Dans un autre ordre d'idée, je suis profondément reconnaissante envers mes parents qui m'ont appris à respecter les autres et à me respecter. Je leur suis également très reconnaissante de m'avoir inculqué la notion de persévérance. Cela m'a déjà grandement aidé et je n'ai nul doute que ça m'aidera tout au long de ma carrière.

Enfin, je remercie tous mes collègues de travail, Judith, Sonya, Michel, Patrick, Mario, Stéphanie, Hugo, Céline, Caroline, Philippe et Phillippe, ainsi que mes superviseurs de thèse, Christian et Philip, pour tous les bons moments passés en leur compagnie.

RÉSUMÉ

Les travaux présentés dans les chapitres 1 à 7 de la présente thèse permettent de faire le point sur la controverse entourant la présence d'activité phospholipase A2 dans les photorécepteurs en bâtonnet d'origine bovine. Il est démontré que, contrairement à ce qui a été publié entre 1987 et 1993 par quatre équipes de chercheurs, il n'y a pas d'activité phospholipase A2 dans les segments externes de bâtonnets purifiés selon les trois méthodes couramment utilisées (vortexage, homogénéisation et agitation à la main). Tous les résultats ci-inclus démontrent clairement que l'activité phospholipase A2 mesurée par ces équipes est fort probablement due à une contamination de leurs préparations de segments externes de bâtonnets. De nombreux résultats, lesquels ont été obtenus de diverses façons, révèlent en effet pour la première fois que deux autres fractions subrétiniennes, soit le RPE (enrichi en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien) et le P200 (contenant toute la rétine neurale à l'exception des segments externes des bâtonnets), ont chacune un niveau significatif d'activité phospholipase A2. Qui plus est, ces fractions se retrouvent initialement (*in vivo*) de part et d'autre des segments externes de bâtonnets, soutenant ainsi l'hypothèse de la contamination. Ces résultats ont donc permis, d'une part, de mettre fin à une controverse vieille de dix ans et, d'autre part, de proposer des hypothèses très constructives et intéressantes afin de concilier les différents résultats publiés entre 1987 et 1993.

Dans le deuxième volet de la thèse, la caractérisation de l'activité phospholipase A2 du RPE et du P200, a permis de découvrir que chacune de ces fractions contient plus d'un type de phospholipase A2, lesquels sont tous différents

l'un de l'autre. Plus encore, la comparaison des caractéristiques des phospholipases A2 rétiniennes à celles des trois groupes de phospholipases A2 répertoriés dans la littérature suggère fortement que le RPE et le P200 contiennent de nouveaux types d'enzymes. Ainsi, les résultats de ce deuxième volet ont permis de présenter les deux premiers rapports ayant trait à la caractérisation biochimique et la classification opérationnelle des phospholipases A2 rétiniennes. Ils suggèrent par ailleurs que les phospholipases A2 rétiniennes pourraient appartenir à un nouveau groupe ou sous-groupe, au même titre que d'autres phospholipases A2 récemment identifiées et caractérisées.

Mes études des phospholipases A2 rétiniennes sont notamment publiées dans "The Journal of Biological Chemistry" (1996. 271: 19209-19218), "Biochemical Journal" (1997. 327: 455-460) et "Biochimica et Biophysica Acta" (1997. sous presse).

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	i
Résumé	ii
Table des matières	iv
Liste des schémas	xii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xv
Liste des abréviations	xvii

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1	Structure de l'oeil	2
1.2	Organisation de la rétine	4
1.3	Caractéristiques des photorécepteurs	6
1.4	Mécanisme de phototransduction	12
1.5	Mécanisme d'inhibition de l'excitation visuelle	20
1.6	Caractéristiques des phospholipides	28
1.7	Composition phospholipidique des ROS	33
1.8	Susceptibilité des phospholipides des ROS à la peroxydation	38
1.9	Phospholipases A2 (PLA2)	39
1.10	Produits d'hydrolyse des phospholipases A2	45
1.11	Régulation des phospholipases A2 par les protéines-G	51
1.12	Arguments en faveur de la présence d'activité phospholipase A2 dans les ROS	53
1.13	Hypothèse proposées pour le rôle de la PLA2 dans les ROS	55
1.13.1	Élimination des phospholipides peroxydés	56

1.13.2 Rétablissement de la concentration de Ca^{2+}_i lors de l'inhibition de l'excitation visuelle	60
1.13.3 Modulation du processus de transduction et/ou d'adaptation visuelle	62
1.14 Arguments suggérant la présence d'activité phospholipase A2 dans la rétine, mais pas dans les ROS	64
1.15 Caractéristiques des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien	66
1.16 Relation photorécepteurs-épithélium pigmentaire rétinien	69
1.17 Objectifs de recherche	71
1.18 Références	73

CHAPITRE 2: PRESENCE OF A LIGHT-INDEPENDENT PHOSPHOLIPASE A2 IN BOVINE RETINA BUT NOT IN ROD OUTER SEGMENTS

2.1 Summary	141
2.2 Introduction	142
2.3 Experimental procedures	144
2.3.1 Materials	144
2.3.2 Isolation of ROS by vortexing (v-ROS)	144
2.3.3 Isolation of ROS by homogenizing (h-ROS)	144
2.3.4 Isolation of ROS by hand shaking (hs-ROS)	145
2.3.5 Preparation of RPE	146
2.3.6 Preparation of P200	147
2.3.7 Phospholipase A2 assay	147
2.3.8 Measurement of ROS PLA2 or PLA1 activity toward endogenous phospholipids	149
2.3.9 Electron microscopy of ROS	150

2.3.10	Other methods	150
2.4	Results	151
2.4.1	Effect of light on ROS PLA2 activity	151
2.4.2	Effect of different substrates on ROS PLA2 activity	151
2.4.3	Intactness of ROS	152
2.4.4	Distribution of PLA2 activity among particulate and soluble fractions generated during the purification of hs-ROS	153
2.4.5	Effect of guanine nucleotides on ROS PLA2 activity	153
2.4.6	Effect of Mg ²⁺ and Ca ²⁺ concentration, EGTA, and detergent on ROS PLA2 activity	154
2.4.7	ROS PLA2 or PLA1 activity toward endogenous phospholipids	155
2.4.8	PLA2 activity in subretinal fractions other than ROS	155
2.4.9	Influence of pH and Ca ²⁺ on RPE and P200 PLA2 activity	156
2.5	Discussion	157
2.6	References	166
2.7	Legends to Figures	170
2.8	Tables and Figures	174

CHAPITRE 3: MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DES PRÉPARATIONS DE SEGMENTS EXTERNES DE BÂTONNETS OBTENUS PAR VORTEXAGE, HOMO-GÉNÉISATION ET AGITATION À LA MAIN

3.1	Introduction	189
3.2	Méthodes	192
3.2.1	Préparation des échantillons pour la microscopie électronique	192
3.2.2	Dosage enzymatique de la glucose 6-phosphate déshydrogénase	194

3.2.3	Mesure du taux d'utilisation de l'acide [¹⁴ C]arachidonique par les ROS	195
3.3	Résultats	196
3.3.1	Évaluation de l'intégrité des segments externes de bâtonnets obtenus par vortexage des rétines (v-ROS)	196
3.3.2	Évaluation de l'intégrité des segments externes de bâtonnets obtenus par homogénéisation des rétines (h-ROS)	199
3.3.3	Évaluation de l'intégrité des segments externes de bâtonnets obtenus par agitation à la main des rétines (hs-ROS)	204
3.3.4	Taux d'utilisation de l'acide [¹⁴ C]arachidonique par les ROS.....	207
3.4	Discussion	208
3.5	Références	211
3.6	Légendes des Figures	217
3.7	Tableaux et Figures	219

CHAPITRE 4: BOVINE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CONTAINS NOVEL TYPES OF PHOSPHOLIPASES A2

4.1	List of abbreviations	228
4.2	Synopsis	229
4.3	Introduction	230
4.4	Materials and methods	232
4.4.1	Materials	232
4.4.2	Preparation of RPE	232
4.4.3	Extraction of RPE	232
4.4.4	Radiometric measurement of PLA2 activity	233
4.4.5	Fluorimetric measurement of PLA2 activity	234

4.4.6	Discrimination between PLA2 and PLC activity using bf-TLC	234
4.4.7	Cation-exchange chromatography	235
4.4.8	Other methods	236
4.5	Results and discussion	237
4.5.1	RPE-PLA2 enzymes are inactivated by H ₂ SO ₄ like cPLA2 but inhibited by GTP[S] and ATP unlike sPLA2, cPLA2, and iPLA2	237
4.5.2	Identification of weakly membrane-associated PLA2 in RPE; evidence for the presence of membrane-bound regulatory components in RPE	238
4.5.3	RPE-PLA2 enzymes have a substrate selectivity that is different from that of sPLA2, cPLA2, and iPLA2	239
4.5.4	Release of fatty acids results from PLA2 activation in RPE.....	241
4.5.5	RPE contains different types of PLA2-active fractions	242
4.5.6	RPE probably contains two different PLA2 enzymes	243
4.5.7	Summary of evidence for RPE-PLA2 being different from sPLA2, cPLA2, and iPLA2	244
4.6	References	247
4.7	Legends to Figures	252
4.8	Tables and Figures	253

CHAPITRE 5: PHOSPHOLIPASES A2 OF ROD OUTER SEGMENT-FREE BOVINE RETINAE ARE DIFFERENT FROM WELL-KNOWN PHOSPHOLIPASES A2

5.1	List of abbreviations	261
5.2	Summary	263
5.3	Introduction	264

5.4	Materials and methods	266
5.4.1	Materials	266
5.4.2	Preparation of P200	266
5.4.3	Extraction of P200	267
5.4.4	Radiometric measurement of PLA2 activity	267
5.4.5	Fluorimetric measurement of PLA2 activity	268
5.4.6	Discrimination between PLA2 and PLC activity using bf-TLC	268
5.4.7	Cation-exchange chromatography	269
5.5	Results	270
5.5.1	P200-PLA2 activity is inactivated by H ₂ SO ₄ but unaffected by GTPγS and ATP	270
5.5.2	P200-PLA2 activity is mostly extracted with PBS6x	271
5.5.3	P200-PLA2 have a substrate selectivity that is different from that of sPLA2, cPLA2 and iPLA2	272
5.5.4	In P200, the release of fatty acids resulted from PLA2 activation	274
5.5.5	P200 contains three major PLA2-active fractions	277
5.5.6	P200 probably contains four different types of PLA2 enzyme	279
5.6	Discussion	281
5.7	References	285
5.8	Legends to Figures	290
5.9	Tables and Figures	291

CHAPITRE 6: PURIFICATION PARTIELLE DE LA PHOSPHOLIPASE A2 DU P200-36

6.1	Introduction	298
6.2	Matériel et Méthodes	300

6.2.1	Matériel.....	300
6.2.2	Essais chromatographiques préliminaires sur colonnes Hi-Trap SP, Hi-Trap Q et Hi-Trap HIC	300
6.2.3	Chromatographie échangeuse de cations éluée avec un gradient discontinu de NaCl à deux plateaux (CEC)	303
6.2.4	Chromatographie à interactions hydrophobes (HIC)	304
6.2.5	Chromatographie échangeuse de cations éluée avec un gradient continu de NaCl (CECg)	305
6.2.6	Chromatographie par filtration moléculaire sur gel de Séphadex G75 SF (GFC)	306
6.2.7	Chromatographie en phase inverse (RPC)	307
6.3	Résultats	307
6.3.1	Profil d'élution de l'activité PLA2 sur les colonnes de chromatographie échangeuse de cations (CEC), échangeuse d'anions (AEC) et à interactions hydrophobes (HIC)	308
6.3.2	Mise au point de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36 ..	310
6.3.3	Évaluation de la pureté du RPC-actif	314
6.3.4	Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-actif, HIC-actif, CECg-actif et GFC-actif en fonction de la concentration de protéines	315
6.3.5	Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-actif, HIC-actif, CECg-actif et GFC-actif en fonction du temps	316
6.4	Discussion	317
6.5	Références	324
6.6	Légendes des Figures	330
6.7	Tableaux et Figures	335

CHAPITRE 7: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

7.1	Hypothèses proposées pour le rôle des PLA2 dans le P200	353
7.1.1	Modulation de l'exocytose des neurotransmetteurs et de la transmission synaptique par l'acide arachidonique	356
7.1.2	Modulation de l'exocytose des neurotransmetteurs et de la transmission synaptique par les lysophospholipides	359
7.1.3	Cellules gliales, métabolisme de l'acide arachidonique et ischémie	361
7.2	Hypothèses proposées pour le rôle des PLA2 dans le RPE	363
7.2.1	Recyclage des acides docosahexaénoïques natifs vers les segments internes de bâtonnets	364
7.2.2	Élimination des acides docosahexaénoïques peroxydés.....	367
7.2.3	Fusion membranaire menant à la formation des phagosomes et/ou des phagolysosomes	368
7.3	Activité optimale des PLA2 rétiniennes à pH alcalin et physiologie cellulaire	372
7.4	Références	379

ANNEXE

ANNEXE 1: Organisation du mélange PAPE:DMPM (50% ratio molaire) en phases lamellaires	399
---	-----

LISTE DES SCHÉMAS

1.1	Structure de l'oeil des vertébrés	3
1.2	Organisation de la rétine	5
1.3	Compartmentalisation des photorécepteurs	7
1.4	Mécanisme de phototransduction d'un bâtonnet	13
1.5	Contrôle des échanges ioniques dans le bâtonnet	18
1.6	Mécanisme d'inhibition de l'excitation visuelle	22
1.7	Structure d'un phospholipide	29
1.8	Organisation des phospholipides en milieu aqueux	32
1.9	Hydrolyse des phospholipides par les PLA2 et autres phospholipases ...	40
1.10	Élimination des PUFA peroxydés et protection des membranes	59
1.11	Polarisation structurelle et fonctionnelle des cellules du RPE	68
7.1	Modulation de l'exocytose des neurotransmetteurs et de la transmis- sion synaptique par une PLA2	357
7.2	Implication d'une PLA2 dans le mécanisme de recyclage du DHA vers les segments internes de bâtonnets	366
7.3	Mécanisme de formation des phagosomes et des phagolysosomes	369
7.4	Implication d'une PLA2 dans le processus de fusion membranaire	371
7.5	Implication d'une PLA2 dans la formation des phagosomes	373

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Caractéristiques morphologiques des photorécepteurs de vertébrés	9
1.2	Caractéristiques biochimiques des photorécepteurs de vertébrés	11
1.3	Variation des concentrations de GMPc, GTP, Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ et mV dans les photorécepteurs de vertébrés	21
1.4	Caractéristiques des phospholipides	31
1.5	Composition en acides gras des phospholipides des ROS	35
1.6	Coefficient de diffusion latérale de divers constituants des ROS	37
1.7	Caractéristiques des sPLA2	41
1.8	Caractéristiques de la cPLA2	42
1.9	Caractéristiques des iPLA2	43
1.10	Paramètres utilisés pour la caractérisation et la classification opérationnelle des PLA2	44
1.11	Exemples de processus physiologiques et pathologiques auxquels une augmentation d'activité PLA2 a été associée	48
1.12	Métabolites secondaires des produits d'hydrolyse des PLA2	49
1.13	Fonctions majeures de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE)	70
2.1	Distribution of PLA2 activity among particulate and soluble fractions generated during the purification of hs-ROS	174
2.2	Comparison of ROS PLA2 activity levels reported by different authors	175
3.1	Résumé des caractéristiques des v-ROS, h-ROS et hs-ROS	219
4.1	Subcellular distribution of PLA2 activity in RPE	253
4.2	Characteristics of RPE-PLA2 active fractions eluted from a cation-exchange chromatography column	254

4.3	Effects of EGTA, DTT, pBPB and heat on RPE-PLA2 activity	255
4.4	Comparison of the characteristics of sPLA2, cPLA2, iPLA2 and RPE-PLA2	256
5.1	Subcellular distribution of PLA2 activity in P200	291
5.2	Characteristics of P200-PLA2 active fractions eluted from cation-exchange chromatography	292
5.3	Effects of EGTA, DTT, pBPB and heat on P200-PLA2 activity	293
5.4	Effects of various reagents on the activity of sPLA2, cPLA2, iPLA2 and P200-PLA2	294
6.1	Purification partielle de la PLA2 du P200-36	335

LISTE DES FIGURES

2.1	Effect of light on ROS PLA2 activity	176
2.2	Effect of different substrates on ROS PLA2 activity	177
2.3	Electron micrographs of purified bovine ROS	178
2.4	Production of NADPH in v-ROS, h-ROS, and hs-ROS	181
2.5	Effect of guanine nucleotides on ROS PLA2 activity	182
2.6	Effect of Mg ²⁺ concentration, EGTA, and detergent on ROS PLA2 activity as a function of free Ca ²⁺ concentration	183
2.7	ROS PLA2 or PLA1 activity toward endogenous substrates	184
2.8	PLA2 activity in subretinal fractions other than ROS	185
2.9	Influence of pH and Ca ²⁺ on RPE and P200 PLA2 activity	186
3.1	Micrographie de v-ROS fixés à la température ambiante	220
3.2	Micrographie de v-ROS fixés à 4°C	220
3.3	Micrographie de h-ROS fixés à la température ambiante dans un tampon Tris-HCl-20% sucrose	221
3.4	Micrographie de h-ROS fixés à 4°C dans un tampon Tris-HCl-40% sucrose	221
3.5	Micrographie de h-ROS fixés à la température ambiante dans un tampon cacodylate	222
3.6	Micrographies de hs-ROS fixés à la température ambiante	223
3.7	Micrographie de hs-ROS fixés à 4°C et sédimentés par gravité	224
3.8	Micrographie de hs-ROS fixés à 4°C "en bloc"	224
3.9	Taux d'utilisation de l'acide [¹⁴ C]arachidonique par les ROS	225
4.1	Discrimination between PLA2 and PLC activity	257
4.2	Cation-exchange chromatography of RPE-cytosol	258

5.1	Discrimination between PLA2 and PLC activity	295
5.2	Cation-exchange chromatography of P200-cytosol	296
6.1	Résumé de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36	336
6.2	Élution de la PLA2 du P200-36 sur CEC en fonction d'une concentra- tion croissante de NaCl	337
6.3	Élution de la PLA2 du P200-36 sur AEC en fonction d'une concentra- tion croissante de NaCl	338
6.4	Élution de la PLA2 du P200-36 sur HIC en fonction de l'augmenta- tion de l'hydrophobicité du tampon éluant	339
6.5	Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur CEC	340
6.6	Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la CEC	341
6.7	Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur HIC	342
6.8	Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la HIC	343
6.9	Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur CECg	344
6.10	Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la CECg	345
6.11	Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur GFC	346
6.12	Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la GFC	347
6.13	Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur RPC	348
6.14	Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la RPC	349
6.15	Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-, HIC-, CECg- et GFC-actif en fonction de la quantité de protéines	350
6.16	Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-, HIC-, CECg- et GFC-actif en fonction du temps	351

LISTE DES ABRÉVIATIONS^a

λ_{max}	longueur d'onde à laquelle le maximum d'absorption (ou d'émission) est atteint
AA	acide arachidonique
AEC	chromatographie échangeuse d'anions
AT	acétyl transférase
ATP	adénosine-5'-triphosphate
bf-TLC	chromatographie sur couche mince "aller-retour"
bis-Tris	2-[bis(2-hydroxyéthyl)amino]-2-hydroxyméthyl-propane-1,3-diol
Ca^{2+}_e	calcium extracellulaire
Ca^{2+}_i	calcium intracellulaire
cPLA2	PLA2 cytosolique
[¹⁴ C]DOPC	1-[¹⁴ C]oléoyl-2-[¹⁴ C]oléoyl phosphatidylcholine
CEC	chromatographie échangeuse de cations
CHES	acide 2-(cyclohexylamino)éthanesulfonique
CIGD	canal ionique GMPc-dépendant
[¹⁴ C]HAPC	1-O-hexadécyl-2-[¹⁴ C]arachidonoyl phosphatidylcholine
CoA	coenzyme A
COS	segment externe de cône
COX	cyclo-oxygénase
[¹⁴ C]PAPC	1-palmitoyl-2-[¹⁴ C]arachidonoyl phosphatidylcholine
[¹⁴ C]PAPE	1-palmitoyl-2-[¹⁴ C]arachidonoyl phosphatidyléthanolamine

^a Par souci d'uniformité et de simplicité, certaines abréviations anglaises ont été utilisées dans les chapitres rédigés en français.

Da	dalton
DAG	1,2-diacylglycérol
DHA	acide docosahexaénoïque
DMPG	dimyristoyl phosphatidylglycérol
DMPM	dimyristoyl phosphatidylméthanol
DOPC	dioléoyl phosphatidylcholine
DOPE	dioléoyl phosphatidyléthanolamine
DOPS	dioléoyl phosphatidylsérine
DPPA	acide dipalmitoyl phosphatidique
DPPC	dipalmitoyl phosphatidylcholine
DPPE	dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine
DPPS	dipalmitoyl phosphatidylsérine
DTT	dithiothréitol
E-64	N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucine]- agmatine
EGTA	acide éthylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther) N,N,N',N'- tétraacétique
G6PD	glucose 6-phosphate déshydrogénase
GDP	guanosine-5'-diphosphate
GDP β S	guanosine-5'-O-(2-thio)diphosphate
GFC	chromatographie par filtration moléculaire sur gel
GMPc	guanosine-3':5'-monophosphate cyclique
GTP	guanosine-5'-triphosphate
GTP γ S	guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate
H _{II}	phase hexagonale inverse
HIC	chromatographie à interactions hydrophobes

HPLC	chromatographie liquide à haute performance
h-ROS	segments externes de bâtonnets obtenus par homogénéisation des rétines
hs-ROS	segments externes de bâtonnets obtenus par agitation à la main des rétines
iPLA2	PLA2 Ca ²⁺ -indépendante
K _D	constante de dissociation
K ⁺ _e	potassium extracellulaire
K ⁺ _i	potassium intracellulaire
LOX	lipoxygénase
LT	leukotriène
LX	lipoxine
lysoPC	lysophosphatidylcholine
lysoPE	lysophosphatidyléthanolamine
lysoPS	lysophosphatidylsérine
mV	potentiel membranaire
Na ⁺ _e	sodium extracellulaire
Na ⁺ _i	sodium intracellulaire
n.d.	non-déterminé
OG	n-octylglucoside
P200	fraction subrétinienne sédimentée à 200g et contenant présumément les cellules nerveuses, les cellules de Müller, et les segments internes de bâtonnets
PA	acide phosphatidique
PAF	"platelet-activating factor"
PAPE	1-palmitoyl-2-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine

pBPB	bromure de p-bromophénacyl
PBS	saline tamponnée au phosphate
PC	phosphatidylcholine
PDE	phosphodiesterase GMPC-dépendante
PDE $\alpha\beta$	complexe catalytique de la PDE
PDE γ	sous-unité inhibitrice de la PDE
PE	phosphatidyléthanolamine
PG	prostaglandine
pKa	logarithme négatif de la constante de dissociation d'un acide
PKC	protéine kinase C
pI	point isoélectrique
P _i	phosphate inorganique
PI	phosphatidylinositol
PLA1	phospholipase A1
PLA2	phospholipase A2
PLB	phospholipase B
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PM	phosphatidylméthanol
P.M.	poids moléculaire
POPE	1-palmitoyl-2-oléoyl phosphatidyléthanolamine
pR	rhodopsine phosphorylée
PS	phosphatidylsérine
PUFA	acide gras polyinsaturé
10PyPM	1-O-hexadécyl-2-[pyrène ₁₀]décanyl-sn-3-phosphométhanol

10Py-decanoic acid	acide [pyrène ₁₀]décanoïque
R	rhodopsine
RIS	segment interne de bâtonnet
R kinase	rhodopsine kinase
ROS	segment externe de bâtonnet
RPC	chromatographie en phase inverse
RPE	épithélium pigmentaire rétinien
SAPC	1-stéaroyl-2-arachidonoyl phosphatidylcholine
SM	sphingomyéline
SN	surnageant
<i>sn</i>	numéro stéréospécifique
sPLA2	PLA2 sécrétée
T α	sous-unité alpha de la transducine
T α -GDP	forme inactive de la sous-unité alpha de la transducine qui contient un GDP dans son site catalytique
T α -GTP	forme active de la sous-unité alpha de la transducine qui contient un GTP dans son site catalytique
T $\beta\gamma$	complexe formé par les sous-unités beta-gamma de la transducine
TLC	chromatographie sur couche mince
T _{HII}	température de transition entre les phases lamellaire et hexagonales inverse
T _t	température de transition entre les phases gel et liquide cristallin
TX	thromboxane
v-ROS	segments externes de bâtonnets obtenus par vortexage des

w/v rétines
 poids par volume

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

L'oeil est l'organe sensoriel responsable de la vision. Il constitue à la fois un instrument d'optique extrêmement performant et un tissu neurosensoriel très sensible. Il doit donc obligatoirement comporter des cellules spécialisées qui sont sensibles aux stimuli visuels, i.e. à la lumière. De plus, ces cellules doivent nécessairement posséder toute la machinerie métabolique essentielle à la conversion des stimuli en impulsions électriques, lesquelles sont décodables par le cerveau. Ces cellules spécialisées, appelées photorécepteurs, sont regroupées dans la couche tissulaire la plus interne de l'oeil, soit la rétine. Ainsi, la lumière qui pénètre dans l'oeil et atteint les photorécepteurs initie une cascade d'évènements biochimiques qui entraînent l'hyperpolarisation¹ de ces derniers et du coup, la génération d'un signal électrique. Ce signal électrique, ou influx nerveux, est aussitôt transmis aux neurones secondaires (également regroupés dans la rétine) pour éventuellement atteindre l'aire visuelle du système nerveux central via le nerf optique (Ali et Klyne. 1986; Shichi. 1994; Wu. 1994).

1.1 Structure de l'oeil

Tel qu'illustré sur le Schéma 1.1, l'oeil est composé des tuniques fibreuse, vasculaire et interne (Spence et Mason. 1983; Ali et Klyne. 1986). La tunique fibreuse constitue l'enveloppe externe rigide et elle comprend la sclérotique, de même que la cornée. La sclérotique couvre environ 80% de la partie postérieure de l'oeil. Elle est formée de tissu conjonctif dense et sert à maintenir la forme du globe oculaire, ainsi qu'à en protéger les structures internes. La cornée, partie antérieure, est également fibreuse et rigide. Elle est cependant parfaitement transparente, ce qui permet à la lumière de pénétrer l'oeil. La

¹ L'hyperpolarisation de la membrane cytoplasmique constitue une caractéristique propre aux photorécepteurs puisque, règle générale, les cellules excitables sont dépolarisées en réponse à un stimulus (Ali et Klyne. 1986; Doly et Meyniel. 1989; Shichi. 1994; Spence et Mason. 1983).

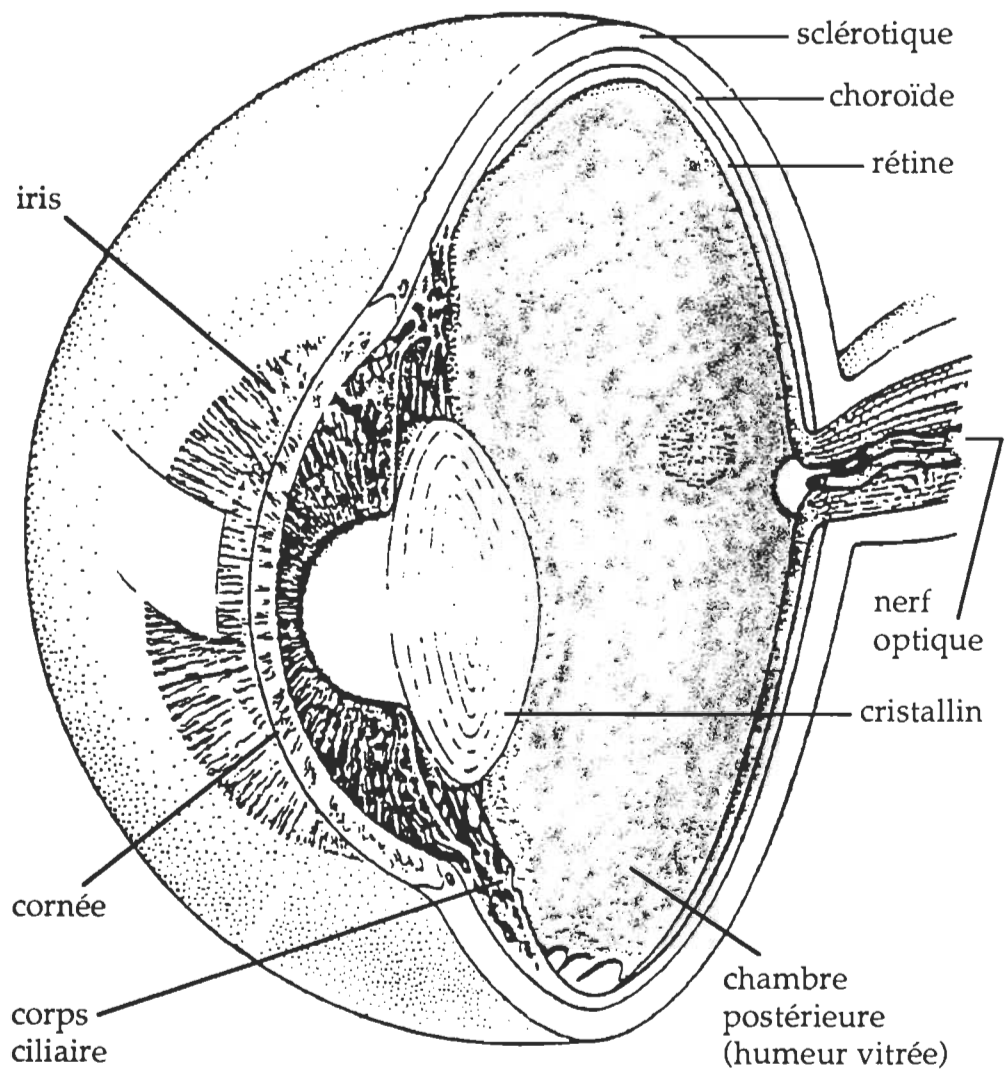


Schéma 1.1: Structure de l'oeil des vertébrés

tunique vasculaire est quant à elle composée de la choroïde, du corps ciliaire et de l'iris. Alors que l'iris délimite la pupille, la choroïde tapisse la face intraoculaire de la sclérotique et, parce qu'elle est très vascularisée, elle sert de tissu nourricier. C'est le prolongement antérieur de la choroïde qui forme le corps ciliaire, lequel contient un système d'échange de fluides très important pour le contrôle de la pression intraoculaire, ainsi que les muscles ciliaires. Ceux-ci sont reliés au cristallin via les ligaments suspenseurs et l'aident à se déformer afin de focaliser sur l'image. Le cristallin représente donc la lentille de l'oeil. L'iris, mince diaphragme musculaire pigmenté, assure pour sa part l'ouverture adéquate de la pupille en fonction de l'intensité lumineuse. Enfin, c'est au niveau de la tunique interne, communément appelée rétine, que se déroule le mécanisme de transduction visuelle, i.e. le mécanisme de phototransduction.

1.2 Organisation de la rétine

La rétine est composée de deux feuillets intimement liés l'un à l'autre (Berman. 1991). Il s'agit de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE), qui est accolé à la choroïde via la membrane de Bruch, et la rétine neurale, qui est en contact avec l'humeur vitrée (voir les schémas 1.1 et 1.2). C'est au sein de la rétine neurale qu'on retrouve les deux types de photorécepteurs, soit les cônes et les bâtonnets (voir Schéma 1.2). Les cônes sont responsables de la perception des couleurs (vision photopique), tandis que les bâtonnets captent la lumière, sans discrimination des longueurs d'onde (vision scotopique) (Olive. 1980; Ali et Klyne. 1986; Shichi. 1994). Les cellules gliales de Müller, ainsi que les cellules nerveuses de types bipolaires, amacrines, ganglionnaires/interplexiformes² et

² Les cellules interplexiformes forment un sous-groupe de cellules ganglionnaires rétiniennes (Ali et Klyne. 1986).

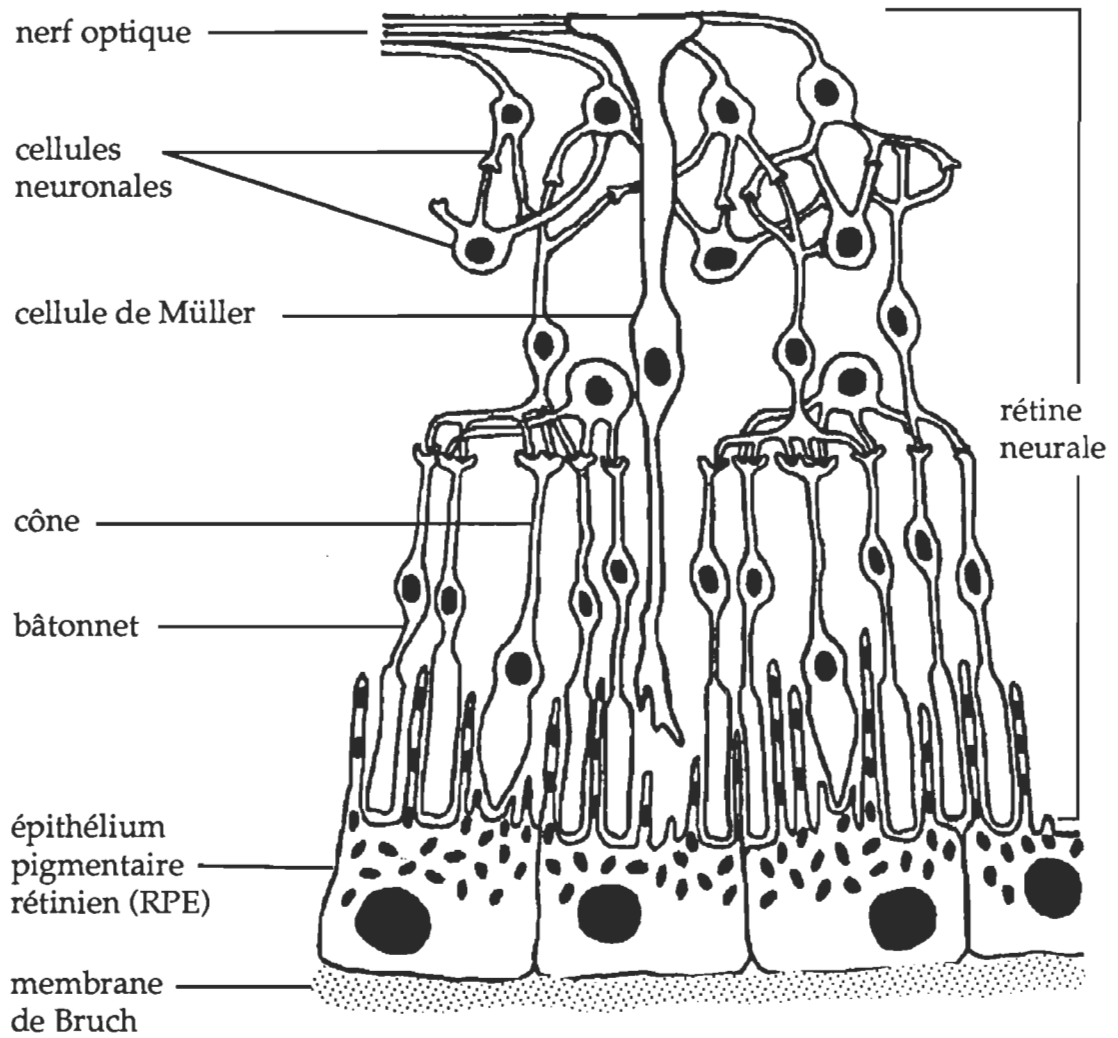


Schéma 1.2: Organisation de la rétine

horizontales font aussi partie intégrante de la rétine neurale. Les neurones assurent la transmission efficace de l'influx nerveux généré par les photorécepteurs jusqu'au nerf optique³, et les cellules de Müller fournissent un soutien mécanique à la rétine (Spence et Mason. 1983; Berman. 1991; Wu. 1994; Chang-Ling. 1994). Il semble par ailleurs que ces dernières puissent jouer un rôle important dans le métabolisme de la rétine neurale (Berman. 1991; Evequoz-Mercier et Tsacopoulos. 1991; Wilhelm *et al.* 1992; Dreher *et al.* 1994; Härtig *et al.* 1995). Le RPE est quant à lui constitué d'une monocouche de cellules hautement polarisées et très riches en mélanine. Tel que décrit plus loin, son bon fonctionnement est étroitement lié au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des photorécepteurs (Zinn et Marmor. 1979; Shichi. 1983; Berman. 1991).

1.3 Caractéristiques des photorécepteurs

Les photorécepteurs, cônes et bâtonnets, tirent leur nom de leur morphologie lorsqu'observés en microscopie électronique. Ils sont fonctionnellement et structurellement polarisés (Olive. 1980; Stryer. 1986; Doly et Meyniel. 1989; Fisher *et al.* 1993). Ils se composent en fait de quatre segments fonctionnels: le segment externe, le segment interne, le noyau et la terminaison synaptique (voir Schéma 1.3). Le segment interne et le noyau contiennent respectivement la machinerie métabolique et génétique, alors que le segment externe

³ Les cellules bipolaires font contact avec les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires dont le prolongement axonal forme le nerf optique. Les impulsions visuelles passent inévitablement par les cellules bipolaires lorsqu'elles progressent vers les cellules ganglionnaires avant de quitter la rétine vers le cerveau. Elles jouent un rôle important dans l'acuité visuelle. Les cellules horizontales établissent, comme leur nom l'indique, un contact latéral entre les photorécepteurs. Les cellules amacrines ont un rôle homologue à celui des cellules horizontales mais, cette fois-ci, entre les cellules ganglionnaires. Les cellules interplexiformes permettent pour leur part de contourner le circuit interneuronal normal, en faisant contact directement avec les bâtonnets (Ali et Klyne. 1986).

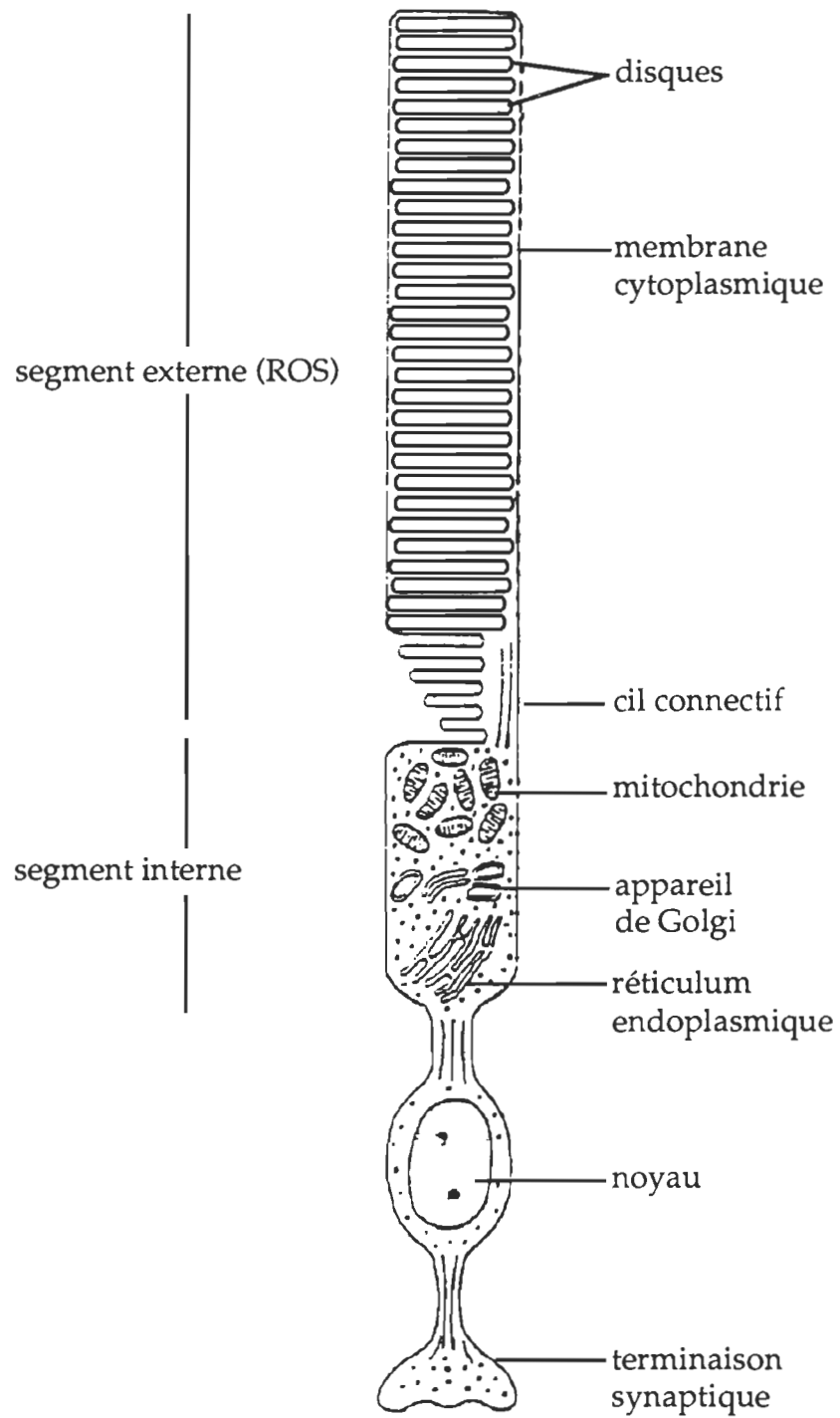


Schéma 1.3: Compartimentalisation des photorécepteurs

constitue le lieu même de conversion des stimuli visuels en influx nerveux. C'est l'aspect du segment externe qui confère le nom aux photorécepteurs. Ainsi, le segment externe des bâtonnets (ROS) est long et cylindrique, alors que celui des cônes (COS) est plus court et légèrement conique (voir Schéma 1.2) (Olive. 1980; Ali et Klyne. 1986; Doly et Meyniel. 1989; Kawata *et al.* 1992; Fisher *et al.* 1993). La terminaison synaptique permet quant à elle la transmission de l'influx nerveux généré jusqu'au nerf optique et ce, en passant par les différents types de cellules nerveuses mentionnés précédemment (voir la section 1.2).

Bien qu'ils soient fonctionnellement compartimentalisés de la même façon, les cônes et les bâtonnets présentent néanmoins des différences morphologiques notables (voir Tableau 1.1). Parmi celles-ci, la continuité entre la membrane cytoplasmique et les disques contenus dans le segment externe est particulièrement remarquable (O'Brien. 1978; Steinberg *et al.* 1980; Ali et Klyne. 1986; Berman. 1991). En effet, le segment externe des bâtonnets est constitué d'un empilement régulier de 500 à 2000 disques (Shichi. 1983; Stryer. 1986; Liebman *et al.* 1987; Doly et Meyniel. 1989; Lolley et Lee. 1990; Shichi. 1994). Ceux-ci sont assemblés à la base du segment externe, i.e. au niveau du cil connectif par lequel transitent tous les matériaux requis pour l'assemblage, en provenance du segment interne (voir Schéma 1.3). Les disques sont donc synthétisés dans la portion basale du segment externe, à la suite de quoi ils migrent progressivement et passivement vers la portion apicale (en contact avec les cellules du RPE). Dans le cas des bâtonnets, la continuité entre la membrane cytoplasmique et les disques se limite à la portion basale du ROS, où se fait l'assemblage. Autrement, les disques sont structurellement et électriquement isolés de la membrane cytoplasmique (Bauer. 1988; Bauer et Drechsler. 1992). Par opposi-

Tableau 1.1: Caractéristiques morphologiques des photorécepteurs de vertébrés

	BÂTONNETS	CÔNES
Segment externe	long et cylindrique	conique
Diamètre du segment externe	même que le segment interne	plus grand que le segment interne
Continuité membranaire ^a	limitée à la portion basale du ROS	sur toute la longueur du COS
Incisions dans les disques ^b	oui	non
Distance entre les disques	18,5-22,0 nm	22,0-25,5 nm
Mitochondries de l'ellipsoïde	moins nombreuses et peu rapprochées	nombreuses et rapprochées
Fibres de connexion ^c	longues et minces	courtes
Terminaison synaptique	sphérique	conique avec une large base

^a Il s'agit de la continuité entre les membranes cytoplasmique et discale.

^b Les incisions sont des invaginations (ou replis) membranaires qui donnent un aspect lobé aux disques.

^c Les fibres de connexion se retrouvent au niveau du cil connectif.

tion, cette continuité entre les membranes plasmique et discale s'étend généralement sur toute la longueur du COS (O'Brien. 1978; Ali et Klyne. 1986; Rayer *et al.* 1990; Lolley et Lee. 1990; Berman 1991; Pugh et Lamb. 1993; Yarfitz et Hurley. 1994). Le COS n'est donc pas constitué de disques proprement dits, mais plutôt de replis de la membrane cytoplasmique.

En plus des paramètres morphologiques, des paramètres biochimiques et physiologiques différencient également les deux types de photorécepteurs (voir les tableaux 1.1 et 1.2). Ainsi, les ROS (constitués de disques isolés) requièrent une très faible quantité de photons pour être stimulés et sont responsables de la vision de nuit. Au contraire, l'excitation des COS (constitués de replis membranaires) requière une intensité lumineuse beaucoup plus grande et ce, pour permettre la perception des couleurs durant le jour. De plus, la réponse des COS à la lumière se termine beaucoup plus rapidement que celle des ROS (O'Brien. 1978; Denton *et al.* 1992). Malgré cela, il semble que les mécanismes de phototransduction utilisés par les cônes et les bâtonnets soient sensiblement les mêmes. Aucune différence biochimique ou physiologique majeure ne semble, par exemple, avoir été attribuée à la présence de disques ou de replis membranaires (Kaupp et Koch, 1986; Lolley et Lee. 1990; Rayer *et al.* 1990; Denton *et al.* 1992; Miller et Korenbrot. 1993; Pugh et Lamb. 1993; Shichi. 1994). Il faut toutefois noter que, jusqu'à présent, relativement peu de travaux ont porté sur les mécanismes de phototransduction des cônes. Les bâtonnets ont en effet été beaucoup plus étudiés et ce, parce qu'ils sont plus gros, plus nombreux, plus faciles à isoler, mais aussi à cause de la disponibilité à faible coût des rétines ne contenant que, ou majoritairement, ce type de photorécepteur (O'Brien. 1978; Miljanich. 1978; Denton *et al.* 1992). Ils font par ailleurs l'objet, entre autres, de

Tableau 1.2: Caractéristiques biochimiques des photorécepteurs de vertébrés^a

	BÂTONNETS	CÔNES
Ségrégation/phagocytose	début de la période diurne	début de la période nocturne
Réponse demi-maximale	30 photons requis	1200 photons requis
Excitation visuelle (msec)	200	50
Nucléotides cycliques	cGMP >>> cAMP	cAMP >>> cGMP
Perception lumineuse	achromatique	chromatique
λ max pigment visuel (nm)	500 (rouge)	620 (rouge), 450 (vert) et 420 (bleu) ^b
Canaux GMPc-dépendants ^c		
Densité (μm^{-2})	300	20
K_D GMPc (μM)	10-50	35-70
Sélectivité	$\text{Na}^+ \geq \text{K}^+$	$\text{K}^+ > \text{Na}^+$

^a Voir Ali et Klyne. 1986; Lolley et Lee. 1990; Denton *et al.* 1992; Hurley. 1992; Kaupp et Koch. 1992; Shichi. 1994.

^b La lumière doit nécessairement être absorbée par au moins deux cônes dont le maximum d'absorption est différent pour permettre la discrimination des couleurs (Shichi. 1994).

^c Ces canaux, tout comme les opsines, transducines, PDEs et recoverines/visinines des bâtonnets et des cônes, sont produits à partir de gènes qui leur sont propres et ont des caractéristiques cinétiques différentes.

la présente thèse. Aussi seront résumées les principales étapes du processus de transduction visuelle, telles qu'abondamment décrites dans la littérature pour les bâtonnets.

1.4 Mécanisme de phototransduction

Comme nous l'avons mentionné antérieurement, c'est au niveau du ROS que se déroule la cascade réactionnelle menant à l'hyperpolarisation du bâtonnet et à la génération concomitante de l'influx nerveux. Plus spécifiquement, c'est sur la membrane des disques que se trouve le pigment visuel photosensible, soit la rhodopsine (O'Brien. 1978. Liebman *et al.* 1987; Doly et Meyniel. 1989; Hargrave et McDowell. 1992; Shichi. 1983; Shichi. 1994; Hargrave. 1995). La rhodopsine est une chromoglycoprotéine transmembranaire de 41 kDa (Papermaster et Dryer. 1974; Hargrave. 1982; Prasad *et al.* 1992; Hargrave. 1992; Endo *et al.* 1996). Elle est constituée d'une apoprotéine, l'opsine, à laquelle est lié un chromophore, le 11-*cis*-rétinal (λ_{max} d'absorption à 497-500 nm) (Shichi. 1983; Thorgeirsson *et al.* 1992; Chen *et al.* 1992). Lorsque celui-ci absorbe des photons, il est isomérisé en tout-*trans*-rétinal (λ_{max} d'absorption à 380 nm), entraînant conséquemment un changement de conformation et d'activité de l'opsine (Schoenlein *et al.* 1991; Yan *et al.* 1991; Cohen *et al.* 1992; Farahbakhsh *et al.* 1993; Peteanu *et al.* 1993; Weitz et Nathans. 1993; Zvyaga *et al.* 1993). L'activité de l'opsine pourrait également être régulée ou stabilisée par la palmitoylation de cette dernière. Des résultats expérimentaux suggèrent en effet que la dépalmitoylation de la rhodopsine pourrait réduire sa régénéralité, en plus d'en induire l'agrégation (Morrison *et al.* 1991; Moench *et al.* 1994a; Moench *et al.* 1994b). La rhodopsine sert donc de récepteur à un stimulus qui n'est pas un ligand au sens propre du terme, i.e. la lumière (voir Schéma 1.4).

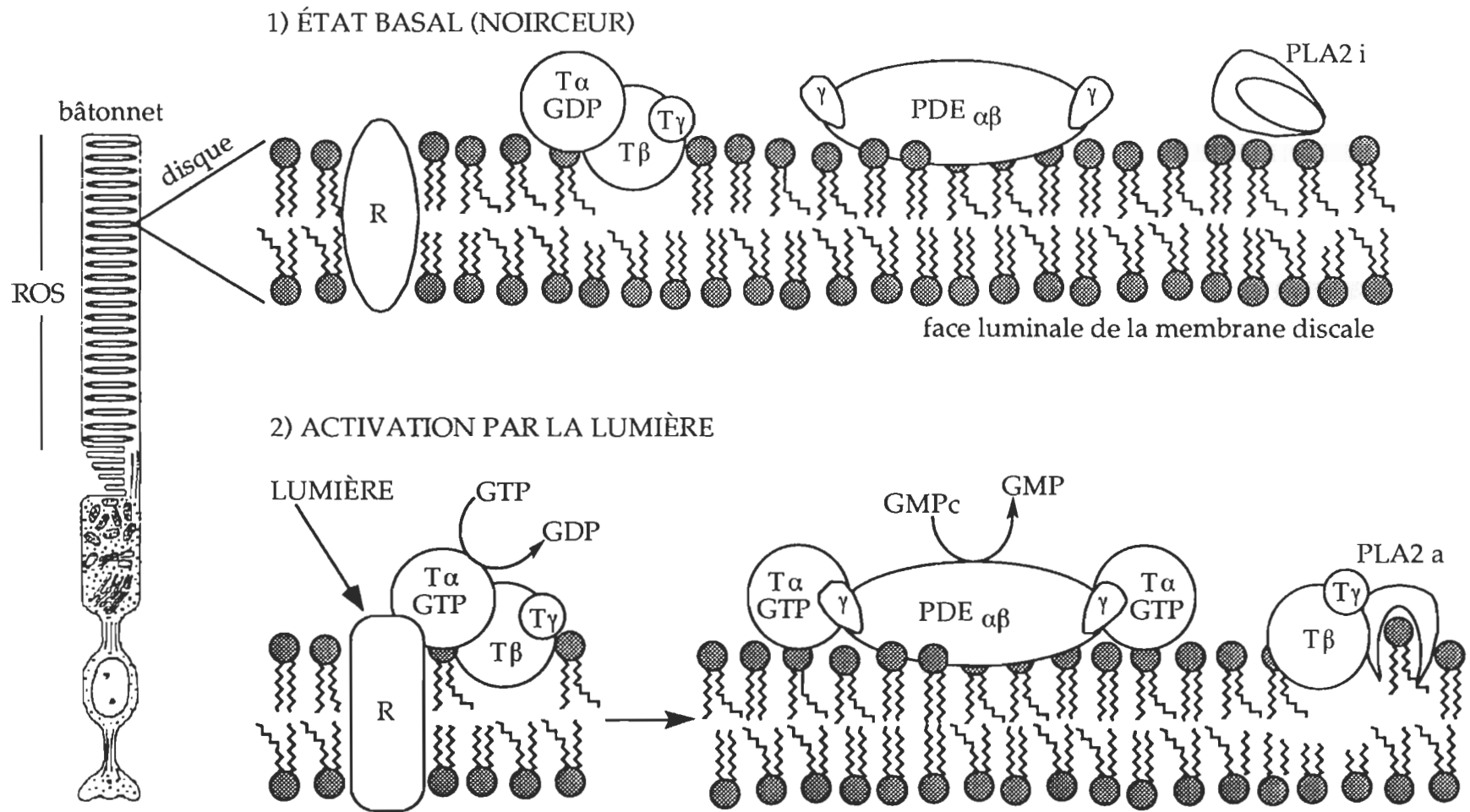


Schéma 1.4: Mécanisme de phototransduction d'un bâtonnet

Une fois activée, la rhodopsine (sous sa forme métarhodopsine II) se lie à une autre protéine de la membrane discale, la transducine (Yamazaki *et al.* 1987a; Wessling-Resnick et Johnson. 1987; Hamm. 1991; Bruckert *et al.* 1992; Fahmy et Sakmar. 1993). La transducine est une protéine hétérotrimérique de la famille des protéines-G. Elle est composée des sous-unités T α (39-41 kDa), T β (36-37 kDa) et T γ (6-8 kDa) (Kühn. 1980; Fung. 1983; Yamazaki *et al.* 1987b). T β et T γ sont fortement associées en un complexe, T $\beta\gamma$, pour lequel aucune fonction autre que la régulation de l'activation de T α n'a encore été confirmée (Jelsema et Axelrod. 1987; Haga et Haga. 1992; Phillips et Cerione. 1992; Phillips *et al.* 1992; Pronin et Gautam. 1993). T α possède quant à elle une activité catalytique de type GTPase qui, tel que décrit ci-dessous, module les interactions rhodopsine-transducine et transducine-PDE. Aucune de ces trois sous-unités ne possède de domaine transmembranaire (Kühn et Hargrave. 1981; Stryer. 1986; Liebman *et al.* 1987; Chabre et Deterre. 1989; Lamb et Pugh. 1992b; Pugh et Lamb. 1993; Yarfitz et Hurley. 1994). Il s'agit donc d'une protéine périphérique⁴ dont l'association à la membrane semble renforcée par l'acylation d'au moins deux de ses sous-unités, soit T α et T γ (Ohguro *et al.* 1991; Perez-Sala *et al.* 1991; Casey. 1992a; Casey. 1992b; Iniguez-Lluhi *et al.* 1992; Neubert *et al.* 1992; Schafer et Rine. 1992; Kinsella et O'Mahony. 1994; Kisselev *et al.* 1994).

Sous sa forme inactive, la sous-unité T α de la transducine contient une molécule de GDP dans son site catalytique. Or la liaison de la métarhodopsine

⁴ Il y aurait vraisemblablement trois types de transducines: un premier qui est soluble et facilement éliminé si les ROS sont brisés en cours de purification (Lerea *et al.* 1986), un second qui est associé à la membrane des ROS mais élué à faible force ionique, en présence de GTP (Kühn. 1980), et un troisième qui est fortement associé à la membrane et élué en présence de détergents seulement (Wensel et Stryer. 1988). Aucune étude n'a encore démontré une interaction préférentielle de la rhodopsine avec l'un ou l'autre de ces types de transducine. Par ailleurs, on ne leur connaît aucune différence fonctionnelle (Hurley. 1992).

II à la transducine favorise l'échange de cette molécule de GDP pour une molécule de GTP, ce qui confère à la transducine son état actif (Stryer et Bourne. 1986; Bruckert *et al.* 1992; Faurobert *et al.* 1993; Mazzoni et Hamm. 1993). Plus précisément, l'échange du GDP pour un GTP provoque, d'une part, la dissociation du complexe $T\alpha\beta\gamma$ de la rhodopsine (Chabre et Deterre. 1989) et, d'autre part, la dissociation de ce complexe en deux sous-unités fonctionnelles, soit $T\alpha$ -GTP et $T\beta\gamma$. La rhodopsine se retrouve ainsi libre d'activer d'autres transducines, ce qui constitue une première étape d'amplification⁵ du processus de phototransduction (Kaupp et Koch. 1986; Lamb et Pugh. 1992a; Chabre *et al.* 1993; Pugh et Lamb. 1993). Pour leur part, $T\alpha$ -GTP et $T\beta\gamma$ sont dès lors aptes à interagir avec des protéines dites effectrices. La transducine agit donc à titre de médiateur entre la rhodopsine (récepteur) et la phosphodiesterase GMPC-dépendante (effecteur) qui module la concentration de GMPC (second messenger).

Jusqu'à présent, une seule équipe (Jelsema et Axelrod. 1987) a présenté des arguments expérimentaux suggérant l'implication de $T\beta\gamma$ dans la régulation d'une activité enzymatique autre que celle de $T\alpha$. Leurs résultats montrent que $T\beta\gamma$ active une phospholipase A2 (PLA2) (voir Schéma 1.4). Cependant, nous avons démontré (Jacob *et al.* 1996) que la présence d'activité PLA2 dans les ROS est fort probablement due à une contamination de leurs préparations (voir les chapitres 2 et 3), ce qui invalide l'hypothèse de Jelsema et Axelrod (1987) voulant qu'une PLA2 soit impliquée dans la régulation du processus de phototransduction. Par opposition, il a été clairement démontré que $T\alpha$ -GTP active une phosphodiesterase GMPC-dépendante (PDE) (Fung *et al.* 1981;

⁵ Chaque molécule de rhodopsine peut activer jusqu'à 1000 molécules de transducine/sec (Fung *et al.* 1981; Chabre. 1992).

Rarick *et al.* 1992; Pfister *et al.* 1993; Heck et Hofmann. 1993; Artemyev *et al.* 1993; Dumke *et al.* 1994). La PDE est, tout comme la transducine, une protéine périphérique et multimérique. Elle est composée d'une sous-unité PDE α (88 kDa), une sous-unité PDE β (84 kDa) et deux sous-unités PDE γ (11 kDa) (Baehr *et al.* 1979; Hamm et Bownds. 1986; Hurley. 1987). Elle devient partiellement ou totalement active selon qu'une ou deux molécules de T α -GTP se lient aux sous-unités PDE γ , respectivement (voir Schéma 1.4) (Yamazaki *et al.* 1983; Wensel et Stryer. 1990; Otto-Bruc *et al.* 1993; Bruckert *et al.* 1994). Cette liaison des T α -GTP aux PDE γ a pour effet de lever la contrainte inhibitrice⁶ qu'imposent ces dernières sur le complexe catalytique PDE $\alpha\beta$. PDE $\alpha\beta$ s'engage dès lors dans une activité hydrolytique très intense (voir Schéma 1.4). Une seule molécule de PDE $\alpha\beta$ active peut hydrolyser de 1000 à 2000 molécules de GMPc/sec (Fung *et al.* 1981; Kaupp et Koch. 1986; Stryer. 1986; Chabre et Deterre. 1989; Lamb et Pugh. 1992a; Pugh et Lamb. 1993). Il s'agit de la deuxième étape d'amplification du processus de transduction visuelle.

Le GMPc est un petit métabolite (345 Da) soluble extra-discal que l'on retrouve, d'une part, libre dans le cytoplasme et, d'autre part, lié à des canaux ioniques transmembranaires. Ces canaux sont des hétéro-oligomères protéiques constitués des sous-unités α (63 kDa) et β (71-102 kDa) (Bodoia et Detwiler. 1984; Stryer. 1986; Chen *et al.* 1992; Cote et Brunnock. 1993; Eismann *et al.* 1993; Molday et Hsu. 1995). Bien que le rapport stoïchiométrique des sous-unités α et

⁶ À l'heure actuelle, on ne peut affirmer avec certitude que le complexe formé par T α -GTP et PDE γ se détache véritablement de PDE $\alpha\beta$ lors de l'activation. Alors que certaines études présentent des évidences en faveur d'un tel détachement (Yamazaki *et al.* 1983; Yamazaki *et al.* 1990; Wensel et Stryer. 1990), d'autres montrent des résultats laissant croire qu'un changement conformationnel de PDE γ et/ou PDE $\alpha\beta$ serait à l'origine de l'activation de PDE $\alpha\beta$ (Gray-Keller *et al.* 1990; Catty *et al.* 1992).

β ne soit pas encore bien défini, il a été clairement démontré que ces canaux sont propres à la membrane cytoplasmique du ROS (Cook *et al.* 1987; Bauer. 1988; Kaupp *et al.* 1989; Bauer et Drechsler. 1992; Eismann *et al.* 1993). C'est par ailleurs la liaison spécifique d'une molécule de GMPc sur chaque sous-unité α constituante (probablement 4 ou 5, selon Molday et Hsu. 1995) qui permet de les maintenir ouverts (Lamb. 1986; Ildefonse *et al.* 1992; Karpen *et al.* 1992; Eismann *et al.* 1993; Yau. 1994), assurant ainsi une perméabilité élevée de la membrane cytoplasmique aux ions Na^+ . Par conséquent, le bâtonnet adapté à la noirceur est fortement dépolarisé (-30 à -40 mV) (Shichi. 1983; Rayer *et al.* 1990). Lorsque le processus d'excitation visuelle est initié et que $\text{PDE}\alpha\beta$ est activée, il y a une chute rapide de la concentration de GMPc cytoplasmique. Une seule molécule de rhodopsine photoexcitée peut en effet activer de 100 à 500 transducines et, par conséquent, de 100 à 500 PDEs qui vont à leur tour hydrolyser de 100 000 à 500 000 molécules de GMPc au total (Kaupp et Koch. 1986; Dizhoor *et al.* 1991; Chabre. 1992; Lamb et Pugh. 1992a). Ceci provoque aussitôt le relargage des molécules de GMPc liées aux canaux ioniques avoisinant le disque touché par le stimulus lumineux (Kaupp et Koch. 1992; Olson et Pugh. 1993; Molday et Hsu. 1995). Ainsi privés de leurs GMPc, les canaux se ferment automatiquement et l'entrée d'ions Na^+ dans le ROS est dorénavant bloquée. Or pendant ce temps, les pompes ATPases à Na^+-K^+ , localisées au niveau du segment interne du bâtonnet (RIS), continuent d'exporter des ions Na^+ hors du bâtonnet⁷ (voir Schéma 1.5) (Cook et Kaupp. 1988; Reid *et al.* 1990; Molday et Hsu. 1995). Il s'ensuit donc une baisse importante de la concentration intracellulaire de Na^+ (Na^+_i), laquelle est à l'origine de l'hyperpolarisation (-70 mV) du bâtonnet sur

⁷ Pour deux molécules d'ATP hydrolysées, six ions Na^+ et cinq ions K^+ sont respectivement transférés à l'extérieur et à l'intérieur du photorécepteur (Rayer *et al.* 1990).

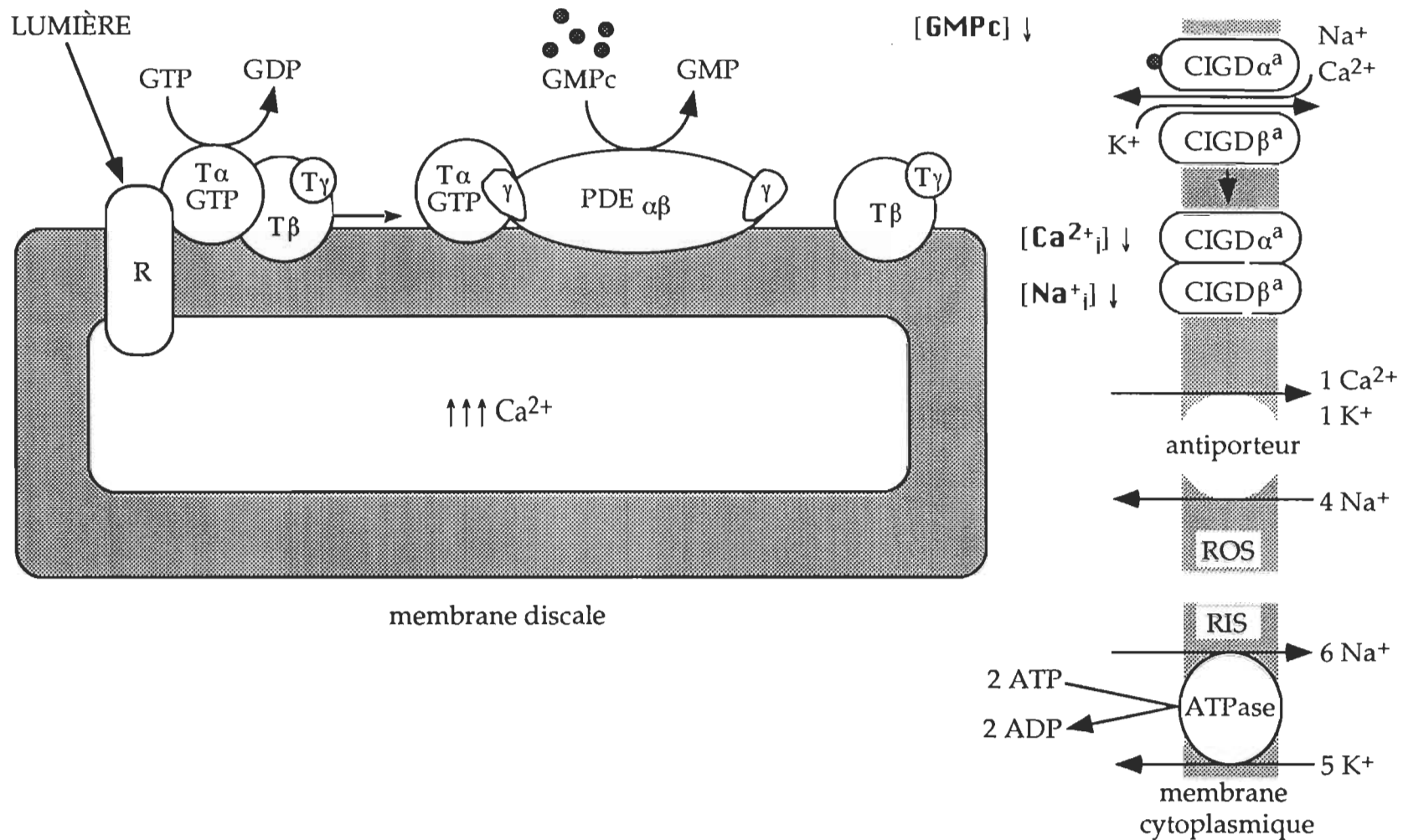


Schéma 1.5: Contrôle des échanges ioniques dans le bâtonnet

^a CIGD α et CIGD β : sous-unités α et β d'un canal ionique GMPc-dépendant, respectivement.

toute sa longueur (Shichi. 1983; Rayer *et al.* 1990).

L'ensemble de ces réactions, de l'activation de la rhodopsine à l'hyperpolarisation du bâtonnet, se produit en environ 200 msec (Shichi. 1983; Chabre et Deterre. 1989; Dizhoor *et al.* 1991; Chabre *et al.* 1993; Shichi. 1994). La réponse globale à un stimulus lumineux, elle, prend environ 500-600 msec (Chabre et Deterre. 1989; Vuong et Chabre. 1991; Shichi. 1994), ce qui laisse un peu plus de 300 msec pour mettre fin à l'excitation visuelle. On parle alors de mécanismes d'inhibition de l'excitation visuelle et les canaux ioniques jouent un rôle très important dans l'initiation de ces mécanismes. En effet, ces canaux ne sont pas strictement sélectifs pour le Na^+ . Ils laissent aussi passer les ions Ca^{2+} (voir Schéma 1.5) (Stryer. 1986; Pugh et Lamb. 1990; Kaupp. 1991; Molday et Hsu. 1995). Cette entrée est normalement contrebalancée par l'activité des échangeurs antiporteurs à $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$, des glycoprotéines transmembranaires de 220-240 kDa qui sont présentes exclusivement sur la membrane cytoplasmique des ROS et qui réexpédient le Ca^{2+} hors du bâtonnet en tirant profit du gradient de concentration⁸ de Na^+ et de K^+ (voir Schéma 1.5) (Pugh. 1987; Baylor. 1987; Cook et Kaupp. 1988; Schnetkamp. 1989; Reid *et al.* 1990; Kaupp et Koch. 1992; Schnetkamp et Szerencsei. 1993; Molday et Hsu. 1995). Ces deux processus contribuent donc au maintien homéostatique de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Ca^{2+}_i). Or lorsque les canaux ioniques sont fermés, il y a non seulement chute de la concentration de Na^+_i , mais également chute de la concentra-

⁸ Certaines études suggèrent une stœchiométrie de 4:1:1 pour ces échangeurs $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$ (Reeves. 1992; Molday et Hsu. 1995). Ils ont une affinité de l'ordre du mM pour le Na^+ et le K^+ , et du μM pour le Ca^{2+} (Nicoll et Applebury. 1989). Par ailleurs, les concentrations intra- et extracellulaire de Na^+ sont respectivement de 15 mM et 140 mM (Ichikawa. 1994), alors qu'elles sont de 140 mM et 3-6 mM pour le K^+ (Mättig et Hanitzsch. 1991; Rispoli *et al.* 1993), et de 300-400 nM et 2 mM pour le Ca^{2+} (Ichikawa. 1994).

tion de Ca^{2+}_i (voir Schéma 1.5 et Tableau 1.3). Cette baisse de concentration de Ca^{2+}_i , de 300-400 nM à 100 nM ou moins (Lambrecht et Koch. 1991), enclenche alors toute une série de réactions visant à restaurer les conditions ioniques et biochimiques initiales du bâtonnet (Cook *et al.* 1986; Caretta *et al.* 1988; Gorodovikova *et al.* 1994; Lagnado et Baylor. 1994; Hurley. 1995).

1.5 Mécanisme d'inhibition de l'excitation visuelle

Plusieurs études ont permis de démontrer que, pour mettre fin au processus de phototransduction aussi rapidement, soit en 500-600 msec, il doit y avoir régulation négative à plusieurs niveaux de la cascade d'activation (Chabre *et al.* 1987; Chabre et Deterre. 1989; Chabre et Deterre. 1990; Pugh et Lamb. 1990; Lolley et Lee. 1990; Rayer *et al.* 1990; Vuong et Chabre. 1991; Stryer. 1991; Kaupp et Koch. 1992; Hurley. 1992). Ainsi, il est essentiel d'inhiber les rhodopsines, transducines et PDEs, en plus de restaurer les concentrations initiales de GMPc, Na^+_i et Ca^{2+}_i libre (voir Tableau 1.3).

Étant donné qu'une seule rhodopsine peut activer quelques centaines de transducines (Dizhoor *et al.* 1991; Chabre. 1992; Lamb et Pugh. 1992b), elle représente un site important de régulation de l'excitation visuelle. Il a d'ailleurs été démontré que la rhodopsine peut se lier à trois protéines différentes des ROS. Elle peut se lier à la transducine, comme nous l'avons expliqué auparavant, mais elle peut aussi se lier à deux protéines solubles (voir Schéma 1.6): la rhodopsine kinase, une protéine de 68 kDa (Kühn et Bader. 1976; Kühn. 1978; Liebman et Pugh. 1980; Palczewski *et al.* 1988; Palczewski et Benovic. 1991; Pepperberg et Okajima. 1992; Ohguro *et al.* 1993; Papac *et al.* 1993; Pullvermüller *et al.* 1993), et l'arrestine, une protéine de 48 kDa aussi appelée antigène-S ou 48K

Tableau 1.3: Variation des concentrations de GMPc, GTP, Ca²⁺, K⁺, Na⁺ et mV dans les photorécepteurs de vertébrés^a

PHOTORÉCEPTEURS		
	ADAPTÉS À LA NOIRCEUR	PHOTOEXCITÉS
GMPc	2-4 μ M	\leq 400 nM
GTP	2 mM	n.d. ^b
Ca ²⁺ _i	300-400 nM	\leq 100 nM
Ca ²⁺ _e	2 mM	
K ⁺ _i	140 mM	n.d.
K ⁺ _e	3-6 mM	
Na ⁺ _i	12-15 mM	n.d.
Na ⁺ _e	140 mM	
m V	-30 à -40 mV	-70 mV

^a Stryer. 1986; Yau et Nakatani. 1984; McNaughton *et al.* 1986; Miller et Korenbrot. 1987; Nakatani et Yau. 1988; Torre *et al.* 1990; Lambrecht et Koch. 1991; Mättig et Hanitzsch. 1991; Kaupp et Koch. 1992; Lamb et Pugh. 1992a; Rispoli *et al.* 1993; Ichikawa. 1994.

^b n.d. = non-disponible

1) inhibition de la rhodopsine

3) synthèse du GMPc par la guanylate cyclase et réouverture des canaux GMPc-dépendants (CIGD)

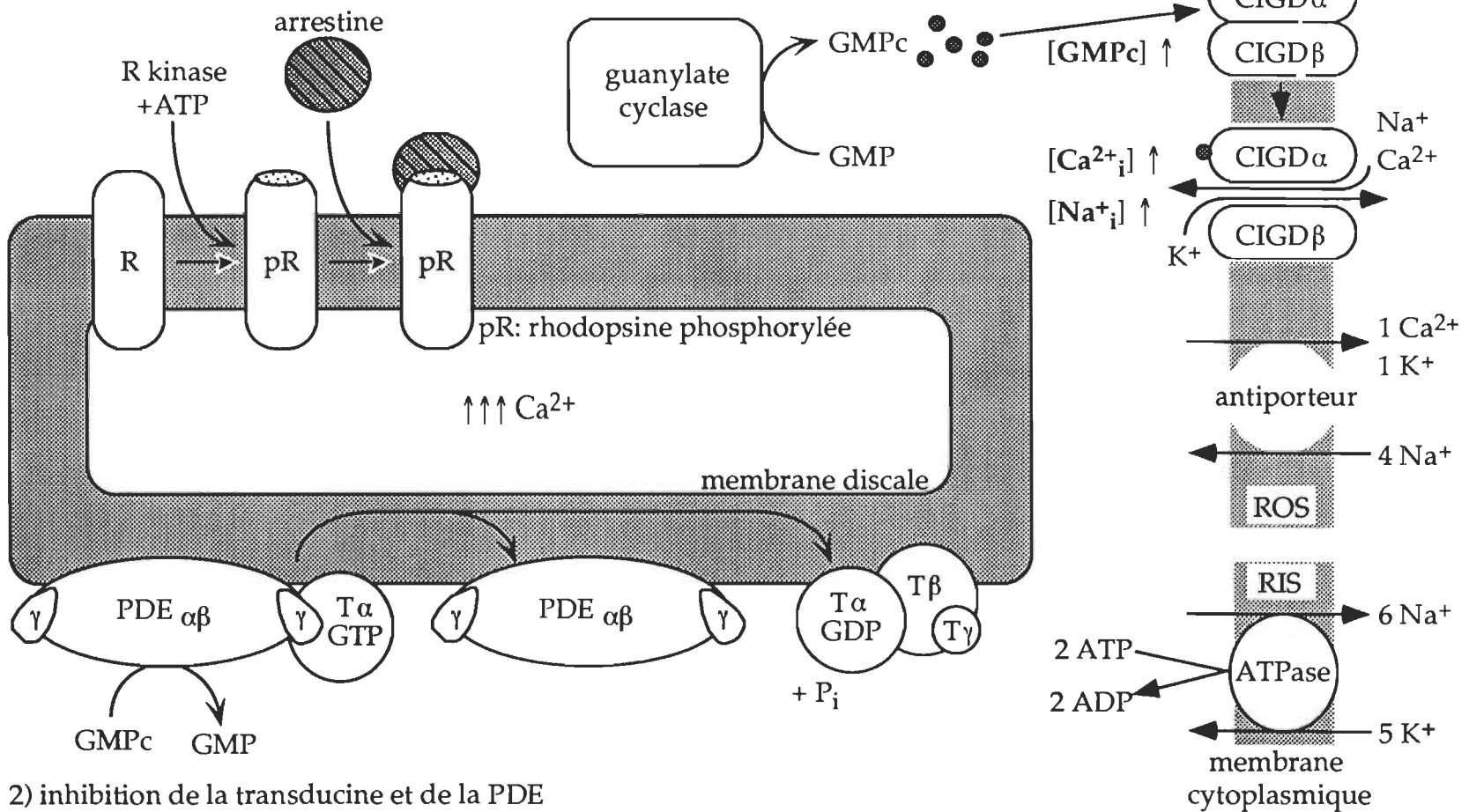


Schéma 1.6: Mécanisme d'inhibition de l'excitation visuelle

(Kühn. 1984; Kühn *et al.* 1984; Wilden *et al.* 1986a; Wilden *et al.* 1986b; Gurevich et Benovic. 1993). Ces liaisons rhodopsine-rhodopsine kinase et rhodopsine phosphorylée-arrestine sont absolument indispensables car, autrement, la rhodopsine serait en mesure d'activer des transducines pendant près de 10 sec (Chabre et Deterre. 1989), ce qui ne correspond en rien aux 500-600 msec que dure un cycle de phototransduction *in vivo*.

Puisque toute cette cascade de signalisation se propage par diffusion et collisions des protéines à la surface des disques, tout est question de concentration (densité) et de coefficient de diffusion latérale de chacune des protéines impliquées (Liebman *et al.* 1982; Helmreich et Elson. 1984; Lamb et Pugh. 1992a). Ainsi, parce que l'arrestine a peu d'affinité pour la rhodopsine non-phosphorylée, et à cause du ratio transducine/rhodopsine kinase élevé, la liaison rhodopsine-transducine est initialement favorisée. Buczylo *et al.* (1992) ont suggéré que, dans des conditions encore mal définies, l'autophosphorylation de la rhodopsine kinase pourrait changer son affinité pour la rhodopsine, de sorte que la liaison rhodopsine-rhodopsine kinase soit désormais favorisée au détriment de la liaison rhodopsine-transducine. Plusieurs acides aminés de la rhodopsine sont ensuite phosphorylés⁹, ce qui augmente considérablement son affinité pour l'arrestine (Wilden *et al.* 1986a; Palczewski *et al.* 1992). C'est donc la liaison rhodopsine-arrestine, suivie de la réduction du tout-*trans* retinal en rétinol (Hofmann *et al.* 1992), qui mène à l'inactivation complète de la rhodopsine.

⁹ Il semble qu'il y ait neuf sites potentiels de phosphorylation (Ser ou Thr) près du bout C-terminal de la protéine (Wilden *et al.* 1986a; Pepperberg et Okajima. 1992; Papac *et al.* 1993), et au moins sept d'entre eux seraient phosphorylés. Le groupement phosphate utilisé pour la phosphorylation provient de l'ATP (substrat préféré) ou du GTP.

Une fois que la rhodopsine et l'arrestine sont liées, il n'y a plus possibilité d'interaction rhodopsine-transducine (voir Schéma 1.6), dû à l'effet d'encombrement stérique produit par l'arrestine (Kühn et Wilden. 1987). Comme il ne peut désormais plus y avoir activation/dissociation de la transducine, toute activation subséquente d'autres PDEs se trouve dès lors empêchée. Il s'agit d'un premier niveau de régulation négative de l'excitation visuelle. Ce n'est toutefois pas suffisant puisque, dans des conditions permettant à la fois la phosphorylation de la rhodopsine et sa liaison avec l'arrestine, les cinétiques d'inhibition de la transducine et de la PDE demeurent trop lentes (Chabre *et al.* 1987; Chabre et Deterre. 1989; Chabre et Deterre. 1990) et ne s'intègrent pas à la cinétique globale du processus de phototransduction qui dure 500-600 msec *in vivo*.

Selon le modèle généralement accepté, l'inactivation de la transducine et de la PDE passe nécessairement par l'hydrolyse du GTP lié à $T\alpha$ activée (Wheeler et Bitensky. 1977; Yee et Liebman. 1978; Arshavsky *et al.* 1989; Kroll *et al.* 1989; Bourne *et al.* 1990; Bourne *et al.* 1991; Angleson et Wensel. 1993; Antony *et al.* 1993; Arshavsky *et al.* 1994). L'activité GTPase intrinsèque de $T\alpha$ serait vraisemblablement stimulée lors de sa liaison avec $PDE\gamma$ (Arshavsky *et al.* 1989; Arshavsky *et al.* 1991; Arshavsky et Bownds. 1992; Pagès *et al.* 1992; Pagès *et al.* 1993; Yamazaki *et al.* 1993; Angleson et Wensel. 1994) et c'est l'hydrolyse du GTP en GDP qui provoquerait le détachement de $T\alpha$ et $PDE\gamma$, $T\alpha$ -GDP n'ayant pas d'affinité pour cette dernière. Considérant les deux hypothèses en vigueur pour expliquer l'activation de la PDE (voir page 16), $PDE\gamma$ se réassocierait avec $PDE\alpha\beta$ ou reprendrait sa conformation initiale, contribuant ainsi à inhiber l'activité catalytique de $PDE\alpha\beta$. Ayant une très forte affinité pour $T\beta\gamma$, $T\alpha$ -GDP s'y réassocie aussitôt, ce qui empêche l'activation continue de la PDE et l'hydrolyse

continue du GMPc¹⁰ (voir Schéma 1.6) (Chabre *et al.* 1987). Ceci constitue le deuxième niveau de régulation négative de la cascade de phototransduction.

La phosducine (ou MEKA), une phosphoprotéine soluble de 33 kDa (Lee *et al.* 1987; Lee *et al.* 1988; Lee *et al.* 1992; Abe *et al.* 1993; Groshan *et al.* 1993), pourrait aussi être impliquée dans l'inhibition de l'excitation visuelle. Bien que son rôle n'ait pas été clairement défini jusqu'à présent, certains travaux ont démontré qu'elle est déphosphorylée de façon lumière-dépendante (Lee *et al.* 1984) et qu'elle interagit avec T β (Lee *et al.* 1987; Lee *et al.* 1992). La phosducine pourrait donc moduler la quantité de T β disponible pour interagir avec T α et, ainsi, être impliquée dans la régulation de l'activité de la PDE.

Kawamura et Murakami (1991) ont pour leur part démontré la présence d'une protéine périphérique de 26 kDa dans les ROS, laquelle pourrait jouer un rôle important dans la régulation du mécanisme de phototransduction. Cette protéine s'appelle recoverine, p26 ou S-moduline. L'acylation du bout N-terminal de la recoverine serait vraisemblablement responsable de son interaction avec la membrane discale (Zozulya et Stryer. 1992; Dizhoor *et al.* 1993). Cette interaction serait même renforcée lorsque la concentration de Ca²⁺_i est élevée (300-400 nM), ce qui permettrait, selon un mécanisme encore inconnu, de sup-

¹⁰ Il y a 5 grandes familles de PDE qui sont classifiés en fonction de caractéristiques telles que leur spécificité de substrat, sensibilité à divers inhibiteurs et activateurs, séquence, etc.: 1) PDE Ca²⁺/calmoduline-sensible, 2) PDE stimulées par le GMPc, 3) PDE inhibées par le GMPc, 4) PDE inhibées par le RO 20-1724 et 5) PDE GMPc-spécifiques (Takemoto *et al.* 1993). La PDE rétinienne en est une de type GMPc-spécifique. Or Arshavsky *et al.* (1992) ont démontré que le complexe $\alpha\beta$ de cette PDE rétinienne possède, en plus des deux sites catalytiques, deux (ou possiblement quatre) sites non-catalytiques de liaison du GMPc. La présence de GMPc dans ces sites non-catalytiques soutiendrait l'activation de PDE $\alpha\beta$ alors que l'absence de GMPc contribuerait à son inactivation rapide (Arshavsky *et al.* 1992; Cote *et al.* 1994). La phosphorylation de PDE γ pourrait également jouer un rôle dans l'inactivation de PDE $\alpha\beta$ (Tsuboi *et al.* 1994a; Tsuboi *et al.* 1994b).

porter l'activation de la PDE (Kawamura. 1992). Suite à l'absorption de la lumière par la rhodopsine et à la baisse de concentration de Ca^{2+}_i qui en découle, il y aurait relâche (selon un mécanisme tout aussi inconnu) de la recoverine dans le cytosol et, par conséquent, réduction de l'activité de la PDE. Rien n'a cependant été irréfutablement établi quant au mode d'action et au rôle de la recoverine dans le processus d'inhibition de l'excitation visuelle (Gray-Keller *et al.* 1993). Une étude de Dizhoor *et al.* (1991) suggère en effet que la recoverine pourrait être impliquée dans le processus qui permet de pallier à la baisse de concentration du GMPc. La recoverine a trois sites potentiels de liaison du Ca^{2+} , lesquels seraient tous occupés dans les ROS adaptés à la noirceur. Or suite à l'absorption de photons et à la chute de concentration de Ca^{2+}_i inhérente, la recoverine relarguerait ses propres ions Ca^{2+} (Koch. 1992b). Une fois dépourvue de ses ions Ca^{2+} , elle serait phosphorylée¹¹ (Lambrecht et Koch. 1991), ce qui lui permettrait d'activer la guanylate cyclase (voir Schéma 1.6). La recoverine serait donc en mesure, selon un mécanisme encore bien mal défini, de détecter la diminution de Ca^{2+}_i et d'y répondre. D'autres études suggèrent quant à elles que la recoverine n'active pas la guanylate cyclase: elle inhiberait plutôt la rhodopsine kinase (Gorodovikova et Philipov. 1993; Kawamura. 1993; Gorodovikova *et al.* 1994). Ainsi, malgré les divergences relatives au rôle de la recoverine, les auteurs s'entendent tous pour dire que l'activité de la recoverine est Ca^{2+} -dépendante.

La calmoduline, une protéine de 20 kDa présente dans les ROS et qui lie également le Ca^{2+} (Kohnken *et al.* 1981; Nagao *et al.* 1987), pourrait répondre,

¹¹ Le mécanisme de phosphorylation de la recoverine n'est pas connu. Bien qu'ATP-dépendant, il ne semble pas lumière-dépendant. De plus, la rhodopsine kinase, une PKC ou l'autophosphorylation ne semble pas impliquée (Lambrecht et Koch. 1991).

elle aussi, aux variations de concentration de Ca^{2+}_i et être impliquée dans la régulation du mécanisme de phototransduction. Hsu et Molday (1993) ont en effet étudié la modulation des canaux ioniques GMPc-dépendants par la calmoduline. Celle-ci se dissocierait des canaux ioniques lorsque les concentrations de GMPc et Ca^{2+}_i chutent, causant une augmentation de l'affinité de ces mêmes canaux¹² pour le GMPc. Les canaux peuvent alors rouvrir et ce, même à une concentration de GMPc plus faible, aidant ainsi au rétablissement des concentrations de Ca^{2+}_i et Na^+_i à mesure que la synthèse du GMPc par la guanylate cyclase se déroule.

La guanylate cyclase est une protéine membranaire de 112 kDa dont la localisation dans les ROS est encore incertaine (Fleischman et Denisevich. 1979; Hayashi et Yamazaki. 1991; Molday *et al.* 1992; Margulis *et al.* 1993; Aparicio et Applebury. 1995). C'est l'enzyme responsable de pallier à la baisse de concentration de GMPc (voir Schéma 1.6). Elle est activée de façon Ca^{2+} -dépendante¹³ (Vuong *et al.* 1984; Koch et Stryer. 1988; Dizhoor *et al.* 1991; Koch *et al.* 1990; Koch. 1992b), possiblement via la recoverine (voir page 26), et synthétise du GMPc afin d'en rétablir la concentration à son taux initial d'environ 2-4 μM (Stryer. 1986). Hakki et Sitaramayya (1990) proposent quant à eux un modèle selon lequel la chute de Ca^{2+}_i active une pyrophosphatase. L'activation de la pyrophosphatase et la diminution inhérente de la concentration de pyrophosphate stimulerait, selon ce même modèle, la guanylate cyclase. L'activation Ca^{2+} -dépendante de la recoverine et de la pyrophosphatase n'est toutefois pas

¹² Il semble que l'affinité des canaux GMPc-dépendants pour le GMPc soit également modulée par une activité phosphatase endogène des ROS (Gordon *et al.* 1992).

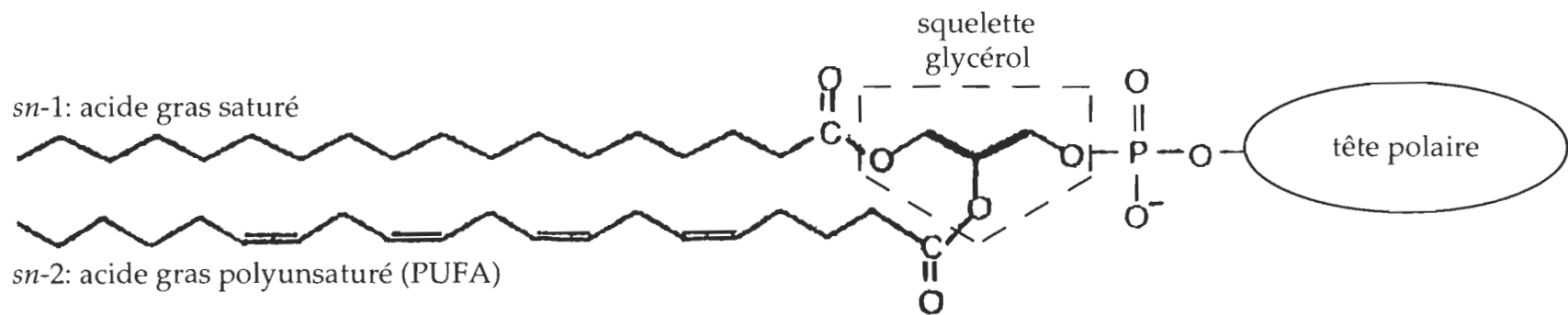
¹³ Bien que certains auteurs suggèrent l'inhibition de la guanylate cyclase par l'ATP (Sitaramaya *et al.* 1991; Margulis *et al.* 1993), d'autres suggèrent au contraire qu'elle est activée par l'ATP (Gorczyca *et al.* 1994).

mutuellement exclusive et, quoiqu'il en soit, l'activation de la guanylate cyclase provoque l'augmentation du taux de GMPc à sa valeur initiale, la réouverture des canaux ioniques GPMc-dépendants et l'afflux d'ions Na^+ et Ca^{2+} à l'intérieur des ROS. Ceci permet de rétablir à la fois les concentrations de Na^+_i , Ca^{2+}_i et la dépolarisation initiale du bâtonnet. La concentration de K^+_i est quant à elle rétablie par efflux d'ions K^+ hors du bâtonnet (voir Tableau 1.3).

Ainsi donc, de nombreuses protéines interagissent et collaborent entre elles pour assurer le bon déroulement du processus de phototransduction. Plusieurs des étapes de ce processus sont bien caractérisées, mais beaucoup restent encore à élucider. D'ailleurs, la contribution du métabolisme des phospholipides audit processus de phototransduction figure très certainement parmi les plus mal définies. À eux seuls, les phospholipides comptent pourtant pour près de 50% du poids sec des ROS; ils représentent plus de 85% des lipides totaux des ROS et ils ont une composition en acides gras tout à fait particulière (Miljanich. 1978; Olive. 1980; Bazan. 1982; Fliesler et Anderson. 1983). Les phospholipides des ROS, et plus spécifiquement le contrôle de leur métabolisme par diverses enzymes, pourraient donc jouer un rôle très important (voir la section 1.8) dans la régulation de la cascade de phototransduction.

1.6 Caractéristiques des phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile et d'un squelette glycérol sur lequel sont acylés deux acides gras hydrophobes (voir Schéma 1.7). Ces acides gras peuvent être saturés ou insaturés à divers degrés. On les retrouve en positions *sn*-1 et *sn*-2 du squelette glycérol (voir Schéma 1.7), lesquelles sont définies d'après les pro-



tête polaire des principaux phospholipides des ROS:

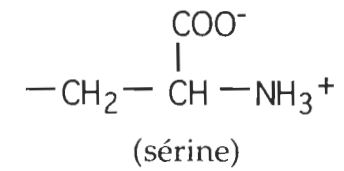
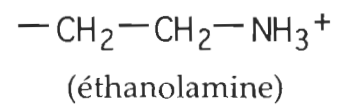
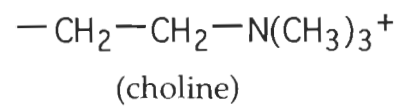


Schéma 1.7: Structure d'un phospholipide

jections de Fisher (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. 1978; Hauser *et al.* 1981). Règle générale, les acides gras saturés sont acylés en position *sn*-1 alors que les acides gras mono- et polyinsaturés sont acylés en position *sn*-2 (Wiegand et Anderson. 1983b; Birkle et Bazan. 1986; Marsh. 1990a; Voet et Voet. 1995). La tête polaire est également fixée au squelette glycérol, en position *sn*-3, via un groupement phosphate. C'est la nature de la tête polaire, soit éthanolamine, choline, sérine, inositol ou hydroxyl, qui détermine le type de phospholipide, de même que certaines de leurs caractéristiques (voir Tableau 1.4) (Cullis *et al.* 1983; Cullis *et al.* 1985; Dufourq. 1985; McMurchie. 1988; Marsh. 1990a; Tocanne et Teissié. 1990). Ces différents phospholipides naturels sont respectivement appelés phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI) et acide phosphatidique (PA). À pH 7 (pH physiologique), PE et PC ont une charge nette neutre (voir Tableau 1.4) et sont dits zwitterioniques. Au contraire, PS, PI et PA ont à pH 7 une charge nette négative (voir Tableau 1.4) et représentent donc des phospholipides anioniques (Lehninger. 1982; Tocanne et Teissié. 1990). Cette différence de charge est très importante parce que de nombreuses interactions protéines-lipides dépendent largement de la charge de ces derniers (Cullis *et al.* 1983; Cullis *et al.* 1985; McMurchie. 1988; Marsh. 1990b; Mouritsen et Bloom. 1993).

La charge ne constitue pas le seul facteur pouvant affecter les interactions protéines-lipides; l'organisation-même des phospholipides en milieu aqueux est déterminante (voir Schéma 1.8). Ainsi, en solution aqueuse les phospholipides purifiés ont tendance à former des phases lamellaires "L" (vésicules uni- et multilamellaires) et ce, pour un grand intervalle de températures. Une ex-

Tableau 1.4: Caractéristiques des phospholipides

Phospholipides	Abréviation	Charge à pH 7 ^a	T _t (°C) ^b	Phase (37°C; pH 7)
Acide phosphatidique	PA	-2	66 (DPPA)	L
Phosphatidylcholine	PC	neutre	41 (DPPC)	L
			-20 (DOPC)	L
			-13 (SAPC) ^c	L
Phosphatidyléthanolamine	PE	neutre	63 (DPPE)	L (T _{HII} = 120°C)
			-16 (DOPE)	H _{II} (T _{HII} = 10°C)
			20 (POPE)	L (T _{HII} = 71°C)
Phosphatidylinositol	PI	-1	n.d. ^d	n.d.
Phosphatidylsérine	PS	-1	54 (DPPS)	L
			-11 (DOPS)	n.d.
Phosphatidylméthanol	PM	-1	n.d. ^e	L

^a Les pKa₁ et pKa₂ de l'acide phosphorique sont de 1,95 et 6,64, alors que le pKa de l'amine des PE et PS est de 9,5 et 8,97, respectivement. Le pKa du carboxyl du PS est de 3,5. Les groupements choline et méthanol sont non-ionisables (Cullis *et al.* 1985; Marsh. 1990a).

^b T_t = Température de transition entre les phases gel et liquide cristallin, phases pour lesquelles les acides gras sont ordonnés et désordonnés, respectivement. Ces valeurs ont toutes été obtenues à pH 7, sauf pour le DPPA (pH 6) (Marsh. 1990a).

^c La valeur de T_t des PAPC et PAPE, utilisés dans nos expériences, ne semble pas disponible dans la littérature. Aussi, les valeurs de T_t de SAPC et POPE sont fournies pour donner un aperçu de la variation de T_t dans les phospholipides mixtes.

^d n.d. = non-disponible

^e Dû à une similarité de structure, la T_t du PM devrait ressembler à celle du PG (phosphatidylglycérol); i.e. 24°C pour le DMPM et DMPG (Marsh. 1990a).

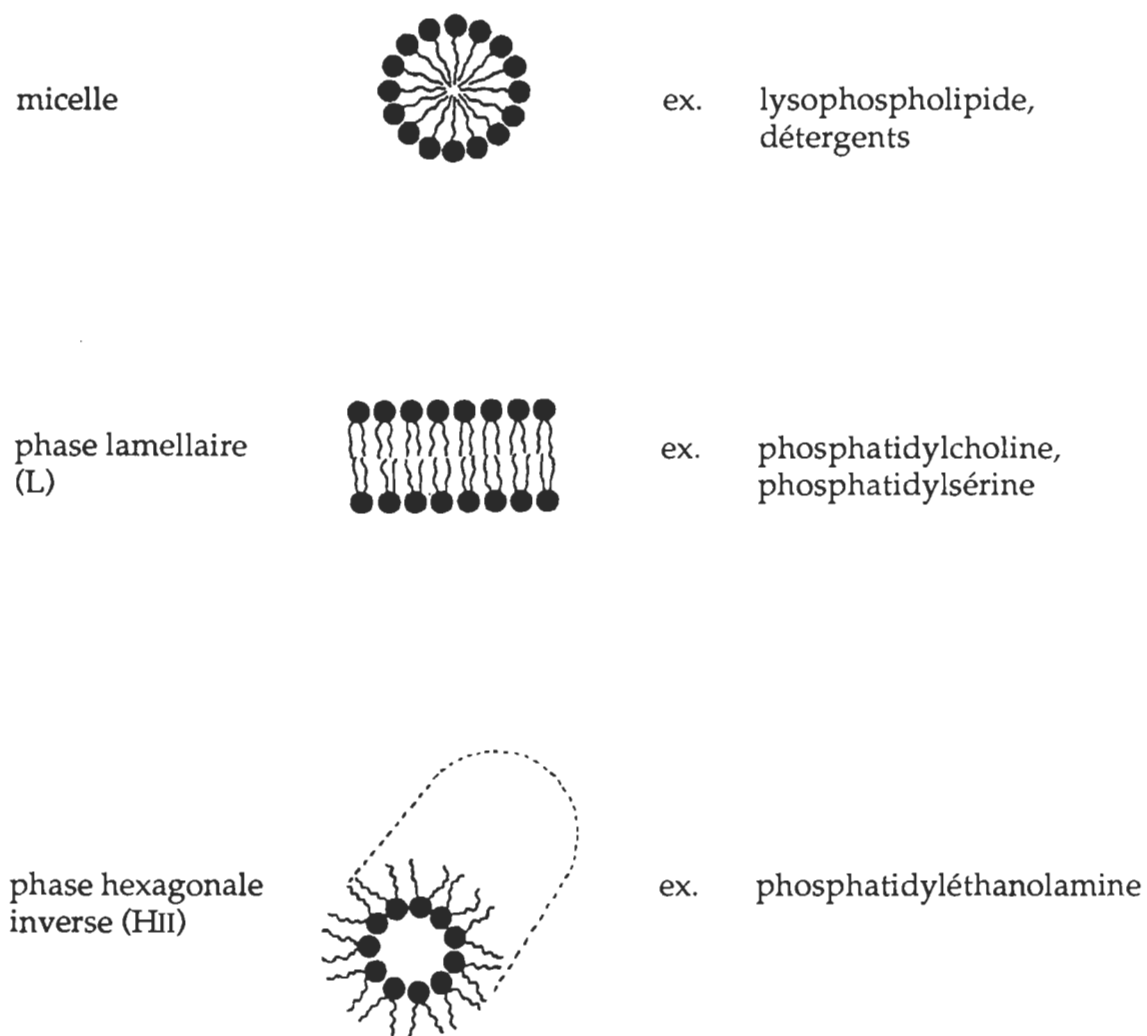


Schéma 1.8: Organisation des phospholipides en milieu aqueux

ception à cette règle, le PE qui a plutôt tendance à former des phases hexagonales inverses "H_{II}" (Cullis *et al.* 1983; Dekker *et al.* 1983; Cullis *et al.* 1985; Caffrey. 1985; Dufourq. 1985; Marsh. 1990b). Il faut toutefois noter que cette propension naturelle du PE à former des phases hexagonales inverses dépend du type et de la longueur des acides gras présents en *sn*-1 et *sn*-2. Les PE disaturés (constitués de deux acides gras saturés) vont former des phases lamellaires alors que les PE di-insaturés (constitués de deux acides gras mono- ou polyinsaturés) vont former des phases hexagonales inverses (Dekker *et al.* 1983; Marsh. 1990b). Les PE mixtes (constitués d'un acide gras saturé et d'un autre insaturé) formeront quant à eux des phases L et/ou H_{II}, dépendamment du degré d'insaturation, de la longueur de l'acide gras saturé, de la température et de la présence ou non d'une matrice lipidique (Cullis *et al.* 1985; Marsh. 1990b).

1.7 Composition phospholipidique des ROS

Tel que mentionné auparavant, les phospholipides représentent environ 50% du poids sec des ROS (Miljanich. 1978). Ils représentent de 80-90 mol% des lipides totaux (Miljanich. 1978; Bazan et Reddy. 1985; Fliesler et Anderson. 1983; Wiegand et Anderson. 1983b). Dépendamment des espèces, il y a de 65 à 75 moles de phospholipides pour une mole de rhodopsine (Miljanich. 1978). Parmi eux, les PE, PC et PS sont majoritaires avec 30-35, 40-45 et 10-15 mol%, respectivement. Le PI est pour sa part minoritaire avec un peu moins de 2 mol% (Miljanich. 1978; Miljanich et Dratz. 1982; Fliesler et Anderson. 1983; Wang *et al.* 1992). Parmi les autres constituants lipidiques des ROS, on note surtout le cholestérol (8 mol%) et les acides gras libres (6 mol%¹⁴) (Miljanich. 1978).

¹⁴ Cette forte proportion constitue un autre indice de la particularité des ROS car, en général, les acides gras libres sont à toute fin pratique absents des membranes cellulaires (Léger. 1993).

Bien que la proportion de phospholipides dans la rétine soit comparable à ce qu'on retrouve dans des tissus tels que le foie, le coeur, les poumons et les reins, elle est sans contredit la plus forte de tous les tissus oculaires (Fliesler et Anderson. 1983). Or les ROS sont non seulement très riches en phospholipides, ils sont aussi très enrichis en acides gras polyinsaturés (PUFA) (Wiegand et Anderson. 1983b; Birkle et Bazan. 1986; Anderson *et al.* 1992). En fait, les phospholipides des ROS sont acylés à plus de 50% avec des PUFA (voir Tableau 1.5) (Fliesler et Anderson. 1983; Salesse *et al.* 1984; Lamb et Pugh. 1992a et b). Selon Anderson et Andrews (1982), c'est le plus haut taux de PUFA répertorié pour des membranes biologiques. Ceci est d'autant plus intéressant que l'acide docosahexaénoïque (22:6 ω 3 ou DHA), comportant six doubles liaisons sur une chaîne de 22 carbones, représente à lui seul plus de 60% de ces PUFA¹⁵ (Fliesler et Anderson. 1983; Salesse *et al.* 1984; Bazan et Reddy. 1985; Birkle et Bazan. 1986). L'acide arachidonique (20:4 ω 6 ou AA), un autre PUFA très important du point de vue métabolique et surtout connu comme précurseur des métabolites inflammatoires (eicosanoïdes), est pour sa part présent en bien moindre proportion, avec seulement 5 mol% (Fliesler et Anderson. 1983; Bazan et Reddy. 1985).

Contrairement à ce qui est généralement observé dans les cellules¹⁶, 30% des phospholipides des ROS sont di-insaturés, comportant un PUFA en position *sn*-1 et *sn*-2, alors que 60% sont mixtes, ayant un PUFA en position *sn*-2 et un acide gras saturé en position *sn*-1. Enfin, 10% des phospholipides des ROS sont disaturés, les acides palmitique (16:0) et stéarique (18:0) acylés en positions

¹⁵ De toutes les cellules du corps humain, les photorécepteurs sont les plus enrichies en DHA (Bazan. 1989; Connor *et al.* 1992).

¹⁶ Pour la majorité des différents types cellulaires, les phospholipides membranaires sont principalement des espèces mixtes, ayant un acide gras saturé en position *sn*-1 et un acide gras mono- ou polyinsaturé en position *sn*-2.

Tableau 1.5: Composition en acides gras des phospholipides des ROS

<u>ACIDES GRAS</u>	<u>Symbole numérique</u>	<u>POURCENTAGE</u>
Palmitique	16:0	13,0
Stéarique	18:0	19,0
Oléique	18:1 ω 9	3,1
Arachidonique	20:4 ω 6	5,1
Docosahexaénoïque	22:6 ω 3	45,0
PUFA (total)		63,7

sn-1 et *sn-2*, respectivement, étant majoritaires. (Miljanich. 1978; Fliesler et Anderson. 1983; Bazan et Reddy. 1985).

Il est à noter que pour les phospholipides di-insaturés, le DHA est préférentiellement acylé en position *sn-2* alors que les autres PUFA sont presque exclusivement acylés en *sn-1* (Fliesler et Anderson. 1983). Ceci constitue une caractéristique plus qu'intéressante dans la mesure où, nous le verrons sous peu, l'objet de la présente étude est de caractériser l'activité phospholipase A2 de trois fractions subrétiniennes afin d'élucider (ou du moins mieux définir) son rôle dans la rétine. Le rôle des PUFA et leur distribution particulière dans les ROS n'a pas encore été clairement défini et ce, bien que plusieurs hypothèses aient été soulevées. Ainsi, plusieurs études suggèrent que le DHA procure un environnement membranaire suffisamment fluide pour faciliter la diffusion latérale des protéines des ROS dans la membrane discale (voir Schéma 1.4 et Tableau 1.6), favoriser les interactions protéines-protéines et le déroulement conséquent du processus de phototransduction en 500-600 msec (Fliesler et Anderson. 1983; Stubbs et Smith. 1984; Dratz et Deese. 1986; Salem *et al.* 1986; Bazan. 1989; Mitchell *et al.* 1992; Treen *et al.* 1992). Alternativement, le DHA pourrait interagir directement avec certaines protéines des ROS (Salem *et al.* 1986), ou moduler la flexibilité des membranes (Dratz et Deese. 1986). Dans ce dernier cas, un changement de conformation du DHA pourrait entraîner une variation d'épaisseur de la membrane qui serait suffisante pour permettre les changements conformationnels des protéines. Il est également possible que le DHA joue un rôle plus spécifique en tant que précurseur des docosanoïdes, des métabolites oxygénés analogues aux eicosanoïdes, mais qui pourraient avoir un rôle différent de ces derniers (Bazan *et al.* 1986; Salem *et al.* 1986; Bazan. 1989).

Tableau 1.6: Coefficient de diffusion latérale de certains constituants des ROS^a

	Coefficient de diffusion ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)		Poids moléculaire (Da)
	22°C	37°C	
Rhodopsine	0,7	1,5	40 000
Tansducine	1,2	1,8	84 000
Transducine α	1,5	2,2	39 000
PDE	0,8	1,2	194 000
GMPc ^b	7,0	n.d.	345
Récepteur à acétylcholine ^c	<0,0001		250 000

^a Ces données proviennent des articles de Lamb et Pugh (1992), Pugh et Lamb (1993) et Shechter (1993).

^b Il s'agit du coefficient de diffusion longitudinale, lequel implique une liberté de mouvement dans les axes x, y et z. Au contraire, le coefficient de diffusion latérale restreint le mouvement aux axes x et y.

^c Cette protéine n'est pas présente dans les ROS; son coefficient de diffusion latérale est fourni pour permettre d'apprécier les résultats relatifs aux protéines des ROS.

1.8 Susceptibilité des phospholipides des ROS à la peroxydation

À cause de leur très forte proportion d'acides gras insaturés et du degré d'insaturation particulièrement élevé du DHA qui, comme nous l'avons vu, représente le PUFA le plus abondant dans les ROS, les phospholipides des ROS sont très sensibles à la peroxydation (Farnsworth et Dratz. 1976; Fliesler et Anderson. 1983; Birkle et Bazan. 1986; Stephens *et al.* 1988; Dratz *et al.* 1989; Van Kuijk *et al.* 1990; De La Paz et Anderson. 1992). Par ailleurs, la rétine étant hautement vascularisée et oxygénée, de nombreux dérivés d'oxygène hyper-réactifs peuvent y être générés (Berman. 1991; Wu *et al.* 1992; Puertas *et al.* 1993; Taylor *et al.* 1993; Varma et Richards. 1988). Des métabolites tels que O_2^- et $\bullet OH$ sont en mesure de réagir fortement et promptement avec toute molécule qui, comme le DHA, comporte plusieurs doubles liaisons. Les réactions de peroxydation des lipides n'étant pas médiées par une enzyme, les produits résultants sont très différents des docosanoïdes (Bazan. 1989). Par conséquent, l'impact potentiel de telles réactions sur les propriétés des phospholipides et, ultimement, sur l'intégrité structurelle et fonctionnelle des ROS est considérable.

Les photorécepteurs disposent cependant de divers mécanismes intracellulaires visant à contrer, ou minimiser, l'impact de ces réactions. Superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxydase (GSH I et GSH II), α -tocophérol (vitamine E) et acide ascorbique (vitamine C), tous interviennent à divers niveaux pour empêcher la peroxydation des phospholipides (Dratz *et al.* 1989; Miller. 1987; Birkle et Bazan. 1986; Berman. 1991; Remé *et al.* 1996). Les PLA2 pourraient aussi jouer un rôle très important dans l'élimination des phospholipides peroxydés (Kagan *et al.* 1978; Sevanian *et al.* 1983; Van Kuijk *et al.* 1985; Sevanian. 1987; Van Kuijk *et al.* 1987; Sevanian. 1988; Sevanian *et al.* 1988;

McLean *et al.* 1993; Van Den Berg *et al.* 1993), d'où l'intérêt de diverses équipes, incluant la nôtre, à identifier et caractériser une activité PLA2 dans les ROS.

1.9 Phospholipases A2 (PLA2)

Les PLA2 sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'acide gras acylé en position *sn*-2 du squelette glycérol des phospholipides (voir les schémas 1.7 et 1.9) (Van Den Bosch. 1980; Verheij *et al.* 1981; Slotbloom *et al.* 1982; Van Den Bosch. 1982; Zahler *et al.* 1984). Il résulte donc de cette réaction la formation d'un lysophospholipide et d'un acide gras libre qui, s'il est marqué d'un atome radioactif (^3H ou ^{14}C) ou d'un groupement fluorescent (ex. pyrène), peut être quantifié par radiométrie ou fluorimétrie, respectivement. Ceci permet alors de suivre la progression de l'activité hydrolytique des PLA2.

Les PLA2 forment une famille d'enzymes dont notre connaissance est en constante expansion, et au sein de laquelle on retrouve plusieurs types d'enzymes. Elles sont classifiées en trois groupes principaux, en fonction de leur séquence en acides aminés et de leur réponse à différents traitements dénaturants (voir les tableaux 1.7-1.10) (Glaser *et al.* 1993; Mayer et Marshall. 1993; Dennis. 1994; Ackermann et Dennis. 1995; Gross. 1995; Clark *et al.* 1995; Murakami *et al.* 1995). Il y a les PLA2 sécrétées¹⁷ (sPLA2), qui sont Ca^{2+} -dépendantes et dont le poids moléculaire (P.M.) varie entre 12 et 18 kDa (voir Tableau 1.7), la PLA2 cytosolique (cPLA2) (voir Tableau 1.8), une protéine type de 85 kDa qui est également Ca^{2+} -dépendante, et les PLA2 Ca^{2+} -indépendantes (iPLA2), des protéines intracellulaires de 40-110 kDa dont l'activation est, comme le nom l'indi-

¹⁷ Leur nom vient de ce qu'elles semblaient initialement toutes extracellulaires. Or il est maintenant connu que plusieurs sPLA2 ne sont pas sécrétées (Mayer et Marshall. 1993; Dennis. 1994).

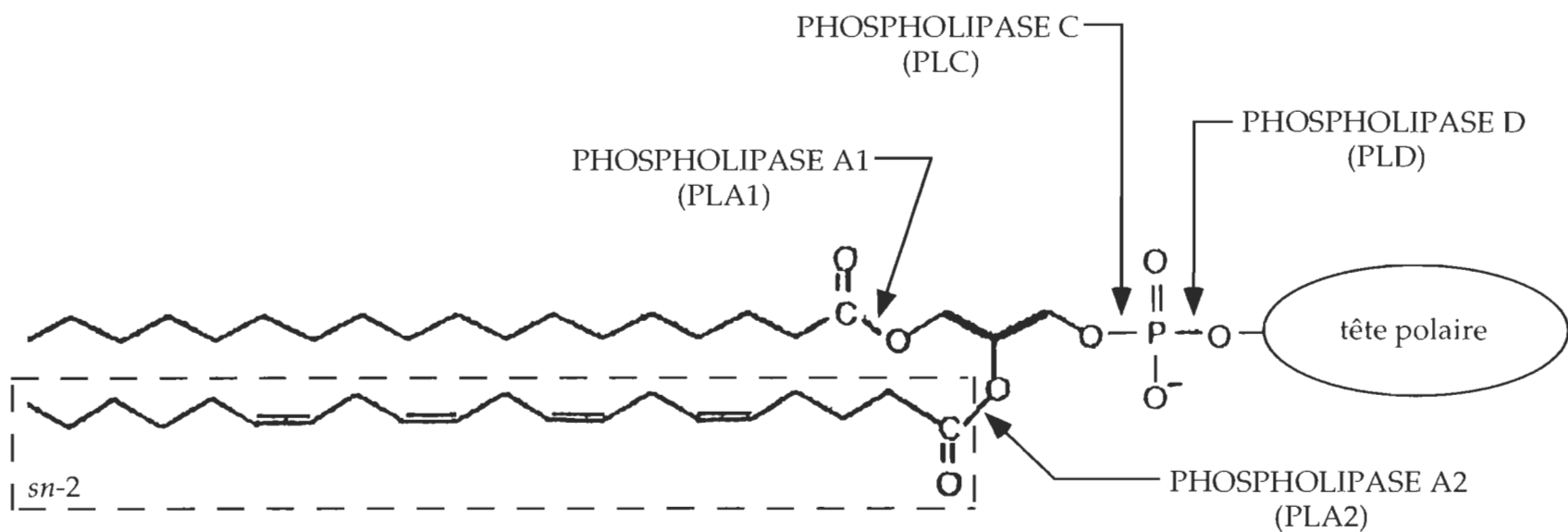


Schéma 1.9: Hydrolyse des phospholipides par les PLA2 et autres phospholipases^a

^a Phospholipase B (PLB) = enzyme possédant à la fois les activités de type PLA2 et PLA1; Lysophospholipase = enzyme exerçant une activité de type PLA1 sur les phospholipides dont l'acide gras *sn-2* est manquant.

Tableau 1.7: Caractéristiques des sPLA2

Sous-groupes	PLA2 SÉCRÉTÉES (sPLA2)			
	I	II ^a	III	IV(?)
Sources types	pancréas (zymogène) venin de cobras	liquide synovial ^b venin de vipères	venim d'abeilles	coeur poumons
P.M. (kDa)	12-14	12-14	16-18 (glycosylée)	12-14
Ponts disulfures	7 (14 Cys)	7 (14 Cys)	5 (10 Cys)	6 (12 Cys)
pH optimum	4-5/pancréas; 7-10/venin	7-10	7-10	7-10
Spécificité ^c	PE ≈ PC	PE, PS >> PC	PE ≈ PC	PE ≈ PC
Modulation ^d	Ca ²⁺ (mM)	Ca ²⁺ (mM)	Ca ²⁺ (mM)	Ca ²⁺ (mM)
Acide aminé catalytique	His ⁴⁸	His ⁴⁸	His ⁴⁸	His ⁴⁸
Inhibiteur	pBPB	pBPB	pBPB	pBPB
Autre activité	aucune	aucune	aucune	aucune

^a Contrairement aux I-sPLA2 et III-sPLA2 qui sont toutes solubles et sécrétées, certaines II-sPLA2 sont associées à la membrane (via des groupements héparans sulfates) et ne sont pas sécrétées (Murakami *et al.* 1995). Les II-sPLA2 sont également les seules à interagir avec la BPI ("bactericidal permeability increasing protein").

^b Leur distribution suggère un rôle lors d'inflammations: rate, thymus, moëlle osseuse, neutrophiles, macrophages, plaquettes et sérum.

^c Aucune des sPLA2 n'est spécifique pour l'acide arachidonique. Elles préfèrent les phospholipides dont l'acide gras *sn*-1 est acylé via un lien ester (par rapport au lien vinyl éther présent dans les plasmalogènes).

^d Le Ca²⁺ est essentiel pour la fonction catalytique des sPLA2 et ne peut être remplacé par d'autres sels.

Tableau 1.8: Caractéristiques de la cPLA2

PLA2 CYTOSOLIQUE (cPLA2)	
Sources types	reins, coeur, foie, poumons, rate, testicules, cerveau, plaquettes, macrophages, monocytes, neutrophiles ^a
P.M. (kDa)	85 ^b
Ponts disulfures	0 (9 Cys)
pH optimum	7-10
Spécificité ^c	PUFA tel l'acide arachidonique et non le DHA
Modulation ^d	Ca ²⁺ (µM); ATP (phosphorylation); protéine-G
Acide aminé catalytique	Ser ²²⁸
Inhibiteur	AACOCF ₃ (arachidonoyl trifluorylméthyl cétone)
Autres activités	lysophospholipase; PLA1; transacylase

^a La cPLA2 est notamment activée par les cytokines proinflammatoires et les agents mitogènes.

^b Le P.M. de la cPLA2 est de 100-110 kDa sur SDS-PAGE, mais la séquence d'acides aminés prédit que le P.M. réel est de 85 kDa (Mayer et Marshall. 1993; Dennis. 1994; Clark *et al.* 1995).

^c À cause de la position des doubles liens du DHA, il n'est pas un bon substrat pour la cPLA2 qui n'est d'ailleurs pas spécifique pour le type de tête polaire ou le type de lien (ester ou vinyl éther) acylant l'acide gras *sn*-1 au squelette glycérol (Clark *et al.* 1995; Mayer et Marshall. 1995).

^d La Ser⁵⁰⁵ est phosphorylée par une MAPK ("mitogen-activated protein kinase"). Le Ca²⁺, lui, est requis pour la translocation de l'enzyme soluble vers la membrane et il peut être remplacé (*in vitro*) par d'autres sels. L'activation par une protéine-G doit être confirmée et pourrait être médiée par la MAPK (revu par Clark *et al.* 1995).

Tableau 1.9: Caractéristiques des iPLA2

PLA2 Ca ²⁺ -INDÉPENDANTES (iPLA2)			
Sous-groupes	I	II	III ^a
Sources types	lysosomes	membrane à bordure en brosse (intestin grêle)	myocarde, macrophages cerveau
Localisation	cytosol	membrane	cytosol ou membrane
P.M. (kDa)	30-32 (glycosylée)	120-140 (glycosylée)	40-110 ^b
Ponts disulfures ^c	0 (Cys ?)	0 (Cys ?)	0 (Cys ?)
pH optimum	4,5	8,5	6-9
Spécificité ^d	PE ≈ PC	PE ≈ PC	plasménylcholine; PA; PC; PI
Modulation		sels biliaires	ATP (cofacteur)
Inhibiteur ^e	DTNB	DTNB	BEL; AACOCF ₃
Autres activités	n.d.	lysophospholipase; acylglycérol lipase	lysophospholipase

^a Les III-iPLA2 sont les seules à avoir un rôle autre que digestif. Ce sous-groupe est très diversifié et peut être redivisé en 4 sous-groupes: IIIA (myocarde), IIIB (macrophages), IIIC (cerveau) et IIID (autres) (Ackermann et Dennis. 1995).

^b La IIIA-iPLA2 (40 kDa) et la IIIB-iPLA2 (80 kDa) forment respectivement des hétéro- et homocomplexes d'environ 400 kDa.

^c La séquence d'acides aminés des iPLA2 n'est pas connue; on ne sait donc rien du nombre de cystéines et de l'acide aminé catalytique.

^d Les iPLA2 sont spécifiques pour l'un ou l'autre de ces substrats. Seules les III-iPLA2 sont spécifiques pour l'acide arachidonique et seule la IIIA-iPLA2 est spécifique pour le plasménylcholine (lien *sn*-1 de type vinyl éther) (Ackermann et Dennis. 1995; Gross. 1995).

^e DTNB, acide dithiobis-(2-nitrobenzoïque); BEL, bromoénol lactone; AACOCF₃, arachidonoyl trifluorure de cétone.

Tableau 1.10: Paramètres utilisés pour la caractérisation et la classification opérationnelle des PLA2

	PLA2 sécrétées	PLA2 cytosolique	PLA2 Ca ²⁺ -indépendantes
H ₂ SO ₄	insensibles	dénaturée	n.d. ^a
EGTA	inhibées	inhibée	insensibles
DTT	dénaturées	insensible	insensibles
pBPB	inhibées	insensible	insensibles
60°C - 5 min	insensibles	dénaturée	dénaturées

^a non-disponible. Vu que les iPLA2 sont des enzymes intracellulaires, comme la cPLA2, et que l'extraction au H₂SO₄ ne semble pas utilisée comme première étape de purification, on peut toutefois penser que les iPLA2 sont également dénaturées par ce traitement.

que, indépendante du Ca^{2+} (voir Tableau 1.9). Contrairement à la cPLA2 qui constitue un groupe non-subdivisé et ne contient qu'un seul type d'enzyme, les sPLA2 et les iPLA2 sont actuellement réparties en trois sous-groupes (I, II et III) (voir les tableaux 1.7-1.9). Or comme le suggèrent des études récentes sur la caractérisation de nouvelles PLA2 (Chen *et al.* 1994; Buhl *et al.* 1995; Ross *et al.* 1995; Thompson et Clark. 1995; Jacob *et al.* 1997, 1998; Portilla et Dai. 1996; Tew *et al.* 1996; Cupillard *et al.* 1997; Soubeyrand *et al.* 1997; Tang *et al.* 1997), de nouveaux groupes et/ou sous-groupes pourraient éventuellement s'ajouter à ceux déjà existants.

Il semble de plus en plus évident que les PLA2 sont présentes dans tous les types cellulaires et que ceux-ci peuvent exprimer plus d'un type de PLA2 (voir les tableaux 1.7-1.9) (Rose *et al.* 1985; Van Den Bosch. 1982; Rodorf *et al.* 1991; Murakami *et al.* 1992; Petit *et al.* 1992; Mayer et Marshall. 1993; Dennis. 1994; Marshall *et al.* 1997). Par ailleurs, l'accumulation d'informations sur leur structure et leurs propriétés laisse entrevoir que leur rôle pourrait être des plus diversifiés. Non seulement elles pourraient participer à la biosynthèse des eicosanoïdes lors de réactions inflammatoires, mais elles pourraient aussi être impliquées dans la régulation du métabolisme des phospholipides, les processus exocytotiques, la réaction acrosomale des spermatozoïdes, l'expression de certains gènes et la transduction des signaux intracellulaires (Irvine. 1982; Kulkarni. 1990; Wood. 1990; Lavoie *et al.* 1991; Pruzanski et Vadas. 1991; Cockcroft. 1992; Mukherjee *et al.* 1992; Slomiany *et al.* 1992; Jacobson et Schrier. 1993; Jurivich *et al.* 1994; Marcus et Hajjar. 1993; Ma-yorga *et al.* 1993; Nevalainen. 1993; Chen et Murakami. 1995; Déglon *et al.* 1995; Yu. 1995; Galkina *et al.* 1996; Tonia-to *et al.* 1996).

1.10 Produits d'hydrolyse des phospholipases A2

Tel que décrit antérieurement (voir page 39), tous les types de PLA2 génèrent deux produits d'hydrolyse, soit un acide gras libre et un lysophospholipide (voir Schéma 1.9). Cependant, parce qu'elles possèdent également une activité lysophospholipase (revu par Clark *et al.* 1995), la cPLA2 et certaines iPLA2 peuvent générer un acide gras supplémentaire, de même qu'un groupement de type *sn*-glycéro-3-phosphoR (R représentant la choline, l'éthanolamine ou la sérine) (voir les tableaux 1.8 et 1.9, ainsi que les schémas 1.7 et 1.9). On s'en doute bien, le rôle cellulaire de chacun de ces produits va être différent. Plusieurs auteurs ont ainsi démontré que les acides gras libres peuvent moduler: 1) l'activité de canaux ioniques (revu par Ordway *et al.* 1991), 2) l'activité de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire (ex. tyrosine kinase et protéine kinase C) (revu par Sumida *et al.* 1993), 3) la liaison et l'action de certaines hormones (revu par Nunez. 1993), 4) la phosphorylation oxydative mitochondriale (Rottenberg et Hashimoto. 1986), 5) la fusion membranaire observée au moment de l'endocytose ou de l'exocytose cellulaire (Lavoie *et al.* 1991; Sloomiany *et al.* 1992; Mayorga *et al.* 1993; Morgan *et al.* 1993; Blackwood *et al.* 1996) et 6) l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (Armstrong *et al.* 1991; Tebbey et Buttke. 1992) ou les réactions inflammatoires (Jacobson et Schrier. 1993; Chepenik *et al.* 1994; Jurivich *et al.* 1994).

Le bon fonctionnement de chacun des processus sus-cités résulte donc de leur régulation adéquate par les acides gras. Or l'intérêt particulier de ces résultats réside dans le fait qu'ils ne sont observables qu'en présence de PUFA, les effets les plus importants étant souvent observés en présence d'acide arachido-

nique. Ainsi, on accepte maintenant d'emblée que l'acide arachidonique puisse agir à titre de messager intracellulaire, en plus de servir de précurseur à la formation de métabolites inflammatoires (voir les tableaux 1.11 et 1.12) (Zurier. 1993). Il y a par ailleurs de plus en plus de résultats expérimentaux suggérant un lien entre l'altération du métabolisme de l'acide arachidonique et la carcinogénèse, de même que divers problèmes reliés au vieillissement (Meskini *et al.* 1993; Guthridge *et al.* 1995; Praml *et al.* 1995; Yoshimi *et al.* 1995). Plus encore, de nombreux articles font état de la régulation de la transmission synaptique par l'acide arachidonique (Herrero *et al.* 1992; Nicholls. 1992; Catania *et al.* 1993; Durgerian *et al.* 1993; Villaroel. 1993; Bramham *et al.* 1994; Miyachi *et al.* 1994; Farooqui et Horrocks. 1994; Volterra *et al.* 1994), ce qui est particulièrement intéressant lorsqu'on tient compte de ce que la rétine est elle-même un tissu nerveux (voir la section 1.2).

En ce qui concerne les lysophospholipides, il semble qu'ils pourraient participer au processus de fusion membranaire, au même titre que les acides gras. Ils ont en effet, tout comme ces derniers, des propriétés fusogéniques (Morin *et al.* 1992; Blackwood *et al.* 1996). Les résultats à ce sujet sont toutefois plus mitigés; Morin *et al.* (1992) et Blackwood *et al.* (1996) ayant respectivement observé un effet inhibiteur et stimulateur des lysophospholipides sur la fusion membranaire. D'autres études ont quant à elles montré une modulation directe de l'activité de certains canaux ioniques par les lysophospholipides (Rustenbeck et Lenzen. 1992; Lundbaek et Andersen. 1994; Lloret et Moreno. 1995), de même qu'une modulation indirecte de la signalisation intracellulaire, via la stimulation de la phosphorylation de diverses protéines (Scherer *et al.* 1993). L'un des lysophospholipides, l'acide lysophosphatidique, est notamment con-

Tableau 1.11: Exemples de processus physiologiques et pathologiques auxquels une augmentation d'activité PLA2 a été associée^{a, b}

PROCESSUS	
PHYSIOLOGIQUES	PATHOLOGIQUES
digestion des lipides	arthrite rhumatoïde
métabolisme des surfactants pulmonaires	Psoriasis
métabolisme des membranes cellulaires	inflammation et oédème
coagulation sanguine	hypertension et hyperthermie
réaction acrosomale des spermatozoïdes	pancréatite et péritonite
métabolisme des lipoprotéines	uvéïte autoimmune
libération de l'insuline	choc septique
exocytose/endocytose	cancer
prolifération/différentiation cellulaire	asthme
signalisation intracellulaire	ischémie
ligand pour des récepteurs	effet myotoxique des venins
modulation de canaux ioniques	effet neurotoxique des venins
activation de kinases	

^a La plupart des études ayant démontré ces effets portaient sur les sPLA2 qui sont, et de loin, les PLA2 les mieux caractérisées, parce qu'étudiées depuis plus longtemps.

^b Ces informations sont tirées des revues publiées par Pruzanski et Vadas (1991), Mukherjee *et al.* (1992) et Glaser *et al.* (1993).

Tableau 1.12: Métabolites secondaires des produits d'hydrolyse des PLA2^a

Précurseur	Enzyme ^b	Métabolite ^c	Concentration élevée lors de:
Acide arachidonique	COX	PG	contraction vasculaire (F ₂ α); lutéolyse (F ₂ α) mobilité gastrointestinale (E ₂ , F ₂ α); sensation de douleur (E ₂ , I ₂);
		TX	contraction bronchiale et vasculaire (A ₂); thrombose (A ₂);
	LOX	LT	prolifération des lymphocytes (B ₄); chimiotaxisme des leukocytes (B ₄); sécrétion d'hormone pituitaire (C ₄);
lysophospholipide	AT	LX	érythroleucémie (A ₄); changements hémodynamiques;
		PAF	sécrétion de neurotransmetteurs; ischémie et convulsions

^a Ces informations proviennent des revues suivantes: Smith. 1989; Bazan *et al.* 1991; Sehran. 1994.

^b AT, acétyl transférase; COX, cyclooxygénase; LOX, lipoxygénase.

^c Les prostaglandines (PG) sont répertoriées en sous-types (D, E, F, G, H et I), selon leur structure. Il en va de même pour les thromboxanes (TX) et les lipoxines (LX), chacune répertoriées en sous-types A et B, et les leukotriènes (LT), répertoriées en sous-types (A, B, C, D et E). PAF, "platelet-activating factor".

nu pour son effet inducteur sur l'agrégation des plaquettes, la contraction des muscles lisses et la prolifération cellulaire, pour ne nommer que ceux-ci (Van Corven *et al.* 1989; Eichholtz *et al.* 1993). Le "platelet-activating factor" (PAF), un métabolite secondaire des lysophospholipides, est quant à lui surtout connu pour son implication dans diverses réactions associées aux réactions inflammatoires (voir Tableau 1.12) et ce, bien qu'il semble être en mesure de moduler l'expression de certains gènes et l'exocytose de neurotransmetteurs (Bazan *et al.* 1991; Bazan *et al.* 1993a; Kato *et al.* 1994; Bazan et Allan. 1996).

À cause de leurs propriétés solubilisante et lytique, les lysophospholipides sont de puissants agents biologiques (Stafford *et al.* 1993). Ils sont également de puissants agents mitogènes (Van Corven *et al.* 1989), ce qui signifie que leur concentration dans les membranes doit être étroitement contrôlée. Pour ce faire, les lysophospholipides peuvent être soit réacylés pour reformer des phospholipides, soit hydrolysés davantage pour former un acide gras libre supplémentaire et un *sn*-glycéro-3-phosphoR (R = choline, éthanolamine ou sérine). Or, tel que déjà mentionné, la cPLA2 et certaines iPLA2 possèdent une activité lysophospholipase (voir les tableaux 1.8 et 1.9) qui leur permettrait d'effectuer cette seconde étape d'hydrolyse (Clark *et al.* 1995; De Carvahlo *et al.* 1995). Le *sn*-glycéro-3-phosphoR pourrait ensuite être recyclé et utilisé pour synthétiser de nouveaux phospholipides, alors que l'acide gras supplémentaire généré pourrait agir à titre de second messager. L'existence de cette voie métabolique pourrait ainsi permettre de mobiliser les acides gras provenant d'une autre classe de phospholipides (les lysophospholipides) et ce, tout en générant des acides gras autres que les PUFA (majoritairement acylés en position *sn*-2). Ces acides gras pourraient réguler des fonctions cellulaires bien précises, ce qui as-

surerait, selon Arthur (1989) et Badiani et Arthur (1991), une plus grande flexibilité des réponses cellulaires.

Les PLA2 semblent donc être impliquées dans une foule de processus cellulaires fondamentaux et, par conséquent, leur dysfonctionnement peut donner lieu à des conditions pathologiques très importantes du point de vue médical (voir Tableau 1.11). En considérant que: 1) les ROS ont de particulier qu'ils sont très enrichis en DHA tout en ne contenant que peu d'acide arachidonique (voir Tableau 1.5) et 2) de forts taux d'activité PLA2 ont été obtenus par Jelsema (1987) en présence de phospholipides ayant un acide arachidonique en position *sn-2*, il nous semblait impératif (Jacob *et al.* 1996) de caractériser l'activité de la PLA2 des ROS afin de mettre en évidence une hydrolyse préférentielle ou non des phospholipides ayant un DHA en position *sn-2*. Une telle préférence pour le DHA (six doubles liaisons sur une chaîne de 22 carbones) par rapport à l'acide arachidonique (quatre doubles liaisons sur une chaîne de 20 carbones) aurait en effet constitué un argument de taille en faveur de l'implication de cette PLA2 dans des processus rétiniens aussi fondamentaux que la phototransduction, le renouvellement des ROS et/ou l'adaptation visuelle. Il nous semblait par ailleurs tout aussi intéressant d'étudier les diverses propriétés de cette PLA2 et, entre autres, la coexistence ou non d'une activité lysophospholipase.

1.11 Régulation des phospholipases A2 par les protéines-G

À cause de l'implication des PLA2 dans la synthèse des métabolites inflammatoires, i.e. les eicosanoïdes (voir Tableau 1.12), moult études ont porté sur les mécanismes de régulation des différents types de PLA2 et la synthèse d'inhibiteurs spécifiques. Depuis une dizaine d'années, il y a eu plusieurs rap-

ports relativement à l'activation de PLA2 par les protéines-G de type hétérotrimerique et ce, dans différents tissus (revu par Axelrod *et al.* 1988; Peitsch *et al.* 1993; Clark *et al.* 1995). Cela offrait une alternative thérapeutique très intéressante puisqu'on pouvait envisager d'inhiber indirectement les PLA2 et, par conséquent, contrer les réactions inflammatoires¹⁸. En inhibant les protéines-G impliquées dans la régulation des PLA2, on pouvait en effet prévenir la formation du précurseur des eicosanoïdes, l'acide arachidonique, et empêcher la progression du processus inflammatoire. D'autre part, cela confirmait et mettait encore plus d'emphase sur l'importance des PLA2 dans les cascades de signalisation avec seconds messagers; une importance qui est encore renforcée par des résultats récents suggérant que la PLA2 soit elle-même un ligand pour certains types de récepteurs (Ancian *et al.* 1995; Xing *et al.* 1995).

Puisqu'il semblait y avoir beaucoup d'activité PLA2 dans les ROS (Jelsema. 1987), que celle-ci semblait régulée par une protéine-G, la transducine, (Jelsema et Axelrod. 1987), et qu'il est facile d'obtenir une grande quantité de ROS purifiés, les ROS s'avéraient être un système des plus intéressants pour caractériser les mécanismes de régulation des PLA2 par les protéines-G. De plus, nous l'avons déjà expliqué à la section 1.3, les ROS sont hautement spécialisés dans le processus de phototransduction. Ils ne contiennent que les protéines nécessaires au maintien de leur intégrité structurelle et au déroulement de ce dernier processus. Il s'agit donc d'un système cellulaire idéal pour étudier la régulation des PLA2 par les protéines-G parce que passablement simplifié.

¹⁸ Il n'y a pas encore de consensus quant au type de PLA2 (sPLA2 ou cPLA2) qui est responsable de générer les précurseurs d'eicosanoïdes. Cependant, on peut penser que ce rôle revient à la cPLA2 puisque les sPLA2 ne sont pas spécifiques pour l'acide arachidonique (voir les tableaux 1.7 et 1.8).

1.12 Arguments en faveur de la présence d'activité phospholipase A2 dans les ROS

Différentes équipes ont rapporté des résultats expérimentaux relativement à la présence d'activité PLA2 dans les ROS (Jelsema. 1987; Jelsema et Axelrod. 1987; Zimmerman et Keys. 1988; Castagnet et Giusto. 1993; Jung et Remé. 1994; Reinboth *et al.* 1996). Toutefois, les résultats publiés par Jelsema (1987), ainsi que Jelsema et Axelrod (1987), étaient sans contredit les plus intéressants et importants puisqu'ils laissaient entrevoir l'implication de cette PLA2 dans la régulation du processus de phototransduction. Leurs résultats montrent en effet que la PLA2 des ROS est très fortement stimulée par la lumière (Jelsema. 1987), et que cette activation lumière-dépendante est médiée par le complexe T β γ de la transducine (Jelsema et Axelrod. 1987) (voir Schéma 1.4). Ces résultats étaient d'autant plus prometteurs qu'ils figuraient parmi les premiers à suggérer un mécanisme de régulation des PLA2 par les protéines-G. Tel que déjà mentionné, cela laissait entrevoir des possibilités d'interventions thérapeutiques nouvelles pour contrer les réactions inflammatoires. Il s'agissait même d'un des premiers rapports à proposer l'implication directe du complexe $\beta\gamma$ des protéines-G dans la régulation d'une activité enzymatique autre que celle de la sous-unité α de ladite protéine-G (Logothetis *et al.* 1987; Blank *et al.* 1992; Camps *et al.* 1992; Haga et Haga. 1992; Katz *et al.* 1992; Taussig *et al.* 1993).

Castagnet et Giusto (1993) ont aussi mesuré de l'activité PLA2 lumière-dépendante dans des préparations de ROS, laquelle semblait également médiée par la transducine puisque GTP γ S-dépendante¹⁹. L'écart entre l'activité stimu-

¹⁹ Le GTP γ S est un analogue du GTP qui est non-hydrolysable par les GTPases cellulaires. Il permet de maintenir la protéine-G active et dissociée de façon permanente.

lée et non-stimulée était toutefois beaucoup moins important et, par conséquent, leurs résultats étaient beaucoup moins convaincants que ceux de Jelsema (1987). Même le niveau maximum d'activité qu'ils ont mesuré était considérablement plus bas que celui rapporté par Jelsema (1987), soit plus de deux ordres de grandeur. Jung et Remé (1994), de même que Reinboth *et al.* (1996), ont également observé un effet stimulateur de la lumière sur le relargage des acides arachidonique et docosahexaénoïque, lequel est attribué à la présence d'une PLA2. Or il est très difficile de comparer leurs résultats avec ceux des autres auteurs, nous inclus, car leurs conditions expérimentales sont très différentes. Premièrement, ils ont travaillé avec des rétines complètes alors que les autres équipes ont utilisé les ROS purifiés (ou semi-purifiés). Il est donc difficile d'affirmer que leur activité PLA2 provient bel et bien des ROS puisque la lumière a également un effet (quoiqu'indirect) sur l'activité biochimique des segments internes de bâtonnets, de même que celle des cellules neuronales secondaires (bipolaires, horizontales, ganglionnaires et amacrines). Deuxièmement, les variations d'activité PLA2 sont exprimées en valeurs relatives, i.e. en pourcentage, et non en activité spécifique, soit en mol d'acides gras libérés/unité de temps par mg de protéines (ou mol de phospholipides). Il est donc impossible de déterminer les niveaux réels d'activité mesurés par ces auteurs. Troisièmement, leurs travaux sont reliés à l'étude d'un modèle de dommage rétinien causé par l'exposition à de fortes intensités lumineuses (10 000 lx), ce qui est loin des conditions d'illumination que nous avons utilisées (environ 1000 lx²⁰). Enfin, ils ont utilisé des rétines de rats albinos, contrairement à des rétines de bovins pigmentés dans toutes les autres études sous- et sus-citées.

²⁰ La luminance, exprimée en lux ($1 \text{ lx} = 1 \text{ lm/m}^2$), est le quotient de l'intensité lumineuse incidente à une surface par l'aire de cette surface (Diem et Lentner. 1970), or on ne sait rien des conditions de luminance utilisées par Jelsema (1987), Zimmerman et Keys (1988) ou Castagnet et Giusto (1993).

Zimmerman et Keys (1988) ont, eux aussi, démontré la présence d'activité PLA2 dans des préparations de ROS. Cependant, ils n'ont observé aucun effet stimulateur de la lumière. En ce qui les concerne, l'activité détectée était plutôt ATP- et coenzyme A (CoA)-dépendante. Par ailleurs, le niveau maximum d'activité observé par Zimmerman et Keys (1988) était sept fois inférieur à celui rapporté par Jelsema (1987), bien que cinquante fois supérieur à celui rapporté par Castagnet et Giusto (1993).

Ayant constaté la très grande divergence parmi les résultats des différents auteurs, il nous est apparu primordial de procéder à la caractérisation de l'activité PLA2 des ROS afin de concilier, autant que faire se peut, les différents résultats de la littérature. De nombreuses techniques et de multiples conditions ont donc été utilisées pour tenter de reproduire les résultats de Jelsema (1987), relativement à la présence d'une PLA2 lumière-dépendante dans les ROS (voir les chapitres 2 et 3), et pour cause. La forte stimulation de cette PLA2 par la lumière (Jelsema. 1987), via le complexe $\beta\gamma$ de la transducine ($T\beta\gamma$) (Jelsema et Axelrod. 1987), laissait en effet croire à son implication dans la régulation du processus de phototransduction qui se déroule au niveau des ROS (voir les sections 1.11-1.12). Tel que décrit dans la section 1.13, on pouvait pressentir l'implication de la PLA2 à différents niveaux de régulation du processus visuel.

1.13 Hypothèses proposées pour le rôle de la PLA2 dans les ROS

Après avoir observé une augmentation de 350% de l'activité PLA2 lorsque les ROS sont exposés à la lumière, Jelsema (1987) avait soulevé la possibilité que la PLA2 en question soit impliquée dans le processus de phototransduction. Aucune hypothèse détaillée, expliquant comment ce processus pouvait

être affecté ou modulé par une PLA2, n'avait toutefois été présentée. Or compte tenu de la composition particulière des ROS en acides gras (voir Tableau 1.5), de leur conséquente susceptibilité à la peroxydation (voir la section 1.8) et du danger que représente l'accumulation des phospholipides peroxydés dans les membranes pour l'intégrité structurelle et fonctionnelle des ROS, il semblait particulièrement intéressant et plausible d'envisager la présence d'une PLA2 dans les ROS et son implication dans la reconnaissance et l'élimination de ces phospholipides peroxydés (voir la section 1.13.1). Alternativement, considérant que les mécanismes d'inhibition de l'excitation visuelle et d'adaptation visuelle ne sont toujours pas entièrement compris, deux autres hypothèses s'avéraient tout aussi attrayantes parce qu'elles auraient pu permettre de raffiner la connaissance de l'un et/ou l'autre. Une PLA2 présente dans les ROS aurait en effet pu jouer un rôle très important dans le rétablissement de la concentration de Ca^{2+}_i (voir la section 1.13.2) ou la modulation de la fluidité membranaire (voir la section 1.13.3).

1.13.1 Élimination des phospholipides peroxydés

Au moment où nous avons entrepris la caractérisation de l'activité PLA2 des ROS (Jacob *et al.* 1996), c'est certainement la très forte proportion d'acides gras polyinsaturés (PUFA) de ces derniers (voir Tableau 1.5) qui générerait le plus d'attente et d'enthousiasme relativement au rôle de la PLA2. En effet, tel que mentionné auparavant, les PUFA représentent un peu plus de 60% des acides gras totaux des ROS (voir Tableau 1.5). Par ailleurs, le DHA est le plus abondant des PUFA, et de loin, comptant pour près de 45% des acides gras totaux, alors que l'acide arachidonique, second en importance (ratio molaire), ne représente que 5% des acides gras totaux (voir Tableau 1.5).

Cette forte proportion de DHA semblait d'autant plus intéressante à considérer que, selon de nombreux auteurs, elle permet de maintenir un environnement membranaire suffisamment fluide pour assurer le déroulement rapide du processus de phototransduction (voir la section 1.7). Certains ont même démontré que, dans les ROS, la présence de DHA en position *sn*-2 des phospholipides favorisait grandement la transition métarhodopsine I-métarhodopsine II, laquelle est nécessaire à l'activation du processus de phototransduction (Mitchell *et al.* 1992). Deux autres équipes ont pour leur part montré qu'une déficience en DHA entraîne une diminution du contenu en rhodopsine dans les ROS *in vivo* (Bush *et al.* 1994) et la mort des photorécepteurs *in vitro* (Rotstein *et al.* 1996), mettant ainsi en lumière l'importance du DHA qui a, selon Niebylski et Salem (1994), des propriétés conformationnelles et organisationnelles absolument uniques. Cependant, tel que décrit à la section 1.8, le DHA est particulièrement sensible à la peroxydation et ce, à cause de son degré élevé d'insaturation (voir la section 1.7) (Kagan *et al.* 1973; Farnsworth et Dratz. 1976; Katz *et al.* 1978; Krasnovsky et Kagan. 1979; Robinson *et al.* 1979; Stone *et al.* 1979; Fliesler et Anderson. 1983; Wiegand *et al.* 1983; Hiramitsu et Armstrong. 1991; De La Paz et Anderson. 1992; Wu *et al.* 1992).

Vu que les PUFA, incluant le DHA, sont majoritairement acylés en position *sn*-2 des phospholipides (voir la section 1.6) et que les PLA2 hydrolysent spécifiquement les acides gras acylés en position *sn*-2 (voir la section 1.9), la présence d'une PLA2 dans les ROS aurait donc pu empêcher la déstabilisation de leur système membranaire et leur dysfonctionnement. C'est-à-dire qu'en hydrolysant préférentiellement les DHA peroxydés, la PLA2 aurait pu assurer leur élimination des phospholipides membranaires des ROS, aidant ainsi à en pro-

téger les membranes (voir Schéma 1.10), tel que suggéré par de nombreux auteurs (Kagan *et al.* 1978; Sevanian *et al.* 1983; Tan *et al.* 1984; Weglicki *et al.* 1984; Van Kuijk *et al.* 1985; Douglas *et al.* 1986; Sevanian. 1987; Van Kuijk *et al.* 1987; Sevanian. 1988; Goldman *et al.* 1992). Une PLA2 dans les ROS aurait donc contribué à réduire les risques de perturbation métabolique (voir Schéma 1.10). Par extension, l'absence ou le dérèglement de cette PLA2 aurait peut-être pu être associé à certaines pathologies dégénératives des photorécepteurs telles que la rétinite pigmentaire ou la dégénérescence maculaire reliée à l'âge (Gong *et al.* 1992; Bazan *et al.* 1993b; Daiger *et al.* 1995).

L'effet de la lumière sur cette PLA2 aurait été particulièrement important puisque l'excitation visuelle engendre inévitablement la production de dérivés d'oxygène hautement réactifs (ex. O_2^-). En effet, la lumière qui pénètre l'oeil et atteint les photorécepteurs se retrouve en contact avec le microenvironnement rétinien qui est richement vascularisé et fortement oxygéné (Berman. 1991). Par conséquent, elle initie une réaction photochimique qui mène à la formation d'anions superoxyde, i.e. O_2^- (Miller. 1987; Varma et Richards. 1988). Ces molécules d' O_2^- peuvent dès lors réagir avec les PUFA des phospholipides des ROS, entraînant l'accumulation de phospholipides peroxydés qui peuvent affecter l'intégrité structurelle et fonctionnelle des ROS (Delmelle. 1978a et b; Delmelle. 1979; Kranovsky et Kagan. 1979). L'activation de la PLA2 par la lumière aurait donc pu permettre de freiner l'accumulation de tels phospholipides, aidant ainsi à protéger les membranes des ROS.

Il semblait d'autant plus plausible de songer à une hydrolyse préférentielle des DHA peroxydés des ROS par la PLA2 que plusieurs auteurs ont obser-

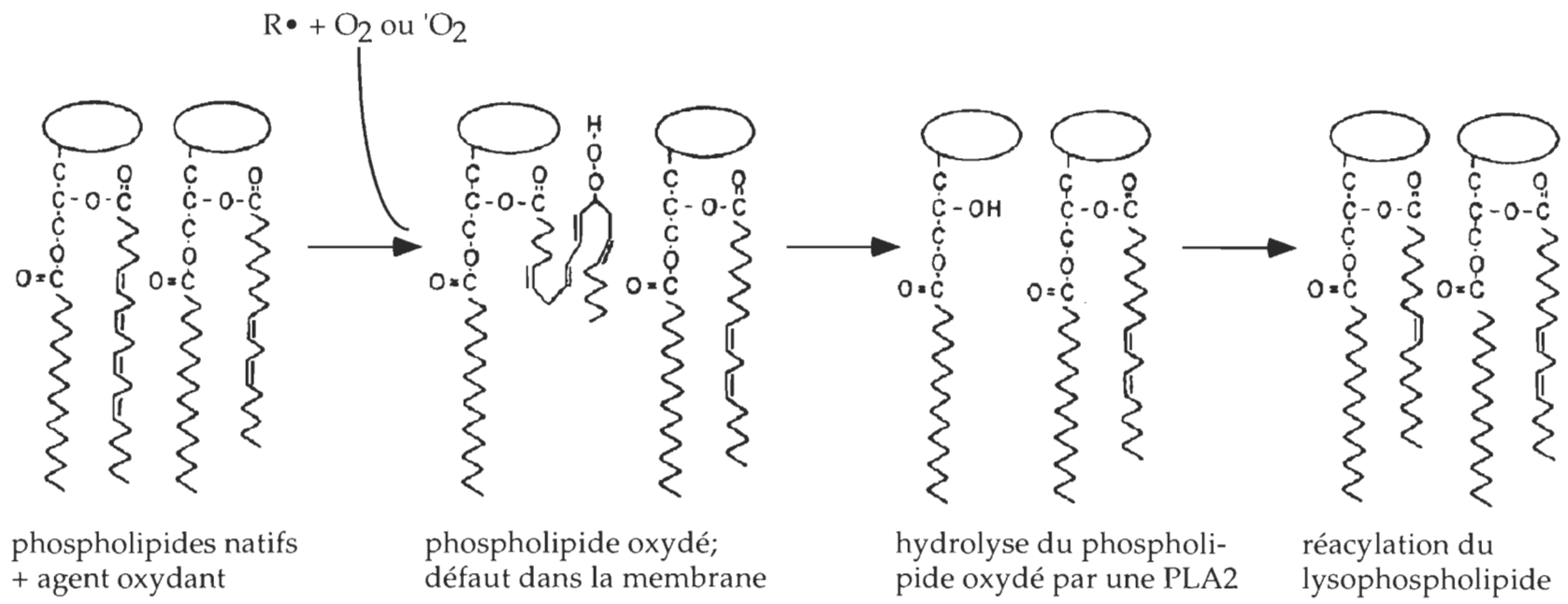


Schéma 1.10: Élimination des PUFA peroxydés et protection des membranes^a

^a Ce schéma est tiré de l'article de Van Kuijk *et al.* (1987).

vé un phénomène similaire dans d'autres systèmes (Sevanian *et al.* 1988; Baba *et al.* 1993; McLean *et al.* 1993; Van Den Berg *et al.* 1993). Selon eux, les PUFA peroxydés adopteraient une conformation différente de celle des PUFA natifs (voir Schéma 1.10), ce qui entraînerait une diminution du degré d'entassement des phospholipides membranaires, faciliterait l'accès de la PLA2 au lien ester *sn*-2 hydrolysable (voir Schéma 1.9) et permettrait leur hydrolyse préférentielle (Sevanian *et al.* 1988; Van Den Berg *et al.* 1993). D'autres études ont par ailleurs démontré que la présence de "défauts" structurels dans les systèmes membranaires crée des sites privilégiés d'hydrolyse par les PLA2 (Upreti et Jain. 1980; Van Den Bosch. 1980, Jain et De Haas. 1983; Jain *et al.* 1984; Jain et Jahagirdar. 1985; Jain *et al.* 1989; Ramirez et Jain. 1991), ces défauts pouvant tout aussi bien être occasionnés par la coexistence de domaines formés de phospholipides peroxydés et natifs (voir Schéma 1.10) que par la coexistence de domaines de phospholipides ayant une température de transition de phase différente (voir Tableau 1.4).

1.13.2 Rétablissement de la concentration de Ca^{2+}_i lors de l'inhibition de l'excitation visuelle

Advenant que la PLA2 des ROS ait été spécifique non pas pour les phospholipides peroxydés, mais plutôt pour les phospholipides natifs, elle aurait alors pu être impliquée dans le rétablissement de la concentration de Ca^{2+}_i suite à l'excitation visuelle et donc, dans la régulation du processus de phototransduction.

Plusieurs équipes de chercheurs ont démontré que les disques empilés dans les ROS (voir Schéma 1.3) constituaient des entrepôts de Ca^{2+} (Hagins et

Yoshikami. 1974; Fishman *et al.* 1977; Yoshikami et Hagins. 1980; Athanassious *et al.* 1984; Schröder et Fain. 1984). De même, plusieurs ont démontré que: 1) l'excitation visuelle entraîne une baisse de la concentration de Ca^{2+} libre dans les ROS (Gold et Korenbrot. 1980; Schröder et Fain. 1984; Yau et Nakatani. 1985; McNaughton *et al.* 1986; Ratto *et al.* 1988; Gallemore *et al.* 1994) et 2) la modulation de l'activité des canaux ioniques GMPc-dépendants et des échangeurs anti-porteurs à $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$ est en grande partie responsable de cette baisse de concentration et de son rétablissement (voir Tableau 1.3, ainsi que les sections 1.4 et 1.5). On pouvait donc poser l'hypothèse suivante, à savoir que l'hydrolyse partielle de la membrane des disques, résultant de l'activation d'une PLA2 lumière-dépendante par $\text{T}\beta\gamma$, provoque le relargage d'ions Ca^{2+} et, par conséquent, contribue au rétablissement de la concentration de Ca^{2+} ; lors de l'inhibition de l'excitation visuelle (voir les schémas 1.5 et 1.6).

Des expériences effectuées avec des ROS purifiés et intacts auraient pu permettre de vérifier cette hypothèse, du moins en partie. Dans un premier temps, des hs-ROS intacts auraient été purifiés par agitation à la main, tel que décrit à la section 2.3.4. Deux aliquots de ROS (contenant une même quantité de protéines) auraient ensuite été exposés à la lumière et ce, pour une période de temps définie. Dans un deuxième temps, l'extraction et la séparation des phospholipides/lysophospholipides de l'un des aliquots (selon la méthode décrite à la section 2.3.8) aurait permis de déterminer le taux d'activité PLA2 de cet aliquot et, parallèlement, le vortexage de l'autre aliquot (tel que décrit à la section 2.3.2) aurait permis d'éclater les hs-ROS qui aurait alors pu être incubés en présence d'un indicateur de Ca^{2+} (ex. indo-1) afin de déterminer la concentration de Ca^{2+} extradiscale par fluorimétrie. Puisque l'émission de fluorescence

maximale de l'indo-1 saturé en Ca^{2+} et dépourvu de Ca^{2+} se produit à 405 et 490 nm, respectivement, l'augmentation du ratio de fluorescence 405/490 nm aurait reflété le taux de relargage du Ca^{2+} intradiscal²¹. Deux autres aliquots, ayant une quantité de protéines équivalente aux deux premiers, auraient quant à eux servi de contrôles négatifs: ils auraient été traités de la même façon que les deux premiers, en étant cependant gardés à la noirceur. L'effet de la lumière sur l'activation de la PLA2 des ROS et la relâche d'ions Ca^{2+} à partir des disques (voir les schémas 1.5 et 1.6) aurait ainsi pu être évalué. Cela aurait aussi permis de vérifier que, advenant le cas, la relâche de Ca^{2+} intradiscal respecte l'écart de concentration physiologique observé (voir Tableau 1.3), sans quoi il aurait été difficilement imaginable que la PLA2 puisse intervenir dans le processus physiologique normal de rétablissement de la concentration de Ca^{2+} ; des ROS.

1.13.3 Modulation du processus de transduction et/ou d'adaptation visuelle

La troisième hypothèse qui avait été envisagée et qui aurait pu permettre d'expliquer le rôle d'une PLA2 lumière-dépendante dans les ROS reposait sur l'hydrolyse spécifique de l'acide arachidonique natif (non-peroxydé) des ROS. En effet, tel qu'expliqué ci-dessous, la PLA2 aurait pu être impliquée dans la régulation du processus de phototransduction et/ou d'adaptation visuelle et ce, en modulant l'activité de certaines protéines des ROS.

Plusieurs études récentes ont permis de mettre en évidence l'importance de l'acide arachidonique dans la régulation (directe ou indirecte) de canaux ou

²¹ Il faut se rappeler que, dans nos conditions de vortexage (10 X 1 sec; vitesse maximum; vortex de type Fisherbrand), seule la membrane cytoplasmique des ROS adaptés à la noirceur est brisée; la membrane discale demeure intacte (voir Figure 2.3A). Il aurait donc fallu déterminer le temps d'illumination optimal permettant d'observer un relargage significatif d'ions Ca^{2+} à partir des disques et ce, tout en préservant au maximum leur intégrité (pour éviter qu'ils n'éclatent eux aussi).

pompes ioniques (Linden and Routtenberg. 1989; Ordway *et al.* 1989; Ordway *et al.* 1991; Dettbarn et Palade. 1993; Ehrenguber *et al.* 1993; Hoffmann *et al.* 1993; Zona *et al.* 1993). D'autres encore ont montré l'activation et l'inhibition directe de protéines-G (Abramson *et al.* 1991; Ligeti *et al.* 1993) et récepteurs (Domanska-Janik. 1993; Tomaska et Resnick. 1993), respectivement, par ce type d'acide gras. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que plusieurs d'entre eux ont été obtenus avec différents types de cellules nerveuses (Linden et Routtenberg. 1989; Domanska-Janik. 1993; Ehrenguber *et al.* 1993; Zona *et al.* 1993). De plus, il y a eu au moins trois publications ayant trait à la caractérisation et/ou purification d'une PLA2, enzyme responsable de la production d'acide arachidonique, dans ce type de cellules (Lauritzen *et al.* 1994; Stephenson *et al.* 1994; Petit *et al.* 1995). Ceci démontre donc l'importance des PLA2 et de l'acide arachidonique dans les tissus nerveux et laissait présager un rôle tout aussi important dans la rétine, qui est elle-même un tissu nerveux (voir Schéma 1.2, ainsi que la section 1.2).

Le mécanisme d'inhibition de l'excitation visuelle, nous l'avons vu à la section 1.5, n'est pas encore entièrement compris. On sait toutefois que le Ca^{2+} est à l'origine de nombreuses réactions menant au rétablissement des conditions initiales, ce qui implique un rôle important pour les canaux et pompes ioniques (voir les schémas 1.5 et 1.6). Il aurait donc été intéressant d'étudier l'effet de la PLA2 lumière-dépendante (localisée dans les ROS par Jelsema en 1987) et de l'acide arachidonique généré sur l'activité de ces canaux et pompes ioniques, de même que sur l'activité de la transducine, protéine-G spécifique aux ROS, et de la rhodopsine, qui agit à titre de récepteur pour les photons (voir la section 1.4). Alternativement, une PLA2 lumière-dépendante aurait pu être

impliquée dans la régulation du processus d'adaptation visuelle.

Il a été clairement démontré qu'en période d'illumination constante, il y a désensibilisation des photorécepteurs, i.e. adaptation visuelle à la luminosité ambiante. Et malgré les nombreux travaux ayant permis de mettre en évidence le rôle prépondérant du Ca^{2+} dans le mécanisme d'adaptation visuelle (Nakatani et Yau. 1988; Fain et Matthews. 1990; Pugh et Lamb. 1990; Torre *et al.* 1990; Kaupp et Koch. 1992; Koch. 1992a; Bownds et Arshavsky. 1995; Torre *et al.* 1995), celui-ci ne demeure néanmoins que partiellement compris (tout comme le mécanisme d'inhibition de l'excitation visuelle). Une des caractéristiques intéressantes du processus d'adaptation visuelle est sans aucun doute l'accélération de la cinétique de réponse aux stimuli lumineux qui accompagne la désensibilisation (Pugh et Lamb. 1990; Kaupp et Koch. 1992; Bownds et Arshavsky. 1995; Torre *et al.* 1995). L'acide arachidonique produit par une PLA2 lumière-dépendante aurait donc pu agir à titre de messager intracellulaire dans les ROS, similairement à ce qui a été observé dans de nombreux autres systèmes cellulaires (voir la section 1.10). Il aurait ainsi pu être impliqué dans la régulation du processus d'adaptation visuelle et ce, en modulant l'activité des canaux et/ou pompes ioniques, de la transducine, de la rhodopsine et possiblement d'autres protéines, de façon à accélérer la cinétique de réponse aux stimuli.

1.14 Arguments suggérant la présence d'activité phospholipase A2 dans la rétine, mais pas dans les ROS

Tel que démontré au Chapitre 2, les trois types de préparations de ROS purifiés que nous avons utilisées n'ont révélé aucune activité PLA2 qui soit significativement supérieure à des contrôles négatifs (hydrolyse non-spécifique et

spontanée). Ceci invalidait donc toutes les hypothèses concernant le rôle d'une PLA2 dans les ROS (voir la section 1.13 qui précède). Par contre, comme le laisse sous-entendre le titre de ce chapitre, soit "Presence of a light-independent phospholipase A2 in bovine retina but not in rod outer segments" (Jacob *et al.* 1996), et comme le confirment les travaux de caractérisation présentés aux chapitres 4 (Jacob *et al.* 1997), 5 (Jacob *et al.* 1998) et 6 de la présente thèse, nous avons décelé des niveaux d'activité PLA2 non négligeables dans deux fractions subrétiniennes autres que les ROS. Il s'agit d'une part du RPE, une fraction enrichie en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, et d'autre part du P200, une fraction sédimentée à 200 g qui contient présumément les segments internes de bâtonnets, les cellules de Müller, ainsi que les différents types de cellules neuronales (voir Schéma 1.2).

Puisque le P200 ne compte vraisemblablement pas moins de cinq types de cellules différents (cellules bipolaires, amacrines, ganglionnaires, horizontales et gliales de Müller), en plus des segments internes des bâtonnets, il est difficile de spéculer sur l'origine cellulaire de l'activité PLA2 mesurée dans cette fraction et, par conséquent, sur son rôle dans la rétine. Au contraire, le RPE est une fraction relativement homogène. Feeney-Burns et Berman (1982) ont démontré que, contrairement aux préparations de RPE obtenues par traitement enzymatique qui sont contaminées par les protéases utilisées, les préparations de RPE obtenues par balayage (voir la section 2.3.5) sont principalement contaminées par des fragments de ROS et des globules rouges. Or puisque nos résultats montrent que les ROS sont dépourvus d'activité PLA2 (voir Chapitre 2), et que l'activité PLA2 du RPE a des caractéristiques différentes de celle des globules rouges et autres PLA2 connues (voir Chapitre 4), il semble plus que probable

que l'activité PLA2 mesurée dans cette dernière fraction soit effectivement imputable aux cellules du RPE.

La présence d'activité PLA2 dans les cellules du RPE apparaît d'autant plus intéressante que le RPE est impliqué dans le renouvellement des photorécepteurs qui, autrement, sont amitotiques. En phagocytant quotidiennement l'apex des ROS (Dudley *et al.* 1984), les cellules du RPE jouent en effet un rôle très important dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des ROS (Stiemke et Hollyfield. 1994; Raymond et Jackson. 1995), de même que dans le recyclage des PUFA (en particulier l'acide docosahexaénoïque) vers les segments internes de bâtonnets (Rodriguez de Turco *et al.* 1991; Bazan *et al.* 1992a et b; Gordon *et al.* 1992; Stinson *et al.* 1991; Anderson *et al.* 1992; Chen et Anderson. 1992; Wang *et al.* 1992). Une PLA2 dans les cellules du RPE pourrait donc s'avérer indispensable pour l'hydrolyse des PUFA, leur recyclage et le renouvellement des photorécepteurs.

1.15 Caractéristiques des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien

Le RPE est constitué d'un seul feuillet de cellules polygonales (majoritairement hexagonales), lesquelles se retrouvent entre la membrane de Bruch²² et les photorécepteurs (Zinn et Marmor 1979; Orzalesi et Staurenghi. 1989; Berman. 1991). Les cellules du RPE sont également amitotiques. Elles sont généralement plates (environ 10 µm) et larges (jusqu'à 60 µm). Chacune d'elles peut être en étroit contact avec 35-40 photorécepteurs, lesquels font en moyenne 1-2 µm de large (Bok. 1982; Shichi. 1983). Elles ont, tout comme les photorécep-

²² La membrane de Bruch n'est pas une membrane au sens propre du terme, mais bien un enchevêtrement de collagène et glucosaminoglycans (Berman. 1991).

teurs, une structure hautement polarisée (voir Schéma 1.11). On y retrouve notamment deux domaines membranaires biochimiquement et fonctionnellement distincts. Il s'agit des domaines apical et baso-latéral, qui sont délimités par des jonctions étanches (Zinn et Marmor. 1979; Orzalesi et Staurenghi. 1989). Du côté baso-latéral, on dénombre notamment des jonctions de type hémidesmosomes, ce qui explique, du moins partiellement, la très forte adhésion du RPE à la choroïde. Du côté apical, on retrouve des pompes ioniques de type Na^+/K^+ -ATPase qui, de concert avec les microvilli et la matrice interphotorécepteurs (composée principalement de mucopolysaccharides), vont assurer l'adhésion de la rétine neurale au RPE²³ (voir les schémas 1.2 et 1.11) (Zinn et Marmor. 1979; Berman. 1991). Il n'y a pas de jonction intercellulaire entre les photorécepteurs et les cellules du RPE. La force maintenant la rétine neurale accolée au RPE est donc relativement faible.

Les cellules du RPE sont très riches en mélanine, un pigment brun-noir qui a la propriété d'absorber l'excès de lumière qui pénètre dans l'oeil et donc, de minimiser la réflexion interne. Ainsi, à cause des nombreux granules de mélanine présents et de leur localisation préférentielle dans la portion apicale du cytoplasme et dans les microvilli (voir Schéma 1.11), les cellules du RPE jouent un rôle photoprotecteur particulièrement important (Zinn et Marmor. 1979; Berman. 1991).

Deux types de microvilli caractérisent les cellules du RPE: les longues (5-

²³ Les pompes ioniques sont impliquées dans le transport actif du fluide subrétinien (i.e. du liquide interstitiel présent entre la rétine neurale et le RPE) vers la choroïde, ce qui permet d'en réguler à la fois le volume et la composition. Les forces générées par ce transport unidirectionnel favorisent ainsi l'adhésion de la rétine neurale au RPE de façon biochimique. La contribution des microvilli à ce phénomène est quant à elle de nature mécanique (Berman. 1991).

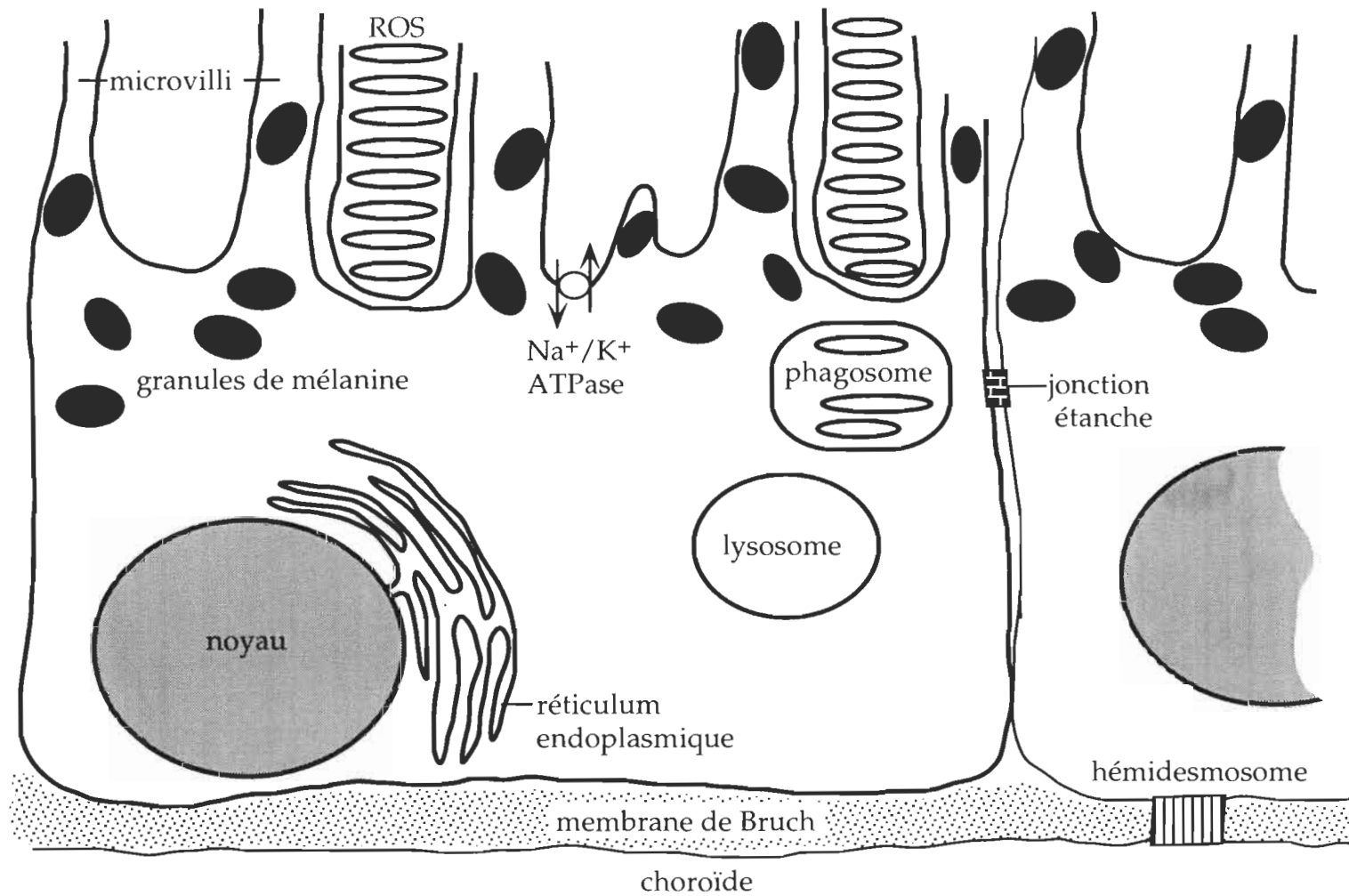


Schéma 1.11: Polarisation structurale et fonctionnelle des cellules du RPE

7 nm), qui s'insèrent entre les photorécepteurs, et les courtes (3-4 nm), qui forment une véritable enveloppe autour du tiers apical des ROS (Zinn et Benjamin-Henkind. 1983; Orzalesi et Staurenghi. 1989). Des études ont permis de démontrer que les courtes microvilli participent au processus de ségrégation et phagocytose des ROS, une des fonctions majeures du RPE (Zinn et Marmor. 1979) (voir Tableau 1.13).

1.16 Relation photorécepteurs-épithélium pigmentaire rétinien

Le lien physique qui existe entre le RPE et la rétine neurale est très important parce que les cellules du RPE sont activement impliquées, comme nous l'avons mentionné ci-haut, dans le processus de ségrégation, phagocytose et dégradation de la portion apicale des ROS (Hall et Abrams. 1987; Gregory et Hall. 1992). Environ 10% de la longueur totale du ROS est dégradé quotidiennement. Compte tenu que chacune des cellules du RPE est en contact avec 35-40 photorécepteurs, cela représente près de 3000 disques engouffrés chaque jour (Feeney. 1973). Les cellules du RPE ont donc développé un système catabolique absolument unique pour s'acquitter d'une de leur plus grande tâche (Bok. 1982; Berman. 1991). Ainsi, chaque fragment de photorécepteur ségrégué et internalisé devient un phagosome (voir Schéma 1.11). Celui-ci fusionne éventuellement avec un ou plusieurs lysosomes pour former un phagolysosome (Bosch *et al.* 1993; McLauhlin *et al.* 1994). C'est dans ce dernier que se déroule l'étape de digestion. Les photorécepteurs étant amitotiques, c'est donc l'équilibre entre la phagocytose de la partie apicale du ROS et la synthèse de nouveaux disques dans sa partie basale qui assure leur renouvellement et maintient leur longueur constante (Bibb et Young. 1974; Fliesler et Anderson. 1983). Cet équilibre spatial et temporel est possible parce que les photorécepteurs sont non seule-

Tableau 1.13: Fonctions majeures de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE)

Biochimiques

Phagocytose des segments externes de bâtonnets et de cônes

Digestion des phagosomes

Recyclage des PUFA

Recyclage des rétinoïdes requis dans le processus de phototransduction

Synthèse de certains constituants de la matrice interphotorécepteur et de la membrane de Bruch

Synthèse de la mélanine

Détoxification des drogues

Physiologiques

Contrôle des échanges de nutriments et métabolites entre les photorécepteurs et la choroïde

Régulation du transport du fluide subrétinien de façon à préserver l'adhésion de la rétine neurale

Physiques et optiques

Maintien de l'adhésion rétinienne grâce aux microvilli

Maintien de la barrière oculo-sanguine

Absorption de l'excès de lumière et contrôle de la réflexion interne grâce aux granules de mélanine

ment polarisés, mais également compartimentalisés (voir Schéma 1.3).

Alors que certains des produits de dégradation des ROS s'accumulent dans ce qui deviennent les corps résiduels, ou granules de lipofuscine (Feeney. 1978; Katz et Gao. 1995; Kennedy *et al.* 1995; Rakoczy *et al.* 1996), d'autres peuvent être recyclés vers les segments internes des photorécepteurs. Des études ont en effet permis de démontrer la présence d'un mécanisme de conservation des PUFA dans les photorécepteurs, lequel dépend du RPE (Rodriguez de Turco *et al.* 1991; Bazan *et al.* 1992a et b; Gordon *et al.* 1991; Stinson *et al.* 1991; Anderson *et al.* 1992; Wang *et al.* 1992; Chen et Anderson. 1992). L'existence de ce mécanisme de conservation des PUFA donne donc encore plus d'ampleur à l'intérêt de caractériser l'activité PLA2 du RPE car les résultats de cette caractérisation permettront éventuellement de vérifier l'implication de l'activité PLA2 dans le mécanisme d'hydrolyse qui précède le recyclage des PUFA et, par extension, l'implication de l'activité PLA2 dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des ROS.

1.17 Objectifs de recherche

En plus de comparer le degré d'intégrité des ROS obtenus via les trois méthodes d'isolement couramment utilisées (Chapitre 3) et de présenter les premiers bilans relatifs à la caractérisation de l'activité PLA2 détectée dans le RPE (Chapitre 4) et le P200 (Chapitre 5 et Chapitre 6), l'ensemble des résultats de la présente thèse permet également de faire le point sur la controverse qui, jusqu'ici, entourait la présence d'activité PLA2 dans les ROS (Chapitre 2).

Des techniques aussi diversifiées que les dosages radiométrique, colori-

métrique et fluorimétrique (pour les dosages d'activité PLA₂, de protéines, de phospholipides et de NADPH), la HPLC (échangeur d'ions, interactions hydrophobes, filtration sur gel et phase inverse pour la purification des PLA₂, et phase normale pour la séparation des phospholipides et lysophospholipides), la TLC (pour distinguer l'activité PLA₂ de l'activité PLC ou PLD) et la microscopie électronique (pour comparer le degré d'intégrité des différents types de préparations de ROS utilisées), ont permis de démontrer que: 1) il n'y a pas d'activité PLA₂ dans les ROS purifiés et intacts, 2) l'activité PLA₂ des ROS mesurée par Jelsema (1987), Zimmerman et Keys (1988) et Castagnet et Giusto (1993) serait en fait due à une contamination de leurs préparations par des composantes du RPE et/ou du P200, 3) le RPE contient probablement deux types de PLA₂, lesquels semblent différents des sPLA₂, cPLA₂ et iPLA₂, 4) le P200 pourrait contenir quatre types de PLA₂ qui semblent non seulement différents des sPLA₂, cPLA₂ et iPLA₂, mais également différents des RPE-PLA₂, et 5) les PLA₂ du RPE et du P200 pourraient appartenir à un nouveau groupe de PLA₂, soit les PLA₂ rétiniennes ou rPLA₂, lequel pourrait lui-même être subdivisé en sous-groupes.

Il s'agit de résultats tout à fait nouveaux, et la totalité de la démarche expérimentale qui s'y rattache est détaillée dans les chapitres 2 à 6 qui suivent. Le Chapitre 7 résume quant à lui certaines perspectives de recherche, de même que les principales hypothèses de rôles retenues et proposées pour ces PLA₂ rétiniennes et ce, en tentant d'intégrer le tout dans un contexte cellulaire.

1.18 Références

- Abe, T., Kikuchi, T., Chang, T. et Shinohara, T. The sequence of the mouse phospholipase A2-encoding gene and its 5'-flanking region. Gene. 1993. 133: 179-186.
- Abramson, S.B., Leszczynska-Piziak, J. et Weissmann, G. Arachidonic acid as a second messenger: Interactions with a GTP-binding protein of human neutrophils. The Journal of Immunology. 1991. 147: 231-236.
- Ackermann, E.J. et Dennis, E.A. Mammalian calcium-independent phospholipase A2. Biochimica et Biophysica Acta. 1995. 1259: 125-136.
- Ali, M.A. et Klyne, M.A. La vision chez les vertébrés. Ville Mont-Royal: Décarie Masson, 1986.
- Ancian, P., Lambeau, G. et Lazdunski, M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. Biochemistry. 1995. 34: 13146-13151.
- Anderson, R.E. et Andrews, L.D. *dans* Visual cells in evolution. New York: Raven Press, 1982.
- Anderson, R.E., O'Brien, P.J., Wiegand, R.D., Koutz, C.A. et Stinson, A.M. Conservation of docosahexaenoic acid in the retina. *dans* Neurobiology of Essential Fatty Acids. New York: Plenum Press, 1992.

- Angleton, J.K. et Wensel, T.G. A GTPase-accelerating factor for transducin, distinct from its effector cGMP phosphodiesterase, in rod outer segment membranes. Neuron. 1993. 11: 939-949.
- Angleton, J.K. et Wensel, T.G. Enhancement of rod outer segment GTPase accelerating protein activity by the inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 16290-16296.
- Antonny, B., Otto-Bruc, A., Chabre, M. et Vuong, T.M. GTP hydrolysis by purified α -subunit of transducin and its complex with the cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor. Biochemistry. 1993. 32: 8646-8653.
- Aparicio, J.G. et Applebury, M.L. The bovine photoreceptor outer segment guanylate cyclase: Purification, kinetic properties, and molecular size. Protein Expression and Purification. 1995. 6: 501-511.
- Armstrong, M.K., Blake, W.L. et Clarke, S.D. Arachidonic acid suppression of fatty acid synthase gene expression in cultured rat hepatocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1991. 177: 1056-1061.
- Arshavsky, V.Y., Antoch, M.P., Lukjanov, A.K.A. et Philipov, P.P. Transducin GTPase for rapid quenching of the cGMP cascade in rod outer segments. FEBS Letters. 1989. 250: 353-356.
- Arshavsky, V.Y. et Bownds, M.D. Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. Nature. 1992. 357: 416-417.

- Arshavsky, V.Y., Dumke, C.L. et Bownds, M.D. Noncatalytic cGMP-binding sites of amphibian rod cGMP phosphodiesterase control interaction with its inhibitory γ -subunits. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 24501-24507.
- Arshavsky, V.Y., Dumke, C.L., Zhu, Y., Artemyev, N.O., Skiba, N.P., Hamm, H.E. et Bownds, M.D. Regulation of transducin GTPase activity in bovine rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 19882-19887.
- Arshavsky, V.Y., Gray-Keller, M.P. et Bownds, M.D. cGMP suppresses GTPase activity of a portion of transducin equimolar to phosphodiesterase in frog rod outer segments: Light-induced cGMP decreases as a putative feedback mechanism of the photoresponse. The Journal of Biological Chemistry. 1991. 266: 18530-18537.
- Artemyev, N.O., Mills, J.S., Thornburg, K.R., Knapp, D.R., Schey, K.L. et Hamm, H.E. A site on transducin α -subunit of interaction with the polycationic region of cGMP phosphodiesterase inhibitory subunit. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 23611-23615.
- Arthur, G. Lysophospholipase A2 activity in guinea-pig heart microsomal fractions displaying high activities with 2-acylglycerophosphocholines with linoleic and arachidonic acids. Biochemical Journal. 1989. 261: 581-586.
- Athanassious, R., Klyne, M.A. et Ali, M.A. Ultracytochemical evidence of cal-

cium in the visual process. Mikroskopie. 1984. 41: 4-11.

Axelrod, J., Burch, R.M. et Jelsema, C.L. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. Trends in Neurosciences. 1988. 11: 117-123.

Baba, N., Mikami, Y., Shigeta, Y., Nakajima, S., Kaneko, T. et Matsuo, M. Hydrolysis of glycerophosphocholine hydroperoxide by phospholipase A2. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 1993. 57: 2200-2201.

Badiani, A. et Arthur, G. 2-Acyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine lysophospholipase A2 activity in guinea pig heart microsomes. Biochemical Journal. 1991. 275: 393-398.

Baehr, W. Devlin, M.J. et Applebury, M.L. Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1979. 254: 11669-11677.

Bauer, P.J. Evidence for two functionally different membrane fractions in bovine retinal rod outer segments. Journal of Physiology. 1988. 401: 309-327.

Bauer, P.J. et Drechsler, M. Association of cyclic GMP-gated channels and Na⁺-Ca²⁺-K⁺ exchangers in bovine retinal rod outer segment plasma membranes. Journal of Physiology. 1992. 451: 109-131.

Baylor, D.A. Photoreceptor signals and vision. Investigative Ophthalmology

and Visual Sciences. 1987. 28: 34-49.

Bazan, H.E.P., Ridenour, B., Birkle, D.L. et Bazan, N.G. Unique metabolic features of docosahexaenoate metabolism related to functional roles in brain and retina. *dans* Phospholipid Research and the Nervous System Biochemical and Molecular Pharmacology. vol. 4. Padova: Liviana Press, 1986.

Bazan, N.G. Metabolism of phospholipids in the retina. Vision Research. 1982. 22: 1539-1548.

Bazan, N.G. The metabolism of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the eye: The possible role of docosahexaenoic acid and docosanoids in retinal physiology and ocular pathology. *dans* The Ocular Effects of Prostaglandins and Other Eicosanoids. New York: Alan R. Liss Inc., 1989.

Bazan, N.G. et Allan, G. Platelet-activating factor in the modulation of excitatory amino acid neurotransmitter release and gene expression. Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling. 1996. 14: 321-330.

Bazan, N.G., Allan, G. et Rodriguez de Turco, E.B. Role of phospholipase A2 and membrane-derived lipid second messengers in membrane function and transcriptional activation of genes: implications in cerebral ischemia and neuronal excitability. Progress in Brain Research. 1993a. 96: 247-257.

Bazan, N.G., Gordon, W.C. et Rodriguez de Turco, E.B. Docosahexaenoic acid

uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *dans* Neurobiology of Essential Fatty Acids. New York: Plenum Press, 1992a.

Bazan, N.G., Gordon, W.C. et Rodriguez de Turco, E.B. The uptake, metabolism and conservation of docosahexaenoic acid (22:6 ω 3) in brain and retina: Alterations in liver and retinal 22:6 metabolism during inherited progressive retinal degeneration. *dans* Essential Fatty Acids and Eicosanoids. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1992b.

Bazan, N.G. et Reddy, T.S. Retina. *dans* Handbook of Neurochemistry. vol. 8. New York: Plenum Press, 1985.

Bazan, N.G., Rodriguez de Turco, E.B., Gordon, W.C., Strand, V.C. et Martin, R.E. Systemic alterations in docosahexaenoic acid metabolism in inherited retinal degenerations. *dans* Retinal Degeneration: Clinical and Laboratory Applications. Plenum Press: New York, 1993b.

Bazan, N.G., Squinto, S.P., Braquet, P., Panetta, T. et Marcheselli, V.L. Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: Intracellular PAF-binding sites and activation of a Fos/Jun/AP-1 transcriptional signalling system. Lipids. 1991. 26: 1236-1242.

Berman, E.R. Biochemistry of the eye. New York: Plenum Press, 1991.

Bibb, C. et Young, R.W. Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell

outer segments. The Journal of Cell Biology. 1974. 61: 327-343.

Birkle, D.L. et Bazan, N.G. The arachidonic acid cascade and phospholipid and docosahexaenoic acid metabolism in the retina. *dans* Progress in Retinal Research. vol. 5. New York: Pergamon Press, 1986.

Blackwood, R.A., Transue, A.T., Harsh, D.M., Brower, R.C., Zacharek, S.J., Smolen, J.E. et Hessler, R.J. PLA2 promotes fusion between PMN-specific granules and complex liposomes. Journal of Leukocyte Biology. 1996. 59: 663-670.

Blank, J.L., Brattian, K.A. et Exton, J.H. Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 23069-23075.

Bodoia, R.D. et Detwiler, P.B. Patch-clamp recordings of the light-sensitive dark noise in retinal rods from the lizard and frog. Journal of Physiology. 1984. 367: 183-216.

Bok, D. Renewal of photoreceptor cells. Methods in Enzymology. 1982. 81: 763-772.

Bosch, E., Horwitz, J. et Bok, D. Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: Phagosome-lysosome interaction. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1993. 41: 253-263.

- Bourne, H.R., Sanders, D.A. et McCormick, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature. 1990. 348: 125-132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. et McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature. 1991. 349: 117-127.
- Bownds, M.D. et Arshavsky, V.Y. What are the mechanisms of photoreceptor adaptation? Behavioral and Brain Sciences. 1995. 18: 415-424.
- Bramham, C.R., Alkon, D.L. et Lester, D.S. Arachidonic acid and diacylglycerol act synergistically through protein kinase C to persistently enhance synaptic transmission in the hippocampus. Neuroscience. 1994. 60: 737-743.
- Bruckert, F., Catty, P., Deterre, P. et Pfister, C. Activation of phosphodiesterase by transducin in bovine rod outer segments: Characteristics of the successive binding of two transducins. Biochemistry. 1994. 33: 12625-12634.
- Bruckert, F., Chabre, M. et Vuong, M.T. Kinetic analysis of the activation of transducin by photoexcited rhodopsin: Influence of the lateral diffusion of transducin and competition of guanosine diphosphate and guanosine triphosphate for the nucleotide site. Biophysical Journal. 1992. 63: 616-629.
- Buczylko, J. Gutmann, C. et Palczewski, K. Regulation of rhodopsin kinase by autophosphorylation. Proceedings of the National Academy of Sciences

of USA. 1991. 88: 2568-2572.

Buhl, W.J., Eisenlohr, L.M., Preuss, I. et Gehring, U. A novel phospholipase A2 from human placenta. Biochemical Journal. 1995. 311: 147-153.

Bush, R.A., Malnoë, A., Remé, C. et Williams, T.P. Dietary deficiency of N-3 fatty acids alters rhodopsin content and function in the rat retina. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1994. 35: 91-100.

Caffrey, M. Kinetics and mechanism of the lamellar gel/lamellar liquid-crystal and lamellar/inverted hexagonal phase transition in phosphatidylethanolamine: A real-time X-ray diffraction study using synchrotron radiation. Biochemistry. 1985. 24: 4826-4844.

Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J. et Gierschik, P. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C β 2 by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. Nature. 1992. 360: 684-686.

Caretta, A., Cavaggioni, A., Grimaldi, R. et Sorbi, R.T. Regulation of cyclic GMP binding to retinal rod membranes by calcium. European Journal of Biochemistry. 1988. 177: 139-146.

Casey, P. G proteins: Visual differences. Nature. 1992a. 359: 671-672.

Casey, P. Biochemistry of protein prenylation. The Journal of Lipid Research. 1992b. 33: 1731-1740.

- Castagnet, P.I. et Giusto, N.M. Properties of phospholipase A2 activity from bovine retinal rod outer segments. Experimental Eye Research. 1993. 56: 709-719.
- Catania, M.V., Hollingsworth, Z., Penney, J.B. et Young, A.B. Phospholipase A2 modulates different subtypes of excitatory amino acid receptors: autoradiographic evidence. Journal of Neurochemistry. 1993. 60: 236-245.
- Catty, P., Pfister, C., Bruckert, F. et Deterre, P. The retinal phosphodiesterase-transducin complex: membrane binding, subunits interactions and activity. Structures and Functions of Retinal Proteins. 1992. 221: 387-390.
- Chabre, M. Transduction du signal visuel dans les cellules rétiniennees. C. R. Académie des Sciences de Paris. 1992. 314: 1-5.
- Chabre, M., Antonny, B., Bruckert, F. et Vuong, T.M. The G protein cascade of visual transduction: kinetics and regulation. *dans* The GTPase Superfamily. Chichester: Wiley, 1993.
- Chabre, M., Bigay, J., Deterre, P. et Pfister, C. Fast termination and adaptation in the cGMP cascade of visual transduction. NATO ASI Series (H). 1987. 6: 225-239.
- Chabre, M. et Deterre, P. Molecular mechanism of visual transduction. European Journal Biochemistry. 1989. 179: 255-266.

- Chabre, M. et Deterre, P. Transducin, rhodopsin, and 3',5'-cyclic GMP phosphodiesterase: typical G-protein-mediated transduction system. *dans* G proteins. San Diego: Academic Press, 1990.
- Chang-Ling, T. Glial, neuronal and vascular interactions in the mammalian retina. *dans* Progress in Retinal Research. vol 13. Great Britain: Pergamon Press, 1994.
- Chen, A.H., Derguini, F., Franklin, P., Hu, S., Nakanishi, K., Silvo, B.R. et Wang, J. The triggering process of visual transduction. Structures and Function of Retinal Proteins. 1992. 221: 243-246.
- Chen, H. et Anderson, R.E. Comparison of uptake and incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids by frog retinas. Current Eye Research. 1992. 12: 851-860.
- Chen, J., Eagle, S.J., Seilhamer, J.J. et Tischfield, J.A. Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight phospholipase A2s containing 16 cysteines. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 23018-23024.
- Chen, S.G. et Murakami, K. Synergistic activation by cis-fatty acid and diacylglycerol of protein kinase C and protein phosphorylation in hippocampal slices. Neuroscience. 1995. 68: 1017-1026.
- Chepenik, K.P., Diaz, A. et Jimenez, S.A. Epidermal growth factor coordinately

- regulates the expression of prostaglandin G/H synthase and cytosolic phospholipase A2 genes in embryonic mouse cells. Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 21786-21792.
- Clark, J.D., Schievella, A.R., Nalefski, E.A. et Lin, L.-L. Cytosolic phospholipase A2. Journal of Lipid Mediators in Cell Signalling. 1995. 12: 83-117.
- Cockcroft, S. G-protein-regulated phospholipases C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. Biochimica et Biophysica Acta. 1992. 1113: 135-160.
- Cohen, G.B., Oprian, D.D. et Robinson, P.R. Mechanism of activation and inactivation of opsin: role of Glu¹¹³ and Lys²⁹⁶. Biochemistry. 1992. 31: 12592-12601.
- Connor, W.E., Neuringer, M. et Reisbick, S. Essential Fatty acids: The importance of *n*-3 fatty acids in the retina and brain. Nutrition Reviews. 1992. 50: 21-29.
- Cook, N.J., Hanke, W. et Kaupp, U.B. Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1987. 84: 585-589.
- Cook, N.J. et Kaupp, U.B. Solubilization, purification, and reconstitution of the sodium-calcium exchanger from bovine retinal rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1988. 263: 11382-11388.

- Cook, N.J., Nullans, G. et Virmaux, N. Interplay between calcium and activated cGMP phosphodiesterase from retinal rod outer segments. Biochimica et Biophysica Acta. 1986. 883: 63-68.
- Cote, R.H., Bownds, M.D. et Arshavsky, V.Y. cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: Role in feedback inhibition of visual transduction. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1994. 91: 4845-4849.
- Cote, R.H. et Brunnock, M.A. Intracellular cGMP concentration in rod photoreceptors is regulated by binding to high and moderate affinity cGMP binding sites. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 17190-17198.
- Cullis, P.R., Hope, M.J., de Kruijff, B., Verkleij, A.J. et Tilcock, C.P.S. Structural properties and functional roles of phospholipids in biological membranes. *dans* Phospholipids and Cellular Regulation. Boca Raton: CRC Press, 1985.
- Cullis, P.R., de Kruijff, B., Hope, M.J., Verkleij, A.J., Nayar, R., Farren, S.B., Tilcock, C., Madden, T.D. et Bally, M.B. Structural properties of lipids and their functional roles in biological membranes. *dans* Membrane Fluidity in Biology. vol. 1. New York: Academic Press Inc., 1983.
- Cupillard, L., Koumanov, K., Mattei, M.G., Lazdunski, M. et Lambeau, G. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. The Journal of Biological Chemistry. 1997. 272:

15745-15752.

Daiger, S.P., Sullivan, L.S. et Rodriguez, J.A. Correlation of phenotype with genotype in inherited retinal degeneration. Behavioral and Brain Sciences. 1995. 18: 452-467.

De Carvalho, M.G.S., Garritano, J. et Leslie, C.C. Regulation of lysophospholipase activity of the 85-kDa phospholipase A2 and activation in mouse peritoneal macrophages. The Journal of Biological Chemistry. 1995. 270: 20439-20446.

Déglon, N., Wilson, A., Desponds, C., Laurent, P., Bron, C. et Fasel, N. Fatty acids regulate Thy-1 antigen mRNA stability in T lymphocyte precursors. European Journal of Biochemistry. 1995. 231: 687-696.

Dekker, C.J., Geurts Van Kessel, W.S.M., Klomp, J.P.G., Pieters, J. et de Kruijff, B. Synthesis and polymorphic phase behaviour of polyunsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines. Chemistry and Physics of Lipids. 1983. 33: 93-106.

De La Paz, M.A. et Anderson, R.E. Lipid peroxidation in rod outer segments: Role of hydroxyl radical and lipid hydroperoxides. Investigative Ophthalmology and Visual Sciences. 1992. 33: 2091-2096.

Delmelle, M. An investigation of retinal as a source of singlet oxygen. Photochemistry and Photobiology. 1978a. 27: 731-734.

- Delmelle, M. Retinal sensitized photodynamic damage to liposomes. Photochemistry and Photobiology. 1978b. 28: 357-360.
- Delmelle, M. Possible implication of photooxidation reactions in retinal photo-damage. Photochemistry and Photobiology. 1979. 29: 713-716.
- Dennis, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 13057-13060.
- Denton, T.L., Yamashita, C.K. et Farber, D.B. The effect of light on cyclic nucleotide metabolism of isolated cone photoreceptors. Experimental Eye Research. 1992. 54: 229-237.
- Dettbarn, C. et Palade, P. Arachidonic acid-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. Biochemical Pharmacology. 1993. 45: 1301-1309.
- Diem, K. et Lentner, C. Scientific Tables. Montréal: CIBA-Geigy Ltd, 1970.
- Dizhoor, A.M., Chen, C.K., Olshevskaya, E., Sinelnikova, V.V., Philipov, P. et Hurley, J.B. Role of the acylated amino terminus of recoverin in Ca^{2+} -dependent membrane interaction. Science. 1993. 259: 829-832.
- Dizhoor, A.M., Ray, S., Kumar, S., Niemi, G., Spencer, M., Brolley, D., Walsh, K.A., Philipov, P.P., Hurley, J.B. et Stryer, L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. Science. 1991. 251: 915-918.

- Doly, M. et Meyniel, G. La transduction rétinienne. Journal de Médecine Nucléaire et Biophysique. 1989. 13: 337-341.
- Domanska-Janik, K. Unsaturated fatty acids induce inhibition of the A₁-adenosine receptor in rat brain membranes. NeuroReport. 1993. 4: 451-453.
- Douglas, C.E., Chan, A.C. et Choy, P.C. Vitamin E inhibits platelet phospholipase A₂. Biochimica et Biophysica Acta. 1986. 876: 639-645.
- Dratz, E.A. et Deese, A.J. The role of docosahexaenoic acid (22:6 ω 3) in biological membranes: examples from photoreceptors and model membrane bilayers. *dans* Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods. New York: Academic Press Inc., 1986.
- Dratz, E.A., Farnsworth, C.C., Loew, E.C., Stephens, R.J., Thomas, D.W. et Van Kuijk, F.J. Products of in vivo peroxidation are present in tissues of vitamin E-deficient rats and dogs. Annals of the New York Academy of Sciences. 1989. 570: 46-60.
- Dreher, Z., Distler, C. et Dreher, B. Vitreal proliferation of filamentous processes in avian Müller cells and its putative functional correlates. The Journal of Comparative Neurology. 1994. 350: 96-108.
- Dudley, P.A., Alligood, J.P. et O'Brien, P.J. Biochemical events related to circadian photoreceptor shedding. *dans* Molecular and Cellular Basis of Visual Acuity. New York: Springer-Verlag Inc., 1984.

- Dufourq, J. Physico-chimie des phospholipides. *dans* Les liposomes. Paris: Lavoisier, 1985.
- Dumke, C.L., Arshavsky, V.Y., Calvert, P.D., Bownds, M.D. et Pugh Jr, E.N. Rod outer segment structure influences the apparent kinetic parameters of cyclic GMP phosphodiesterase. Journal of General Physiology. 1994. 103: 1071-1098.
- Durgerian, S., Bahls, Richmond, J., Doyle, B.T., Larson, D.D. et Haydon, P.G. Roles for arachidonic acid and GTP-binding proteins in synaptic transmission. Journal of Physiology. 1993. 87: 123-137.
- Ehrengruber, M.U., Deranleau, D.A., Kempf, C., Zahler, P. et Lanzrein, M. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids alter membrane potential in PC12 and bovine adrenal chromaffin cells. Journal of Neurochemistry. 1993. 60: 282-288.
- Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. et Moolenaar, W.H. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. Biochemical Journal. 1993. 291: 677-680.
- Eismann, E., Bönigk, W. et Kaupp, U.B. Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. Cell Physiology and Biochemistry. 1993. 3: 332-351.
- Endo, T., Niu, N., Organisciak, D.T., Sato, Y., Kobata, A. et Kean, E.L. Analysis of the oligosaccharide chains of rhodopsin from normal rats and those

with hereditary retinal dystrophy. Experimental Eye Research. 1996. 63: 395-405.

Evequoz-Mercier, V. et Tsacopoulos, M. The light-induced increase of carbohydrate metabolism in glial cells of the honeybee retina is not mediated by K^+ movement nor by cAMP. Journal of General Physiology. 1991. 98: 497-515.

Fahmy, K. et Sakmar, T. Regulation of the rhodopsin-transducin interaction by a highly conserved carboxylic acid group. Biochemistry. 1993. 32: 7229-7236.

Fain, G.L. et Matthews, H.R. Calcium and the mechanism of of light adaptation in vertebrate photoreceptors. Trends in Neurosciences. 1990. 13: 378-384.

Farahbakhsh, Z.T., Hideg, K. et Hubbell, W.L. Photoactivated conformational changes in rhodopsin: A time-resolved spin label study. Science. 1993. 262: 1416-1419.

Farnsworth, C.C. et Dratz, E.A. Oxidative damage of retinal rod outer segment membranes and the role of vitamin E. Biochimica et Biophysica Acta. 1976. 443: 556-570.

Farooqui, A.A. et Horrocks, L.A. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration.

Journal of Neuroscience Research. 1994. 38: 6-11.

Faurobert, E., Otto-Bruc, A., Chardin, P. et Chabre, M. Tryptophan W207 in transducin $T\alpha$ is the fluorescence sensor of the G protein activation switch and is involved in the effector binding. The EMBO Journal. 1993. 12: 4191-4198.

Feeney, L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1978. 17: 583-595.

Feeney, L. The phagolysosomal system of the pigment epithelium. A key to retinal disease. Investigative Ophthalmology. 1973. 12: 635-638.

Feeney-Burns, L. et Berman, E.R. Methods for isolating and fractionating pigment epithelial cells. Methods in Enzymology. 1982. 81: 95-110.

Fisher, S.K., Anderson, D.H., Erickson, P.A., Guérin, C.J., Lewis, G.P. et Linberg, K.A. Light and electron microscopy of vertebrate photoreceptors. *dans* Methods in Neurosciences. vol. 15. San Diego: Academic Press Inc, 1993.

Fishman, M.L., Oberc, M.A., Hess, H.H. et Engel, W.K. Ultrastructural demonstration of calcium in retina, retinal pigment epithelium and choroid. Experimental Eye Research. 1977. 24: 341-353.

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

- Fliesler, S.K. et Anderson, R.E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. Progress in Lipid Research. 1983. 22: 79-131.
- Fung, B.K.K. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits. The Journal of Biological Chemistry. 1983. 258: 10495-10502.
- Fung, B.K.K., Hurley, J.B. et Stryer, L. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1981. 78: 152-156.
- Galkina, S.I., Sud'ina, G.F. et Margolis, L.B. Regulation of intracellular pH by phospholipase A2 and protein kinase C upon neutrophil adhesion to solid substrate. FEBS Letters. 1996. 393: 117-120.
- Gallemore, R.P., Li, J.-D., Govardovskii, V.I. et Steinberg, R.H. Calcium gradients and light-evoked calcium changes outside rods in the intact cat retina. Visual Neuroscience, 1994. 11: 753-761.
- Glaser, K.B., Mobilio, D., Chang, J.Y. et Senko, N. Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. Trends in Pharmacological Sciences. 1993. 14: 92-98.
- Gold, G.H. et Korenbrot, J.I. Light-induced calcium release by intact retinal rods. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1980. 77: 5557-5561.

- Goldman, R., Ferber, E. et Zor, U. Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. FEBS Letters. 1992. 309: 190-192.
- Gong, J., Rosner, B., Rees, D.G., Berson, E.L., Weigel-DiFranco, C.A. et Schaefer, E.J. Plasma docosahexaenoic acid levels in various genetic forms of retinitis pigmentosa. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1992. 33: 2596-2602.
- Gorczyca, W.A., Van Hooser, J.P. et Palczewski, K. Nucleotide inhibitors and activators of retinal guanylyl cyclase. Biochemistry. 1994. 33: 3217-3222.
- Gordon, S.E., Brautigan, D.L. et Zimmerman, A.L. Protein phosphatases modulate the apparent agonist affinity of the light-regulated ion channel in retinal rods. Neuron. 1992. 9: 739-748.
- Gordon, W.C., Rodriguez de Turco, E.B. et Bazan, N.G. Retinal pigment epithelial cells play a central role in the conservation of docosahexaenoic acid by photoreceptor cells after shedding and phagocytosis. Current Eye Research. 1991. 1: 73-83.
- Gorodovikova, E.N. et Philipov, P.P. The presence of a calcium-sensitive p26-containing complex in bovine retina rod cells. FEBS Letters. 1993. 335: 277-279.
- Gorodovikova, E.N., Senin, I.I. et Philipov, P.P. Calcium-sensitive control of rhodopsin phosphorylation in the reconstituted system consisting of

photoreceptor membranes, rhodopsin kinase and recoverin. FEBS Letters. 1994. 353: 171-172.

Gray-Keller, M.P., Biernbaum, M.S. et Bownds, M.D. Transducin activation in electropermeabilized frog rod outer segments is highly amplified, and a portion equivalent to phosphodiesterase remains membrane-bound. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 15323-15332.

Gray-Keller, M.P., Polans, A.S., Palczewski, K. et Detwiler, P.B. The effect of recoverin-like calcium binding proteins on the photoresponse of retinal rods. Neuron. 1993. 10: 523-531.

Gregory, C.L. et Hall, M.O. The phagocytosis of ROS by RPE cells is inhibited by an antiserum to rat RPE cell plasma membranes. Experimental Eye Research. 1992. 54: 843-851.

Groshan, K.R., Norton, J.C., Craft, C.M. et Travis, G.H. Isolation and characterization of a cDNA for mouse retinal phosphducin. Experimental Eye Research. 1993. 57: 253-255.

Gross, R.W. Myocardial phospholipase A2. Journal of Lipid Mediators in Cell Signalling. 1995. 12: 131-137.

Gurevich, V.V. et Benovic, J.L. Visual arrestin interaction with rhodopsin: Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry.

1993. 268: 11628-11638.

Guthridge, C.L., Zimmer, S.G. et Steiner, M.R. Phospholipases A2 in *ras*-transfected fibroblasts. Anticancer Research. 1995. 15: 1957-1962.

Haga, K. et Haga, T. Activation of G protein $\beta\gamma$ subunits of agonist- or light-dependent phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptors and rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 2222-2227.

Hagins, W.A. et Yoshikami, S. A role for calcium in excitation of retinal rods and cones. Experimental Eye Research. 1974. 18: 299-305.

Hakki, S. et Sitaramayya, A. Guanylate cyclase from bovine rod outer segments: Solubilization, partial purification, and regulation by inorganic pyrophosphate. Biochemistry. 1990. 29: 1088-1094.

Hall, M.O. et Abrams, T. Kinetics studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells. Experimental Eye Research. 1987. 45: 907-922.

Hamm, H.E. Molecular interactions between the photoreceptor G protein and rhodopsin. Cellular and Molecular Neurobiology. 1991. 11: 563-577.

Hamm, H.E. et Bownds, M.D. Protein complement of rod outer segments of frog retina. Biochemistry. 1986. 25: 4512-4523.

- Hargrave, P.A. Rhodopsin chemistry, structure and topography. *dans* Progress in Retinal Research. vol. 1. New York: Pergamon Press, 1982.
- Hargrave, P.A. Structure and function of vertebrate rhodopsin. *dans* Structures and Functions of Retinal Proteins. 1992. 221: 51-54.
- Hargrave, P.A. Future directions for rhodopsin structure and function studies. Behavioral and Brain Sciences. 1995. 18: 403-414.
- Hargrave, P.A. et McDowell, J.H. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. The FASEB Journal. 1992. 6: 2323-2331.
- Härtig, W., Grosche, J., Distler, C., Grimm, D., El-Hifnawi, E. et Reichenbach, A. Alterations of Müller (glial) cells in dystrophic retinae of RCS rats. Journal of Neurocytology. 1995. 24: 507-517.
- Hauser, H., Pascher, I., Pearson, R.H. et Sundell, S. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. Biochimica et Biophysica Acta. 1981. 650: 21-51.
- Hayashi, F. et Yamazaki, A. Polymorphism in purified guanylate cyclase from vertebrate rod photoreceptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1991. 88: 4746-4750.
- Heck, M. et Hofmann, K.P. G protein-effector coupling: A real-time light-scat-

tering assay for transducin-phosphodiesterase interaction. Biochemistry. 1993. 32: 8220-8227.

Helmreich, E.J.M. et Elson, E.L. Mobility of proteins and lipids in membranes. *dans* Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research. vol. 18. New York: Raven Press, 1984.

Herrero, I., Miras-Portugal, T. et Sanchez-Pietro, J. Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. Nature. 1992. 360: 163-165.

Hiramitsu, T. et Armstrong, D. Preventive effect of antioxidant on lipid peroxidation in the retina. Ophthalmic Research. 1991. 23: 196-203.

Hofmann, K.P., Pullvermüller, A., Buczylko, J., Van Hooser, P. et Palczewski, K. The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 15701-15706.

Hoffmann, P., Richards, D., Plews, P., Hoffmann-Heinroth, I. et Toraason, M. Arachidonic acid inhibits electrically induced intracellular calcium transients in neonatal rat cardiomyocytes. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1993. 49: 837-838.

Hsu, Y.T. et Molday, R.S. Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin. Nature. 1993. 361: 76-79.

- Hurley, J.B. Molecular properties of the cGMP cascade of the vertebrate photoreceptors. Annual Review of Physiology. 1987. 49: 793-812.
- Hurley, J.B. Recoverin and Ca²⁺ in vertebrate phototransduction. Behavioral and Brain Sciences. 1995. 18: 425-428.
- Hurley, J.B. Signal transduction enzymes of vertebrate photoreceptors. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 1992. 24: 219-226.
- Ichikawa, K. Critical processes which characterize the photocurrent of retinal rod outer segments to flash stimuli. Neuroscience Research. 1994. 19: 201-212.
- Ildefonse, M., Crouzy, S. et Bennett, N. Gating of retinal rod cation channel by different nucleotides: Comparative study of unitary currents. Journal of Membrane Biology. 1992. 130: 91-104.
- Iniguez-Lluhi, J.A., Simon, M.I., Robishaw, J.D. et Gilman, A.G. G protein $\beta\gamma$ subunits synthesized in Sf9 cells: Functional characterization and the significance of prenylation of γ . The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 23409-23417.
- Irvine, R.F. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? Biochemical Journal. 1982. 204: 3-16.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The Nomenclature

of lipids. Chemistry and Physics of Lipids. 1978. 21: 159-173.

Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Presence of a light-independent phospholipase A2 in bovine retina but not in rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 19209-19218.

Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Bovine retinal pigment epithelium contains novel types of phospholipases A2. Biochemical Journal. 1997. 327: 455-460.

Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Phospholipases A2 from rod outer segment-free retinae are different from well-known phospholipases A2. Biochimica et Biophysica Acta. 1998. sous presse.

Jacobson, P.B. et Schrier, D.J. Regulation of CD11b/CD18 expression in human neutrophils by phospholipase A2. The Journal of Immunology. 1993. 151: 5639-5652.

Jain, M.K. et De Haas, G.H. Activation of phospholipase A2 by freshly added lysophospholipids. Biochimica et Biophysica Acta. 1983. 736: 157-162.

Jain, M.K. et Jahagirdar, D.V. Action of phospholipase A2 on bilayers: Effect of fatty acid and lysophospholipid additives on the kinetic parameters. Biochimica et Biophysica Acta. 1985. 814: 313-318.

Jain, M.K., Streb, M., Rogers, J. et De Haas, G.H. Action of phospholipase A2 on

bilayers containing lysophosphatidylcholine analogs and the effect of inhibitors. Biochemical Pharmacology. 1984. 33: 2541-2551.

Jain, M.K., Yu, B.Z. et Kozubek, A. Binding of phospholipase A2 to zwitterionic bilayers is promoted by lateral segregation of anionic amphiphiles. Biochimica et Biophysica Acta. 1989. 980: 23-32.

Jelsema, C.L. Light activation of phospholipase A2 in rod outer segments of bovine retina and its modulation by GTP-binding proteins. The Journal of Biological Chemistry. 1987. 262: 163-168.

Jelsema, C.L. et Axelrod, J. Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the $\beta\gamma$ subunit of transducin and its inhibition by the α subunit. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1987. 84: 3623-3627.

Jung, H. et Remé, C. Light-evoked arachidonic acid release in the retina: illuminance/duration dependence and the effects of quinacrine, mellitin and lithium. Graefe's Archives of Clinical and Experimental Ophthalmology. 1994. 232: 167-175.

Jurivich, D.A., Sistonen, L., Sarge, K.D. et Morimoto, R.I. Arachidonate is a potent modulator of human heat shock gene transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1994. 91: 2280-22284.

Kagan, V.Y., Shvedova, A.A. et Novokov, K.N. Participation of the phospho-

lipases in the "repair" of photoreceptor membranes exposed to peroxide oxidation. Biophysics. 1978. 23: 281-287.

Kagan, V.E., Shvedova, A.A., Novikov, K.N. et Kozlov, Y.P. Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina. Biochimica et Biophysica Acta. 1973. 330: 76-79.

Karpen, J.W., Loney, D.A. et Baylor, D.A. Cyclic GMP-activated channels of salamander retinal rods: Spatial distribution and variation of responsiveness. Journal of Physiology. 1992. 448: 257-274.

Kato, K., Clark, G.D., Bazan, N.G. et Zorumski, C.F. Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. Nature. 1994. 367: 175-179.

Katz, A., Wu, D.Q. et Simon, M.I. Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G-protein activate $\beta 2$ isoform of phospholipase C. Nature. 1992. 360: 686-689.

Katz, M.L. et Gao, C.-L. Vitamin A incorporation into lipofuscin-like inclusions in the retinal pigment epithelium. Mechanisms of Ageing and Development. 1995. 84: 29-38.

Katz, M.L., Stone, W.L. et Dratz, E.A. Fluorescent pigment accumulation in retinal pigment epithelium of antioxidant-deficient rats. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1978. 17: 1049-1058.

- Kaupp, U.B. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. Trends in Neurosciences. 1991. 14: 150-157.
- Kaupp, U.B. et Koch, K.W. Mechanism of photoreception in vertebrate vision. Trends in Biochemical Sciences. 1986. 11: 43-47.
- Kaupp, U.B. et Koch, K.W. Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. Annual Review of Physiology. 1992. 54: 153-175.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bonigk, W., Stuhmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. et Numa, S. Primary structure and functional expression from cDNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. Nature. 1989. 342: 762-766.
- Kawamura, S. Light-sensitivity modulating protein in frog rods. Photochemistry and Photobiology. 1992. 56: 1173-1180.
- Kawamura, S. Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. Nature. 1993. 362: 855-857.
- Kawanura, S. et Murakami, M. Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. Nature. 1991. 349: 420-423.
- Kawata, A., Oishi, T., Fukada, Y., Shichida, Y. et Yoshizawa, T. Photoreceptor

cell types in the retina of various vertebrate species: immunocytochemistry with antibodies against rhodopsin and iodopsin. Photochemistry and Photobiology. 1992. 56: 1157-1166.

Kennedy, C.J., Rakoczy, P.E. et Constable, I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: A review. Eye. 1995. 9: 763-771.

Kinsella, B.T. et O'Mahony, D.J. Lipid modification of G proteins. Trends in Cardiovascular Medicine. 1994. 4: 27-34.

Kisselev, O.G., Ermolaeva, M.V. et Gautam, N. A farnesylated domain in the G protein γ subunit is a specific determinant of receptor coupling. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 21399-21402.

Koch, K.W. Biochemical mechanism of light adaptation on vertebrate photoreceptors. Trends in Biochemical Sciences. 1992a. 17: 307-311.

Koch, K.W. Recovery of the photoresponse in vertebrate photoreceptors: Role of Ca^{2+} -dependent regulation of guanylate cyclase. Structures and Functions of Retinal Proteins. 1992b. 221: 391-394.

Koch, K.W, Eckstein, F. et Stryer, L. Stereochemical course of the reaction catalyzed by guanylate cyclase from bovine retinal rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 9659-9663.

Koch, K.W. et Stryer, L. Highly cooperative feedback control of retinal rod gua-

nylate cyclase by calcium ions. Nature. 1988. 334: 64-66.

Kohnken, R.E., Chafouleas, J.G., Eadie, D.M., Means, A.R. et McConnell, D.G.
Calmodulin in bovine rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1981. 256: 12517-12522.

Krasnovsky, A.A. et Kagan, V.E. Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photoreceptor cells of the cat retina. FEBS Letters. 1979. 108: 152-154.

Kroll, S., Phillips, W.J. et Cerione, R.A. The regulation of the cyclic GMP phosphodiesterase by the GDP-bound form of the α subunit of transducin. The Journal of Biological Chemistry. 1989. 264: 4490-4497.

Kühn, H. Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. Biochemistry. 1978. 17: 4389-4395.

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

Kühn, H. Interactions between photoexcited rhodopsin and light-activated enzymes in rods. *dans* Progress in Retinal Research. vol. 3. New York: Pergamon Press, 1984.

Kühn, H. et Bader, S. The rate of rhodopsin phosphorylation in isolated retinas of frog and cattle. Biochimica et Biophysica Acta. 1976. 428: 13-18.

- Kühn, H., Hall, W. et Wilden, U. Light-induced binding of a 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. FEBS Letters. 1984. 176: 473-478.
- Kühn, H. et Hargrave, P.A. Light-induced binding of guanosine-triphosphatase to bovine photoreceptor membranes: Effect of limited proteolysis of the membranes. Biochemistry. 1981. 20: 2410-2417.
- Kühn, H. et Wilden, U. Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin kinase and arrestin. Journal of Receptor Research. 1987. 7: 283-298.
- Kulkarni, P. Eicosanoids in ocular inflammation. *dans* Lipid Mediators in Eye Inflammation. vol. 5. Basel: Karger, 1990.
- Lagnado, L. et Baylor, D.A. Calcium controls light-triggered formation of catalytically active rhodopsin. Nature. 1994. 367: 273-277.
- Lamb, T.D. Transduction in vertebrate photoreceptors: the roles of cyclic GMP and calcium. Trends in Neurosciences. 1986. 9: 224-228.
- Lamb, T.D. et Pugh Jr, E.N. A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors. Journal of Physiology. 1992b. 449: 719-758.
- Lamb, T.D. et Pugh Jr, E.N. G-protein cascade: gain and kinetics. Trends in Neurosciences. 1992a. 16: 291-298.

- Lambrecht, H.G. et Koch, K.W. Phosphorylation of recoverin, the calcium-sensitive activator of photoreceptor guanylyl cyclase. FEBS Letters. 1991. 294: 207-209.
- Lauritzen, I., Heurteux, C. et Lazdunski, M. Expression of group II phospholipase A2 in rat brain after severe forebrain ischemia and in endotoxic shock. Brain Research. 1994. 651: 353-356.
- Lavoie, C., Jolicoeur, M. et Paiement, J. Accumulation of polyunsaturated free fatty acids coincident with the fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 1991. 1070: 274-278.
- Lee, R.H., Brown, B.M. et Lolley, R.N. Light-induced dephosphorylation of a 33 K protein in rod outer segments of rat retina. Biochemistry. 1984. 23: 1972-1977.
- Lee, R.H., Lieberman, B.S. et Lolley, R.N. A novel complex from bovine visual cells of a 33 000-dalton phosphoprotein with beta- and gamma-transducin: purification and structure determination. Biochemistry. 1987. 26: 3983-3990.
- Lee, R.H., Ting, T.D., Lieberman, B.S., Tobias, D.E., Lolley, R.N. et Ho, Y.K. Regulation of retinal cGMP cascade by phosphducin in bovine rod photoreceptor cells. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 25104-25112.
- Lee, R.H., Whelan, J.P., Lolley, R.N. et McGinnis, J.F. The photoreceptor-speci-

- fic 33 kDa phosphoprotein of mammalian retina: generation of monospecific antibodies and localization by immunocytochemistry. Experimental Eye Research. 1988. 46: 829-840.
- Léger, C.L. Physicochemical approach of the function of the fatty acid incorporation in biological membranes. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1993. 48: 17-21.
- Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers Inc., 1982.
- Lerea, C.L., Stomers, D.E., Hurley, J.B., Kloch, I.B. et Blunt-Milam, A.H. Identification of specific transducin α subunits in retinal rod and cone photoreceptors. Science. 1986. 234: 77-80.
- Liebman, P.A., Parker, K.R. et Dratz., E.A. The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment. Annual Review of Physiology. 1987. 49: 765-791.
- Liebman, P.A. et Pugh Jr, E.N. ATP modulates rapid reversal of cGMP phosphodiesterase activation in visual receptor membranes. Nature. 1980. 287: 634-636.
- Liebman, P.A., Weiner, H.L. et Drzymala, R.E. Lateral diffusion of visual pigment in rod disk membranes. Methods in Enzymology. 1982. 81: 660-668.

- Ligeti, E., Pizon, V., Wittinghofer, A., Gierschik, P. et Jakobs, K.H. GTPase activity of small GTP-binding proteins in HL-60 membranes is stimulated by arachidonic acid. European Journal of Biochemistry. 1993. 276: 813-820.
- Linden, D.J. et Routtenberg, A. *cis*-Fatty acids, which activate protein kinase C, attenuate Na⁺ and Ca²⁺ currents in mouse neuroblastoma cells. Journal of Physiology. 1989. 419: 95-119.
- Lloret, S. et Moreno, J.J. Ca²⁺ influx, phosphoinositide hydrolysis, and histamine release induced by lysophosphatidylserine in mast cells. Journal of Cellular Physiology. 1995. 165: 89-95.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J. et Clapham, D.E. The $\beta\gamma$ -subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. Nature. 1987. 325: 321-326.
- Lolley, R.N. et Lee, R.H. Cyclic GMP and photoreceptor function. The FASEB Journal. 1990. 4: 3001-3008.
- Lundbaek, J.A. et Andersen, O.S. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. Journal of General Physiology. 1994. 104: 645-673.
- Marcus, A.J. et Hajjar, D.P. Vascular transcellular signalling. The Journal of Lipid Research. 1993. 34: 2017-2032.

- Margulis, A., Goraczniack, R.M., Duda, T., Sharma, R.K. et Sitaramayya, A. Structural and biochemical identity of retinal rod outer segment membrane guanylate cyclase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1993. 194: 855-861.
- Marsh, D. CRC Handbook of Lipid Bilayers. Boston: CRC Press, 1990a.
- Marsh, D. Lipid-protein interactions in membranes. FEBS Letters. 1990b. 268: 371-375.
- Marshall, L.A., Bolognese, B., Winkler, J.D. et Roshak, A. Depletion of human monocyte 85-kDa phospholipase A2 does not alter leukotriene formation. The Journal of Biological Chemistry. 1997. 272: 759-765.
- Mättig, W.U. et Hanitzsch, R. Measurements of the extracellular potassium concentrations in the isolated retina with different kinds of potassium-sensitive electrodes. Journal of Neuroscience Methods. 1991. 40: 127-132.
- Mayer, R.J. et Marshall, L.A. New insights on mammalian phospholipase A2(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes. The FASEB Journal. 1993. 7: 339-348.
- Mayorga, L.S., Colombo, M.I., Lenhartz, M., Brown, E.J., Rahman, K.H., Weiss, R., Lennon, P.J. et Stahl, P.D. Inhibition of endosome fusion by phospholipase A2 (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1993. 90: 10255-10259.

Mazzoni, M.R. et Hamm, H.E. Tryptophan²⁰⁷ is involved in the GTP-dependent conformational switch in the α subunit of the G protein transducin: Chymotryptic digestion patterns of the GTP γ S and GDP-bound forms. Journal of Protein Chemistry. 1993. 12: 215-221.

McLaughlin, B.J., Cooper, N.G.F. et Shepherd, V.L. How good is the evidence to suggest that phagocytosis of ROS by RPE is receptor mediated? *dans* Progress in Retinal and Eye Research. vol. 1. Great Britain: Pergamon Press Ltd, 1994.

McLean, L.R., Hagaman, K.A. et Davidson, W.S. Role of lipid structure in the activation of phospholipase A2 by peroxidized phospholipids. Lipids. 1993. 28: 505-509.

McMurchie, E.J. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function. *dans* Physiological Regulation of Membrane Fluidity. vol. 3. New York: Alan R. Liss Inc., 1988.

McNaughton, P.A., Cervetto, L. et Nunn, B.J. Measurement of the intracellular free calcium concentration in salamander rods. Nature. 1986. 322: 261-263.

Meskini, N., Nemoz, G., Chapuy, P., Haond, P., Pageaux, J.F., Vericel, E., Lagar-

de, M. et Prigent, A.F. Glutathione peroxidase activity and metabolism of arachidonic acid in peripheral blood mononuclear cells from elderly subjects. Clinical Sciences. 1993. 85: 203-211.

Miljanich, G.P. Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane. Thèse, University of California, Santa Cruz, 1978.

Miljanich, G.P. et Dratz, E.A. Fatty acid composition and pairing in phospholipids of rod outer segments. Methods in Enzymology. 1982. 81: 806-813.

Miller, D. The photochemistry of life and cell death: A philosophical overview. *dans* Clinical Light Damage to the Eye. New York: Springer-Verlag, 1987.

Miller, J.L. et Korenbrot, J.I. Kinetics of light-dependent Ca^{2+} fluxes across the plasma membrane of rod outer segments: a dynamic model of the regulation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. Journal of General Physiology. 1987. 90: 397-425.

Miller, J.L. et Korenbrot, J.I. Phototransduction and adaptation in rods, single cones, and twin cones of the striped bass retina: A comparative study. Visual Neuroscience. 1993. 10: 653-667.

Mitchell, D.C., Straume, M. et Litman, B.J. Role of *sn*-1-saturated, *sn*-2-polyunsaturated phospholipids in control of membrane receptor conformational equilibrium: Effects of cholesterol and acyl chain unsaturation on the

- metarhodopsin I \leftrightarrow metarhodopsin II equilibrium. Biochemistry. 1992. 31: 662-670.
- Miyachi, E., Kato, C. et Nakaki, T. Arachidonic acid blocks gap junctions between retinal horizontal cells. NeuroReport. 1994. 5: 485-488.
- Moench, S.J., Moreland, J., Stewart, D.H., Dewey, T.G. Fluorescence studies of the location and membrane accessibility of the palmitoylation sites of rhodopsin. Biochemistry. 1994a. 33: 5791-5796.
- Moench, S.J., Terry, C.E. et Dewey, T.G. Fluorescence labeling of the palmitoylation sites of rhodopsin. Biochemistry. 1994b. 33: 5783-5790.
- Molday, R.S. et Hsu, Y.T. The cGMP-gated channel of photoreceptor cells: Its structural properties and role in phototransduction. Behavioral and Brain Sciences. 1995. 18: 441-451.
- Molday, R.S., Reid, D.M., Connel, G. et Molday, L.L. Molecular properties of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells as probed with monoclonal antibodies. *dans* Signal Transduction in Photoreceptor Cells. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- Morgan, A., Roth, D., Martin, H., Aitken, A. et Burgoyne, R.D. Identification of cytosolic protein regulators of exocytosis. Biochemical Society Transactions. 1993. 21: 401-405.

- Morin, C., Langlais, J. et Lambert, R.D. Possible implication of lysophosphatidylcholine in cell fusion accompanying implantation in rabbits. Journal of Reproduction and Fertility. 1992. 96: 827-936.
- Morrison, D.F., O'Brien, P.J. et Pepperberg, D.R. Depalmitoylation with hydroxylamine alters the functional properties of rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry. 1991. 266: 20118-20123.
- Mouritsen, O.G. et Bloom, M. Models of lipid-protein interactions in membranes. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structures. 1993. 22: 145-171.
- Mukherjee, A.B., Cordella-Miele, E. et Miele, L. Regulation of extracellular phospholipase A2 activity: Implications for inflammatory diseases. DNA and Cell Biology. 1992. 11: 233-243.
- Murakami, M., Kudo, I. et Inoue, K. Secretory phospholipases A2. Journal of Lipid Mediators in Cell Signalling. 1995. 12: 119-130.
- Murakami, M., Kudo, I. Umeda, M., Matsuzawa, A., Takeda, M., Komada, M., Fujimori, Y., Takahashi, K. et Inoue, K. Detection of three distinct phospholipases A2 in cultured mast cells. The Journal of Biochemistry (Tokyo). 1992. 111: 175-181.
- Nagao, S., Yamazaki, A. et Bitensky, M.W. Calmodulin and calmodulin binding proteins in amphibian rod outer segments. Biochemistry. 1987. 26:

1659-1665.

Nakatani, K. et Yau, K.W. Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-activated conductance studied in a truncated rod outer segment of the toad. Journal of Physiology. 1988. 395: 731-742.

Neubert, T.A., Johnson, R.S., Hurley, J.B. et Walsh, K.A. The rod transducin α subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 18274-18277.

Nevalainen, T.J. Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases. Clinical Chemistry. 1993. 39: 2453-2459.

Nicholls, D.G. A retrograde step forward. Nature. 1992. 360: 106-107.

Nicoll, D.A. et Applebury, M.L. Purification of the bovine rod outer segment $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. The Journal of Biological Chemistry. 1989. 264: 16207-16213.

Niebylski, C.D. et Salem, N. Jr. A calorimetric investigation of a series of mixed-chain polyunsaturated phosphatidylcholines: Effects of *sn*-2 chain length and degree of unsaturation. Biophysical Journal. 1994. 67: 2387-2393.

Nunez, E.A. Free fatty acids as modulators of the steroid hormone message. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1993. 48: 63-70.

- O'Brien, P.J. Rhodopsin: A light-sensitive membrane glycoprotein. *dans Receptors and Recognition*. vol. 6. London: Chapman and Hall, 1978.
- Ohguro, H., Fukada, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Yoshizawa, T. et Akino, T. Carboxyl methylation and farnesylation of transducin γ -subunit synergistically enhance its coupling with metarhodopsin II. *The EMBO Journal*. 1991. 10: 3669-3674.
- Ohguro, H., Palczewski, K., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. et Johnson, R.S. Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry*. 1993. 32: 5718-5724.
- Olive, J. The structural organization of mammalian retinal disk membrane. *International Review of Cytology*. 1980. 64: 107-169.
- Olson, A. et Pugh Jr, E.N. Diffusion coefficient of cyclic GMP in salamander rod outer segments estimated with two fluorescent probes. *Biophysical Journal*. 1993. 65: 1335-1352.
- Ordway, R.W., Walsh, J.V. Jr. et Singer, J.J. Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science*. 1989. 244: 1176-1179.
- Ordway, R.W., Singer, J.J. et Walsh, J.V. Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends in Neurosciences*. 1991. 14. 96-100.

- Orzalesi, N. et Staurenghi, G. Structure and function of RPE. *dans* Retinal Pigment Epithelium. Berkeley: Kugler & Ghedeni Publications, 1989.
- Otto-Bruc, A., Antonny, B., Vuong, T.M., Chardin, P. et Chabre, M. Interaction between the retinal cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor and transducin: Kinetics and affinity studies. Biochemistry. 1993. 32: 8636-8645.
- Pagès, F., Deterre, P. et Pfister, C. Enhanced GTPase activity of transducin when bound to cGMP phosphodiesterase in bovine retinal rods. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 22018-22021.
- Pagès, F., Deterre, P. et Pfister, C. Enhancement by phosphodiesterase subunits of the rate of GTP hydrolysis by transducin in bovine retinal rods. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 26358-26364.
- Palczewski, K. et Benovic, J.L. G-protein-coupled receptor kinases. Trends in Biochemical Sciences. 1991. 16: 387-391.
- Palczewski, K., McDowell, J.H. et Hargrave, P.A. Purification and characterization of rhodopsin kinase. The Journal of Biological Chemistry. 1988. 263: 14067-14073.
- Palczewski, K., Rispoli, G. et Detwiler, P.B. The influence of arrestin (48K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction. Neuron. 1992. 8: 117-126.

- Papac, D.I., Oatis Jr, J.E., Crouch, R.K. et Knapp, D.R. Mass spectrometric identification of phosphorylation sites in bleached bovine rhodopsin. Biochemistry. 1993. 32: 5930-5934.
- Papermaster, D.S. et Dreyer, W.J. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. Biochemistry. 1974. 13: 2438-2444.
- Peitsch, M.C., Borner, C. et Tschopp, J. Sequence similarity of phospholipase A2 activating protein and the G protein β -subunits: a new concept of effector protein activation in signal transduction? Trends in Biochemical Sciences. 1993. 18: 292-293.
- Pepperberg, D.R. et Okajima, T.L.L. Hydroxylamine-dependent inhibition of rhodopsin phosphorylation in the isolated retina. Experimental Eye Research. 1992. 54: 369-376.
- Perez-Sala, D., Tan, E.W., Canada, F.J. et Rando, R.R. Methylation and demethylation reactions of guanine nucleotide-binding proteins of retinal rod outer segments. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1991. 88: 3043-3046.
- Peteanu, L.A., Schoenlein, R.W., Wang, Q., Mathies, R.A. et Shank, C.V. The first steps in vision occurs in femtoseconds: Complete blue and red spectral studies. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1993. 90: 11762-11766.

- Petit, K., De Block, J. et De Potter, W. Isolation and characterization of a cytosolic phospholipase A2 from bovine adrenal medulla. Journal of Neurochemistry. 1995. 64: 139-146.
- Petit, K., Miserez, B., DeBlock, J., Van Dessel, G. et De Potter, W. The presence of phospholipase A2 in bovine adrenal medulla: arguments for more than one type of phospholipase A2. Biochimica et Biophysica Acta. 1992. 1125: 150-156.
- Pfister, C., Bennet, N., Bruckert, F., Catty, P., Clerc, A., Pages, F. et Deterre, P. Interactions of a G-protein with its effector: transducin and cGMP phosphodiesterase in retinal rods. Cellular Signalling. 1993. 5: 235-251.
- Phillips, W.J. et Cerione, R.A. Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin- $\beta\gamma$ subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 17032-17039.
- Phillips, W.J., Wong, S.C. et Cerione, R.A. Rhodopsin/transducin interactions. II. Influence of the transducin- $\beta\gamma$ subunit complex on the coupling of the transducin- α subunit to rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 17040-17046.
- Portilla, D. et Dai, G. Purification of a novel calcium-independent phospholipase A2 from rabbit kidney. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 15451-15457.

- Praml, C., Savelyeva, L., Le Paslier, D., Siracusa, L.D., Buchberg, A.M., Schwab, M. et Amler, L.C. Human homologue of a candidate for the *mom1* locus, the secretory type II phospholipase A2 (PLA2S-II), maps to 1p35-36.1/D1S199. Cancer Research. 1995. 55: 5504-5506.
- Prasad, A.V.K., Plantner, J.J. et Kean, E.L. Effect of enzymatic deglycosylation on the regenerability of bovine rhodopsin. Experimental Eye Research. 1992. 54: 913-920.
- Pronin, A.N. et Gautam, N. Proper processing of a G protein γ subunit depends on complex formation with a β subunit. FEBS Letters. 1993. 328: 89-93.
- Pruzanski, W. et Vadas, P. Phospholipase A2: a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. Immunology Today. 1991. 12: 143-146.
- Puertas, F.J., Diaz-Llopis, M., Chipont, E., Roma, J., Raya, A. et Romero, F.J. Glutathione system of human retina: enzymatic conjugation of lipid peroxidation products. Free Radicals in Biology and Medicine. 1993. 14: 549-551.
- Pugh Jr, E.N. The nature and identity of the internal excitational transmitter of vertebrate phototransduction. Annual Review of Physiology. 1987. 49: 715-741.
- Pugh Jr, E.N. et Lamb, T.D. Amplification and kinetics of the activation steps in

phototransduction. Biochimica et Biophysica Acta. 1993. 1141: 111-149.

Pugh Jr, E.N. et Lamb, T.D. Cyclic GMP and calcium: The internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors. Vision Research. 1990. 30: 1923-1948.

Pulvermüller, A., Palczewski, K. et Hofmann, K.P. Interaction between photoactivated rhodopsin and its kinase: Stability and kinetics of complex formation. Biochemistry. 1993. 32: 14082-14088.

Rakoczy, P.E., Baines, M., Kennedy, C.J. et Constable, I.J. Correlation between autofluorescent debris accumulation and the presence of partially processed forms of cathepsin D in cultured retinal pigment epithelial cells challenged with rod outer segments. Experimental Eye Research. 1996. 63: 159-167.

Ramirez, F. et Jain, M.K. Phospholipase A2 at the bilayer interface. Proteins. 1991. 9: 229-239.

Rarick, H.M., Artemyev, N.O. et Hamm, H.E. A site on rod G protein α subunit that mediates effector activation. Science. 1992. 256: 1031-1033.

Ratto, G.M., Payne, R., Owen, W.G. et Tsien, R.Y. The concentration of cytosolic free calcium in vertebrate rod outer segments measured with Fura-2. The Journal of Neuroscience. 1988. 8: 3240-3246.

- Rayer, B., Naynert, M. et Stieve, H. Phototransduction: Different mechanisms in vertebrates and invertebrates. Journal of Photochemistry and Photobiology. 1990. 7: 107-148.
- Raymond, S.M. et Jackson, I.J. The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina. Current Biology. 1995. 5: 1286-1295.
- Reeves, J.P. Molecular aspects of sodium-calcium exchange. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1992. 292: 320-334.
- Reid, D.M., Friedel, U., Molday, R.S. et Cook, N.J. Identification of the sodium-calcium exchanger as the major ricin-binding glycoprotein of bovine rod outer segments and its localization to the plasma membrane. Biochemistry. 1990. 29: 1601-1607.
- Reinboth, J.J., Clausen, M. et Remé, C.E. Light elicits the release of docosahexaenoic acid from membrane phospholipids in the rat retina in vitro. Experimental Eye Research. 1996. 63: 277-284.
- Remé, C., Reinboth, J., Clausen, M. et Hafezi, F. Light damage revisited: converging evidence, diverging views? Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 1996. 234: 2-11.
- Rispoli, G., Sather, W.A. et Detwiler, P.B. Visual transduction in dialyzed detached rod outer segments from lizard retina. Journal of Physiology. 1993.

465: 513-537.

Robinson, W.G. Jr, Kuwabara, T. et Bieri, J.G. Vitamin E deficiency and the retina: Photoreceptor and pigment epithelial changes. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1979. 18: 683-690.

Rodorf, G., Uemura, Y. et Bonventre, J.V. Characterization of phospholipase A2 (PLA2) activity in gerbil brain: enhanced activities of cytosolic, mitochondrial, and microsomal forms after ischemia and reperfusion. The Journal of Neurosciences. 1991. 11: 1829-1836.

Rodriguez de Turco, E.B., Gordon, W.C. et Bazan, N.G. Rapid and selective uptake, metabolism, and cellular distribution of docosahexaenoic acid among rod and cone photoreceptor cells in the frog retina. The Journal of Neurosciences. 1991. 11: 3667-3678.

Rotstein, N.P., Avelano, M.I., Barrantes, F.J. et Politi, L.E. Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors in vitro. Journal of Neurochemistry. 1996. 66: 1851-1859.

Rose, M.I., Deems, R.A., Jesaitis, A.J., Dennis, E.A. et Ulevitch, R.J. Phospholipase activities of the P388D₁ macrophage-like cell line. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1985. 238: 247-258.

Ross, B.M., Kim, D.K., Bonventre, J.V. et Kish, S.J. Characterization of a novel phospholipase A2 activity in human brain. Journal of Neurochemistry.

1995. 64: 2213-2221.

Rottenberg, H. et Hashimoto, K. Fatty acids uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. Biochemistry. 1986. 25: 1747-1755.

Rustenbeck, I. et Lenzen, S. Effect of lysophospholipids, arachidonic acid and other fatty acids on regulation of Ca^{2+} -transport in permeabilized pancreatic islets. Cell Calcium. 1992. 13: 193-202.

Salem Jr, N., Kim, H.K. et Yergey, J.A. Docosahexaenoic acid: Membrane function and metabolism. *dans* Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods. New York: Academic Press Inc., 1986.

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

Schafer, W.R. et Rine, J. Protein prenylation: Genes, enzymes, targets, and functions. Annual Review of Genetics. 1992. 30: 209-237.

Scherer, G.F.E., Hecker, D. et Müller, J. Ca^{2+} ions and lysophospholipids activate phosphorylation of different proteins in plasma membranes and tonoplast. Journal of Plant Physiology. 1993. 142: 425-431.

Schnetkamp, P.P.M. Na^+ - Ca^{2+} or Na^+ - Ca^{2+} - K^+ exchange in rod photoreceptors. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 1989. 54: 1-29.

- Schnetkamp, P.P.M. et Szerencsei, R.T. Intracellular Ca^{2+} sequestration and release in intact bovine retinal rod outer segments: Role in inactivation of Na^+ - Ca^{2+} - K^+ exchange. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 12449-12457.
- Schoenlein, M.I., Stratman, M.P. et Gautam, N. The first step in vision: femto-second isomerization of rhodopsin. Science. 1991. 254: 412-414.
- Schröder, W.H. et Fain, G.L. Light-dependent calcium release from photoreceptors measured by laser micro-mass analysis. Nature. 1984. 309: 268-270.
- Sehran, C.N. Lipoxin synthesis and its impact in inflammatory and vascular events. Biochimica et Biophysica Acta. 1994. 1212: 1-25.
- Sevanian, A. Phospholipase A2: A secondary membrane antioxidant. *dans* Lipid Peroxidation in Biological Systems. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1987.
- Sevanian, A. Lipid peroxidation, membrane damage, and phospholipase A2 action. *dans* Cellular Antioxidant Defense Mechanisms. vol. 1. Boca Raton: CRC Press Inc., 1988.
- Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S.F. et Montestruque, S. The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1983. 223: 441-452.

- Sevanian, A., Wratten, M.L., McLeod, L.L. et Kim, E. Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. Biochimica et Biophysica Acta. 1988. 961. 316-327.
- Shechter, E. Biochimie des membranes: Aspects structuraux et fonctionnels. Paris: Masson, 1993.
- Shichi, H. Biochemistry of vision. New York: Academic Press, 1983.
- Shichi, H. Molecular biology of vision. *dans* Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. New York: Raven Press Ltd, 1994.
- Sitaramayya, A., Marala, R.B., Hakki, S. et Sharma, R.K. Interactions of nucleotide analogues with rod outer segment guanylate cyclase. Biochemistry. 1991. 30: 6742-6747.
- Slomiany, A., Grzelinska, E., Kasinathan, C., Yamaki, K.-I., Palecz, D. et Slomiany, B. Function of intracellular phospholipase A2 in vectorial transport of apoproteins from ER to Golgi. International Journal of Biochemistry. 1992. 9: 1397-1406.
- Slotbloom, A.J., Verheij, H.M. et de Haas, G.H. On the mechanism of phospholipase A2. *dans* Phospholipids. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982.

- Smith, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. Biochemical Journal. 1989. 259: 315-324.
- Soubeyrand, S., Khadir, A., Brindle, Y. and Manjunah, P. Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. The Journal of Biological Chemistry. 1997. 272: 222-227.
- Spence, A.P. et Mason, E.B. Anatomie et physiologie: une approche intégrée. Montréal: Éditions du Renouveau Inc., 1983.
- Stafford, R.E., Zhang, Y.-Y., Deems, R.A. et Dennis, E.A. Kinetic analysis and substrate specificity of a lysophospholipase from the macrophage-like cell line P388D₁. Biochimica et Biophysica Acta. 1993. 1167: 43-48.
- Steinberg, R.H., Fisher, S.K. et Anderson, D.H. Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. The Journal of Comparative Neurology. 1980. 190: 501-518.
- Stephens, R.J., Negi, D.S., Short, S.M., Van Kuijk, F.J., Dratz, E.A. et Thomas, D.W. Lipid peroxidation and retinal phototoxic degeneration. Basic Life Sciences. 1988. 49: 283-289.
- Stephenson, D.T., Manetta, J.V., White, D.L., Chiou, X.G., Cox, L., Gitter, B., May, P.C., Sharp, J.D., Kramer, R.M. et Clemens, J.A. Calcium-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) is expressed in human brain astrocytes. Brain Research. 1994. 637: 97-105.

- Stiemke, M.M. et Hollyfield, J.G. Outer segment disc membrane assembly in the absence of the pigment epithelium: the effects of exogenous sugars. Developmental Brain Research. 1994. 80: 285-289.
- Stinson, A.M., Wiegand, R.D. et Anderson, R.E. Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency. Journal of Lipid Research. 1991. 32: 2009-2017.
- Stone, W.L., Katz, M.L., Lurie, M., Marmor, M.F. et Dratz, E.A. Effects of dietary vitamin E and selenium on light damage to the rat retina. Photochemistry and Photobiology. 1979. 29: 725-730.
- Stryer, L. Cyclic GMP cascade of vision. Annual Review of Neuroscience. 1986. 9: 87-119.
- Stryer, L. Visual excitation and recovery. The Journal of Biological Chemistry. 1991. 266: 10711-10714.
- Stryer, L. et Bourne, H.R. G-proteins: A family of signal transducers. Annual Review of Cell Biology. 1986. 2: 391- 419.
- Stubbs, C.D. et Smith, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. Biochimica et Biophysica Acta. 1984: 89-137.
- Sumida, C., Graber, R. et Nunez, E. Role of fatty acids in signal transduction:

- Modulators and messengers. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1993. 48: 117-122.
- Takemoto, D.J., Gonzalez, K., Udovichenko, I. et Cunnick, J. Cyclic GMP-regulated nucleotide phosphodiesterases. *dans* Cellular Signalling. Great Britain: Pergamon Press, 1993.
- Tan, K.H., Meyer, D.J., Belin, J. et Ketterer, B. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione and glutathione transferases B et AA: Role of endogenous phospholipase A2. Biochemical Journal. 1984. 220: 243-252.
- Tang, J., Kriz, R.W., Wolfman, N., Shaffer, M., Sehra, J. et Jones, S.S. A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. The Journal of Biological Chemistry. 1997. 272: 8567-8575.
- Taussig, R., Quarmby, L.M. et Gilman, A.G. Regulation of purified type-I and type-II adenylylcyclases by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 9-12.
- Taylor, A., Jacques, P.F. et Dorey, C.K. Oxidation and ageing: Impact on vision. Toxicology and Industrial Health. 1993. 9: 349-371.
- Tebbey, P.W. et Buttke, T.M. Arachidonic acid regulates unsaturated fatty acid synthesis in lymphocytes by inhibiting stearoyl-CoA desaturase gene expression. Biochimica et Biophysica Acta. 1992. 1171: 27-34.

- Tew, D.G., Southan, C., Rice, S.Q., Lawrence, M.P., Li, H., Boyd, H.F., Moores, K., Gloger, I.S. et MacPhee, C.H. Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 1996. 16: 591-599.
- Thompson, F.J. et Clark, M.A. Purification of a phosphatidic-acid-hydrolyzing phospholipase A2 from rat brain. Biochemical Journal. 1995. 306. 305-309.
- Thorgeirsson, T.E., Lewis, J.W., Wallace-Williams, S.E. et Kliger, D.S. Photolysis of rhodopsin results in deprotonation of its retinal Schiff's base prior to formation of metarhodopsin II. Photochemistry and Photobiology. 1992. 56: 1135-1144.
- Tocanne, J.F. et Teissié, J. Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. Biochimica et Biophysica Acta. 1990. 1031: 111-142.
- Tomaska, L. et Resnick, R.J. Suppression of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase activity by unsaturated fatty acids. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 5317-5322.
- Toniato, E., Flati, V., Cifone, M.G., Del Grosso, E., Roncaioli, P., Cilenti, L., Tessitore, A., Lista, F., Frati, L., Gulino, A. et Martinotti, S. Involvement of an arachidonic-acid-dependent pathway in the interferon- β -mediated ex-

- pression of C202 gene in Ehrlich-ascites-tumor cells. European Journal of Biochemistry. 1996. 235: 91-96.
- Torre, V., Ashmore, J.F., Lamb, T.D. et Menini, A. Transduction and adaptation in sensory receptor cells. The Journal of Neuroscience. 1995. 15: 7757-7768.
- Torre, V., Forti, S., Menini, A. et Campani, M. Model of phototransduction in retinal rods. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1990. 55: 563-573.
- Treen, M., Uauy, R.D., Jameson, D.M., Thomas, V.L. et Hoffman, D.R. Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1992. 2: 564-570.
- Tsuboi, S., Matsumoto, H., Jackson, K.W., Tsujimoto, K., Williams, T. et Yamazaki, A. Phosphorylation of an inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase in *Rana catesbiana* rod photoreceptors. I. Characterization of the phosphorylation. The Journal of Biological Chemistry. 1994a. 269: 15016-15023.
- Tsuboi, S., Matsumoto, H. et Yamazaki, A. Phosphorylation of an inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase in *Rana catesbiana* rod photoreceptors. II. A possible mechanism for the turnoff of cGMP phosphodiesterase without GTP hydrolysis. The Journal of Biological Chemistry. 1994b.

269: 15024-15029.

Upreti, G.C. et Jain, M.K. Action of phospholipase A2 on unmodified phosphatidylcholine bilayers: Organizational defects are preferred sites of action. Journal of Membrane Biology. 1980. 55: 113-121.

Van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. et Moolenaar, W.H. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: Identification and dissection of signalling pathways mediated by G proteins. Cell. 1989. 59: 45-54.

Van Den Berg, J.J.M., Op Den Kamp, J.A., Lubin, B.H. et Kuypers, F.A. Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: A monolayer study. Biochemistry. 1993. 32: 4962-4967.

Van Den Bosch, H. Intracellular phospholipases A. Biochimica et Biophysica Acta. 1980. 604: 191-246.

Van Den Bosch, H. Phospholipases. *dans* Phospholipids. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982.

Van Kuijk, F.J.G.M., Handelman, G.J. et Dratz, E.A. Consecutive action of phospholipase A2 and glutathione peroxidase is required for reduction of phospholipid hydroperoxides and provides a convenient method to determine peroxide values in membranes. Journal of Free Radicals in Biology and Medicine. 1985. 1:421-427.

- Van Kuijk, F.J., Holte, L.L. et Dratz, E.A. 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosahexaenoic acid. Biochimica et Biophysica Acta. 1990. 1043: 116-118.
- Van Kuijk, F.J.G.M., Sevanian, A., Handelman, G.J. et Dratz, E.A. A new role for phospholipase A2: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. Trends in Biochemical Sciences. 1987. 12: 31-34.
- Varma, S.D. et Richards, R.D. Visual disorders and oxidative reactions. *dans* Cellular Antioxidant Defense Mechanisms. Boca Raton: CRC Press Inc., 1988.
- Verheij, H.M., Slotbloom, A.J. et de Haas, G.H. Structure and function of phospholipase A2. Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 1981. 91: 91-203.
- Villaroel, A. Suppression of neuronal potassium A-current by arachidonic acid. FEBS Letters. 1993. 335: 184-188.
- Voet, D. et Voet, J.G. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.
- Volterra, A., Trotti, D., Gambino, G. et Racagni, G. Convergent inhibition of glutamate uptake by arachidonic acid and oxygen free radicals: Molecular mechanisms and relevance to neurodegenerative pathologies. *dans* Recent Advances in the Treatment of Neurodegenerative Disorders and Cognitive Dysfunction. Basel: Karger Press, 1994.

- Vuong, T.M., Chabre, M. et Stryer, L. Millisecond activation of transducin in the cyclic nucleotide cascade of vision. Nature. 1984. 311: 659-661.
- Vuong, T.M. et Chabre, M. Deactivation kinetics of the transduction cascade of vision. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1991. 88: 9813-9817.
- Wang, N., Wiegand, R.D. et Anderson, R.E. Uptake of 22-carbon fatty acids into rat retina and brain. Experimental Eye Research. 1992. 54: 933-939.
- Weglicki, W.B., Dickens, B.F. et Mak, T. Enhanced lysosomal phospholipid degradation and lysophospholipid production due to free radicals. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1984. 124: 229-235.
- Weitz, C.J. et Nathans, J. Rhodopsin activation: Effects on the metarhodopsin I-metarhodopsin II equilibrium of neutralization or introduction of charged amino acids within putative transmembrane segments. Biochemistry. 1993. 32: 14176-14182.
- Wensel, T.G. et Stryer, L. Activation mechanism of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase probed by fluorescein-labeled inhibitory subunit. Biochemistry. 1990. 29: 2155-2161.
- Wessling-Resnick, M. et Johnson, G.L. Allosteric behavior in transducin activation mediated by rhodopsin: Initial rate analysis of guanine nucleotide exchange. The Journal of Biological Chemistry. 1987. 262: 3697-3705.

- Wheeler, G.L. et Bitensky, M.W. A light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors: regulation of light-activated cyclic GMP phosphodiesterase. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1977. 74: 4238-4242.
- Wiegand, R.D. et Anderson, R.E. Neutral lipids of frog and rat rod outer segments. Experimental Eye Research. 1983a. 36: 389-396.
- Wiegand, R.D. et Anderson, R.E. Phospholipid molecular species of frog rod outer segment membranes. Experimental Eye Research. 1983b. 37: 159-173.
- Wiegand, R.D., Giusto, N.M., Rapp, L.M. et Anderson, R.E. Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1983. 24: 1433-1435.
- Wilden, U., Hall, S.W. et Kühn, H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1986a. 83: 1174-1178.
- Wilden, U., Wust, E., Weyand, I. et Bitensky, M.W. Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin. FEBS Letters. 1986b. 207: 292-295.

- Wilhelm, M., Straznicky, C. et Gabriel, R. Neuron-specific enolase-like immunoreactivity in the vertebrate retina: selective labelling of Müller cells in Anura. Histochemistry. 1992. 98: 243-252.
- Wood, J.N. Essential fatty acids and their metabolites in signal transduction. Biochemical Society Transactions. 1990. 18: 785-786.
- Wu, S.M. Synaptic transmission in the outer retina. Annual Review of Physiology. 1994. 56: 141-168.
- Wu, G.S., Sevanian, A. et Rao, N.A. Detection of retinal lipid hydroperoxides in experimental uveitis. Free Radicals in Biology and Medicine. 1992. 12: 19-27.
- Xing, M., Miele, L. et Mukherjee, A.B. Arachidonic acid release from NIH 3T3 cells by group-I phospholipase A2: Involvement of a receptor-mediated mechanism. Journal of Cellular Physiology. 1995. 165: 566-575.
- Yamazaki, A., Bitensky, M.W. et Garcia-Sainz, J.A. The GTP-binding protein of rod outer segments. II. An essential role for Mg²⁺ in signal transduction. The Journal of Biological Chemistry. 1987a. 262: 9324-9331.
- Yamazaki, A., Hayashi, F., Tatsumi, M., Bitenski, M.W. et George, J.S. Interaction between the subunits of transducin and cyclic GMP phosphodiesterase in *Rana Catesbiana* rod photoreceptors. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 11539-11548.

- Yamazaki, A., Stein, P.J., Chernoff, N. et Bitensky, M.W. Activation mechanism of rod outer segment cyclic GMP phosphodiesterase: Release of inhibitor by the GTP/GTP-binding protein. The Journal of Biological Chemistry. 1983. 258: 8188-8194.
- Yamazaki, A., Tatsumi, M., Torney, D.C. et Bitensky, M.W. The GTP-binding protein of rod outer segments. I. Role of each subunit in the hydrolytic cycle. The Journal of Biological Chemistry. 1987b. 262: 9316-9323.
- Yamazaki, A., Yamazaki, M., Tsuboi, S., Kishigami, A., Umbarger, K.O., Hutson, L.D., Madland, W.T. et Hayashi, F. Regulation of G protein function by an effector in GTP-dependent signal transduction: An inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase inhibits GTP hydrolysis by transducin in vertebrate photoreceptors. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 8899-8907.
- Yan, M., Manor, D., Weng, G., Chao, H., Rothberg, L., Jedju, T.M., Alfano, R.R. et Callender, R.H. Ultrafast spectroscopy of the visual pigment rhodopsin. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1991. 88: 9809-9812.
- Yarfitz, S. et Hurley, J.B. Transduction mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 14329-14332.
- Yau, K.W. Cyclic nucleotide-gated channels: An expanding new family of ion

- channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1994. 91: 3481-3483.
- Yau, K.W. et Nakatani, K. Electrogenic Na⁺-Ca²⁺ exchange in retinal rod outer segment. Nature. 1984. 311: 661-663.
- Yau, K.-W., et Nakatani, K. Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment. Nature. 1985. 313: 579-587.
- Yee, R. et Liebman, P.A. Light-activated phosphodiesterase of the rod outer segment: kinetics and parameters of activation and deactivation. The Journal of Biological Chemistry. 1978. 253: 8902-8909.
- Yoshikami, S. et Hagns, W.A. Light-induced calcium fluxes from outer segment layer of vertebrate retinas. Nature. 1980. 286: 395-398.
- Yoshimi, N., Ino, N., Suzui, M., Tanaka, T., Nakashima, S., Nakamura, M., Nozawa, Y. et Mori, H. The mRNA overexpression of inflammatory enzymes, phospholipase A2 and cyclooxygenase, in the large bowel mucosa and neoplasms of F344 rats treated with naturally occurring carcinogen, 1-hydroxyanthraquinone. Cancer Letters. 1995. 97: 75-82.
- Yu, S.P. Roles of arachidonic acid, lipoxygenases and phosphatases in calcium-dependent modulation of M-current in bullfrog sympathetic neurons. The Journal of Physiology. 1995. 487: 797-811.

- channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1994. 91: 3481-3483.
- Yau, K.W. et Nakatani, K. Electrogenic Na^+ - Ca^{2+} exchange in retinal rod outer segment. Nature. 1984. 311: 661-663.
- Yau, K.-W., et Nakatani, K. Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment. Nature. 1985. 313: 579-587.
- Yee, R. et Liebman, P.A. Light-activated phosphodiesterase of the rod outer segment: kinetics and parameters of activation and deactivation. The Journal of Biological Chemistry. 1978. 253: 8902-8909.
- Yoshikami, S. et Hagens, W.A. Light-induced calcium fluxes from outer segment layer of vertebrate retinas. Nature. 1980. 286: 395-398.
- Yoshimi, N., Ino, N., Suzui, M., Tanaka, T., Nakashima, S., Nakamura, M., Nozawa, Y. et Mori, H. The mRNA overexpression of inflammatory enzymes, phospholipase A2 and cyclooxygenase, in the large bowel mucosa and neoplasms of F344 rats treated with naturally occurring carcinogen, 1-hydroxyanthraquinone. Cancer Letters. 1995. 97: 75-82.
- Yu, S.P. Roles of arachidonic acid, lipoxygenases and phosphatases in calcium-dependent modulation of M-current in bullfrog sympathetic neurons. The Journal of Physiology. 1995. 487: 797-811.
- Zahler, P., Käsermann, D. et Reist, M. Membrane-bound phospholipases: Properties and functions. NATO ASI Series (A). 1984. 76: 179-192.

- Zimmerman, W.F et Keys, S. Acylation and deacylation of phospholipids in isolated bovine rod outer segments. Experimental Eye Research. 1988. 47: 247-260.
- Zinn, K.M. et Benjamin-Henkind, J. Retinal pigment epithelium. *dans* Bio-medical Foundations of Ophthalmology. vol. 1. Philadelphie: Harper & Row Publishers, 1983.
- Zinn, K.M. et Marmor, M.F. The retinal pigment epithelium. Cambridge: Harvard University Press, 1979.
- Zona, C., Palma, E., Pellerin, L. et Avoli, M. Arachidonic acid augments potassium currents in rat neocortical neurones. NeuroReport. 1993. 4: 359-362.
- Zozulya, S. et Stryer, L. Calcium-myristoyl protein switch. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1992. 89: 11569-11573.
- Zurier, R.B. Fatty acids, inflammation and immune responses. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1993. 48: 57-62.
- Zvyaga, T.A., Min, K.C., Beck, M. et Sakmar, T.P. Movement of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin by one helix turn reverses the pH dependence of the metarhodopsin I to metarhodopsin II transition. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 4661-4667.

CHAPITRE 2

PRESENCE OF A LIGHT-INDEPENDENT PHOSPHOLIPASE A2 IN BOVINE
RETINA BUT NOT IN ROD OUTER SEGMENTS

publié dans:

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

(Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. J. Biol. Chem. 1996. 271: 19209-19218)

**Presence of a Light-Independent Phospholipase A2 in Bovine Retina
but not in Rod Outer Segments**

Michèle Jacob[‡], Philip K. Weech[§] and Christian Salessé[‡]

From the [‡]Centre de Recherche en Photobiophysique, Université du Québec à
Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7 and the [§]Merck Frosst
Centre for Therapeutic Research, Pte-Claire-Dorval, Québec, Canada H9R 4P8

RUNNING TITLE: Phospholipase A2 in rod outer segments

2.1 SUMMARY

Rod outer segments (ROS) are responsible for the visual transduction process. Rhodopsin, which constitutes 85-90% of ROS proteins, absorbs light photons, changes its conformation and then binds to a heterotrimeric G-protein called transducin. As a consequence, transducin dissociates into $T\alpha$ and $T\beta\gamma$ subunits. The presence in ROS of a phospholipase A2 (PLA2) stimulated by light and guanosine 5'-O-(3-thio)triphosphate was first demonstrated in 1987 (Jelsema, C.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 163-168). This led that author to conclude that ROS PLA2 could be involved in the phototransduction process, and raised the possibility of receptor-mediated activation of PLA2 via G-proteins in cell types other than rods. However, the biochemical characteristics and the role of this PLA2 have not been fully elucidated. We have tried to reproduce some of the results previously reported in order to further characterize this enzyme. We have found that, in our hands, there is neither light-dependent nor GTP-dependent PLA2 activity in intact purified ROS. We also failed to detect PLA1 activity in those ROS preparations. Nevertheless, we detected significant amounts of PLA2 activity in two subretinal fractions adjacent to ROS: RPE (enriched with retinal pigment epithelial cells) and P200 (presumably containing neuronal cells, Müller cells and rod inner segments). The enzyme present both in RPE and P200 is light- and GTP-independent, Ca^{2+} - and Mg^{2+} -independent, and seems to be optimally active in the alkaline pH range. Our results suggest that there is, if any, vanishingly little PLA2 or PLA1 activity in intact purified ROS and that the activity levels previously reported in the literature could have been due to a contamination by either RPE or P200. This is supported by our observation that some contaminated ROS preparations were "PLA2 active".

2.2 INTRODUCTION

In the mammalian eye, rod outer segments (ROS) consist of a stack of 1000-2000 disks which contain the visual pigment, rhodopsin. ROS are thus responsible for the phototransduction process. It has been clearly shown that following absorption of light, photoexcited rhodopsin binds to and activates transducin ($T\alpha\beta\gamma$), which is a member of the heterotrimeric GTP-binding protein family. During the activation of transducin, the GDP molecule (normally associated with the inactive state of the protein) is exchanged for GTP. As a consequence, transducin dissociates into $T\alpha$ and $T\beta\gamma$ subunits. $T\alpha$ is well known to activate a cGMP-phosphodiesterase whose activity eventually leads to hyperpolarization of the rod through closure of Na^+/Ca^{2+} cGMP-dependent channels (see Refs. 1-4 for reviews).

Jelsema reported in 1987 (5) that phospholipase A2 (PLA2) activity was present in "crude ROS" and "partially purified ROS", and that this activity was stimulated by light and a non-hydrolyzable analog of GTP, $GTP\gamma S$. Moreover, Jelsema and Axelrod (6) demonstrated that $T\beta\gamma$ was responsible for the activation of this ROS PLA2. These results led them to conclude that ROS PLA2 could be involved in the phototransduction process. However, conflicting results have been reported since that time. In fact, although Zimmerman and Keys (8) detected phospholipase A activity in their ROS preparations, the activity that they measured, either PLA2 or PLA1, was neither light-dependent nor GTP-dependent. It was rather stimulated by ATP and coenzyme A (CoA). Moreover, the maximum activity that they observed was approximately one order of magnitude lower than that reported by Jelsema (5). In addition, Castagnet and Giusto (9) published data on ROS PLA2 activity but the maximum

activity that they obtained was almost three orders of magnitude lower than that reported by Jelsema (5).

The mechanism of stimulus-response coupling between G-proteins and phospholipase A2 could be important in many cells other than the retinal rods, given the wide distribution of PLA2 in tissues (10-20) and its potential role in controlling the biosynthesis of prostaglandins, leukotrienes and other inflammatory mediators (21-25), as well as the turnover of phospholipids. Moreover, the biochemical characteristics of this retinal PLA2 have not been fully studied yet and its role is still unknown. We present here results showing that two subretinal fractions, namely RPE (enriched with retinal pigment epithelial cells) and P200 (presumably containing neuronal cells, Müller cells, and rod inner segments) are rich in PLA2 activity having an alkaline pH optimum. Our results also point out that purified ROS isolated by three different methods, vortexing, homogenizing or hand shaking, are devoid of significant PLA2 activity. The varying levels of activity that have been reported in ROS preparations by the aforementioned authors (5, 8, 9) could thus, in most cases, be accounted for by a contamination by adjacent retinal cell types.

2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.3.1 *Materials*- 1-Palmitoyl-2-[¹⁴C]arachidonoyl-phosphatidylcholine ([¹⁴C]PAPC), 1-hexadecyl-2-[¹⁴C]arachidonoyl-phosphatidylcholine ([¹⁴C]HAPC), 1-palmitoyl-2-[¹⁴C]arachidonoyl-phosphatidylethanolamine ([¹⁴C]PAPE), 1-[¹⁴C]oleoyl-2-[¹⁴C]oleoyl-phosphatidylcholine ([¹⁴C]DOPC) and Econofluor-2 were from Dupont Canada. 1-Oleoyl-lysophospholipids and dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) were from Avanti Polar Lipids. Tris-HCl, DTT, GTP, GTP γ S and GDP β S were from Boehringer Mannheim. Heptane, and diethyl ether were ACS reagent grade from Baxter while hexane, methanol, isopropyl alcohol and chloroform were HPLC grade from Fisher. Bio-Sil A silicic acid (100-200 mesh) was purchased from Bio-Rad. Osmium tetroxide (OsO₄) was from Mecalab. Epon 812 and uranyl acetate were from Fluka. All other chemicals were from Sigma.

2.3.2 *Isolation of ROS by vortexing (v-ROS)*- Dark-adapted v-ROS were prepared from fresh bovine eyes kept on ice, according to the procedure of Salesse *et al.* (26). ROS were broken off the retinas by vortexing (10 X 1 s) and then purified as described (26). Purified v-ROS were assayed for purity and intactness as described below. They were either used directly for PLA2 activity measurement, processed for electron microscopy, or aliquoted and stored at -80°C.

2.3.3 *Isolation of ROS by homogenizing (h-ROS)*- Dark-adapted h-ROS were prepared from fresh bovine eyes kept either on ice or at 15°C. Dissection was made under dim red light according to a modification of the procedure described by Feeney-Burns and Berman (27). Briefly, 64 eyes were cut along the *ora*

serrata. The anterior segment and the vitreous were then eliminated by tilting the eyes. Eyecups were gently filled with buffer A (20 mM Tris-HCl, 11% sucrose, 0.5 mM DTT, pH 7.4) and incubated at room temperature for 15 minutes. After removal of buffer A, retinas remained attached only at the optic disk and were cut with scissors. Sixteen retinas were collected in 40 ml of buffer B (20 mM Tris-HCl, 20% sucrose, 0.5 mM DTT, pH 7.4) and were either homogenized immediately or kept on ice in total darkness for about 2 h (to allow for preparation of RPE). Homogenization was done as described by Zimmerman and Godchaux (28). The loose-fitting Potter-Elvehjem homogenizer (clearance of 2 mm) was operated at 300 rpm. Six strokes (20 s/each) were used. The homogenate was then sedimented at 200 X g (4°C, 5 min; Sorvall HB4 rotor). The supernatant was collected and kept on ice while the pellet was gently resuspended by inversion in buffer B and centrifuged in the same conditions. Supernatants were pooled and further centrifuged at 7,000 X g (4°C, 6 min; Sorvall SS34 rotor). The 7,000 X g-supernatant was discarded and the pellet resuspended in buffer B with a wide-mouth plastic pipette. This suspension was layered on the top of six 27-50% continuous sucrose gradients and centrifuged (140,000 X g, 4°C, 16 h; Beckman SW28 rotor). ROS bands were collected, diluted to 20% sucrose with buffer B and pelleted (17,500 X g, 4°C, 5 min; Sorvall SS34 rotor). Purified h-ROS were resuspended in a minimal volume of buffer B and assayed for purity and intactness (see below). They were then either used directly for PLA2 activity measurement, processed for electron microscopy, or aliquoted and stored at -80°C.

2.3.4 Isolation of ROS by hand shaking (hs-ROS)- Dark-adapted hs-ROS were purified from fresh bovine eyes kept either on ice or at 15°C according to the

procedure of McDowell and Kühn (29). Briefly, 60 retinas were gently peeled off the eyecup and rinsed with buffer C containing 45% sucrose (buffer C: 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, pH 7.0). They were then cut at the optic disk, collected in a 250-ml Erlenmeyer containing 54 ml of buffer C containing 45% sucrose, and gently hand shaken for 3 min. The suspension was centrifuged (3,000 X g, 4°C, 5 min; Sorvall SS34 rotor) and the supernatant collected (SN 3,000 X g = crude ROS). It was used as the starting material for further purification of ROS and for determination of PLA2 activity associated with particulate and soluble fractions at each purification step. The crude ROS-supernatant (SN 3,000 X g) was diluted 1:1 with buffer C and centrifuged (4,400 X g, 4°C, 7 min; Sorvall SS34 rotor). The 4,400 X g-pellet (P 4,400 X g = semi-purified ROS) was resuspended in buffer C containing 25% sucrose with a wide-mouth plastic pipette and layered on the top of discontinuous sucrose gradients (27-32%). Gradients were centrifuged at 140,000 X g (4°C, 2 h; Beckman SW28 rotor). Purified diluted ROS (SN 140,000 X g) were collected at the 27-32% interface, mixed with 1 volume of buffer C and centrifuged (17,500 X g, 4°C, 5 min; Sorvall SS34 rotor). The 17,500 X g-pellet (P 17,500 X g = purified concentrated hs-ROS) was resuspended in a minimum of buffer C containing 45% sucrose. hs-ROS were assayed for purity and intactness as described below. They were then either used directly for PLA2 activity measurement, processed for electron microscopy or aliquoted and stored at -80°C. Aliquots of the 4,400 X g and 17,500 X g supernatants (SN 4,400 and SN 17,500 X g, respectively) were kept for measurements of rhodopsin and total protein concentrations, as well as PLA2 activity.

2.3.5 Preparation of RPE- RPE cells were purified according to a modification

of the method described by Feeney-Burns and Berman (27). After the retinas were cut from the optic disc, eyecups were gently filled with buffer A containing 2 mM EGTA and incubated at room temperature for 15 min. In the next steps, eyes are treated one at a time. Buffer A-EGTA was discarded and replaced by 1 ml of buffer A. RPE cells were immediately brushed off from the choroid with a soft camel hair brush (number 12) and the suspension was aspirated with a wide-mouth plastic pipette. RPE suspension was pelleted (400 X g, 4°C, 10 min; Sorvall HB4 rotor), resuspended in a minimal volume of buffer B and either used directly or aliquoted and stored at -80°C.

2.3.6 Preparation of P200- The pellet obtained after centrifugation of the homogenized retinas at 200 X g (see "Isolation of ROS by homogenizing") was used as the "P200" fraction. For some experiments, it was rehomogenized with a tight-fitting (0.5 mm clearance) Potter-Elvehjem homogenizer before use. It was either assayed directly for PLA2 activity or aliquoted and stored at -80°C.

2.3.7 Phospholipase A2 assay- *In vitro* assays of PLA2 activity were performed on each type of purified ROS, using [¹⁴C]PAPC, [¹⁴C]DOPC, [¹⁴C]HAPC or [¹⁴C]PAPE as the substrate. Radiolabeled phospholipids were evaporated under argon, resuspended in 120 mM Tris-HCl, pH 8.8 (4.5 µCi/ml), and solubilized by sonication in a Branson sonicating bath for 5 min at 37°C. The suspension was further sonicated for 15 s with a microtip probe and then incubated for 2 h at 37°C before use to allow for reannealing (30). When [¹⁴C]PAPE was used as the substrate, unlabeled DPPC (80 µg/ml) was added to [¹⁴C]PAPE before the evaporation of solvent. The sonication and incubation steps were done at 42°C. Reactions were initiated by addition of 20 µl of the sonicated radiolabeled subs-

trate to ROS aliquots containing 20-75 μ g of proteins. The buffer used was either 30 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂, 0.6 mM NaCl, 4 mM glutathione as described by Jelsema (5) or 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 mM ATP, 0.25 mM CoA as described by Zimmerman and Keys (8). The total volume was 250 μ l. Incubations were done at 37°C under either dim red light or white light (1330 lx; we used a 250W tungsten lamp which practically does not emit in the UV range (31)). Reactions were stopped at specified times with 1.25 ml of Dole's reagent (isopropyl alcohol: *n*-heptane: 1 N H₂SO₄, 40:10:1 v/v/v). After addition of 0.75 ml of *n*-heptane and 0.5 ml of water, samples were vortexed and allowed to stand for 5 min for phase separation. The enzymatically released [¹⁴C]oleic or [¹⁴C]arachidonic acids were separated from unreacted substrate by elution of the heptane phase on columns containing 200 mg of dessicated Bio-Sil A silicic acid with 1 ml of diethyl ether. After addition of 7.5 ml of Econofluor-2 to the 1 ml-eluates, radioactivity was measured using a Beckman scintillation counter programmed to correct for quenching and counting efficiency. PLA2 activity was expressed as nmol of [¹⁴C]arachidonic or [¹⁴C]oleic acid released/mg of proteins and was corrected for the dilution of the radiolabeled substrate by the endogenous unlabeled phospholipids. This was done by using a phospholipid to rhodopsin weight ratio of 1:1 (32). Zero-time control values were subtracted. This method was also used to assay PLA2 activity in the particulate and soluble fractions collected during the ROS purification procedure, as well as in the RPE and P200 fractions. In these cases, we used phospholipid to protein weight ratios of 0.09:1 for RPE -which is in agreement with the data published by Berman *et al.* (33)- and 0.35:1 for P200 (as determined in our lab by measuring the phosphorus content of a P200-phospholipid extract (see below)).

2.3.8 Measurement of ROS PLA2 or PLA1 activity toward endogenous phospholipids- *In vitro* investigations of ROS PLA2 or PLA1 activity were done by HPLC. Purified ROS were incubated at 37°C for different periods of time (0, 0.5, 10, 30 and 60 min). The endogeneous unlabeled phospholipids were the only source of substrate. Reaction was started by transferring samples from ice to 37°C. Samples were either exposed to white light (1330 lx) or a dim red light during the incubation. Reaction was stopped by cooling the tubes to 0°C and adding 0.5 ml of argon-saturated methanol/mg of ROS proteins. Phospholipids were extracted and quantitated by measuring its phosphorus content according to a modification of the procedure described by Miljanich (32). Briefly, aliquots of the phospholipid extracts were evaporated to dryness at 110°C. Then, 750 µl of H₂SO₄ 1.8 M: HClO₄ 7% (40:25, v/v) were added and samples were heated for 1 h at 210-220°C on an aluminum heating block with occasional shaking. After cooling to room temperature, 1 ml of ascorbate 2% and 1 ml of molybdate 0.5% were added to each tube. Tubes were vigorously vortexed and incubated for 1 h at 37°C. Absorbance was read at 825 nm. Typically, 800 µg of ROS phospholipids were injected on two HPLC columns placed in tandem: 1) a 4.6 X 250 mm analytical Ultrasphere Si and 2) a 10 X 250 mm semi-preparative Ultrasphere Si (Beckman). The solvent system consisted of hexane: isopropyl alcohol (3:4, v/v) with a final concentration of water increasing from 1 to 9.1%. The elution was monitored at 206 nm using a Waters M490 multi-wavelength detector. Appearance of lysophospholipid peak(s) and/or decrease in phospholipid peak height was considered to be suggestive of endogenous ROS PLA2 or PLA1 activity. The retention time of lysophospholipids that could be expected from ROS PLA2 or PLA1 activity was determined as described above with commercially available lysophospholipids.

2.3.9 *Electron microscopy of ROS*- Samples of freshly purified ROS (v-ROS, h-ROS and hs-ROS) were fixed for 1 h at 20°C in 3% glutaraldehyde in a cacodylate buffer (100 mM, pH 7.4, 20% sucrose or 140 mM NaCl, 12 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) and then washed 3 times with the buffer alone. Post-fixation was done for 30 min at 4°C in 1% OsO₄ in the same buffer. After they were washed 3 times, the fixed samples were progressively dehydrated in 30, 50, 70, 85, 95 and 100% ethanol, and finally in 100% propylene oxide. Fixed and dehydrated ROS samples were then embedded in Epon 812 and stained with uranyl acetate.

2.3.10 *Other methods*- Rhodopsin concentration was determined according to the procedure of Raubach *et al.* (35). Total protein concentration was determined using the Lowry protein assay kit from Sigma. ROS purity was evaluated by measuring the ratio of A₂₈₀/A₅₀₀ nm (26). ROS intactness was estimated by measuring the production of NADPH as described Schnetkamp and Daemen (36).

2.4 RESULTS

2.4.1 Effect of light on ROS PLA2 activity- Considering the discrepancy between ROS PLA2 activity levels reported in the literature and that its role is still unknown, we have attempted to reproduce some of the reported results in order to further characterize this enzyme. We first tried to measure PLA2 activity in the conditions described by Jelsema (5) because she reported the highest level of activity. Surprisingly, we could not detect any significant light-dependent or light-independent PLA2 activity in our ROS preparations (Fig. 2.1). In an attempt to detect PLA2 activity, we have tried: 1) to preincubate the eyes on ice, in total darkness, for different periods of time (1, 2 or 4 h) prior to dissection, 2) to vary the composition of the ROS purification buffer, 3) to vary the method used to either collect the retinas or detach ROS from the retina (see the three procedures for ROS isolation and purification) and 4) to use mixed substrate vesicles ($[^{14}\text{C}]$ PAPC + DPPC) in the activity assay, but none of these conditions allowed us to detect significant PLA2 activity in ROS. Fig. 2.1 shows typical results that were obtained in all those diverse conditions.

2.4.2 Effect of different substrates on ROS PLA2 activity- We have tested ROS PLA2 activity toward other exogenous radiolabeled substrates differing from $[^{14}\text{C}]$ PAPC either by the type of fatty acid present in *sn*-1 and *sn*-2 positions ($[^{14}\text{C}]$ DOPC), the type of polar headgroup ($[^{14}\text{C}]$ PAPE) or the type of bond between the *sn*-1 fatty acid and the glycerol backbone ($[^{14}\text{C}]$ HAPC). Since $[^{14}\text{C}]$ DOPC was labeled on both fatty acid chains, it allowed for the detection of either PLA2 or PLA1 activity. However, even if we used $[^{14}\text{C}]$ DOPC in the same conditions as described by Zimmerman and Keys (8) or Jelsema (5), we did not

observe any PLA2 or PLA1 activity that could be considered significantly different from the background. In fact, as can be seen in Fig. 2.2, none of the substrates we used was significantly hydrolyzed by our ROS preparations.

2.4.3 Intactness of ROS- As we could not reproduce the results of Jelsema (5) and Zimmerman and Keys (8), we have investigated the intactness of our ROS preparations. Using electron microscopy of freshly purified v-ROS, we found that our preparations were in fact completely burst (Fig. 2.3A). Since our negative results could be due to the loss of the PLA2 (or PLA1) enzyme itself or some soluble-activating factors during the purification procedure, we changed our method of ROS preparation in order to get intact plasma membranes. We used homogenization (as described by Zimmerman and Godchaux (28)) and hand shaking (as described by McDowell and Kühn (29)) to isolate h-ROS and hs-ROS, respectively. Fig. 2.3, B and C, clearly show that hand shaking gives better results; only ROS isolated by hand shaking have densely packed discs as well as a sealed plasma membrane (Fig. 2.3C). Moreover, we measured the production of NADPH as a quantitative criteria for evaluating the intactness of v-ROS, h-ROS and hs-ROS. Given that the NADPH-recycling enzyme required for the reduction of rhodopsin's chromophore is cytosolic (36), we measured the production of NADPH, in the presence of exogenously added substrates (D-glucose 6-phosphate + β NADP), prior to and after solubilization of ROS membranes with Triton X-100 (36). The results were compared to negative controls where addition of both substrates was omitted. An increase in the absorbance at 340 nm after solubilization of the plasma membrane indicates that cytosolic NADPH-recycling enzymes were present in ROS and thus provides an indication that ROS were initially intact. Fig. 2.4 shows results

obtained for the three types of ROS preparations. The three curves show a slow production of NADPH prior to membrane solubilization with Triton X-100. The addition of the detergent clearly leads to a large increase of NADPH production, mainly for h-ROS and hs-ROS. Obviously, v-ROS contain much less intact ROS as observed in Fig. 2.3A. From Figs. 2.3 and 2.4, the intactness of these ROS preparations can be assessed as hs-ROS \gg h-ROS \gggg v-ROS. Nonetheless, no matter whether we used v-ROS, h-ROS or hs-ROS preparations, we have failed to detect significant PLA2 activity. Fig. 2.1 shows typical results that we observed with each type of preparation.

2.4.4 Distribution of PLA2 activity among particulate and soluble fractions generated during the purification of hs-ROS- To further investigate the possibility that PLA2 enzymes were lost during the purification procedure, we measured PLA2 activity in the particulate and soluble fractions generated at each step of ROS purification. As can be seen in Table 2.1, there is no significant PLA2 activity in any of these fractions. Moreover, coincubation of the corresponding pellet and supernatant obtained after the centrifugation run at either 4,400 or 17,500 X g was not sufficient to restore PLA2 activity. The only PLA2-active fraction was "P 3,000 X g" which is equivalent to the P200 fraction (presumed to contain neuronal cells, Müller cells and rod inner segments). These results argue strongly against the loss of PLA2 enzymes during ROS purification and support our results showing the absence of endogenous PLA2 activity in intact ROS (see Figs. 2.1 and 2.2, and Table 2.1).

2.4.5 Effect of guanine nucleotides on ROS PLA2 activity- It has been well established that guanine nucleotides such as GTP and GDP influence the active-

inactive state transition of G-proteins. Moreover, Jelsema and Axelrod (6) have shown that light-activation of ROS PLA2 occurred through the $\beta\gamma$ complex of transducin ($T\beta\gamma$). That is, photoexcited rhodopsin undergoes conformational changes which allow its binding to the inactive undissociated transducin α -subunit containing a GDP molecule in its catalytic site ($T\alpha$ -GDP). After photoexcited rhodopsin has bound to $T\alpha$ -GDP, the GDP molecule is exchanged for GTP which confers the active state to transducin and allows it to dissociate into $T\alpha$ -GTP and $T\beta\gamma$ subunits. $T\beta\gamma$ would then, according to the results of Jelsema and Axelrod (6), be able to activate ROS PLA2 until GTP is hydrolyzed to GDP by $T\alpha$ and $T\alpha$ -GDP reassociates with $T\beta\gamma$. We thus have attempted to measure PLA2 activity in the presence of a non-hydrolyzable GTP analog ($GTP\gamma S$) or a GDP analog that cannot be phosphorylated ($GDP\beta S$) to promote, respectively, the permanent dissociation or association of transducin $T\alpha$ and $T\beta\gamma$ subunits. As a consequence, light-stimulated ROS PLA2 activity was expected to be enhanced while dark-adapted basal activity was expected to be lowered. We have also tested the effect of unmodified hydrolyzable GTP. Unfortunately, as shown in Fig. 2.5, we did not observe any significant light-dependent or light-independent PLA2 activity in any of these conditions.

2.4.6 Effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} concentration, EGTA, and detergent on ROS PLA2 activity- Since Mg^{2+} is an essential cofactor of G-proteins and since there are several types of PLA2 differing in their Ca^{2+} requirement (see Refs. 37-39 for reviews), we have tested the effect of two Mg^{2+} concentrations on ROS PLA2 activity as a function of Ca^{2+} concentration. Moreover, it has been shown by Marshall and McCarte-Roshak (40) that the addition of EGTA to the assay buffer can reduce the Ca^{2+} -requirement of some PLA2. So we have used two types of

PLA2 assay buffers in our experiments: one containing increasing concentrations of Ca^{2+} and the other one containing an increasing excess of Ca^{2+} over a fixed concentration of EGTA. We have also tested the effect of emulphogene on ROS PLA2 activity since this detergent is efficient at extracting ROS proteins (41) and could thus favor the interactions between the substrate vesicles and ROS PLA2. However, as shown in Fig. 2.6, we did not detect any significant PLA2 activity in any of these conditions.

2.4.7 ROS PLA2 or PLA1 activity toward endogenous phospholipids- As can be seen in Figs. 2.1, 2.2, 2.5 and 2.6, we did not observe significant PLA2 activity in ROS incubated with exogenous radiolabeled substrate, whatever the conditions we used, and whatever the type of ROS preparations we used. Moreover, the results obtained with [^{14}C]DOPC also suggest the absence of PLA1 activity (see Fig. 2.2). We have thus tested ROS PLA2 or PLA1 activity toward endogenous unlabeled ROS phospholipids. Purified ROS were incubated for different periods of time under either white light or dim red light. A decrease in any phospholipid peak height and/or the appearance of lysophospholipid peak(s) on HPLC chromatograms, as compared to zero-time controls, was considered to be indicative of ROS PLA2 or PLA1 activity. Fig. 2.7 represents a typical HPLC elution profile of ROS phospholipids. We did not find any significant decrease in any phospholipid peak height from samples incubated under light or in the dark. This result is in agreement with those shown in Figs. 2.1, 2.2, 2.5 and 2.6, and suggests that there is neither PLA2 nor PLA1 activity in intact ROS.

2.4.8 PLA2 activity in subretinal fractions other than ROS- In order to explain the discrepancy between the activity levels reported by Jelsema (5), Zimmer-

man and Keys (8), Castagnet and Giusto (9) and in the present study, we have measured PLA2 activity in two subretinal fractions containing cell types which are found adjacent to ROS *in vivo*: RPE (enriched with retinal pigment epithelial cells) and P200 (presumed to contain neuronal cells, Müller cells and rod inner segments). Significant levels of light-independent PLA2 activity were detected in both fractions (Fig. 2.8). Considering the possibility that ROS PLA2 activity detected by Jelsema (5), Zimmerman and Keys (8) and Castagnet and Giusto (9) is due to a contamination by adjacent cell types, our results on a light-independent PLA2 activity would be in agreement with the characteristics determined by Zimmerman and Keys (8) but would contradict the results of Jelsema (5) and Castagnet and Giusto (9) who observed a 3.3-fold and a 35% increase upon light-stimulation, respectively.

2.4.9 Influence of pH and Ca²⁺ on RPE and P200 PLA2 activity- In order to better identify the type of PLA2 present in RPE and P200, and because it is known that there are at least three types of PLA2 differing by their Ca²⁺-requirement and their pH optimum (37-39), we have tested the effect of pH and Ca²⁺ concentration on its activity. As shown in Fig. 2.9, the enzyme present in both fractions was found to be Ca²⁺-independent and optimally active at alkaline pH. Moreover, Fig. 2.9, A and C, suggest that Tris-HCl is not a good buffer to measure PLA2 activity, at least in our systems, when used in conjunction with calcium. In fact, we always observed an inhibitory effect of this buffer on both RPE and P200 PLA2 activity.

2.5 DISCUSSION

In 1987, Jelsema (5) reported high levels of PLA2 activity in "crude" and "partially purified" ROS preparations. Moreover, the enzyme was shown to be stimulated 4.5- and 3.8-fold by light and GTP γ S, respectively, as compared to dark-adapted controls. Values of 133.6 ± 24.0 and 110.5 ± 12.7 nmol of [14 C]arachidonic acid released/10 min per mg of proteins were reported for light- and GTP γ S-stimulated samples, respectively, as compared to a value of 29.4 ± 2.6 for dark-adapted controls. Thus, it was suggested that ROS PLA2 could be regulated by light through a GTP binding-protein, herein transducin (5). In 1993, Castagnet and Giusto (9) also published data on the presence of a light-stimulated PLA2 in ROS. However, the maximum activity level that they observed (see Table 2.2) was more than two orders of magnitude lower than that reported by Jelsema (5), although using the same assay conditions. That is, Castagnet and Giusto (9) obtained 350 times less activity than Jelsema (5) for a sixfold longer incubation period (see Table 2.2). The reported effect of light and GTP γ S was also much less important with only a 35% and 63% increase, respectively, over dark-adapted controls (9).

Zimmerman and Keys (8) also reported results on a ROS phospholipase A activity but, in their hands, it was found to be light-independent but CoA- and ATP-dependent. The substrate ([14 C]DOPC) they used did not allow them to discriminate between PLA2 or PLA1 activity. Moreover, the maximum activity that they measured (see Table 2.2) was approximately one order of magnitude lower than that reported by Jelsema (5). In fact, Zimmerman and Keys (8) observed seven times less activity than Jelsema (5) for a sixfold longer incubation period (see Table 2.2). They reported activity values of 11.22 ± 2.11 mmol

of [^{14}C]oleic acid released/h per mol of phospholipid which, once expressed in the same units as Jelsema (5) and Castagnet and Giusto (9), represents 19.16 ± 3.60 nmol of [^{14}C]oleic acid released/h per mg of proteins.

Recently, Jung and Remé (43) reported that light could stimulate the release of [^3H]arachidonic acid in intact retinas by approximately 2-fold as compared to dark-adapted controls. It is however difficult for us to compare their activity values with those cited above as they were not expressed in terms of specific activity but rather as a ratio of [^3H]arachidonic acid released/[^3H]arachidonic acid preincorporated in retinal phospholipids (43). Moreover, they worked with whole retinas on a retinal light-damage model using lithium-treated albino rats. These conditions are very different from those used by Jelsema (5, 6), Zimmerman and Keys (8), Castagnet and Giusto (9), and in the present paper.

Considering the high levels of ROS PLA2 activity reported by Jelsema (5), its likely regulation by a G-protein (transducin) (6), the discrepancy between ROS PLA2 activity in the literature (see Table 2.2), and that its biochemical characteristics and its role have not been fully elucidated, we have attempted to reproduce the aforementioned results. We were first interested in characterizing this enzyme because the mechanism of stimulus-response coupling between G-proteins and PLA2 could be important in many cells other than retinal rods. Moreover, the activation of PLA2 through G-protein-coupled receptors in cells is still a matter of controversy (7). Unfortunately, we did not find any significant PLA2 or PLA1 activity in ROS, whatever the conditions we used and whatever the type of ROS preparations we used (Figs. 2.1-2.7). We did not detect either light- and GTP-dependent (Fig. 2.5, Table 2.1), or light-independent but CoA- and ATP-dependent PLA2 or PLA1 activity (Fig. 2.2). In our hands,

there was no significant increase in ROS PLA2 or PLA1 activity over time (Figs. 2.1, 2.2, 2.5 and 2.7). This means that the amount of [^{14}C]fatty acids collected after the enzymatic reaction had been quenched was, in all cases, equivalent to the level of free [^{14}C]fatty acids originally contaminating the substrate preparation. In other words, we obtained the same results whether the substrate was incubated or not with ROS. So, when we subtracted the background value due to those contaminating free [^{14}C]fatty acids, the activity level became almost equal to zero (Figs. 2.1, 2.2, 2.5 and 2.6).

Considering that our negative results could be due to the loss of PLA2 enzymes (or some soluble-activating factors) from ROS during the purification procedure, we investigated the intactness and PLA2 activity of ROS isolated using three fundamentally different methods. Indeed, there are essentially three basic methods described in the literature for ROS purification, the major difference between them being the way ROS are separated from the retina: 1) vortexing (v-ROS), 2) homogenizing (h-ROS) and 3) hand shaking (hs-ROS). We thus prepared v-ROS, h-ROS and hs-ROS as described (see "Experimental Procedures") and assayed each preparation for PLA2 activity, after we looked at their intactness both qualitatively and quantitatively (Figs. 2.3 and 2.4). The intactness was quantitatively estimated as described by Schnetkamp and Daemen (36), by measuring the production of NADPH for each type of ROS preparations. This assay is based on the fact that sealed ROS plasma membranes prevent access of cytosolic NADPH-recycling enzymes to exogenously added substrates. Thus, a larger production of NADPH following solubilization of the membrane with Triton X-100 is expected to reflect a higher degree of intactness prior to solubilization.

Since we did not observe any contaminating mitochondria, which would

give erroneously high results (36), in the electron micrographs of our v-ROS, h-ROS and hs-ROS preparations (Fig. 2.3, as well as other micrographs not shown), the extent of NADPH production effectively correlates with the extent of intactness. However, the highest production of NADPH (Fig. 2.4) by the most intact hs-ROS (Fig. 2.3C), did not correlate with a higher level of PLA2 activity. None of the ROS preparations show significant levels of PLA2 activity (Figs. 2.1, 2.2, 2.5, 2.6 and 2.7). We also failed to detect PLA2 activity in the different particulate and soluble fractions that were generated during the purification of hs-ROS (see Table 2.1). Incubating for longer (30 min) or shorter (1, 5 or 10 min) periods of time did not appear to be beneficial since no significant PLA2 activity was detected (data not shown). Another important point is that we could not recover any significant PLA2 activity by coincubating the corresponding pellet and supernatant generated after centrifugation at either 4,400 or 17,500 X g (Table 2.1). These results thus strongly suggest that the absence of PLA2 or PLA1 activity in our ROS preparations is not due to the loss of PLA2 or PLA1 enzymes or some soluble-activating factors during ROS purification.

In order to understand why we did not find PLA2 activity in ROS whereas others did (5, 8, 9), we have assayed PLA2 activity in two other subretinal fractions and found that RPE and P200 contained reproducibly high levels of PLA2 activity (Fig. 2.8). This result suggests that the varying levels of activity that have been reported for ROS preparations could be due, in most cases, to contamination to varying extent by adjacent retinal cell types. As a matter of fact, we found that there was a relationship between the level of PLA2 activity in our h-ROS preparations and their purity coefficient (A_{280}/A_{500}) (results not shown). That is, rhodopsin constitutes 85-90% of total ROS proteins (44) and has two principal absorption bands: 1) aromatic amino acids of the protein

moiety at 280 nm and 2) the 11-*cis*-retinal Schiff base at 500 nm. Thus, measurement of this A_{280}/A_{500} ratio for ROS preparations is indicative of their contamination by proteins from adjacent cell types other than ROS. Moreover, Salesse *et al.* (26) have demonstrated that this purity criterion is useful to evaluate the contamination of ROS by non-ROS proteins. In our hands, PLA2 activity was detected only in contaminated h-ROS. Samples with the highest A_{280}/A_{500} ratios being the most "PLA2-active" ROS preparations. For example, we detected 12.5 ± 0.8 and 4.4 ± 0.7 nmol of hydrolyzed [^{14}C]arachidonic acid/10 min per mg of proteins for ROS preparations having a A_{280}/A_{500} ratio of 6.9 and 3.4, respectively (data not shown). As a comparison, results presented in Figs. 2.1-2.7 were all obtained with ROS preparations having A_{280}/A_{500} ratios which were always lower than 3.

This observation supports the idea that the different levels of ROS PLA2 activity reported in the literature could be due to a contamination by proteins coming from adjacent retinal cell types. However, it still does not explain why Jelsema (5) observed such a strong light effect on PLA2 activity whereas Castagnet and Giusto (9) only noted a slight effect, and Zimmerman and Keys (8) and our lab did not (see Figs. 2.1 and 2.5). We have tried to restore this light-stimulation by incubating RPE and P200 in the presence of ROS. Unfortunately, ROS were unable to induce light-activation of PLA2 in either fraction. The activity detected in light-exposed samples containing ROS were equivalent to dark-adapted controls without ROS (not shown).

It could be suggested that the light-sensitive PLA2 detected by Jelsema (5) is normally associated with the outside of the plasma membrane and that, depending on the treatment during the purification, we lose it either partially or totally. This could explain why Castagnet and Giusto (9) saw only very low

levels of PLA2 activity whereas we saw none (Figs. 2.1, 2.2, 2.5-2.7). We cannot exclude this possibility. However, given that PLA2 hydrolyzes phospholipids, which account for up to 80% of total ROS lipids (45), it seems improbable to us that the enzyme is present on the outside of the plasma membrane since it certainly requires to be highly regulated. Moreover, it was shown (5, 6) to be regulated by G-protein and guanine nucleotide components of intracellular signal transduction. One alternative hypothesis is that the PLA2 activity measured by Jelsema (5) was in fact present in rod inner segments still present in her crude and partially purified ROS preparations and was activated secondary to light-activation of the ROS visual cascade. The extent of light-sensitive PLA2 activity detected in ROS would thus be dependent on the extent of contamination by rod inner segments still attached to ROS (via the connective cilium). Since electron microscopy of our ROS preparations did not reveal the presence of mitochondria, this would mean that our preparations were essentially free of rod inner segments and this could thus explain why we did not observe any light-sensitive PLA2 activity.

This latter hypothesis suggests that PLA2 activity found in our P200 fractions could come, at least partly, from rod inner segments. The absence of a light-effect (Fig. 2.8) could then be due to the disruption of the connection between rod inner and outer segments. PLA2 activity of rod inner segments would only be light-sensitive, though probably indirectly, when rod inner and outer segments are joined to each other by the connective cilium. Moreover, this light-stimulation could effectively be mediated by a G-protein as described by Jelsema (6) but, since cross-reactivity between different G-proteins has been demonstrated in different systems (46, 47), the exogenously added transducin

could have mimicked the role that should normally be held by a different but similar G-protein.

Considering the high PLA2 activity levels that we detected in RPE and P200, we have tested the influence of pH and Ca^{2+} concentration on this activity to identify the type of enzyme present in both fractions. As shown in Fig. 2.9, PLA2 present in both RPE and P200 is optimally active in the alkaline pH range and is Ca^{2+} -independent. However, care should be taken when interpreting the effect of Ca^{2+} because Reynolds *et al.* (48) have recently shown that, in the absence of Ca^{2+} , high salt concentrations can overcome the requirement of PLA2 for divalent metals. They showed that 10 mM Mg^{2+} could stimulate human cytosolic PLA2 to almost the same extent as did 2 mM Ca^{2+} . Since those pH- and Ca^{2+} -dependency measurements were made in the assay conditions described by Jelsema (5) and thus contained a high concentration of Mg^{2+} , additional experiments using different Mg^{2+} concentrations will be required to characterize this enzyme. As can be pointed out in Fig. 2.9, the maximum activity detected in RPE and P200 are, respectively, lower than those shown in Fig. 2.8. This might be explained by the fact that, for these experiments (see Fig. 2.9), we used buffers at 133 mM final concentration, instead of 30 mM (Fig. 2.8), to make sure that substrate and sample buffers would not significantly affect the final pH needed for the assay. It may be possible that such high buffer concentration partially inhibits PLA2 activity by affecting either the PLA2-substrate interactions or the enzyme itself. Otherwise, it is possible that part of the hydrolyzed [^{14}C]arachidonic acids were further metabolized during the 1-h incubation period, thus rendering them unavailable for quantitation as free fatty acids. Another point is that Tris-HCl seems to inhibit the enzyme activity at pH 7, 8, and 9 when used in conjunction with calcium. This is evident both

in RPE and P200 (see Fig. 2.9, A and C). We also had similar difficulties with cacodylate and imidazole buffers having a profound inhibitory effect on PLA2 activity at pH 5, 6, and 7, and 6, 7, and 8, respectively (results not shown). Although we were able to successfully replace cacodylate and imidazole buffers by Na⁺ acetate (pH 5 and 6) and bis-Tris (pH 6 and 7) buffers, we did not find an adequate combination of buffers which could be used at pH 7, 8, and 9 instead of Tris-HCl. Glycine seems to be a more "permissive" buffer since we repeatedly obtained higher levels of PLA2 activity with glycine (pH 9) compared to Tris-HCl (pH 9) (see Fig. 2.9). We also tested CHES and AMP buffers at pH 9 and we observed results which were similar to those obtained with glycine (pH 9). In fact, activity was greater with CHES, AMP and glycine buffers compared to Tris-HCl (not shown). This suggests that Tris-HCl is not a good buffer to assay PLA2 activity at pH 7, 8 or 9 in RPE and P200.

Taken together, our results suggest that both RPE and P200 contain PLA2 activity which is light-independent, Ca²⁺-independent, and optimally active at alkaline pH (Figs. 2.8 and 2.9). Considering that the maximum activity observed in RPE is less than that observed in P200, the possibility that RPE preparations are contaminated by P200 cells cannot be completely excluded. However, it seems unlikely that neuronal cells, Müller cells and/or rod inner segments could have contaminated our RPE preparations since retinas were removed from the eyecup after incubation with buffer which allows ROS to retract from RPE microvilli, thus facilitating detachment of retinas (49). Moreover, it is well known that RPE cells and ROS are in intimate contact (50). Most of the contamination of RPE should thus come from ROS which, according to our results, does not contain PLA2. Berman *et al.* (33) have demonstrated that most RPE preparations purified by brushing out the cells are contaminated with varying

amounts of ROS and red blood cells. Again, this should not affect our results since, as shown in Figs. 2.1-2.7, ROS do not contain PLA2 activity. Moreover, PLA2 activity present in RPE is Ca^{2+} -independent (Fig. 2.9, A and B) whereas that in red blood cells is Ca^{2+} -dependent (51). This suggests that RPE-PLA2 is different from red blood cell-PLA2 and probably not due to a contamination by P200. More experiments will be necessary to verify this hypothesis.

In summary, we have shown that there is no significant PLA2 or PLA1 activity in ROS and that the activity levels previously reported by Jelsema (5), Castagnet and Giusto (9) and Zimmerman and Keys (8) could be accounted for by a contamination by adjacent retinal cell types. We identified two potential sources of such contaminating activity: RPE and P200. The enzyme present in both fractions is light- and Ca^{2+} -independent and is optimally active at alkaline pH. Other experiments are needed to further characterize the PLA2 present in RPE and P200. It will be particularly important to study PLA2 activity in P200 because of its cell composition. Indeed, we hypothesize that PLA2 activity found in our P200 fractions could come, at least partly, from rod inner segments. The absence of a light-effect in our hands could then be due to the disruption of the connection between rod inner and outer segments. PLA2 activity of rod inner segments could be light-sensitive only when these two segments are joined by the connective cilium. It will thus be very interesting to isolate and purify rod cells where the inner and outer segments are still attached to test this attractive hypothesis.

2.6 REFERENCES

- 1 Hargrave, P.A. (1993) *Methods in Neurosci.* **15**
- 2 Pfister, C., Bennett, N., Bruckert, F., Catty, P., Clerc, A., Pages F., and Deterre, P. (1993) *Cell. Signalling* **5**, 235-251
- 3 Chabre, M., and Deterre, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 255-266
- 4 Liebman, P.A., Parker, K.R., and Dratz, E.A. (1987) *Annu. Rev. Physiol.* **49**, 765-791
- 5 Jelsema, C.L. 1987. *J. Biol. Chem.* **262**, 163-168
- 6 Jelsema, C.L., and Axelrod, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 3623-3627
- 7 Axelrod, J. (1995) *Trends Neurosci.* **18**, 64-65
- 8 Zimmerman, W.F., and Keys, S. (1988) *Exp. Eye Res.* **47**, 247-260
- 9 Castagnet, O.I., and Giusto, N. M. (1993) *Exp. Eye Res.* **56**, 709-719
- 10 Neagos, G.R., Feysa, A., and Peters-Golden, M. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, L261-L268
- 11 Hirashima, Y., Farooqui, A.A., Mills, J.S., and Horrocks, L.A. (1992) *J. Neurochem.* **59**, 708-714
- 12 Ronkko, S. (1992) *Int. J. Biochem.* **24**, 869-876
- 13 Jordan, L.M., and Russo-Marie, F. (1992) *J. Chromatogr.* **597**, 299-308
- 14 Petit, K., Miserez, B., De Block, J., Van Dessel, G., and De Potter, W. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1125**, 150-156
- 15 Kramer, R.M., Roberts, E.F., Manetta, J., and Putnam, J.E. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 5268-5272
- 16 Hazen, S.L., Stuppy, R.J., and Gross, R.W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10622-10630

- 17 Gronich, J.H., Bonventre, J.V., and Nemenoff, R.A. (1990) *Biochem. J.* **271**, 37-43
- 18 Ulevitch, R.J., Watanabe, Y., Sano, M., Lister, M.D., Deems, R.A., and Dennis, E.A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3079-3085
- 19 Pind, S., and Kuksis, A. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **901**, 78-87
- 20 Apitz-Castro, R.J., Mas, M.A., Cruz, M.R., and Jain, M.K. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 63-71
- 21 Sehran, C.N. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 1-25
- 22 Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1128**, 117-131
- 23 Smith, W.L. (1989) *Biochem. J.* **259**, 315-324
- 24 Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R., and Lefkowitz, J.B. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 69-102
- 25 Irvine, R.F. (1982) *Biochem. J.* **204**, 3-16
- 26 Salesse, C., Boucher, F., and Leblanc, R.M. (1984) *Anal. Biochem.* **142**, 258-266
- 27 Feeney-Burns, L., and Berman, E.R. (1982) *Methods Enzymol.* **81**, 95-102
- 28 Zimmerman, W.F., and Godchaux, W. (1982) *Methods Enzymol.* **81**, 52-57
- 29 McDowell, J.H., and Kühn, H. (1977) *Biochemistry* **16**, 4054-4060
- 30 New, R.R.C. (1990) *Liposomes: a practical approach*. (New, R.R.C., ed) pp 44-48, IRL Press, New York
- 31 Gardiner, F.J. (1968) *Electro-optics handbook: a compendium of useful informations and technical data*, pp 6.12-6.14, Radio Corporation of America (RCA), U.S.A.
- 32 Miljanich, G.P. (1978) *Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane*, Ph. D. Dissertation, University of

California, Santa Cruz

- 33 Berman, E.R., Schwell, H., and Feeney, L. (1974) *Invest. Ophthalmol.* **13**: 675-687
- 34 Deleted in proof
- 35 Raubach, R.A., Franklin, L.K., and Dratz, E.A. (1974) *Vision Res.* **14**, 335-337
- 36 Schnetkamp, P.P.M., and Daemen, F.J.M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **672**: 307-312
- 37 E.A. Dennis. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060
- 38 Mayer, R.J., and Marshall, L.A. (1993) *FASEB J.* **7**, 339-348
- 39 Glaser, K.B., Mobilio, D., Chang, J.Y., and Senko, N. (1993) *Trends Pharm. Sci.* **14**, 92-98
- 40 Marshall, L.A., and McCarte-Roshak, A. (1992) *Biochem. Pharmacol.* **44**: 1849-1858
- 41 Mc Connell, D.G., Dangler, C.A., Eadie, D.M., and Litman, B.J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 4913-4918
- 42 Stone, W.L., Farnsworth, C.C., and & Dratz, E.A. (1979) *Exp. Eye Res.* **28**, 387-397
- 43 Jung, H., and Remé, C. (1994) *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **232**, 167-175
- 44 Krebs, W., and Kühn, H. (1977) *Exp. Eye Res.* **25**, 511-526
- 45 Fliesler, S.J., and Anderson, R.E. (1983) *Progr. Lipid Res.* **22**, 79-131
- 46 Gilman, A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 615-649
- 47 Neer, E.J., and Clapham, D.E. (1988) *Nature* **333**: 129-134
- 48 Reynolds, L.J., Hughes, L.L., Louis, A.I., Kramer, R.M., and Dennis, E.A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1167**, 272-280

- 49 Heller, J., and Jones, P. (1980) *Exp. Eye Res.* **30**, 481-487
- 50 Zinn, K.M., and Benjamin-Henkind, J.V. (eds) (1979) in *The retinal pigment epithelium*, pp 3-8, Harvard University Press, Cambridge
- 51 Kramer, R.M., Wüthrich, C., Bollier, C., Allegrini, P.R., and Zahler, P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **507**, 381-394

2.7 LEGENDS TO FIGURES

Fig. 2.1: **Effect of light on ROS PLA2 activity.** PLA2 activity was measured as described by Jelsema (5) in 30 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂, 0.6 mM NaCl, 4 mM glutathione with [¹⁴C]PAPC as the substrate. The activity was measured at 37°C for different times using either v-ROS, h-ROS or hs-ROS (see "Experimental Procedures"). During the incubation, samples were either exposed to dim red light (dark) or white light (light). A typical result is shown; mean ± S.D. of triplicates is representative of 15 separate experiments.

Fig. 2.2: **Effect of different substrates on ROS PLA2 activity.** When [¹⁴C]PAPC, [¹⁴C]HAPC or [¹⁴C]PAPE were used as the substrate, PLA2 activity was measured as described by Jelsema (5) in 30 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂, 0.6 mM NaCl, 4 mM glutathione. When [¹⁴C]DOPC was used as the substrate, PLA2 activity was measured as described by Zimmerman and Keys (8) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 mM ATP, 0.25 mM CoA. Pure vesicles of [¹⁴C]PAPC, [¹⁴C]HAPC or [¹⁴C]DOPC were used whereas [¹⁴C]PAPE was used with unlabeled DPPC in mixed vesicles. The activity was measured at 37°C under white light using either v-ROS, h-ROS or hs-ROS. The results are representative of mean ± S.D. of triplicates from four separate experiments.

Fig. 2.3: **Electron micrographs of purified bovine ROS.** A, v-ROS (14,000 X) isolated by vortexing the retinas. B, h-ROS (10,000 X) isolated by homogenizing the retinas. C, hs-ROS (16,000 X) isolated by hand shaking of the retinas. Fresh dark-adapted ROS preparations were used. v-ROS were obtained accor-

ding to a modification by Salesse *et al.* (26) of the method of Stone *et al.* (42) (see "Isolation of ROS by vortexing"). h-ROS were prepared according to a modification of the procedure of Zimmerman and Godchaux (28) (see "Isolation of ROS by homogenizing"). hs-ROS were prepared as described by McDowell and Kühn (29) (see "Isolation of ROS by homogenizing").

Fig. 2.4: Production of NADPH in v-ROS, h-ROS and hs-ROS. Freshly purified ROS were used. The assay was conducted in the dark as described by Schnetkamp and Daemen (36). The reaction was started by adding 200 μM βNADP and 200 μM D-glucose-6-phosphate to 7.7 μM rhodopsin, in a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 600 mM sucrose, 0.25% Ficoll 400, 1 mM MgCl_2 . The *arrow* indicates the time where Triton X-100 was added (0.5% final concentration). NADPH formation was determined by measuring the absorbance at 340 nm ($A_{340 \text{ nm}}$). The baseline, made by omitting βNADP and D-glucose-6-phosphate, was subtracted to yield the $\Delta A_{340 \text{ nm}}$. These results are representative of five separate experiments.

Fig. 2.5: Effect of guanine nucleotides on ROS PLA2 activity. A) PLA2 activity of ROS exposed to dim red light (dark-adapted). B, PLA2 activity of ROS exposed to white light. The activity was measured as described in the legend to Fig. 1 using either h-ROS or hs-ROS and [^{14}C]PAPC as the substrate. The assay buffer was either not supplemented (control), or supplemented with 100 μM $\text{GTP}\gamma\text{S}$, 1 mM GTP or 100 μM $\text{GDP}\beta\text{S}$. The results are mean \pm S.D. of triplicates from three separate experiments.

Fig. 2.6: Effect of Mg²⁺ concentration, EGTA, and detergent on ROS PLA2 activity as a function of free Ca²⁺ concentration. Ca²⁺ concentration was varied from 10 nM to 5 mM in the presence or absence of 1 mM EGTA, according to the procedure of Marshall and McCarte-Roshak (40). The activity was measured as described in the legend to Fig. 1 using intact ROS and [¹⁴C]PAPC as the substrate. Either 40 or 4 mM Mg²⁺ was included in the assay buffer. Where indicated, 1% emulphogene was used as detergent. Samples were incubated under white light for 10 min. The results are mean ± S.D. of triplicates from two separate experiments.

Fig. 2.7: ROS PLA2 or PLA1 activity towards endogenous substrates. Intact ROS were incubated in 30 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂, 0.6 mM NaCl, 4 mM glutathione without any exogenous substrate added. During the assay, samples were kept at 37°C and were either exposed to white light or dim red light for 0, 0.5, 15, 30 and 60 min. Phospholipids were then extracted, quantitated and separated by HPLC as described (see "Experimental Procedures"). FFA, free fatty acids; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine; lysoPE, lyso-phosphatidylethanolamine; lysoPS, lyso-phosphatidylserine; lysoPC, lyso-phosphatidylcholine. The elution profile is typical of three separate injections for each condition.

Fig. 2.8: PLA2 activity in subretinal fractions other than ROS. A, PLA2 activity of RPE and P200 exposed to dim red light. B, PLA2 activity of RPE and P200 exposed to white light. The activity was measured as described in the legend to Fig. 1 using [¹⁴C]PAPC as the substrate. Samples were incubated for 10 min at 37°C. The results are mean ± S.D. of triplicates from three separate exper-

riments.

Fig. 2.9: Influence of pH and Ca²⁺ on RPE and P200 PLA2 activity. A, PLA2 activity of RPE in the presence of Ca²⁺. B, PLA2 activity of RPE in the absence of Ca²⁺. C, PLA2 activity of P200 in the presence of Ca²⁺. D, PLA2 activity of P200 in the absence of Ca²⁺. The activity was measured in different buffers containing final concentrations of 30 mM MgCl₂, 0.6 mM NaCl, and 4 mM glutathione. In A and C, a final concentration of 5 mM Ca²⁺ was included in the assay buffer whereas 5 mM of EGTA was used for B and D. Buffers were used at a final concentration of 133 mM. Samples were incubated for 1 h at 37°C with [¹⁴C]PAPC as the substrate. The results are mean ± S.D. of triplicates from four separate experiments.

TABLE 2.1

Distribution of PLA2 activity among particulate and soluble fractions generated during the purification of hs-ROS

Fractions assayed (see "Isolation of ROS by hand shaking" for a description of each fraction)	PLA2 activity ^a (nmol of [¹⁴ C]arachidonic acid/15 min per mg proteins)			
	Dark		Light	
	-GTPγS	+GTPγS	-GTPγS	+GTPγS
SN 3,000 X g (crude ROS)	-0.03 ± 0.05	0.00 ± 0.04	-0.06 ± 0.08	-0.02 ± 0.11
SN 4,400 X g (waste)	0.01 ± 0.03	-0.02 ± 0.02	0.07 ± 0.13	0.03 ± 0.11
P 4,400 X g (semi-purified ROS)	-0.14 ± 0.02	-0.13 ± 0.05	-0.10 ± 0.11	-0.01 ± 0.09
SN 140,000 X g (purified diluted ROS)	0.00 ± 0.02	0.01 ± 0.03	0.05 ± 0.11	0.01 ± 0.09
SN 17,500 X g (waste)	0.00 ± 0.06	-0.01 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.03
P17,500 X g (purified concentrated ROS)	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.02	-0.06 ± 0.05	-0.07 ± 0.04
SN 4,400 X g + P 4,400 X g	0.06 ± 0.07	0.02 ± 0.09	0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.04
SN 17,500 X g + P 17,500 X g	-0.02 ± 0.02	-0.01 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.06

^a The assay was performed over 15 min as described in the legend to Fig. 1. P 3,000 X g (not shown) is equivalent to the P200 fraction (see "Preparation of P200"). The results are representative mean ± S.D. of triplicates from two separate experiments.

TABLE 2.2

Comparison of ROS PLA2 activity levels reported by different authors

Authors	Maximum activity reported (nmol of fatty acids per mg proteins)	Experimental conditions
Jelsema (5)	133.6 ± 24.0/10 min	20 µg of dark-adapted ROS proteins; 4.5 µCi/ml [¹⁴ C]PAPC + 80 µg/ml DPPC
Castagnet and Giusto (9)	0.38 ± 0.03/60 min	100 µg of dark-adapted ROS proteins; 4.5 µCi/ml [¹⁴ C]PAPC + 100 µg/ml DPPC
Zimmerman and Keys (8)	19.16 ± 3.60/60 min	300-500 µg of ROS proteins; 10 µCi/ ml [¹⁴ C]DOPC
Jacob <i>et al.</i> (this publication)	0.46 ± 0.55/5 min 0.00 ± 0.01/60 min	See Fig. 1 Same as Zimmerman and Keys (8) (result not shown)

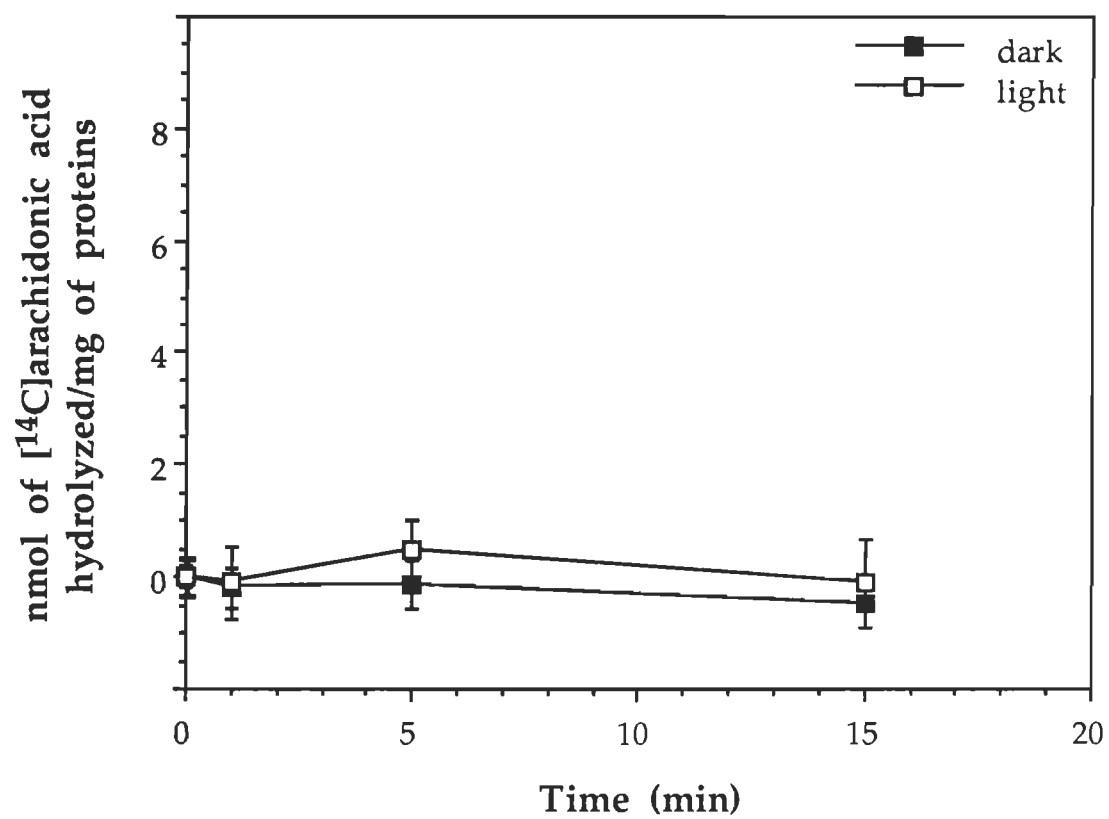


Figure 2.1: Effect of light on ROS PLA2 activity

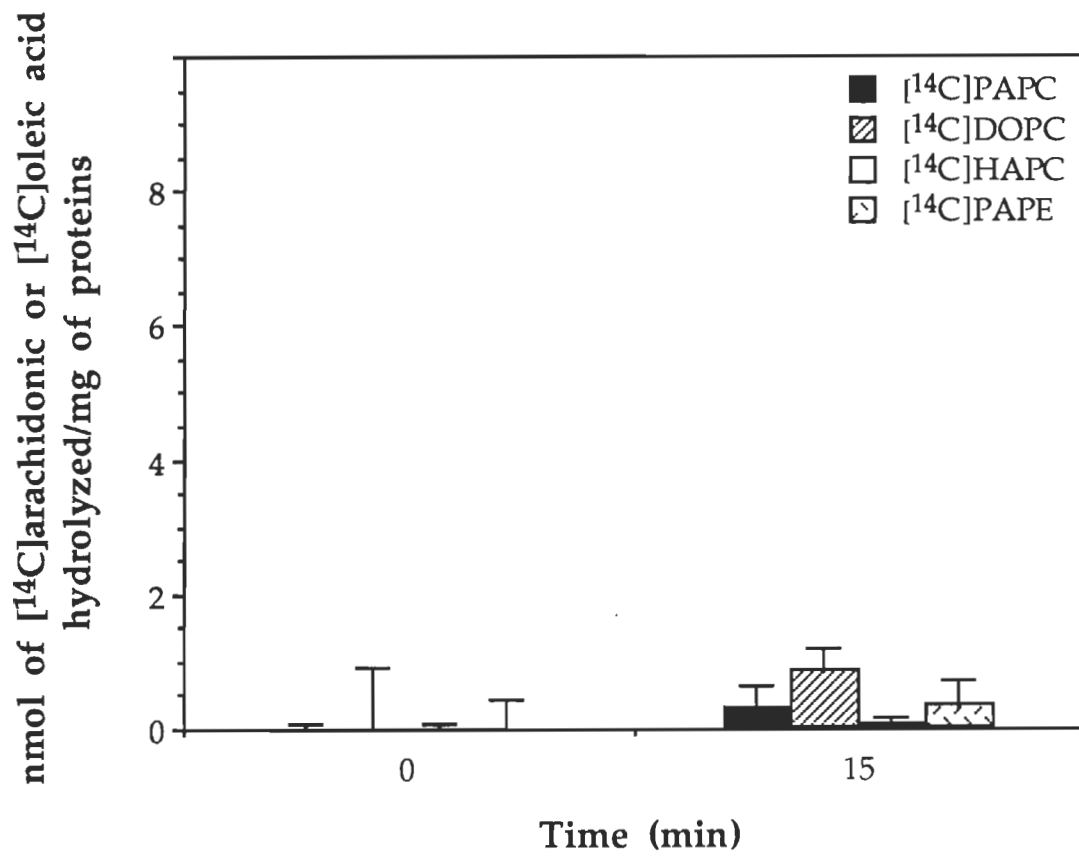


Figure 2.2: Effect of different substrates on ROS PLA2 activity

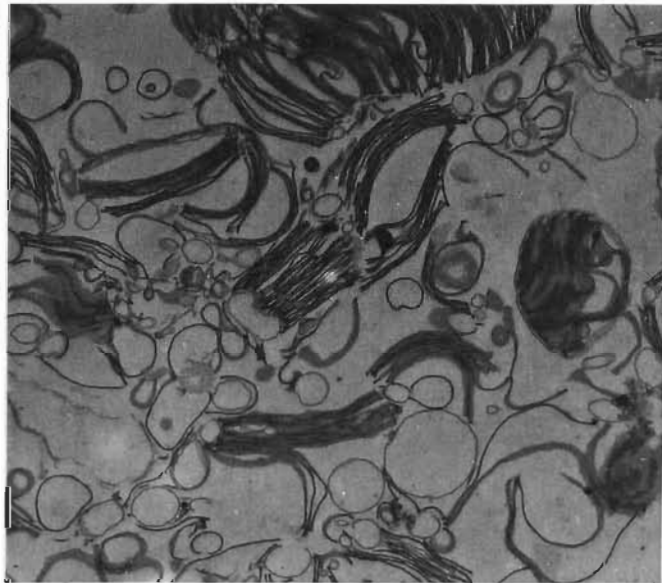


Figure 2.3A: Electron micrograph of purified bovine v-ROS

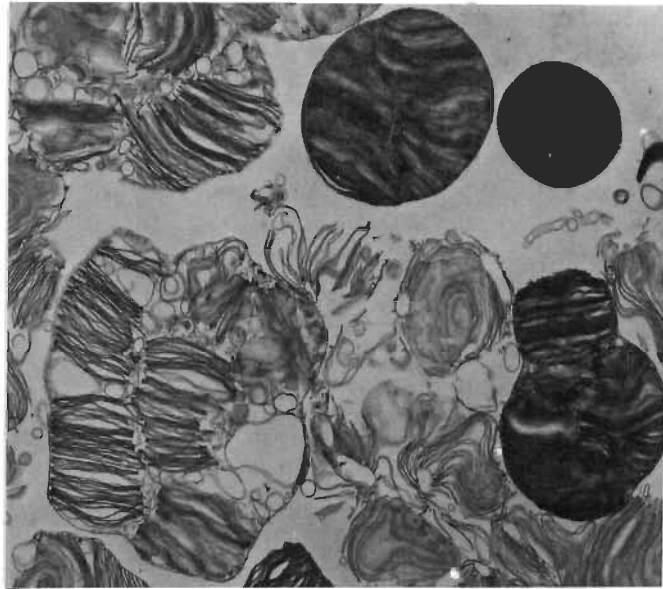


Figure 2.3B: Electron micrograph of purified bovine h-ROS

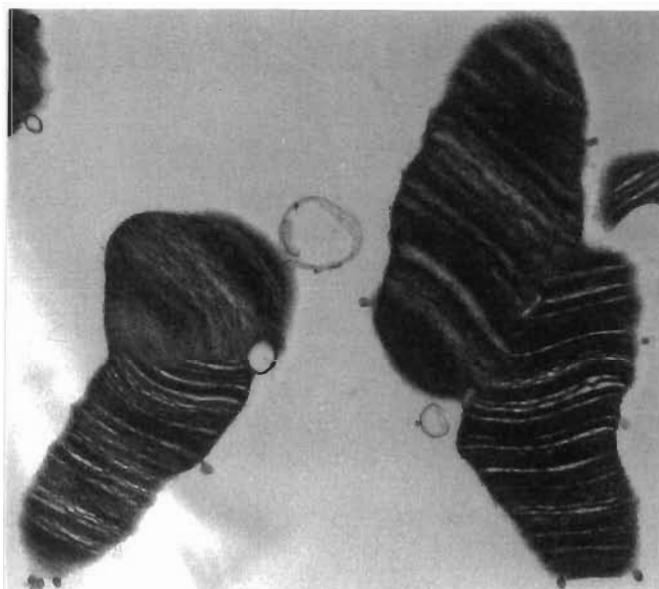


Figure 2.3C: Electron micrograph of purified bovine hs-ROS

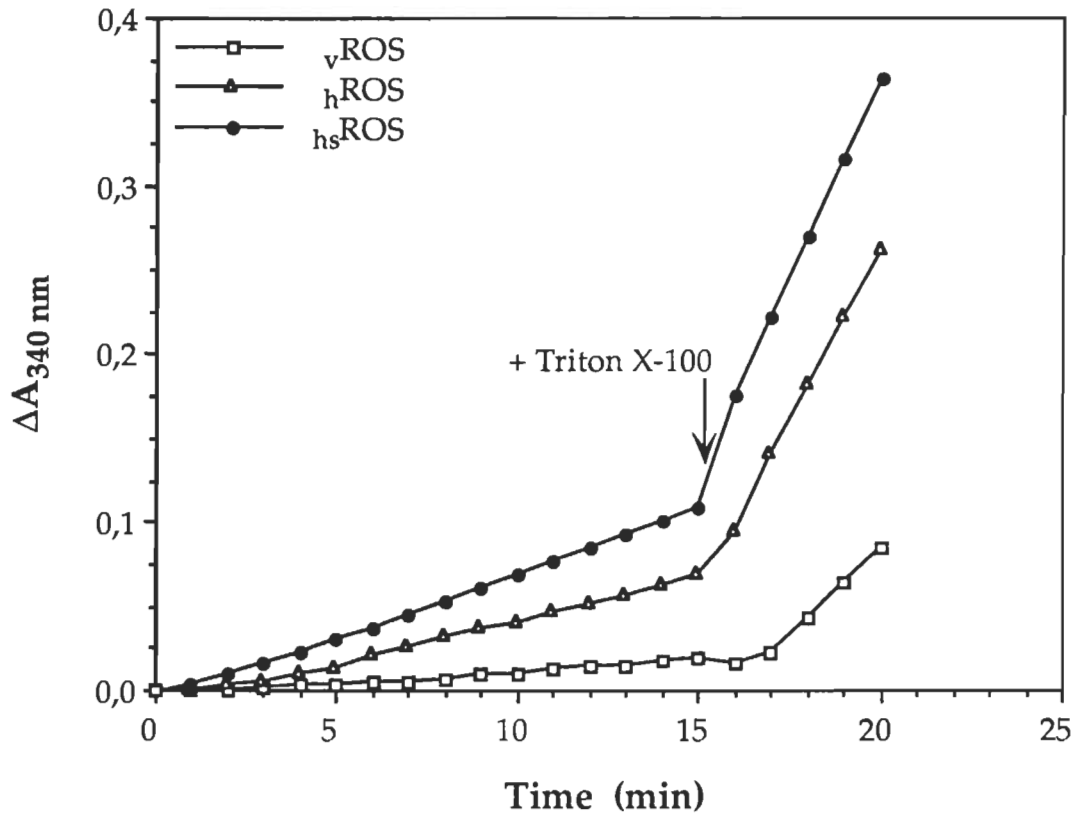


Figure 2.4: Production of NADPH in v-ROS, h-ROS and hs-ROS

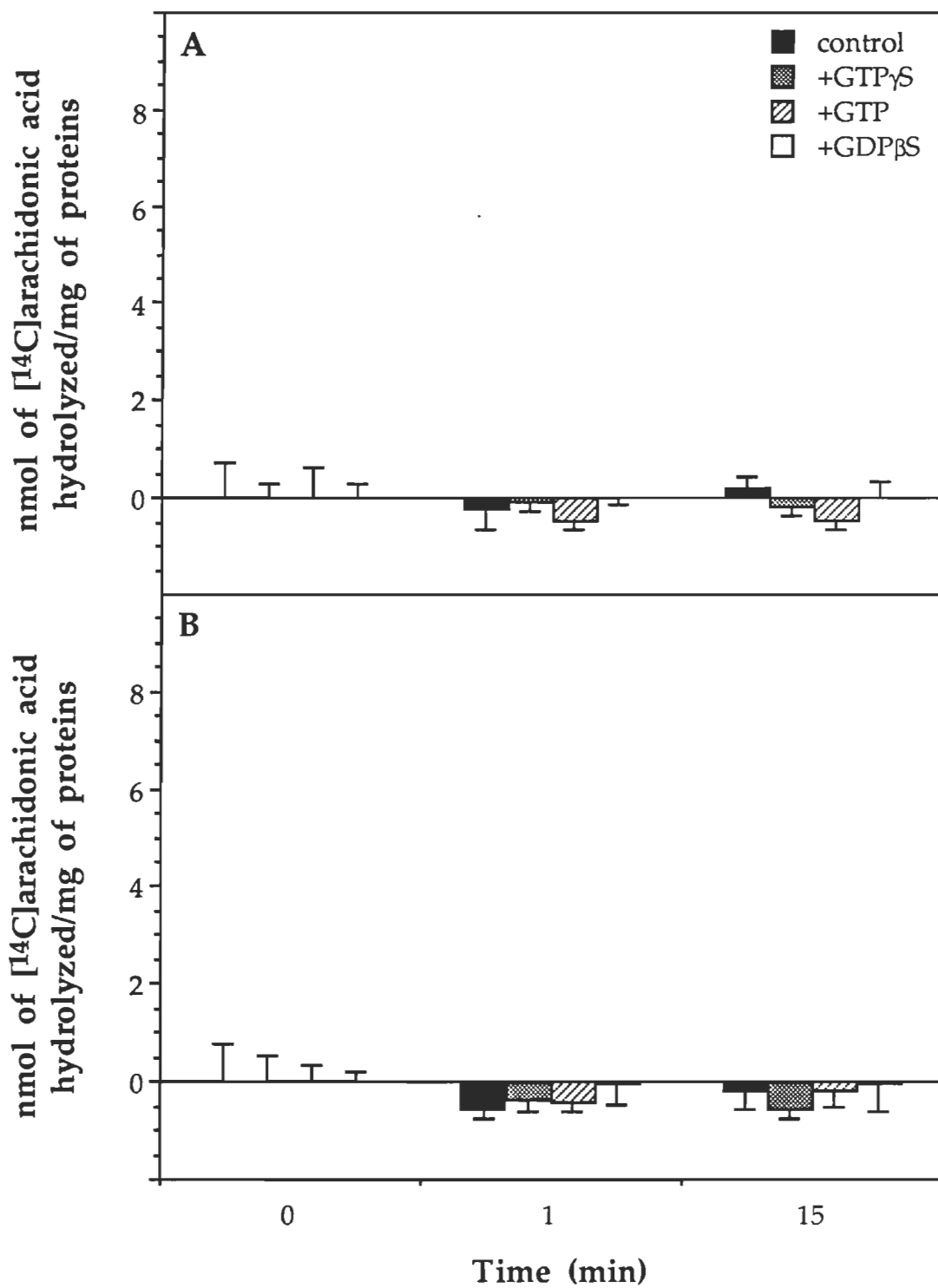


Figure 2.5: Effect of guanine nucleotides on ROS PLA2 activity

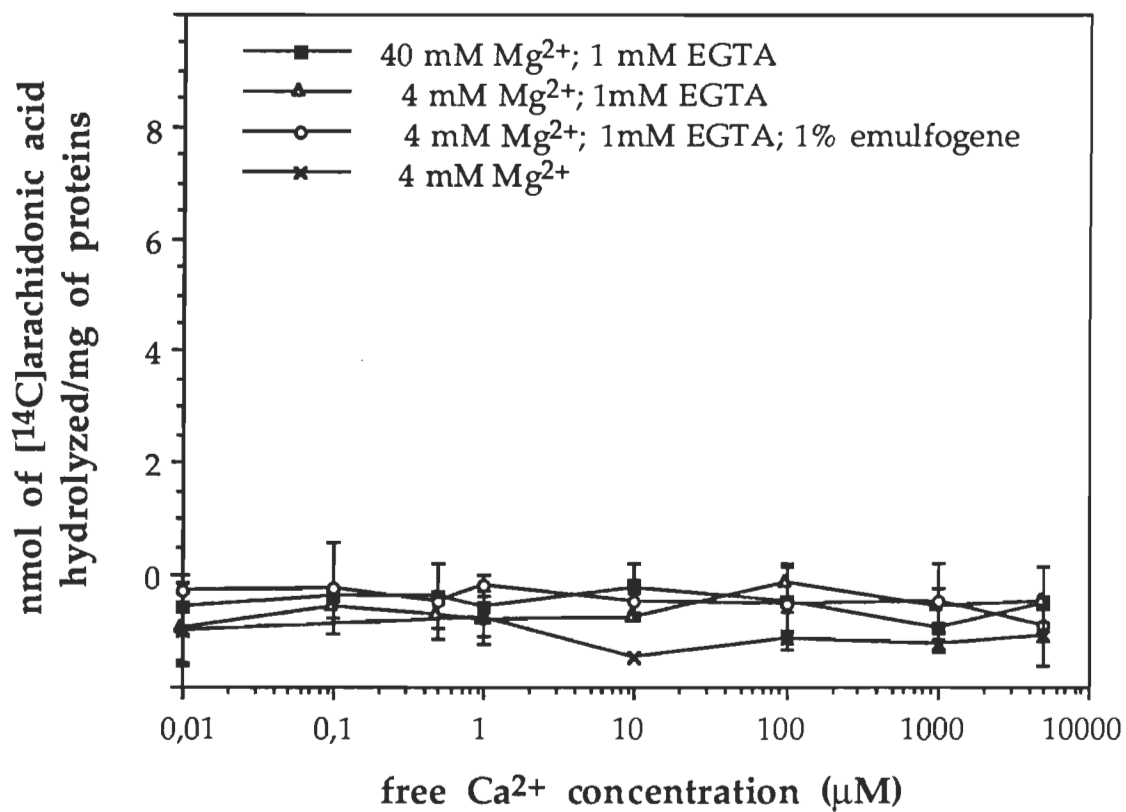


Figure 2.6: Effect of Mg²⁺ concentration, EGTA, and detergent on ROS PLA2 activity as a function of free Ca²⁺ concentration

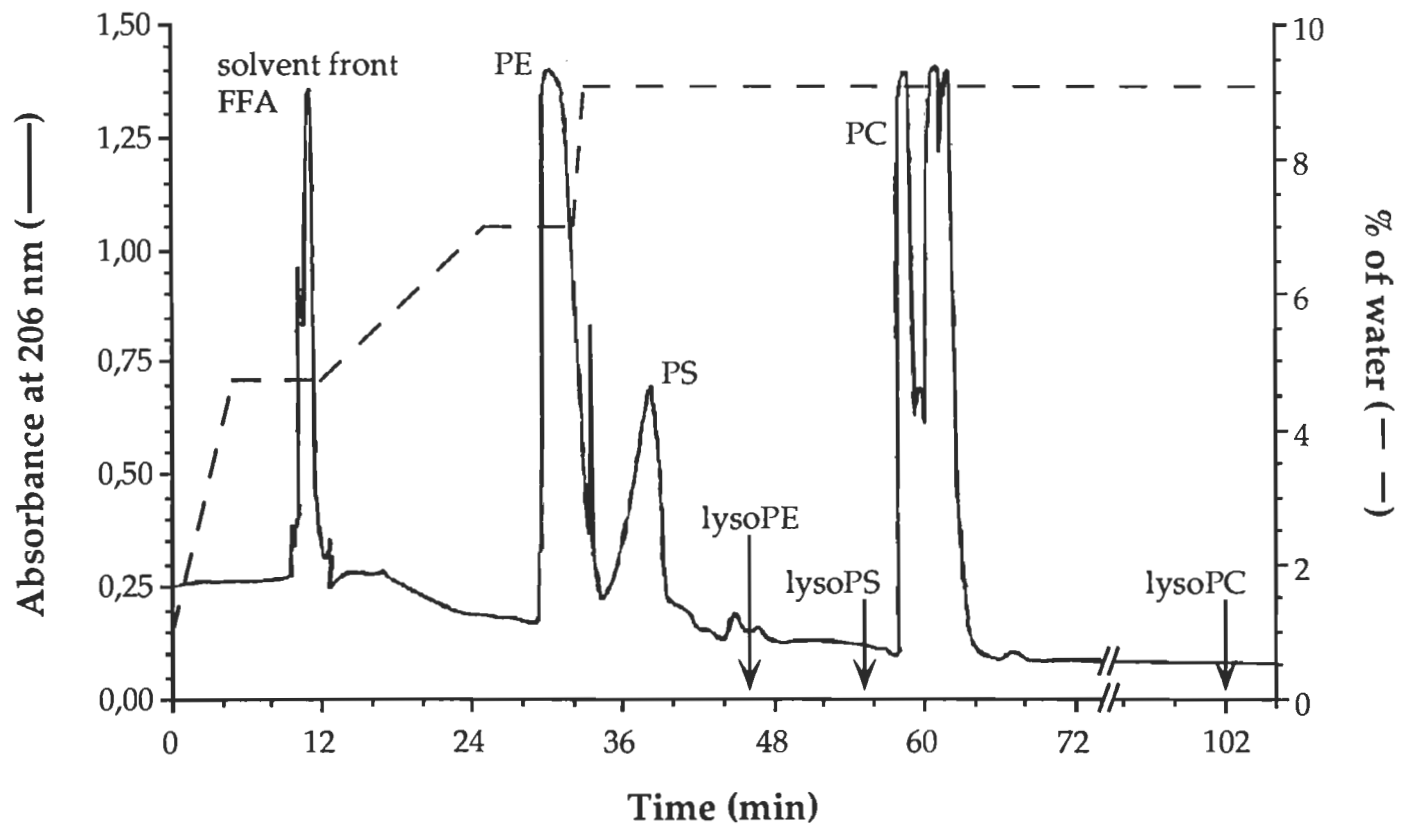


Figure 2.7: ROS PLA2 or PLA1 activity toward endogenous substrates

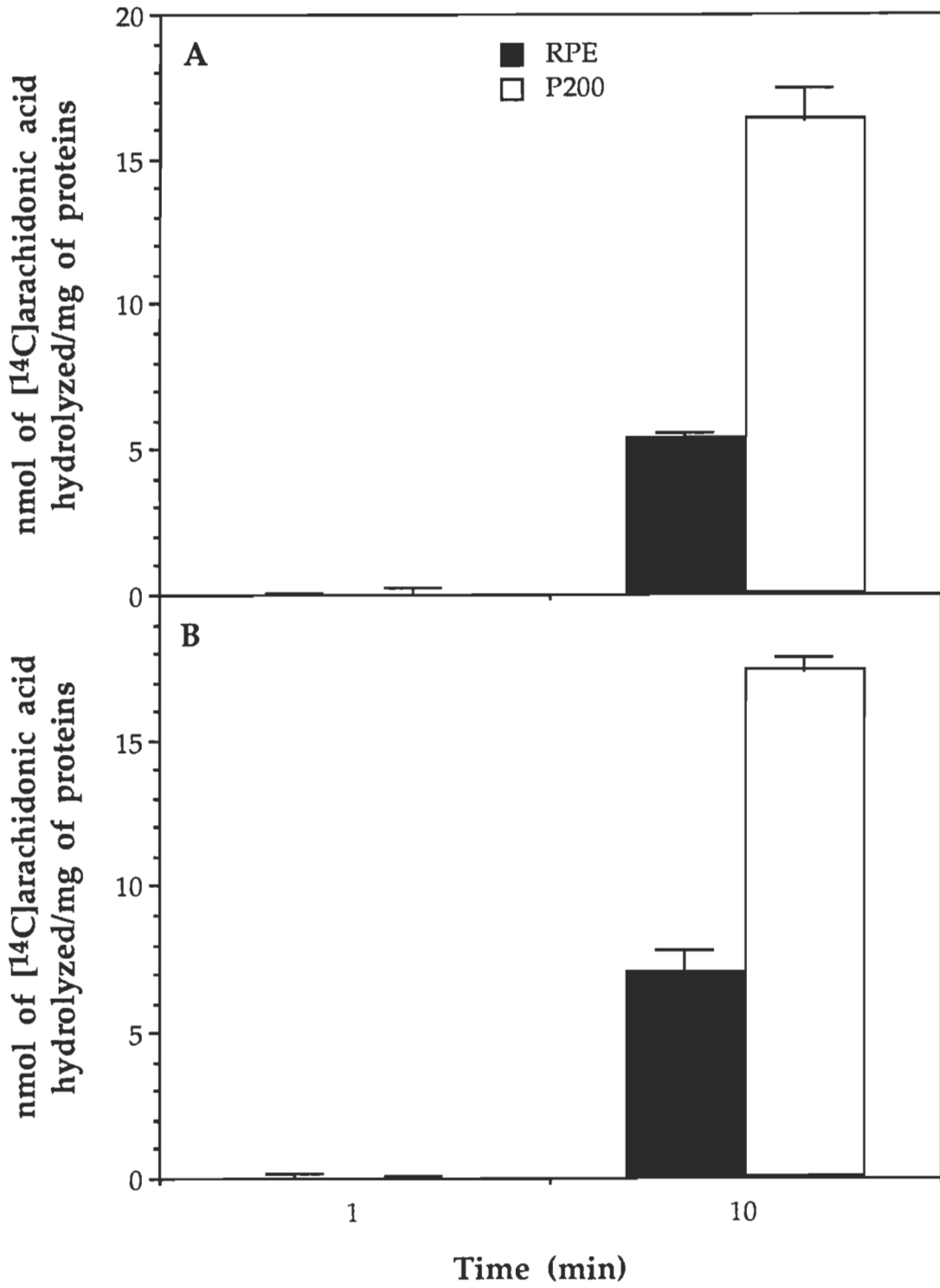


Figure 2.8: PLA2 activity in subretinal fractions other than ROS

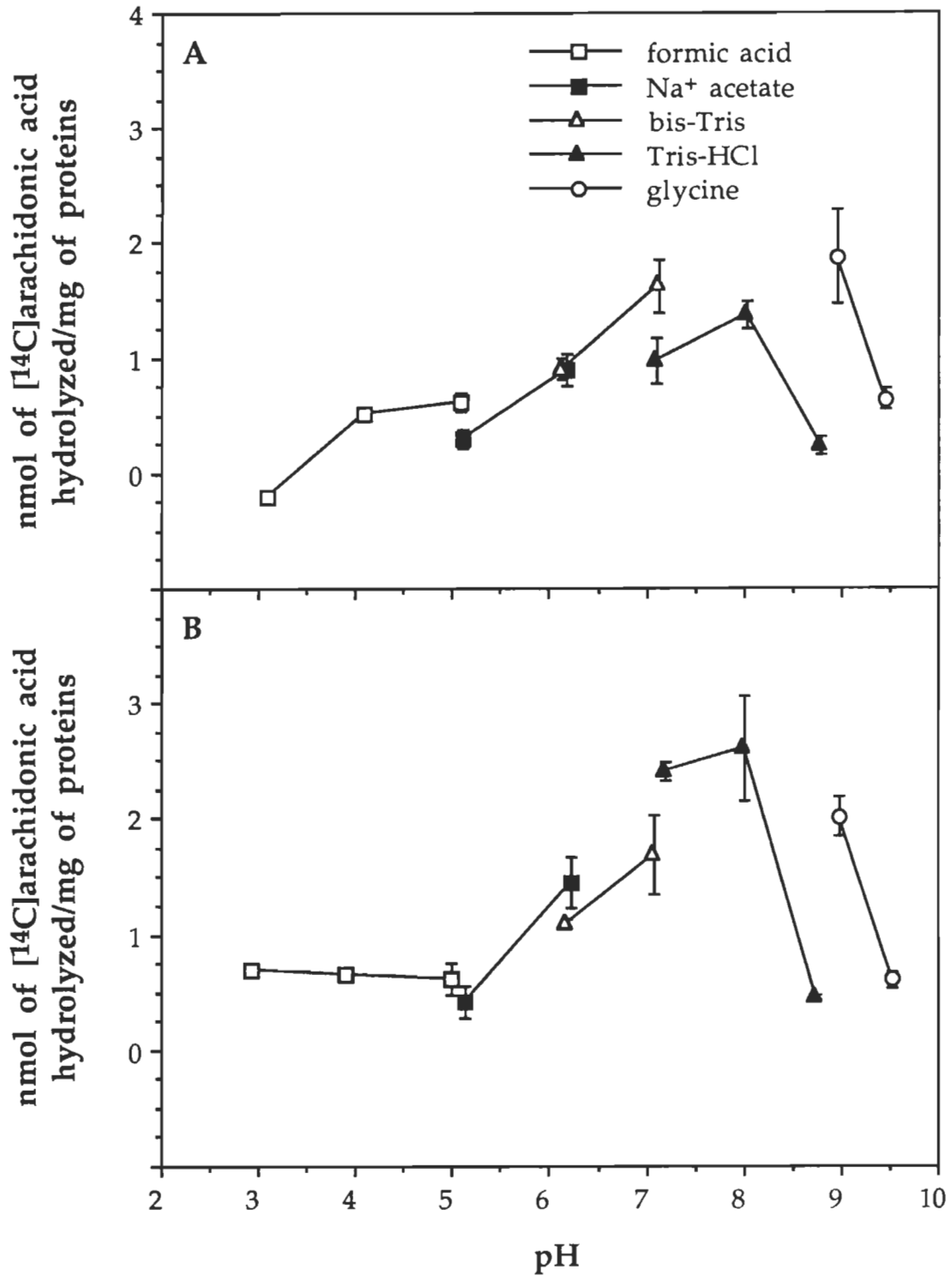


Figure 2.9: Influence of pH and Ca²⁺ on RPE and P200 PLA2 activity

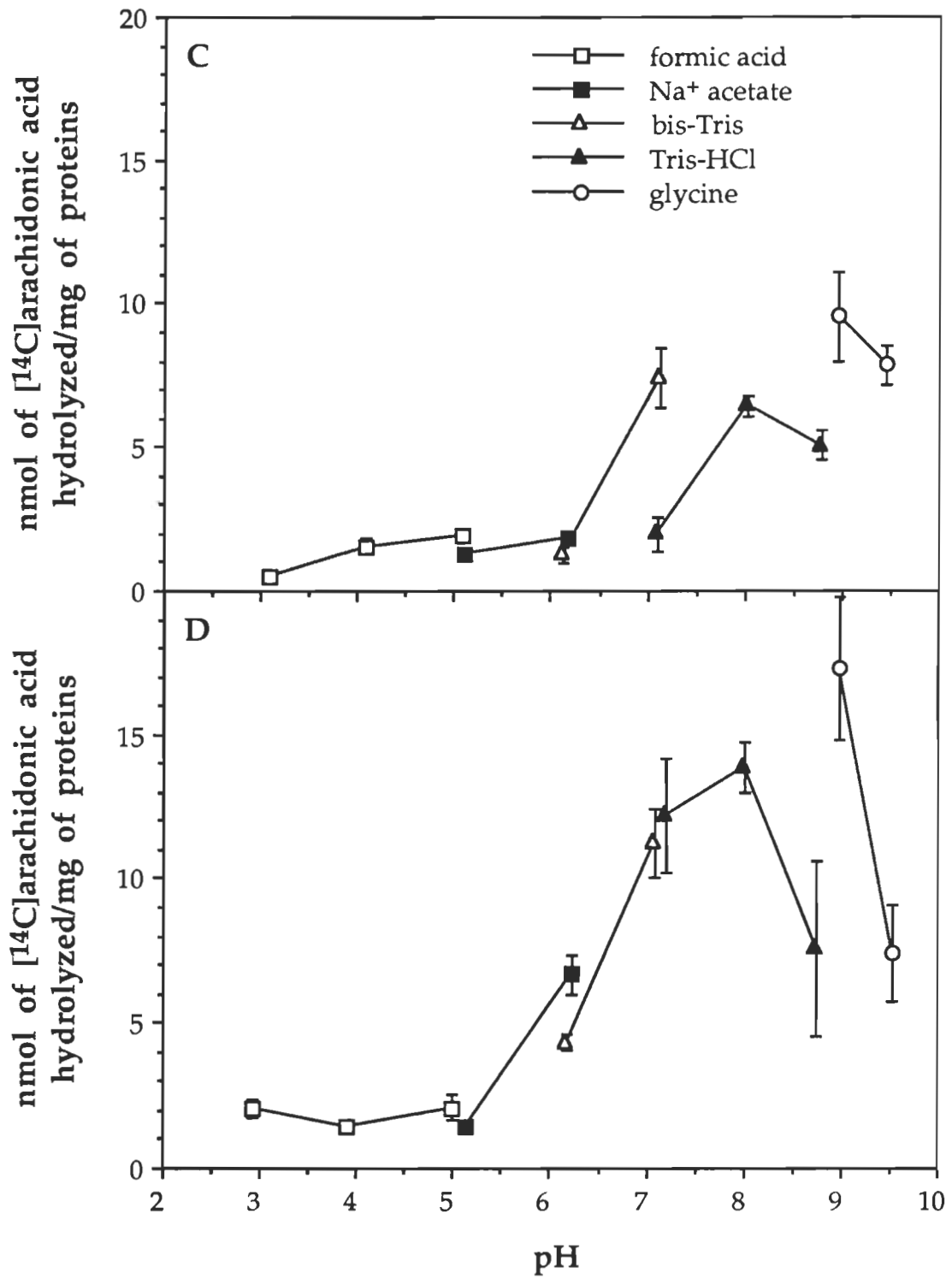


Figure 2.9: Influence of pH and Ca²⁺ on RPE and P200 PLA2 activity

CHAPITRE 3

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DES PRÉPARATIONS DE SEGMENTS

EXTERNES DE BÂTONNETS OBTENUS PAR VORTEXAGE,

HOMOGENÉISATION ET AGITATION À LA MAIN

3.1 Introduction

Puisque les résultats obtenus des dosages d'activité PLA2 ne permettaient de confirmer ni les résultats de Jelsema (1987), ni ceux de Castagnet et Giusto (1993) ou Zimmerman et Keys (1988), et ce, malgré les nombreuses conditions testées (voir Chapitre 2), il fallait s'assurer de la qualité des préparations de ROS utilisées pour ces dosages. C'est-à-dire qu'il fallait s'assurer que les ROS étaient intacts, avec une membrane plasmique scellée et un empilement serré des disques (voir Schéma 1.3) (Dickson et Graves. 1979; Anderson *et al.* 1980; Olive. 1980; Saari et Hunt. 1980; Steinberg *et al.* 1980; Tsukamoto et Yamada. 1982; Athanassious *et al.* 1984; Uhl *et al.* 1987; Saito. 1991; Fisher *et al.* 1993). Plusieurs types de PLA2, de même que certaines des protéines régulatrices de PLA2 (ex. MAPK²⁴), sont en effet solubles. Il semblait donc plus que possible qu'une protéine régulatrice, ou la PLA2 elle-même, ait été perdue en cours de purification des ROS. De ce constat découlait la nécessité d'examiner les préparations de ROS en microscopie électronique pour en déterminer le degré d'intégrité.

Il y a plusieurs façons de purifier les ROS (McConnell. 1965; Papermaster et Dreyer. 1974; Krebs et Kühn. 1977; McDowell et Kühn. 1977; Stone *et al.* 1979; Godchaux et Zimmerman. 1979; De Grip *et al.* 1980; Schnetkamp et Daemen. 1982; Salesse *et al.* 1984; Molday et Molday. 1987; Uhl *et al.* 1987). Chaque méthode diffère de par le type (phosphate, Tris-HCl, Tris acétate, Hépes) et la composition (présence ou non de taurine, DTT, NaCl, glucose, EDTA) du tampon utilisé, le nombre et la vitesse de centrifugation, le type de gradient (discontinu/sucrose, continu/sucrose, Ficoll), etc. Cependant, toutes ces méthodes peuvent être regroupées en trois catégories, dépendamment de la technique utili-

²⁴ MAPK = "mitogen-activated protein kinase".

sée pour séparer, ou isoler, les ROS du reste de la rétine. Il y a trois techniques fondamentales d'isolement des ROS: le vortexage (Stone *et al.* 1979; Schnetkamp et Daemen. 1982; Salesse *et al.* 1984; Uhl *et al.* 1987), l'homogénéisation (McConnell. 1965; De Grip *et al.* 1980; Godchaux et Zimmerman. 1979) et l'agitation à la main (Papermaster et Dreyer. 1974; McDowell et Kühn. 1977; Krebs et Kühn. 1977; Molday et Molday. 1987). Chacune tire profit de la fragilité du cil connectif reliant les segments externe et interne du bâtonnet (voir Schéma 1.3). Toutefois, tel que démontré ci-dessous dans les sections 3.3.1-3.3.3, elles ne préservent pas tout aussi bien l'une que l'autre l'intégrité structurale et biochimique des ROS. La microscopie électronique, de concert avec le dosage enzymatique de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), aura donc permis de réaliser la première étude comparative des trois techniques couramment utilisées pour l'isolement des ROS.

Cette étude est d'autant plus intéressante et importante que la méthode de purification des ROS utilisée par Jelsema (1987), l'auteur ayant rapporté le plus haut taux d'activité PLA2 (voir Tableau 2.2), n'est pas décrite. L'article cité en référence à ce sujet (Sternweiss et Gilman. 1982) ne contient en effet aucune information relative à la purification des ROS, mais traite plutôt de la purification d'une guanylate cyclase. Par ailleurs, Jelsema (1987) ne relate aucun détail quant à la pureté (A_{280}/A_{500} nm) et l'intégrité (micrographies et/ou production de NADPH) des préparations de ROS utilisées, ce qui jette une ombre sur la valeur des résultats publiés et remet en question l'origine de l'activité PLA2 mesurée par Jelsema (1987).

Le fondement de cette remise en question est encore plus solide lors-

voit une centrifugation de 16 h à 140 000 g^{25} (Jacob *et al.* 1996). On peut donc, là encore, douter de la pureté des préparations de ROS utilisées et, par conséquent, douter de l'origine de l'activité PLA2 mesurée par Zimmerman et Keys (1988).

Considérant toutes ces informations, le besoin de faire une étude comparative des principales méthodes d'isolement et de purification des ROS se justifiait de lui-même. Il s'avérait en effet essentiel d'évaluer, en termes d'intégrité et de pureté, la qualité des ROS obtenus par vortexage (v-ROS), homogénéisation (h-ROS) et agitation à la main (hs-ROS) des rétines. Cela devait permettre de consolider les conclusions de la section 2.5 affirmant que: 1) il n'y a pas d'activité PLA2 dans les ROS purifiés intacts et 2) l'activité mesurée par Jelsema (1987), Zimmerman et Keys (1988) et Castagnet et Giusto (1993) est due à une contamination de leurs préparations.

3.2 Méthodes

3.2.1 Préparation des échantillons pour la microscopie électronique

Les v-ROS, h-ROS et hs-ROS ont été purifiés selon les protocoles décrits dans les sections 2.3.2, 2.3.3 et 2.3.4, respectivement. Après avoir été délicatement resuspendus²⁶ avec une pipette de transfert à large ouverture et ce, dans un minimum de tampon (tampon A pour les v-ROS: 10 mM Hépes, 0,15 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, pH 7,5; tampon B pour les h-

²⁵ Ni Jelsema (1987) ni Castagnet et Giusto (1993) ne précise la vitesse de centrifugation des gradients. En fait, il semble même que Jelsema (1987) n'ait utilisé que des préparations de ROS semi-purifiés, i.e. non purifiés sur gradients de sucrose.

²⁶ Lorsque les ROS passaient des gradients de sucrose à un tampon dont la concentration de sucrose était plus faible ou nulle, soit au moment de concentrer les ROS purifiés, une attention particulière a été portée à l'étape de dilution des ROS dans ce dernier tampon: 3-4 ml de tampon étaient ajoutés aux ROS "post-gradients" (5-10 ml) toutes les 10 minutes, de façon à les diluer progressivement (jusqu'à 35-40 ml) et ainsi réduire les risques de choc osmotique (Zimmerman et Godchaux. 1982).

ROS: 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM DTT, 20% sucrose, pH 7,4; et tampon C pour les hs-ROS: 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, pH 7,0), les ROS étaient mélangés à 5 volumes de tampon de fixation (3% glutaraldéhyde dans le tampon A, B ou C, selon le cas). Ils étaient alors fixés pendant 1 h à la température ambiante (18-23°C), puis sédimentés (5 min; 4 000 X g; centrifugeuse clinique IEC). Après avoir éliminé le surnageant, les ROS étaient lavés 3 fois avec le tampon approprié, incubés pendant 30 minutes à 4°C dans 1% OsO₄ (ajouté au tampon A, B ou C, selon le cas) pour la post-fixation, puis sédimentés à nouveau (tel que décrit ci-haut) pour être lavés 3 fois avec le tampon. Des essais de fixation/lavages/post-fixation/lavages ont également été effectués dans un tampon 100 mM cacodylate; 12 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; pH 7,4, tel que suggéré par Mercer et Birbeck (1972) et Robinson et Gray (1990), et ce, pour chaque type de préparation de ROS. Le culot obtenu était ensuite progressivement déshydraté dans 30%, 50%, 70%, 85%, 95% et 100% éthanol. Pour les cinq premières étapes (30-95% éthanol), les ROS étaient incubés pendant 10 minutes à la température ambiante, dans 2 volumes d'éthanol. La dernière étape (100% éthanol) durait quant à elle 20 minutes et était répétée 3 fois. Les ROS étaient ensuite incubés 2 fois (10 minutes chacune) dans 2 volumes d'oxyde de propylène 100%, un solvant de transition entre l'éthanol et la résine (Fisher *et al.* 1993). Les échantillons de ROS ainsi fixés, déshydratés et équilibrés dans l'oxyde de propylène (Méalab) étaient alors enrobés de résine (Epon 812; Mecalab), à la suite de quoi des coupes étaient préparées à l'aide d'un microtome. Chaque coupe était finalement colorée à l'acétate d'uranyl pour en permettre l'observation. Ces dernières manipulations étaient effectuées selon les recommandations de Mercer et Birbeck (1972), Robinson et Gray (1990) et Fisher *et al.* (1993).

3.2.2 Dosage enzymatique de la glucose 6-phosphate déshydrogénase²⁷

Alors que la microscopie électronique n'offre qu'une mesure qualitative de l'intégrité des ROS, le dosage de l'activité de la G6PD permet de la quantifier. L'absorbance à 340 nm du NADPH, un des produits de réaction de la G6PD²⁸, permet en effet de déterminer l'activité de cette dernière. La G6PD est une enzyme soluble qui est normalement retenue dans les ROS par la membrane plasmique (Schnetkamp et Daemen. 1981, 1982) et qui, comme toute enzyme, est active seulement lorsqu'elle a accès à son substrat. Ainsi, s'il y a rupture de la membrane plasmique des ROS au cours de la purification, l'enzyme est perdue dans le tampon et n'est plus disponible pour les dosages d'activité en présence d'un substrat exogène. Par contre, si les ROS sont intacts et que leur membrane plasmique reste scellée, l'enzyme demeure dans les ROS. De tels ROS intacts incubés en présence d'un substrat exogène ne permettront pas de détecter la formation du produit de réaction (NADPH) et ce, parce que l'enzyme et le substrat ne sont pas en contact. Toutefois, la perméabilisation de la membrane plasmique avec un détergent donne à l'enzyme accès à son substrat, ce qui permet de mesurer le taux de production de NADPH. L'augmentation du taux de production de NADPH après solubilisation de la membrane plasmique avec un détergent reflète donc l'intégrité préalable des ROS (voir la section 2.4.3).

Le dosage enzymatique de la G6PD a été effectué à la température ambiante, tel que décrit par Schnetkamp et Daemen (1982). La réaction était initiée

²⁷ Bien que les résultats relatifs aux dosages de NADPH soient présentés dans le Chapitre 2 et non dans ce chapitre, la méthode de dosage y est tout de même décrite et ce, autant pour pallier à l'absence d'une telle description au Chapitre 2 (voir la section 2.3.10) que pour permettre d'en apprécier l'importance.

²⁸ Glucose 6-phosphate + 2 NADP⁺ + H₂O → D-ribose 5-phosphate + CO₂ + 2 NADPH + 2H⁺ (Lehninger. 1982). Le coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm est de 6,22X10⁶ M⁻¹ cm⁻¹ (Budavari *et al.* 1989).

en ajoutant 200 μM de NADP^+ et 200 μM de glucose 6-phosphate à un échantillon de ROS contenant 7,7 μM de rhodopsine dans un volume total de 1 ml. La suspension était momentanément agitée par inversion, de façon à obtenir une distribution homogène du substrat tout en minimisant les risques de briser les ROS. Le tampon de dosage contenait 20 mM Tris-HCl; 0,25% Ficoll 400; 600 mM sucrose; 1 mM MgCl_2 ; pH 7,4. L'absorbance à 340 nm était enregistrée à chaque minute pendant 14 minutes, après quoi 0,5% Triton X-100 (concentration finale) était ajouté pour perméabiliser la membrane plasmique des ROS et ainsi donner plein accès de la G6PD à son substrat exogène. Après une brève agitation de la suspension par inversion, l'absorbance était à nouveau enregistrée à chaque minute pendant 5 minutes. Le contrôle négatif subissait exactement le même traitement et contenait tous les réactifs, sauf le NADP^+ et le glucose 6-phosphate. Après soustraction des valeurs d'absorbance du contrôle négatif, on obtenait le taux net de production de NADPH. En comparant ensuite les taux nets de production de NADPH avant et après perméabilisation au détergent, on peut déterminer le degré d'intégrité des ROS. Autrement dit, plus le taux net de production de NADPH est faible avant perméabilisation mais élevé après perméabilisation au détergent, plus les ROS étaient intacts (voir la section 2.4.3).

3.2.3 Mesure du taux d'utilisation de l'acide [^{14}C]arachidonique par les ROS

Les ROS ont été isolés et purifiés tel que décrit à la section 2.3.4. Des aliquots contenant l'équivalent de 20 μg de rhodopsine ont ensuite été incubés en présence de 800 pmol d'acide [^{14}C]arachidonique dans un volume total de 250

μl^{29} et ce, pendant différentes périodes de temps. La suspension aqueuse d'acide [^{14}C]arachidonique a été préparée tel que décrit à la section 2.3.7 pour les suspensions aqueuses de phospholipides. Deux tampons différents ont été utilisés pour ce test, soit: 1) 30 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , 30 mM MgCl_2 , 0,6 mM NaCl, 4 mM glutathione, pH 8,8 tel que décrit par Jelsema (1987) ou 2) 20 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , 30 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0,5 mM DTT, 1 mM ATP, 0,25 mM CoA, pH 7,5 tel que décrit par Zimmerman et Keys (1988). La réaction et la récupération des acides [^{14}C]arachidoniques se sont déroulées tel que décrit à la section 2.3.7, les contrôles négatifs ayant reçu le réactif de Dole au temps zéro. Juste avant de transférer les tubes à 37°C , ils ont été soniqués (dans un bain à sonication) pendant 4 sec selon les recommandations de Zimmerman et Keys (1988), afin de favoriser le contact enzyme/substrat. Le taux d'utilisation est exprimé en pourcentage d'acide [^{14}C]arachidonique récupéré aux temps 2, 5, 10 et 15 minutes, par rapport à ce qui est récupéré au temps 0 minute.

3.3 Résultats

3.3.1 Évaluation de l'intégrité des segments externes de bâtonnets obtenus par vortexage des rétines (v-ROS)

La première méthode ayant été utilisée pour purifier des ROS, soit le vortexage, s'est avérée être très destructrice pour les ROS. En fait, toutes les préparations de v-ROS ayant été fixées/post-fixées selon les directives sus-mentionnées pour ensuite être observées, voire scrutées, au microscope électronique ne contenaient pratiquement que des ROS éclatés (voir Figure 3.1). En observant les ROS présentés à la Figure 3.1, on remarque immédiatement l'ab-

²⁹ La concentration finale d'acide [^{14}C]arachidonique était donc de $3,2 \mu\text{M}$, ce qui est équivalent ou supérieur à la concentration utilisée par Jung et Remé (1994) et Birkle et Bazan (1986) pour des études d'incorporation de l'acide arachidonique dans les phospholipides rétinien.

sence de structure correspondant à la représentation du Schéma 1.3, i.e. des ROS ayant une membrane plasmique scellée qui entoure un empilement serré de disques (voir Schéma 1.3). On y distingue quelques rares fragments de ROS désorganisés et, surtout, des disques dispersés (voir Figure 3.1). Il n'y a donc aucun v-ROS intact mais, tel que réflété par l'absence de noyaux et de mitochondries, ainsi que le ratio A_{280}/A_{500} nm, ceux-ci sont bien purifiés (voir Figure 3.1 et Tableau 3.1).

Ne pouvant exclure la possibilité que les ROS soient particulièrement instables à la température ambiante (18-23°C), des essais ont été faits pour lesquels les v-ROS ont été fixés à 4°C (durant 16 h). Malheureusement, aucune amélioration de la qualité de ces v-ROS n'a été notée (voir Figure 3.2). On n'observe que des fragments de ROS désorganisés et des disques dispersés, ce qui ne ressemble en rien à la structure escomptée (voir Schéma 1.3). Par ailleurs, bien que l'effet néfaste du sucrose sur le taux de pénétration du OsO_4 ait été démontré³⁰ par certains auteurs (Hagström et Bahr. 1960), il est également connu que le sucrose peut, en augmentant l'osmolarité³¹ des tampons utilisés (Hopwood. 1990), aider à préserver l'intégrité des ROS. Aussi, des observations microscopiques ont été faites sur des préparations de v-ROS purifiées, puis fixées et post-fixées en présence de sucrose. Cependant, aucun effet bénéfique du sucrose n'a été constaté. Une fois de plus, les préparations ne contenaient principalement que des v-ROS éclatés pour lesquels il n'y a pas de membrane plasmique scellée

³⁰ Hagström et Bahr (1960) ont observé une diminution de 50% du taux de pénétration du OsO_4 en présence de 250 mM (8,6%) sucrose.

³¹ L'osmolarité représente la molarité qu'une solution doit avoir, en termes de substances non-dissociantes (ex. sucrose, Ficoll), pour exercer une pression osmotique équivalente (iso-osmolarité) ou supérieure (hyper-osmolarité) à celle de l'objet à étudier dans cette solution (Diem et Lentner. 1970), en l'occurrence les ROS.

entourant un empilement serré de disques (voir Figure 2.3A et Schéma 1.3).

Certains pourraient argumenter que, dû à une exposition prolongée des ROS à la lumière ambiante (pendant le temps que durent les étapes de fixation et post-fixation) et aux perturbations ioniques et biochimiques inhérentes (voir les schémas 1.4 et 1.5), de même qu'à l'absence combinée des segments internes de bâtonnets et des cellules du RPE (normalement requis pour rétablir l'équilibre ionique et biochimique basal du ROS; voir les sections 1.4, 1.5 et 1.16), l'intégrité des ROS est sévèrement altérée. Or, dans le cas où les v-ROS ont été fixés à 4°C, ceux-ci ont été gardés à la noirceur durant les 16 h d'incubation et ce, sans qu'aucun impact positif sur leur intégrité ne soit remarqué. La Figure 3.2 montre les v-ROS typiquement obtenus dans ces conditions, v-ROS qui ne contiennent ni membrane plasmique scellée ni empilement serré de disques.

Pour sa part, le dosage enzymatique de la G6PD corrobore et renforce les observations qualitatives fournies par la microscopie électronique. Tel que démontré à la Figure 2.4 (voir les explications à la section 2.4.3), les v-ROS offrent la moins bonne performance quant au taux net de production de NADPH. Or tel qu'expliqué en détail à la section 3.2.2, plus le taux net de production de NADPH est faible après perméabilisation des membranes au détergent, moins la G6PD était présente dans les ROS avant perméabilisation. Cela signifie que: 1) la quasi-totalité des v-ROS (voir les figures 2.3A, 3.1 et 3.2) n'ont jamais été en mesure de conserver l'enzyme, 2) la membrane plasmique n'était pas scellée (voir Schéma 1.3) et donc 3) les v-ROS n'étaient pas intacts.

Puisqu'il semblait fort peu probable d'arriver à isoler des ROS intacts par

vortexage des rétines (voir les figures 2.3A, 3.1 et 3.2), cette méthode de purification a dès lors été abandonnée au profit de la méthode proposée par Zimmerman et Godchaux (1982), laquelle repose sur l'homogénéisation des rétines.

3.3.2 Évaluation de l'intégrité des segments externes de bâtonnets obtenus par homogénéisation des rétines (h-ROS)

Tel que mentionné plus tôt (voir la section 3.1), la méthode d'isolement des ROS par homogénéisation des rétines a été utilisée par plusieurs équipes (McConnell. 1965; De Grip *et al.* 1980; Godchaux et Zimmerman. 1979). Cependant, puisque Zimmerman et Keys (1988) ont pu détecter de l'activité PLA2 dans des préparations de h-ROS isolés et purifiés selon la procédure décrite par Zimmerman et Godchaux (1982), c'est cette même procédure qui a été choisie par notre équipe (Jacob *et al.* 1996) afin de poursuivre les travaux de caractérisation de la PLA2 des ROS.

Telle que mise au point par Godchaux et Zimmerman (1979), cette méthode d'isolement des h-ROS résulte, après purification sur gradients continus de sucrose, en la répartition des h-ROS dans deux bandes. La bande I, dont la densité est égale à 1,127 g/ml, contient majoritairement des h-ROS éclatés, alors que la bande II, d'une densité de 1,142 g/ml, contient les h-ROS intacts (Godchaux et Zimmerman. 1979). Ainsi, la densité supérieure de la bande II coïncide avec la présence de h-ROS pour lesquels la membrane plasmique est intacte et retient, selon les auteurs, le contenu soluble.

Après avoir purifié des h-ROS selon la procédure détaillée de Zimmerman et Godchaux (1982), nous avons tout d'abord constaté que, dans la majori-

té des cas, il n'y avait qu'une seule bande de h-ROS dans les gradients. De plus, lorsque les gradients comptaient deux bandes de h-ROS, tel que prévu par les auteurs, la qualité de celles-ci semblait passablement équivalente. Le coefficient de pureté, i.e. le ratio protéines totales/rhodopsine (A_{280}/A_{500} nm), des bandes I et II était en effet très similaire. La microscopie électronique a par ailleurs confirmé que les bandes I et II de h-ROS n'étaient pas considérablement différentes et, surtout, que ni l'une ni l'autre ne contenait de h-ROS aussi intacts qu'escompté. Après avoir fixé/post-fixé les h-ROS selon le protocole décrit à la section 3.2.1, lequel est lui-même basé sur le protocole de Godchaux et Zimmerman (1979), aucune des coupes examinées ne présentait de h-ROS ayant à la fois une membrane plasmique scellée et un empilement serré des disques. La Figure 3.3 rend typiquement compte des nombreuses observations qui ont été effectuées sur les bandes I et II de ce type de préparation. On constate que, malgré la présence de certains empilements de disques plus ou moins serrés, ceux-ci ne semblent jamais entourés d'une membrane plasmique scellée (voir Figure 3.3). Les seuls ROS dont la structure semble assez régulière (voir Schéma 1.3) apparaissent toujours tronqués, et certains disques semblent même avoir été déchirés, fort possiblement par la friction exercée sur eux par l'homogénéisateur (voir Figure 3.3).

Ces h-ROS n'étaient donc pas suffisamment intacts pour invalider l'hypothèse voulant que, dans nos conditions, l'absence d'activité PLA2 soit imputable à la perte de l'enzyme (ou d'une protéine régulatrice) soluble. De plus, les résultats obtenus sont très similaires à ceux de Godchaux et Zimmerman (1979), ce qui tend à suggérer que la procédure elle-même ne permet pas d'isoler des h-ROS véritablement intacts. Pour s'en assurer, certains paramètres ont tout de

même été variés, et leur effet sur la qualité des préparations de h-ROS vérifié.

Dans un premier temps, des préparations de h-ROS ont été incubées en présence de 40% sucrose durant 16 h à 4°C, avant de les fixer/post-fixer tel que décrit ci-haut. Cela devait, en principe, favoriser une certaine déshydratation des h-ROS et ainsi réduire, l'espérons-nous, leur sensibilité au traitement subséquent de fixation/post-fixation. La Figure 3.4 ne montre toutefois pas d'amélioration importante de la qualité, i.e. de l'intégrité des h-ROS. Un seul h-ROS semble avoir à la fois une membrane plasmique scellée et un empilement de disques serré, les autres étant tronqués ou éclatés (voir Figure 3.4). On note également certains h-ROS dont les disques semblent avoir été déchirés (voir les figures 3.3 et 3.4; en haut, au centre), de même que plusieurs disques vésiculés (voir sur les figures 3.3 et 3.4 les vésicules arrondies dont l'intérieur est clair).

Compte tenu que les résultats de la Figure 3.3 ont été obtenus avec des h-ROS ayant été fixés et post-fixés dans un tampon Tris-HCl (voir la section 3.2.1), selon les recommandations de Godchaux et Zimmerman (1979), et que le Tris-HCl est fortement déconseillé comme tampon pour la fixation avec de la glutaraldéhyde (Hopwood. 1990), des essais ont été réalisés pour lesquels les h-ROS ont été fixés et post-fixés dans un tampon cacodylate, selon les recommandations de Hopwood (1990) et de Mercer et Birbeck (1972). La figure 3.5 est représentative des h-ROS fixés et post-fixés dans le cacodylate et elle montre bien, encore une fois, que les h-ROS ayant à la fois une membrane plasmique scellée et des disques empilés serrés (voir Schéma 1.3) se font très rares. On n'en dénombre qu'un ou deux au centre de la Figure 3.5, les autres apparaissant tel que décrit pour les figures 3.3 et 3.4. Le cacodylate ne semblait donc pas avoir d'im-

pact positif majeur sur l'intégrité des h-ROS, mais il a tout de même été utilisé, en remplacement du Tris-HCl, pour les essais subséquents.

L'effet de la variation de l'espacement piston-réceptacle³² sur l'intégrité des h-ROS a été testé parce que la description que faisait Zimmerman et Godchaux (1982) de l'espacement à utiliser était très subjective. Selon eux, l'extrémité de la tige du piston (se trouvant hors du réceptacle) devait pouvoir décrire un cercle de 5 cm de diamètre lorsque le piston (portion de téflon qui sert à homogénéiser) touchait le fond du réceptacle. Or ce critère est tout à fait subjectif puisqu'il dépend de la longueur du piston: pour un même espacement, un piston court décrira un cercle beaucoup plus grand qu'un piston long. De même, une tige plus longue décrira un cercle plus grand. Cette notion d'espacement est par ailleurs très importante puisqu'un trop faible espacement peut faire que tous les h-ROS isolés sont éclatés, alors qu'un espacement trop grand peut se traduire par l'absence de h-ROS isolés. Des espacements de 0,25, 0,5, 1, 2 et 3 mm³³ ont donc été comparés et, bien que les meilleurs résultats aient été obtenus avec un espacement de 2 mm, l'intégrité des h-ROS ne s'en est pas trouvée améliorée de façon appréciable. Les figures 3.3-3.5 rendent typiquement compte des résultats obtenus lorsqu'un homogénéisateur d'espacement égal à 2 mm a été utilisé pour isoler les h-ROS. Les expériences subséquentes ont, elles aussi, été réalisées avec un homogénéisateur d'espacement égal à 2 mm.

L'effet d'un ajout de sucre (20%) ou NaCl (140 mM/isotonique) au

³² Cet espacement n'est autre que l'espace libre entre le piston et la paroi interne du réceptacle de l'homogénéisateur Elvehjeim.

³³ L'espacement a été mesuré à l'aide de mèches de perceuse très fines dont le diamètre est déterminé avec une très grande précision. Ces mesures et ajustements ont été effectués à l'atelier de mécanique de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

tampon cacodylate a aussi été vérifié. La Figure 2.3B est typique des résultats obtenus en présence de l'un ou l'autre des solutés et montre bien que ceux-ci n'offrent aucun effet protecteur. On y observe le même genre de structures que sur les figures 3.3-3.5, i.e. des h-ROS tronqués, éclatés, ou pour lesquels les disques semblent déchirés (voir Figure 2.3B). Les micrographies des figures 2.3B et 3.3-3.5 ne révèlent donc aucune amélioration notable de l'intégrité des ROS car la très grande majorité des h-ROS obtenus n'ont pas une membrane plasmique scellée entourant un empilement serré de disques (tel qu'illustré sur le Schéma 1.3).

La microscopie électronique a donc montré que, peu importe les conditions de fixation/post-fixation utilisées, l'intégrité des h-ROS reste à toute fin pratique inchangée (voir les figures 2.3B et 3.3-3.5). Ceci suggère que l'homogénéisation même des rétines, et non la procédure de fixation/post-fixation, est responsable de l'altération des h-ROS. Ainsi, l'homogénéisation ne permet pas d'obtenir des ROS ayant à la fois une membrane plasmique scellée et un empilement serré des disques. Par ailleurs, le dosage enzymatique de la G6PD confirme cet état de fait: même si le taux net de production de NADPH par les h-ROS est supérieur à celui des v-ROS, il n'en demeure pas moins inférieur à celui des hs-ROS (voir Figure 2.4). De plus, certaines micrographies des préparations de h-ROS (Figure 3.4 et d'autres non-présentées) ont révélé la présence de matériel contaminant. On y distingue en effet (voir Figure 3.4; à gauche, au centre) de toutes petites structures qui ne ressemblent pas du tout à des ROS ou même des disques vésiculés (voir les figure 3.3 et 3.4), ce qui a un impact sur le coefficient de pureté (A_{280}/A_{500} nm) de ces h-ROS (voir Tableau 3.1). L'homogénéisation des rétines est la méthode d'isolement des ROS pour laquelle le ratio A_{280}/A_{500}

nm est le plus élevé, ce qui signifie que: 1) les h-ROS ne sont pas intacts et 2) ils ne sont pas aussi bien purifiés que le prétendent Zimmerman et Godchaux (1982) (voir Tableau 3.1, ainsi que les figures 2.3B et 3.3-3.5). Par conséquent, la troisième méthode d'isolement des ROS couramment utilisée, soit l'agitation des rétines à la main, a été utilisée et comparée aux deux précédentes.

3.3.3 Évaluation de l'intégrité des segments externes de bâtonnets obtenus par agitation à la main (hs-ROS)

L'agitation a été, dans le cas des hs-ROS, le premier paramètre à être étudié et pour cause. La force déployée pour l'agitation à la main des rétines représente en effet un critère très subjectif, une agitation douce (Molday et Molday. 1987) ou vigoureuse (Krebs et Kühn. 1977; McDowell et Kühn. 1977; Papermaster et Dreyer. 1974) dépendant uniquement de l'évaluation qu'en fait l'opérateur. Des hs-ROS obtenus par agitation douce ou vigoureuse ont donc été préparés et observés en microscopie électronique. Les figures 3.6A et 3.6B démontrent bien que, même si l'agitation à la main constitue en soi la méthode d'isolement la plus douce (voir les figures 2.3 et 3.1-3.6), une agitation vigoureuse peut quand même endommager les hs-ROS. La Figure 3.6B montre quelques fragments de hs-ROS (à gauche, au centre et dans le coin supérieur), quelques hs-ROS dont la membrane plasmique est rompue (coin supérieur droit) et plusieurs hs-ROS contenant des disques vésiculés ou ayant perdu leur forme aplatie (voir Schéma 1.3), en plus des hs-ROS pour lesquels la membrane plasmique semble, d'une part, intacte et, d'autre part, entourer un empilement assez serré de disques (centre). La Figure 3.6A montre quant à elle qu'une agitation douce permet d'obtenir plus de ROS ayant une membrane plasmique scellée et un empilement serré des disques que le vortexage (voir les figures 2.3A et 3.1-

3.2), l'homogénéisation (voir les figures 2.3B et 3.3-3.5) et l'agitation à la main vigoureuse (voir Figure 3.6B). On note toutefois que l'agitation à la main ne permet pas d'obtenir uniquement des ROS intacts (voir Figure 3.6A, en périphérie).

Il est également important et intéressant de noter que, contrairement aux préparations de h-ROS, les préparations de hs-ROS ne montraient pas de signe de contamination (voir Tableau 3.1, ainsi que les figures 3.4 et 3.6). Le coefficient de pureté (A_{280}/A_{500} nm) des hs-ROS était en effet beaucoup plus comparable à celui des v-ROS (voir Tableau 3.1). Cependant, seule l'agitation des rétines à la main permettait d'obtenir des ROS intacts (voir les figures 2.3A, 3.1, 3.2 et 3.6). L'agitation douce, et à la main, des rétines s'avérait donc être la méthode de choix pour isoler des ROS le plus intact possible. C'est donc de cette façon qu'ont été isolés les hs-ROS pour les expériences subséquentes.

Pour les résultats relatifs à la Figure 3.6, les tampons de purification/fixation/post-fixation ne contenaient ni sucrose, ni NaCl (voir la section 3.2.1). Des essais ont donc été effectués pour lesquels les tampons contenaient soit 20% sucrose, soit 140 mM NaCl. La Figure 2.3C reflète les résultats typiques obtenus dans chacune de ces deux conditions et on constate que l'ajout de NaCl ou de sucrose aux tampons n'a ni effet positif ni effet négatif majeur sur l'intégrité des hs-ROS (voir les figures 2.3C et 3.6A). Dans les deux cas, une forte proportion des hs-ROS avaient une membrane plasmique scellée entourant un empilement serré de disques. La coloration des coupes semblait toutefois affectée par la présence de sucrose. En fait, les micrographies de ROS (qu'il s'agisse de v-ROS, h-ROS ou hs-ROS) fixés/post-fixés dans des tampons contenant du sucro-

se révélèrent fréquemment la présence de précipités, lesquels étaient observables sous forme de taches noires plus ou moins grosses (voir Figure 3.5).

Pour la procédure habituelle de fixation/post-fixation, les ROS ont été fixés pendant 1 h à température ambiante, lavés, puis post-fixés pendant 30 minutes à 4°C, chacune de ces étapes étant entrecoupée d'une centrifugation qui permet de sédimenter les ROS. Or, toujours en vue d'améliorer ou préserver l'intégrité des hs-ROS, certaines préparations ont été fixées pendant 16 h à 4°C, post-fixées pendant 30 minutes à 4°C et, chaque fois que c'était nécessaire, sédimentées par gravité seulement. En principe, cela devait permettre de minimiser les étapes de manipulations des hs-ROS (resuspension avec des pipettes de transfert), d'en minimiser la compaction et donc, de favoriser le maintien de leur intégrité. La Figure 3.7 montre toutefois qu'il n'en est rien. En comparant les figures 2.3C, 3.6 et 3.7, on constate qu'au contraire, cette façon de procéder est passablement dommageable pour les hs-ROS. On observe en effet, sur la Figure 3.7, beaucoup plus de fragments de hs-ROS et de hs-ROS pour lesquels la membrane plasmique est éclatée, de même que de nombreux disques vésiculés.

Finalement, des essais de fixation/post-fixation "en bloc" ont été effectués pour permettre d'éliminer complètement les étapes de sédimentation/resuspension. Il s'agissait de fixer (16 h à 4°C), laver (3 fois 15 min à 4°C) et post-fixer (2 h à 4°C) les hs-ROS par simple infiltration des réactifs, tel que décrit par Godchaux et Zimmerman (1979) et Fisher *et al.* (1993). Cependant, comme l'indique la Figure 3.8, ces modifications n'ont pas permis de mieux préserver l'intégrité des hs-ROS. Là encore, il semble que cette procédure ait été plus dommageable, comparativement à la procédure habituelle qui comporte des étapes

de sédimentation/resuspension (voir les figures 2.3C, 3.6A et 3.7-3.8). La majorité des hs-ROS ainsi obtenus sont désorganisés, i.e. qu'ils n'ont pas à la fois une membrane plasmique scellée et un empilement serré de disques (voir Figure 3.8 et Schéma 1.3). Ceci suggère donc que, lors de la fixation/post-fixation "en bloc", les réactifs n'ont pas suffisamment infiltré les échantillons pour bien les fixer et ainsi préserver leur morphologie.

Bien qu'aucune des modifications apportées à la méthode de préparation et/ou fixation/post-fixation des hs-ROS n'ait conduit à l'observation de plus de 50-60% de hs-ROS intacts (appréciation visuelle), les micrographies des figures 2.3 et 3.1-3.8, de même que le taux de production de NADPH par la G6PD (voir Figure 2.4) montrent clairement que les hs-ROS sont les seuls à être intacts, i.e. les seuls à avoir un empilement de disques serré et une membrane plasmique scellée (voir Schéma 1.3).

3.3.4 Taux d'utilisation de l'acide [^{14}C]arachidonique par les ROS

Alors que la microscopie électronique et les dosages de NADPH permettent de s'assurer que l'absence d'activité PLA2 (dans nos conditions) n'est pas due à la perte de l'enzyme ou d'une protéine régulatrice, la mesure du taux d'utilisation de l'acide [^{14}C]arachidonique par les ROS permet de vérifier que, contrairement à ce que suggère Jelsema (1987), l'absence d'activité PLA2 n'est pas non plus due au recyclage rapide de l'acide arachidonique généré vers d'autres voies métaboliques. Ainsi, la Figure 3.9 montre clairement qu'il n'y a pas d'augmentation significative du taux d'utilisation de l'acide [^{14}C]arachidonique en fonction du temps. Autrement dit, nous avons récupéré la même quantité d'acide [^{14}C]arachidonique aux temps 0, 2, 5, 10 et 15 minutes, ce qui se traduit

par un pourcentage d'utilisation nul. La Figure 3.9 montre les résultats obtenus avec le tampon décrit par Jelsema, mais des résultats tout à fait similaires ont été obtenus avec le tampon décrit par Zimmerman (voir la section 3.2.3).

3.4 Discussion

Les différents résultats des figures 2.3-2.4 et 3.1-3.8 constituent donc la première étude comparative des trois méthodes couramment utilisées pour l'isolement des ROS. Ils ont permis de démontrer que seule l'agitation à la main des rétines conduit à l'isolement de ROS intacts. Bien que Godchaux et Zimmerman (1979) aient affirmé avoir isolé des h-ROS intacts par homogénéisation des rétines, leurs résultats n'incluaient aucune mesure quantitative de l'intégrité de leurs préparations. Leur seul critère d'évaluation consistait en l'observation de coupes par microscopie électronique. Or les micrographies publiées par ces auteurs montrent clairement que les h-ROS de la bande II, supposément la plus intacte, ne contiennent pas un empilement régulier et compact des disques (voir Schéma 1.3). Ceci laisse donc croire que les h-ROS ne sont pas tout à fait intacts, et c'est ce que reflète les résultats des dosages de NADPH (voir Figure 2.4).

Le dosage d'activité de la G6PD indique, de manière quantitative, que les hs-ROS sont plus intacts que les h-ROS, et que ceux-ci sont plus intacts que les v-ROS. On pourrait penser qu'une contamination par des mitochondries provenant de l'ellipsoïde, un sous-compartiment du segment interne adjacent au ROS et rempli de mitochondries (voir Schéma 1.3), est responsable de la plus forte production de NADPH par les hs-ROS avant perméabilisation des membranes (voir Figure 2.4). Les mitochondries, à cause de leur implication dans le

métabolisme du glucose, sont en effet très enrichies en activité G6PD (Lehninger. 1982). Par conséquent, une contamination des ROS par des mitochondries entraînerait inévitablement une surestimation de l'activité G6PD endogène des ROS et, du coup, une surestimation du degré d'intégrité de ces mêmes ROS (Schnetkamp et Daemen. 1981). Cependant, aucune des préparations de hs-ROS examinées au microscope électronique n'a révélé la présence de telles mitochondries. Par ailleurs, il a été rapporté (Uhl et Abrahamson. 1981) que seuls les ROS de grenouilles, qui sont les plus gros du règne animal, peuvent se détacher des photorécepteurs ailleurs qu'au niveau du cil connectif³⁴ (voir Schéma 1.3). La probabilité que les hs-ROS, obtenus par agitation douce (voir les figures 2.3C et 3.6A), aient contenu des mitochondries qui auraient échappé à notre attention est donc très faible. La forte production de NADPH par les hs-ROS non perméabilisés est donc interprétée comme étant due à une plus forte concentration de substrats endogènes, ce qui confirme le fait que les hs-ROS sont plus intacts.

Les résultats des figures 3.1-3.8 démontrent également à quel point il est difficile de préserver l'intégrité des ROS. Ainsi, malgré les nombreuses conditions utilisées, et malgré que des coupes aient, chaque fois, été faites à différents niveaux de profondeur dans les blocs d'échantillons, nous n'avons pu faire en sorte d'observer plus de 50-60% de ROS intacts (appréciation visuelle). Ceci pourrait s'expliquer, du moins en partie, par le fait que le cytosquelette des ROS semble peu développé (Papermaster *et al.* 1978; Chaitin *et al.* 1984; Vaughan *et al.* 1989; Fisher *et al.* 1993; Renthal *et al.* 1993). Les ROS seraient en effet beau-

³⁴ Pour notre part, nous avons observé que certaines coupes effectuées sur des h-ROS (bandes I et II) contenaient des mitochondries, ce qui suggère que l'homogénéisation des rétines peut également provoquer la séparation des ROS ailleurs qu'au niveau du cil connectif.

coup plus fragiles et beaucoup plus difficiles à préserver intacts que les segments internes de ces mêmes bâtonnets et ce, parce que les ROS semblent contenir peu de constituants cytosquelettiques (ex. microtubules, tubulines) par rapport aux segments internes qui ont un cytosquelette bien développé (Papermaster *et al.* 1978; Chaitin *et al.* 1984; Vaughan *et al.* 1989; Fisher *et al.* 1993).

Les résultats des figures 2.3-2.4 et 3.1-3.8 confirment donc que l'absence d'activité PLA2 dans les ROS, telle que démontrée au Chapitre 2, n'est pas due à la perte de l'enzyme ou d'une protéine régulatrice durant la purification des ROS. En effet, si l'activité PLA2 détectée dans les ROS par Jelsema (1987), Zimmerman et Keys (1988), et Castagnet et Giusto (1993) était véritablement due à une PLA2 endogène, les 50-60% de hs-ROS intacts présents dans chacune des préparations utilisées pour les diverses expériences auraient dû amplement suffire à la détecter; ce qui n'a pas été le cas. Les meilleures préparations de ROS intacts qu'il nous ait été donné d'obtenir (voir les figures 2.3 et 2.4) ne contenaient pas d'activité PLA2 endogène (voir la section 2.4, ainsi que les figures 2.1, 2.2 et 2.5-2.7), ce qui confirme notre hypothèse, à savoir que l'activité PLA2 rapportée par les auteurs sus-mentionnés est probablement due à une contamination de leurs préparations par des composantes rétiniennes autres que les ROS. De plus, la Figure 3.9 a permis de vérifier que l'absence d'activité PLA2 (dans nos conditions) n'était pas due au recyclage rapide des acides [¹⁴C]arachidoniques générés vers d'autres voies métaboliques, ce qui nous (Jacob *et al.* 1996) aurait alors empêché de détecter leur présence comme acides gras libres.

Les résultats ci-présentés constituent donc de très forts arguments en faveur de l'absence d'activité PLA2 dans les ROS purifiés intacts.

3.5 Références

- Anderson, D.H., Fisher, S.K., Erickson, P.A. et Tabor, G.A. Rod and cone disc shedding in the rhesus monkey retina: A quantitative study. Experimental Eye Research. 1980. 30: 559-574.
- Athanassious, R., Klyne, M.A. et Ali, M.A. Regulation of cyclic nucleotides in retinal photoreceptors: An ultrastructural approach on the role of cyclases. Cell Tissue Research. 1984. 237: 95-101.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. et Heckelman, P.E. The Merck Index. Rahway: Merck & Co. Inc., 1989.
- Birkle, D.L. et Bazan, N.G. The arachidonic acid cascade and phospholipid and docosahexaenoic acid metabolism in the retina. *dans* Progress in Retinal Research. vol. 5. New York: Pergamon Press, 1986.
- Castagnet, P.I. et Giusto, N.M. Properties of phospholipase A2 activity from bovine retinal rod outer segments. Experimental Eye Research. 1993. 56: 709-719.
- Chaitin, M.H., Schneider, B.G., Hall, M.O. et Papermaster, D.S. Actin in the photoreceptor connecting cilium: Immunocytochemical localization to the site of outer segment disk formation. The Journal of Cell Biology. 1984. 99: 239-247.
- De Grip, W.J., Daemen, F.J.M. et Bonting, S.L. Isolation and purification of bo-

vine rhodopsin. Methods in Enzymology. 1980. 67: 301-319.

Dickson, D. et Graves, D.A. Fine structure of the lamprey photoreceptors and retinal pigment epithelium. Experimental Eye Research. 1979. 29: 45-60.

Diem, K. et Lentner, C. Scientific Tables. Montréal: CIBA-Geigy Ltd, 1970.

Fisher, S.K., Anderson, D.H., Erickson, P.A., Guérin, C.J., Lewis, G.P. et Linberg, K.A. Light and electron microscopy of vertebrate photoreceptors, including a technique for electron microscopic autoradiography. Methods in Neurosciences. 1993. 15: 3-36.

Godchaux III, W. et Zimmerman, W.F. Soluble proteins of intact bovine rod cell outer segments. Experimental Eye Research. 1979. 28: 483-500.

Hagström, L. et Bahr, G.F. Penetration rates of osmium tetroxide with different fixation vehicles. Histochemie. 1960. 2: 1-4.

Hopwood, D. Fixation and fixatives. *dans* Theory and Practice of Histological Techniques. New York: Churchill Livingstone, 1990.

Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Presence of a light-independent phospholipase A2 in bovine retina but not in rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 19209-19218.

Jelsema, C.L. Light activation of phospholipase A2 in rod outer segments of

bovine retina and its modulation by GTP-binding proteins. The Journal of Biological Chemistry. 1987. 262: 163-168.

Jung, H. et Remé, C. Light-evoked arachidonic acid release in the retina: illuminance/duration dependence and the effects of quinacrine, mellitin and lithium. Graefe's Archives of Clinical and Experimental Ophthalmology. 1994. 232: 167-175.

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

Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers Inc., 1982.

McConnell, D.G. The isolation of retinal outer segment fragments. The Journal of Cell Biology. 1965. 27: 459-473.

McDowell, J.H. et Kühn, H. Light-induced phosphorylation of rhodopsin in cattle photoreceptor membranes: substrate activation and inactivation. Biochemistry. 1977. 16: 4054-4060.

Mercer, E.H. et Birbeck, M.S.C. Electron microscopy: a handbook for biologists. 3^e édition. Oxford: Blackwell Scientific, 1972.

Molday, R.S. et Molday, L.L. Differences in the protein composition of bovine retinal rod outer segment disk and plasma membranes isolated by a ricin-

- gold-dextran density perturbation method. The Journal of Cell Biology. 1987. 105: 2589-2601.
- Olive, J. The structural organization of mammalian retinal disc membrane. International Review of Cytology. 1980. 64: 107-169.
- Papermaster, D.S. et Dreyer, W.J. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. Biochemistry. 1974. 13: 2438-2444.
- Papermaster, D.S., Schneider, B.G., Zorn, M.A. et Kraehenbuhl, J.P. Immunocytochemical localization of a large intrinsic membrane protein to the incisures and margins of frog rod outer segment disks. The Journal of Cell Biology. 1978. 78: 415-425.
- Renthal, R., Schneider, B.G., Miller, M.M. et Luduena, R.F. β_{1V} is the major β -tubulin isotype in bovine cilia. Cell Motility and the Cytoskeleton. 1993. 25: 19-29.
- Robinson, G. et Gray, T. Electron microscopy 2: Tissue preparation, sectioning and staining. *dans* Theory and Practice of Histological Techniques. New York: Churchill Livingstone, 1990.
- Saari, J.C. et Hunt, A.H. Fucosylation of rabbit photoreceptor outer segments: Properties of the labeled components. Experimental Eye Research. 1980. 30: 231-244.

- Saito, T. Ultracytochemistry of enzymes in cell biology of the retina. Journal of Electron Microscopy. 1991. 40: 312-318.
- Salesse, C., Boucher, F. et Leblanc, R.M. An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes. Analytical Biochemistry. 1984. 142: 258-266.
- Schnetkamp, P.P.M. et Daemen, F.J.M. Transfer of high-energy phosphate in bovine rod outer segments. Biochimica et Biophysica Acta. 1981. 672: 307-312.
- Schnetkamp, P.P.M. et Daemen, F.J.M. Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments. Methods in Enzymology. 1982. 81: 110-116.
- Steinberg, R.H., Fisher, S.K. et Anderson, D.H. Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. The Journal of Comparative Neurology. 1980. 190: 501-518.
- Sternweiss, P.C. et Gilman, A.G. Aluminium: A requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1982. 79: 4888-4891.
- Stone, W.L., Farnsworth, C.C. et Dratz, E.A. A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments. Experimental Eye Research. 1979. 28: 387-397.

- Tsukamoto, Y. et Yamada, Y. Light-related morphological changes of outer segment membranes from lamellae to tubules and two kinds of wavy configurations in the frog visual cells. Experimental Eye Research. 1982. 34: 675-694.
- Uhl, R. et Abrahamson, W. Dynamic processes in visual transduction. Chemical Reviews. 1981. 81: 291-312.
- Uhl, R., Desel, H., Ryba, N. et Wagner, R. A simple and rapid procedure for the isolation of intact bovine rod outer segments (ROS). Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 1987. 14: 127-138.
- Vaughan, D.K., Fisher, S.K., Bernstein, S.A., Hale, I.L., Linberg, K.A. et Matsumoto, B. Evidence that microtubules do not mediate opsin vesicle transport in photoreceptors. The Journal of Cell Biology. 1989. 109: 3053-3062.
- Zimmerman, W.F. et Godchaux III, W. Preparation and characterization of sealed bovine rod cell outer segments. Methods in Enzymology. 1982. 81: 52-57.
- Zimmerman, W.F. et Keys, S. Acylation and deacylation of phospholipids in isolated bovine rod outer segments. Experimental Eye Research. 1988. 47: 247-260.

3.6 Légendes des figures

Figure 3.1: **Micrographie de v-ROS fixés à la température ambiante.** Les v-ROS ont été isolés et purifiés, puis fixés et post-fixés selon les procédures décrites aux sections 2.3.2 et 3.2.1, respectivement. La température ambiante variait entre 18 et 23°C. Grossissement: 10 000 X.

Figure 3.2: **Micrographie de v-ROS fixés à 4°C.** Les v-ROS ont été isolés et purifiés selon la procédure décrite à la section 2.3.2. Ils ont ensuite été fixés et post-fixés, tel que décrit à la section 3.2.1, exception faite que la fixation durait 16 h à 4°C. Grossissement: 10 000 X.

Figure 3.3: **Micrographie de h-ROS fixés à la température ambiante dans un tampon Tris-HCl-20% sucrose.** Les h-ROS ont été isolés et purifiés tel que décrit à la section 2.3.3, puis fixés et post-fixés à la température ambiante dans un tampon Tris-HCl contenant 20% de sucrose, selon la procédure détaillée à la section 3.2.1. Grossissement: 4 500 X.

Figure 3.4: **Micrographie de h-ROS fixés à 4°C dans un tampon Tris-HCl-40% sucrose.** Les h-ROS ont été isolés, purifiés, fixés et post-fixés tel que décrit dans la légende de la Figure 3.3, sauf que la fixation se faisait à 4°C pendant 16 h, dans un tampon Tris-HCl contenant 40% de sucrose. Grossissement: 4 500 X.

Figure 3.5: **Micrographie de h-ROS fixés à la température ambiante dans un tampon cacodylate.** Les h-ROS ont été isolés, purifiés, fixés et post-fixés tel que décrit dans la légende de la Figure 3.3. Un tampon cacodylate a toutefois été

utilisé pour la fixation/post-fixation (voir à la section 3.2.1 pour la composition du tampon). Grossissement: 4 500 X.

Figure 3.6: Micrographies de hs-ROS fixés à la température ambiante. A) hs-ROS obtenus par agitation douce des rétines. Grossissement: 10 000 X. B) hs-ROS obtenus par agitation vigoureuse des rétines. Grossissement: 7 000 X. Les hs-ROS ont été isolés et purifiés tel que décrit à la section 2.3.4. Ils ont ensuite été fixés et post-fixés tel que décrit à la section 3.2.1.

Figure 3.7: Micrographie de hs-ROS fixés à 4°C et sédimentés par gravité. Les hs-ROS ont été isolés par agitation douce et purifiés tel que décrit à la section 2.3.4. Ils ont ensuite été fixés et post-fixés selon la procédure présentée à la section 3.2.1, excepté que la fixation se faisait à 4°C pendant 16 h et que les hs-ROS n'ont jamais été centrifugés. Chaque fois que c'était nécessaire, ils étaient sédimentés par la seule force gravitationnelle. Grossissement: 7 000 X.

Figure 3.8: Micrographie de hs-ROS fixés à 4°C "en bloc". Les hs-ROS ont été isolés et purifiés, puis fixés et post-fixés, tel que décrit dans la légende de la Figure 3.7. Cependant, aucune manipulation de type de resuspension/sédimentation n'a été effectuée. Ces hs-ROS ont été fixés et post-fixés par simple infiltration des réactifs. Grossissement: 7 000 X.

Figure 3.9: Mesure du taux d'utilisation de l'acide [¹⁴C]arachidonique par les ROS. L'expérience a été effectuée tel que décrit à la section 3.2.3. Les résultats (moyenne ± écart type) sont représentatifs d'une expérience réalisée en quadruplicata.

Tableau 3.1: Résumé des caractéristiques des v-ROS, h-ROS et hs-ROS

	Coefficient de pureté ^a (A ₂₈₀ /A ₅₀₀ nm)	Production de NADPH	Membrane plasmique	Disques
v-ROS	2.2-2.6	faible	éclatée	dispersés; souvent vésiculés
h-ROS	2.8-4.0	moyenne	souvent rompue	souvent dispersés; souvent vésiculés; parfois déchirés
hs-ROS	2.3-2.7	élevée	souvent intacte	souvent empilés; très peu dispersés

^a Bien que le vortexage et l'agitation à la main permettent d'obtenir des ROS dont le coefficient de pureté est similaire, le rendement de ces deux méthodes, en termes de quantité de rhodopsine récupérée par oeil, est très différent. Le rendement de la méthode d'isolement par agitation à la main est en effet de beaucoup inférieur.

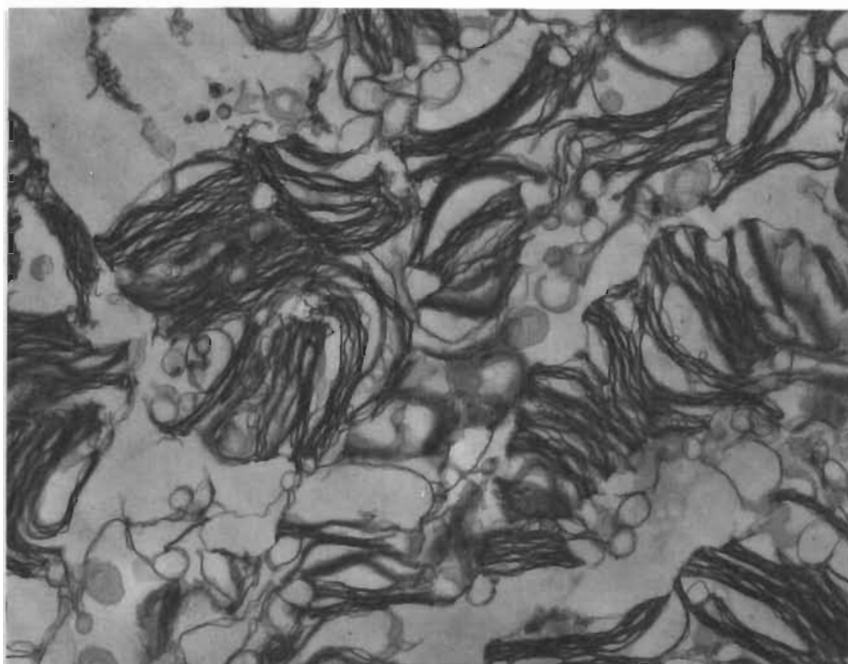


Figure 3.1: Micrographie de v-ROS fixés à la température ambiante

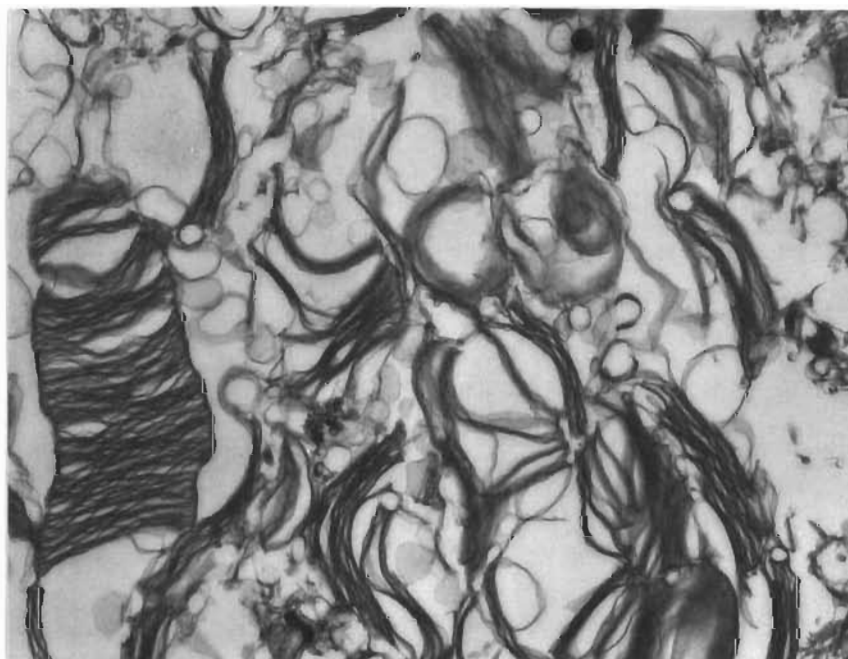


Figure 3.2: Micrographie de v-ROS fixés à 4°C

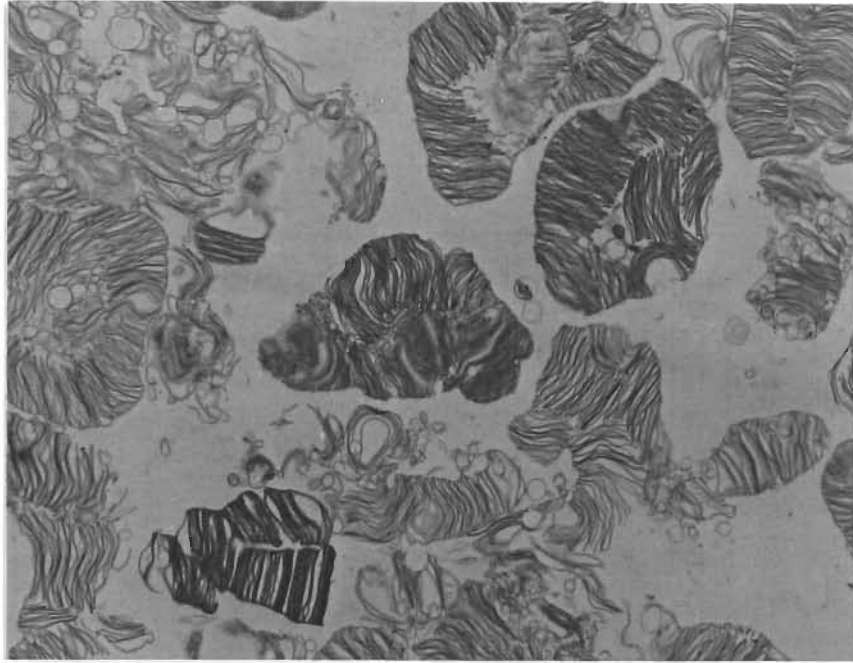


Figure 3.3: Micrographie de h-ROS fixés à la température ambiante dans un tampon Tris-HCl-20% sucrose

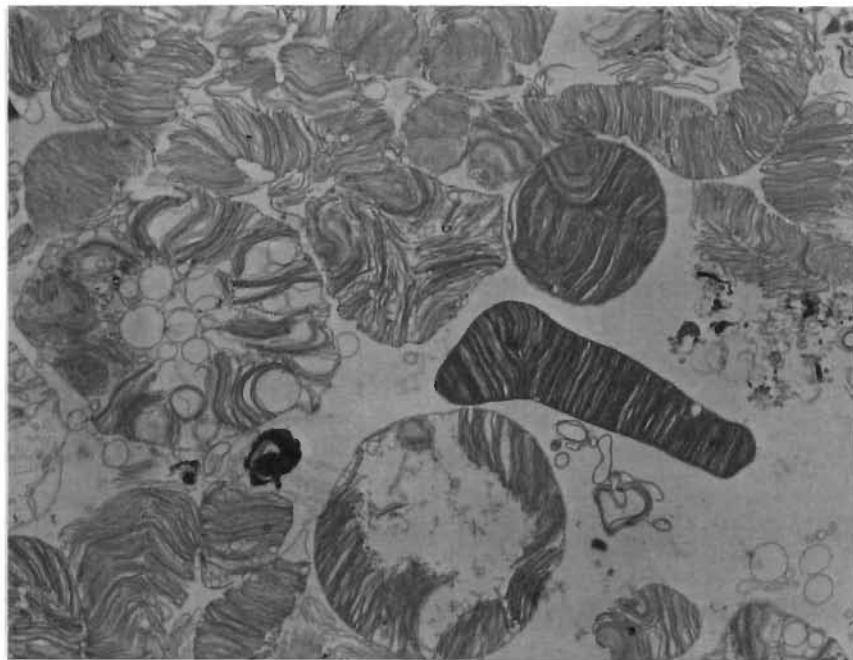


Figure 3.4: Micrographie de h-ROS fixés à 4°C dans un tampon Tris-HCl-40% sucrose



Figure 3.5: Micrographie de h-ROS fixés à la température ambiante dans un tampon cacodylate

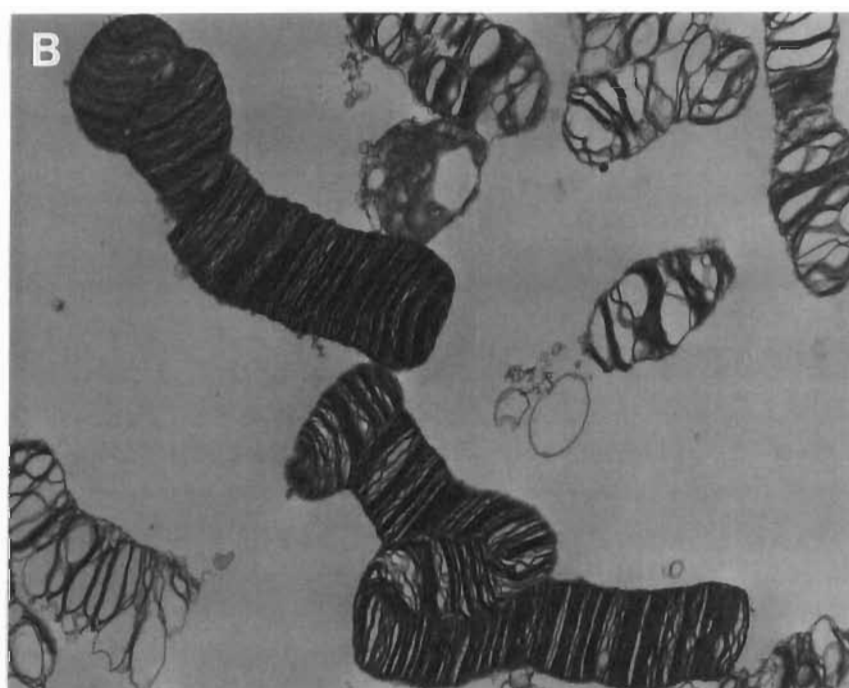
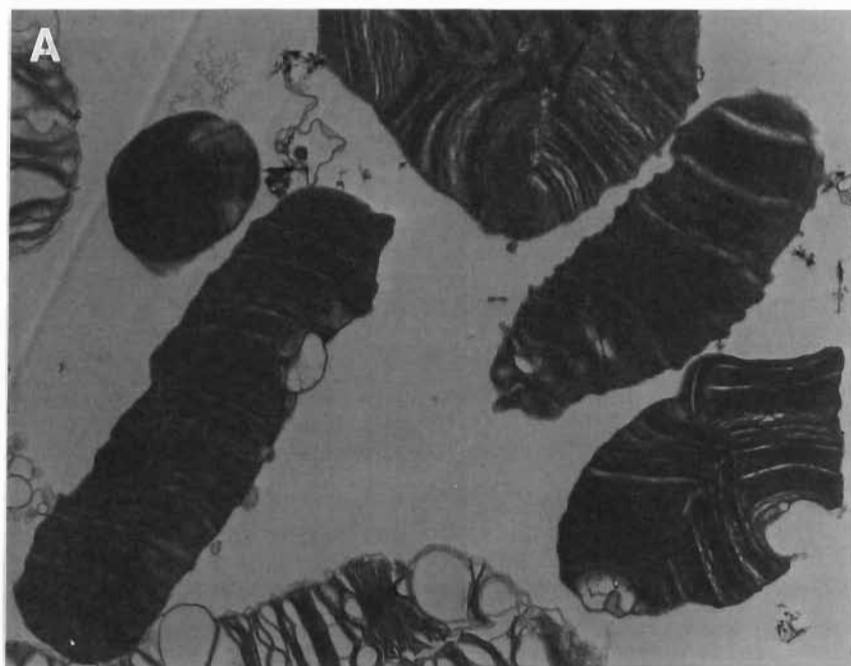


Figure 3.6: Micrographies de hs-ROS fixés à la température ambiante

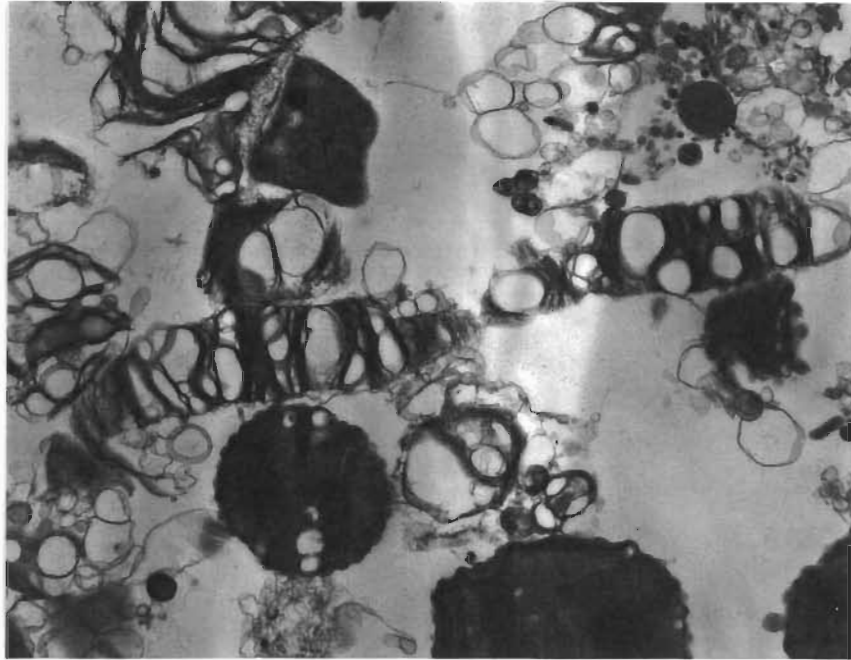


Figure 3.7: Micrographie de hs-ROS fixés à 4°C et sédimentés par gravité



Figure 3.8: Micrographie de hs-ROS fixés à 4°C "en bloc"

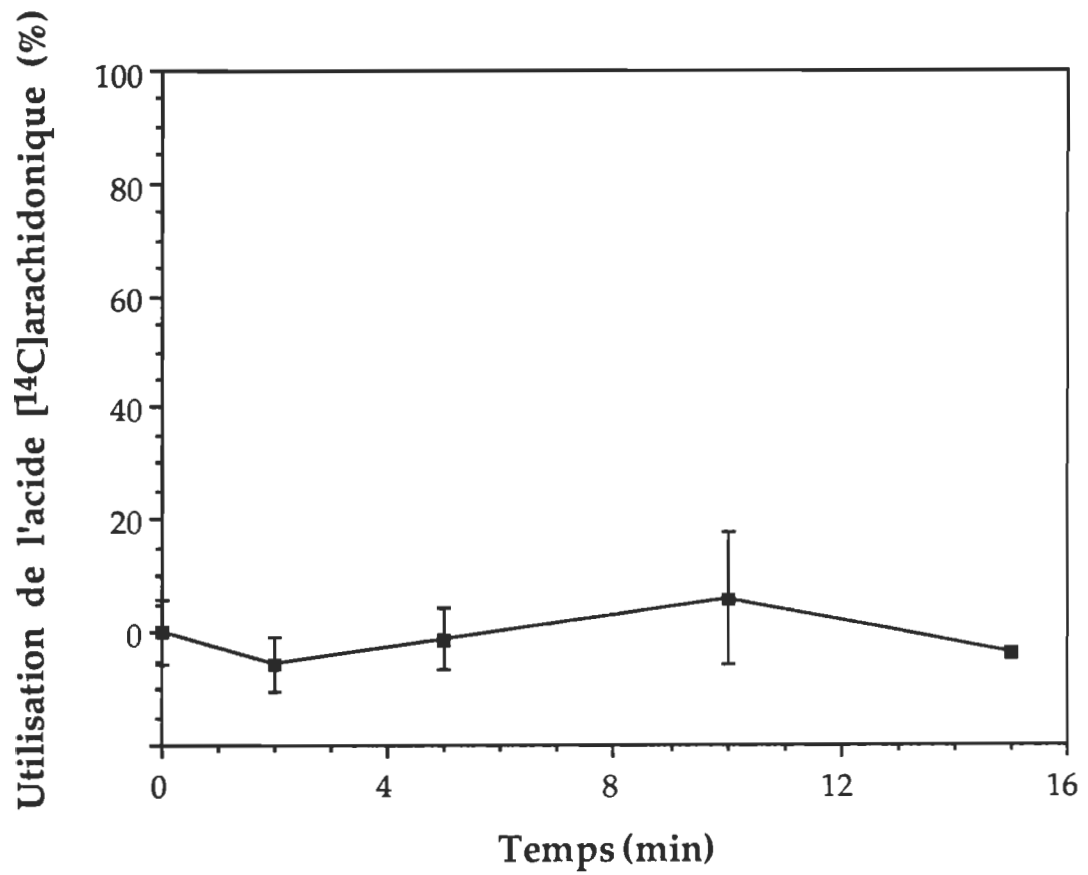


Figure 3.9: Mesure du taux d'utilisation de l'acide [¹⁴C]arachidonique par les ROS

CHAPITRE 4

BOVINE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CONTAINS NOVEL TYPES OF
PHOSPHOLIPASE A2

publié dans:

BIOCHEMICAL JOURNAL

(Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Biochem. J. 1997. 327: 455-460)

**BOVINE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CONTAINS NOVEL TYPES OF
PHOSPHOLIPASES A2**

Michèle Jacob*, Philip K. Weecht and Christian Salessé*
GREIB*, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-
Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7; Merck Frosst Centre for
Therapeutic Research†, Pointe-Claire-Dorval, Québec, Canada, H9R 4P8.

RUNNING TITLE: PHOSPHOLIPASE A2 OF BOVINE RPE

4.1 LIST OF ABBREVIATIONS

pBPB	p-bromophenacyl bromide
[¹⁴ C]PAPC	1-palmitoyl-2-[¹⁴ C ₁]arachidonoylphosphatidylcholine
[¹⁴ C]PAPE	1-palmitoyl-2-[¹⁴ C ₁]arachidonoylphosphatidylethanolamine
[¹⁴ C]DOPC	1-[¹⁴ C ₁]-oleoyl-2-[¹⁴ C ₁]-oleoylphosphatidylcholine
DAG	1,2-diacylglycerol
DMPM	dimyristoylphosphatidylmethanol
DTT	dithiothreitol
E-64	<i>trans</i> -epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane
GTP[S]	guanosine 5'-[γ-thio]triphosphate
lysoPC	lysophosphatidylcholine
OG	<i>n</i> -Octyl glucoside
PAPE	1-palmitoyl-2-arachidonoylphosphatidylethanolamine
PE	phosphatidylethanolamine
PLA2	phospholipase A2
cPLA2	cytosolic PLA2
iPLA2	Ca ²⁺ -independent PLA2
sPLA2	secretory PLA2
PLC	phospholipase C
10PyPM	1- <i>O</i> -hexadecyl-2-[pyrene ₁₀]decanoyl- <i>sn</i> -3-phosphomethanol
10Py-decanoic acid	[Pyrene ₁₀]decanoic acid
RPE	Retinal pigment epithelium
bf-TLC	"back-and-forth"-Thin layer chromatography

4.2 SYNOPSIS

We have recently demonstrated the presence of phospholipase A2 (PLA2) activity in bovine retinal pigment epithelium (RPE) cells [Jacob et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 19209-19218]. We report here our results on the characterization of this RPE-PLA2 activity. We show that RPE probably contains two types of PLA2 enzyme, as indicated by the results obtained with different PLA2-active fractions eluted from a cation-exchange column and treated with Ca^{2+} /EGTA, dithiothreitol, p-bromophenacyl bromide or heat. These results, in addition to those from PLA2 assays using different substrates, also suggest that RPE-PLA2 enzymes are different from well-known secretory, cytosolic and Ca^{2+} -independent PLA2. Sequential extraction of RPE with 1) isotonic, 2) hypertonic and 3) detergent-containing PBS argues for the presence of weakly membrane-associated enzymes. Control experiments using "back-and-forth" TLC allowed us to discriminate between PLA2 and phospholipase C/diacylglycerol lipase activity and confirmed that, in our assay conditions, the release of fatty acids was indeed due to PLA2 enzymes. These results, together with those obtained by treating of RPE homogenates with H_2SO_4 , guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate, ATP and different protease inhibitors, permitted us to make the first characterization of these RPE-PLA2 enzymes. We conclude that RPE contains novel types of PLA2 enzyme that are different from the secretory, cytosolic and Ca^{2+} -independent forms.

4.3 INTRODUCTION

Phospholipases A2 (PLA2) are important enzymes involved in the turnover of phospholipids. They catalyze the hydrolysis of *sn*-2 fatty acyl chains and are thus responsible for the production of fatty acids and lysophospholipids which may then be further metabolized into many types of inflammatory lipid mediators [1-4]. Alternatively, non-esterified fatty acids so generated could act as second messengers in signal transduction [5-8].

There are numerous types of PLA2. They have been isolated from different sources and classified into three major groups: secretory PLA2 (sPLA2), which are subdivided into three subgroups according to their evolutionary relationship [9]; cytosolic PLA2 (cPLA2); Ca²⁺-independent PLA2 (iPLA2), which are also subdivided into three subgroups according to their biochemical characteristics [10]. These are indeed distinguished on the basis of many criteria, including their primary structure, subcellular localization, molecular mass, Ca²⁺-requirement, substrate preference, and sensitivity to denaturing treatments (H₂SO₄, dithiothreitol (DTT), *p*-bromophenacyl bromide (pBPB) and heat) [10-13]. This is an operational classification which is widely accepted and used to characterize PLA2, as well as to define procedures to purify them from new sources. In the future, this classification will certainly be refined, since recent results from Thomson and Clark [14], Buhl et al. [15], as well as Soubeyrand et al. [16], suggest that other groups or subgroups could be needed to describe newly discovered and cloned PLA2.

We have recently demonstrated [17] that PLA2 activity is present in bovine

retinal pigment epithelium (RPE), a subretinal fraction which is enriched with RPE cells. We have shown that PLA2 activity present in RPE homogenate was active at alkaline pH [17]. In order to characterize, for the first time, the minimum number of PLA2 enzymes present in RPE, as well as their properties, we tested the effects of H_2SO_4 , guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate (GTP[S]) and ATP on RPE homogenate. Then, we measured the subcellular distribution of PLA2 activity in RPE by sequentially extracting it with isotonic, hypertonic, and detergent-containing PBS. We also tested different substrates for PLA2 hydrolysis, and control experiments using "back-and-forth" TLC (bf-TLC) allowed us to confirm that, in our assay conditions, the hydrolysis of fatty acids was not due to the combined action of phospholipase C (PLC) and diacylglycerol (DAG) lipase but rather to PLA2. Moreover, we looked at the effects of Ca^{2+} /EGTA, DTT, pBPB and heat on different PLA2-active fractions collected after elution of an RPE-high salt extract on a cation-exchange chromatography column.

We present here the first results on the operational characterization of RPE-PLA2 activity. From these results, we conclude that RPE probably contains two types of PLA2 enzyme. Moreover, on comparing the properties of RPE-PLA2 with those of sPLA2, cPLA2, and iPLA2, RPE-PLA2 appeared to be quite different, suggesting the presence of novel types of PLA2 which could be part of either a new group or a new subgroup of PLA2 enzymes.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Materials

1-Palmitoyl-2-[¹⁴C]arachidonoylphosphatidylcholine ([¹⁴C]PAPC), 1-palmitoyl-2-[¹⁴C]arachidonoylphosphatidylethanolamine ([¹⁴C]PAPE) and 1-oleoyl-2-[¹⁴C]oleoylphosphatidylcholine ([¹⁴C]DOPC) were from Dupont Canada. 1-O-Hexadecyl-2-[pyrene₁₀]decanoyl-*sn*-3-phosphomethanol (10PyPM) and [pyrene₁₀]decanoic acid (10Py-decanoic acid) were from Molecular Probes. Dimyristoylphosphatidylmethanol (DMPM), 1-palmitoyl-2-arachidonoylphosphatidylethanolamine (PAPE), egg lysophosphatidylcholine (lysoPC) and egg phosphatidic acid were from Avanti Polar Lipids. 1-Stearoyl-2-arachidonoylphosphatidylcholine (SAPC), NaN₃, fatty acid-free BSA and pBPB were from Sigma. Aprotinin, leupeptin, *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64), DTT, *n*-octyl glucoside (OG), EGTA, EDTA, ATP, GTP[S], 1,2-diolein and arachidonic acid were from Boehringer Mannheim. Chloroform, methanol, heptane, isopropyl ether, acetic acid and H₂SO₄ were from Fisher Scientific. TLC plates were LK6D silica gel 60Å from Whatman.

4.4.2 Preparation of RPE

RPE was prepared from fresh bovine eyes as described previously [17] and was either used immediately or divided into aliquots and stored at -80°C.

4.4.3 Extraction of RPE

After addition of protease inhibitors (2.8 μM E-64, 0.06 μM aprotinin, 1 μM leupeptin and 100 μM EDTA, final concentrations), RPE was homogenized 10 times with 3 vol. of PBS6x (50 mM Na₂HPO₄/600 mM NaCl, pH 7.5) in a tight-

fitting glass homogenizer. After centrifugation of the homogenate (140 000 g; 4°C; 1h; Beckman 70.1 Ti rotor), the resulting supernatant was collected and used for all experiments except those presented in Table 4.1. In this case, RPE was first homogenized with PBS1x (50 mM Na₂HPO₄/100 mM NaCl, pH 7.5) and centrifuged as described above. The resulting supernatant was collected as "supernatant-PBS1x" and the pellet was washed once with PBS1x in the same conditions. "Wash-PBS1x" supernatant was collected whereas the pellet was treated as described using PBS6x. After supernatant-PBS6x and wash-PBS6x had been recovered, the pellet was resuspended in PBS1x containing 1% OG and treated as described above. Both supernatant-PBS1xOG and wash-PBS1xOG were collected. Before use, supernatant- and wash-PBS6x, as well as supernatant- and wash-PBS1xOG were dialyzed overnight at 4°C against PBS1x with two changes of buffer. The H₂SO₄ extraction was carried out as described by Apitz-Castro et al. [18].

4.4.4 Radiometric measurement of PLA2 activity

PLA2 assays with either [¹⁴C]PAPC, [¹⁴C]PAPE+DMPM, [¹⁴C]PAPC+DMPM or [¹⁴C]DOPC+DMPM were performed as described previously [17]. Briefly, the assay buffer contained 50 mM Tris-HCl, pH 9.0 (or 50 mM glycine), 3 mM CaCl₂, 30 mM MgCl₂ and 100 mM NaCl. [¹⁴C]PAPE+DMPM, [¹⁴C]PAPC+DMPM, and [¹⁴C]DOPC+DMPM were used at 1:1 molar ratios. Where indicated, GTP[S] (200 μM) or ATP (10 mM) was included. Incubation was done at 37°C with 1.85 nmol of phospholipid and 50 μg of proteins per tube. Total volume was 200 μl. The enzymatically released [¹⁴C]oleic or [¹⁴C]arachidonic acids were extracted and quantified by liquid scintillation counting. PLA2 activity was expressed as pmol of [¹⁴C]oleic or [¹⁴C]arachidonic acid released/mg of proteins and was

corrected for the presence of unlabelled DMPM, if present. When homogenate was assayed, the activity was corrected for the presence of endogenous unlabelled phospholipids as described [17]. Zero-time values were subtracted.

4.4.5 Fluorimetric measurement of PLA2 activity

PLA2 assays with 10PyPM were performed as described by Bayburt et al. [19]. Enzymatic reactions were started by the addition of 1.85 nmol of phospholipid/well. The assay buffer contained 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mg/ml BSA. Incubation was at 22°C with 20 µl of protein samples in a total volume of 200 µl. Fluorescence (excitation wavelength 345 nm; emission wavelength 377 nm) was read with a Perkin Elmer LS50B spectrofluorimeter. PLA2 activity was expressed as pmol of 10Py-decanoic acid released/mg of proteins. Zero-time values were subtracted. For Table 4.3, protein samples were first incubated for 15 min at 37°C (as described by Hara et al. [20]) with 2 mM Ca²⁺ (control), 3 mM DTT, 1 mM pBPB or 3 mM EGTA and then cooled to 4°C, before the addition of the substrate and transfer to 22°C. Heat-treated samples (20 min at 60°C [21]) were also cooled to 4°C before addition of 10PyPM and transfer to 22°C for the activity measurements.

4.4.6 Discrimination between PLA2 and PLC activity using bf-TLC

To determine whether [¹⁴C]-labelled fatty acids were released as a consequence of PLA2 activity or PLC coupled to DAG lipase activity, we used the radiometric assay of RPE, using [¹⁴C]DOPC+DMPM as described. However, total lipids were extracted with chloroform/methanol, according to the procedure of Miljanich [22]. The extract was then evaporated to dryness by heating under an argon stream, resuspended in 100 µl chloroform/methanol (2:1, v/v), applied on TLC

plates and resolved according to a new TLC method (bf-TLC). The first solvent system consisted of chloroform/methanol/water (14:6:1, by vol.). Migration was stopped 2 cm away from the top of the plate. This first step allowed the separation of [^{14}C]lysoPC, [^{14}C]DOPC and DMPM, whereas [^{14}C]oleic acids and [^{14}C]DAGs both migrated with the solvent front [23]. Solvent was evaporated from the plate which was then put upside-down in a second TLC chamber containing just enough of the second solvent system (heptane/isopropyl ether/acetic acid, 60:40:4, by vol.) to cover 1 cm of the plate height. Solvent was allowed to migrate over only half of the plate to separate [^{14}C]oleic acids and [^{14}C]DAGs [23] without overlapping the compounds separated in the first migration. Solvent was evaporated and separation was visualized with I_2 vapours. Spots corresponding to fatty acid, DAG, lysoPC and SAPC standards were identified, individually scraped and collected in scintillation vials. I_2 was allowed to evaporate and liquid scintillation cocktail was added for quantification. PLA2 activity was expressed as pmol of [^{14}C]-labelled hydrolysis products/mg of proteins and was corrected for the presence of unlabelled DMPM.

4.4.7 Cation-exchange chromatography

RPE homogenate was extracted directly with PBS6x and centrifuged (140 000 g; 4°C; 1h; Beckman 70.1 Ti rotor). The supernatant was collected, adjusted to pH 6.0, agitated for 1h at 4°C and centrifuged as described above. The resulting supernatant was collected, mixed with Sephadex G10 (1.5 ml of swollen gel/50 ml), gently agitated for 1h at 4°C to adsorb suspended lipids and centrifuged again as described above. Cleared supernatant was filtered (1 μm Whatman filters) and then injected onto a Fractogel EMD SO_3^- -650S column (150 X 10 mm) equilibrated with PBS1x pH 6. Unbound proteins were eluted with PBS1x

pH 6 and a single-step gradient (50 mM Na₂HPO₄/2 M NaCl, pH 6.0) was then applied to elute bound proteins.

4.4.8 Other methods

Protein concentration was determined using the Lowry protein assay kit from Sigma.

4.5 RESULTS AND DISCUSSION

We have recently [17] published data on the presence of PLA2 activity in bovine RPE, a subretinal fraction which is enriched RPE cells. There had been two previous reports on uncharacterized PLA activity in RPE [24, 25], but these papers focused on lysosomal PLA activity which was optimal at pH 4.5. This is thus very different from PLA2 activities that we measured and which were shown to be optimally active at alkaline pH [17]. To identify better and classify these RPE-PLA2 enzymes more efficiently, we have tested the effects of Ca^{2+} /EGTA, DTT, pBPPB, H_2SO_4 , GTP[S], ATP, and different substrates on PLA2-active fractions obtained using different methods. We report here the first operational characterization of the minimum number of PLA2 enzymes detected in RPE.

4.5.1 RPE-PLA2 enzymes are inactivated by H_2SO_4 like cPLA2 but inhibited by GTP[S] and ATP unlike sPLA2, cPLA2 and iPLA2

Given that sPLA2 but not cPLA2 may be acid-extracted without inactivation (18), we measured PLA2 activity in H_2SO_4 extracts from RPE. Since we detected no more than $0.5 \pm 0.1\%$ (mean \pm S.D. of triplicates from two separate experiments) of PLA2 activity in neutralized RPE- H_2SO_4 extracts, as compared with untreated controls, it is clear that RPE-PLA2 was inactivated by H_2SO_4 . This suggests that RPE-PLA2 are not of the sPLA2 type. We also tested the effects of GTP[S] and ATP on RPE-PLA2 activity because of reports on the regulation of cPLA2 and iPLA2 by these nucleotides [26-35]. GTP[S] and ATP caused inhibition to $54.7 \pm 4.6\%$ and $59.6 \pm 6.2\%$ (mean \pm S.D. of triplicate determinations from two separate experiments) of untreated control RPE-PLA2 activity, respectively. The ineffectiveness of ATP in stimulating RPE-PLA2 activity suggests that RPE

does not contain iPLA2 of the myocardial, platelet, pancreatic, or macrophage type (as described by Hazen et al. [32], Margalit et al. [33], Ramanadham et al. [34], and Ackermann et al. [35]), which were all shown to be stimulated two- to six-fold by ATP. Similarly, the ineffectiveness of GTP[S] in stimulating RPE-PLA2 activity suggests that it is different from cPLA2 since none was shown to be inhibited by GTP[S] [26-31]. Thus, these results suggest that RPE-PLA2 represent novel types of PLA2 which may be down-regulated by ATP and GTP[S] through kinases and/or G-proteins.

4.5.2 Identification of weakly membrane-associated PLA2 in RPE; evidence for the presence of membrane-bound regulatory components in RPE

To determine the subcellular localization of RPE-PLA2, we measured PLA2 activity in supernatants sequentially collected after extraction of the homogenate with PBS1x, PBS6x and PBS1xOG. Interestingly, Table 4.1 shows that RPE apparently contains an endogenous PLA2 inhibitor since the total of all supernatant and wash fractions yielded more than twice ($238.4 \pm 20.1\%$) the activity originally measured in the homogenate-PBS1x ($100.0 \pm 12.2\%$). Given that PBS1x and PBS6x extracted $220.4 \pm 19.9\%$ of PLA2 activity as compared with the homogenate ($100.0 \pm 12.2\%$), this suggests that PBS1x and PBS6x did not co-extract the PLA2 inhibitor and thus, that it is not a soluble or weakly membrane-associated one. This is consistent with our results on the effect of GTP[S] and ATP (see text above), which suggest that RPE-PLA2 activity could be down-regulated by a more tightly membrane-bound protein, namely a G-protein [36-40]. Moreover, it seems very improbable to us that this increase in activity reflects the removal of endogenous unlabelled phospholipids (which would dilute the radiolabelled substrate) since, as described in "Radiometric measure-

ment of PLA2 activity", PLA2 activity of the homogenate was corrected for the presence of these endogenous phospholipids.

After normalization of the PLA2 activity recovered in each fraction to 100%, the resulting "relative percentage of PLA2 activity extracted" indicates that most, if not all, of RPE-PLA2 is weakly membrane-associated (Table 4.1). PBS1x, PBS6x and PBS1xOG extracted $32.1\pm 0.5\%$, $61.7\pm 7.8\%$ and $6.3\pm 0.1\%$ of PLA2 activity, respectively. PBS1x and PBS6x were thus sufficient to extract more than 90% of total RPE-PLA2 activity, suggesting that RPE mainly possesses PLA2 enzymes that are soluble and/or weakly membrane-associated.

4.5.3 RPE-PLA2 enzymes have a substrate selectivity that is different from that of sPLA2, cPLA2 and iPLA2

Since sPLA2 are known to preferentially hydrolyze phosphatidylethanolamine over phosphatidylcholine without being selective for the *sn*-2 fatty acid [13], whereas cPLA2 and soluble iPLA2 are selective for *sn*-2 arachidonic acid but not for polar headgroups [10-11], we measured the PLA2 activity of a high salt extract of RPE towards different substrates. We compared the hydrolysis rates of [^{14}C]PAPC, [^{14}C]PAPC+DMPM, [^{14}C]PAPE+DMPM, and 10PyPM and found that RPE-PLA2 have a strong preference for the anionic phosphomethanol group of 10PyPM over the zwitterionic phosphocholine group of [^{14}C]PAPC. Indeed, even at 22°C, we observed more than a 100-fold increase in the hydrolysis of 10PyPM (2224.1 ± 569.3 pmol/h per mg) over [^{14}C]PAPC (21.4 ± 3.9 pmol/h per mg) at 37°C. This preference is also evidenced, although less markedly, by the 3-fold increase obtained by simply adding DMPM (50% molar ratio) to [^{14}C]PAPC (63.7 ± 3.4 pmol/h per mg). Results with [^{14}C]PAPC and

[^{14}C]PAPC+DMPPM are mean \pm S.D. of triplicate determinations from two separate experiments whereas results with 10PyPM are mean \pm S.D. of triplicate determinations from five separate experiments.

Although we cannot rule out that this increase reflects an acyl chain-selectivity, we do not favor this possibility because no PLA2 has yet been shown to be selective for fatty acids other than polyunsaturated fatty acids (11-13, 41-42). Nevertheless, if RPE-PLA2 were found to be selective for saturated fatty acids, this would also constitute a novel property. Moreover, this increase would not be due to the presence of BSA (which is known to bind free fatty acids) in the 10PyPM-assay buffer since addition of BSA to the [^{14}C]PAPC+DMPPM assay buffer did not allow us to recover as much activity with [^{14}C]PAPC+DMPPM (81.5 \pm 1.8 pmol/h per mg, mean \pm S.D. of triplicate determinations from two separate experiments) as with 10PyPM. We thus interpret these results as indicating that RPE-PLA2 binds more tightly to substrate vesicles with a negatively charged surface (phosphomethanol) instead of having a preference for saturated myristoyl-containing phospholipids over polyunsaturated arachidonoyl-containing phospholipids.

The low levels of activity observed towards [^{14}C]PAPE+DMPPM (16.6 \pm 6.3 pmol/h per mg) suggest that, in contrast with what is known for sPLA2, it is not a good substrate for RPE-PLA2. At first glance, one might think that this low level of [^{14}C]arachidonic acid release from [^{14}C]PAPE is due to a property of phosphatidylethanolamine (PE) bearing unsaturated fatty acid(s) at the *sn*-1 and/or *sn*-2 position(s). Indeed, "unsaturated PE" has a natural tendency to form hexagonal_{II} (H_{II}) phases at low temperatures in an aqueous environ-

ment, instead of lamellar phases (43). Given that the lamellar-H_{II} transition temperature of PAPE has not yet been determined (44), and that saturated fatty acids are known to hinder this H_{II} phase-forming tendency of unsaturated PE (43, 44), DMPM (50% molar ratio) was added to [¹⁴C]PAPE in the PLA2 assay. Moreover, ³¹P-NMR of this mixture (PAPE/DMPM, 1:1 molar ratio) allowed us to determine the distribution of PAPE between lamellar and H_{II} phases. We found that, in our assay conditions, PAPE was essentially organized into lamellar structures (to be published elsewhere). This means that, even in the presence of DMPM, which ensures the formation of mixed vesicles, [¹⁴C]PAPE is still not a good substrate for RPE-PLA2. Taken together, these results thus support our hypothesis that RPE-PLA2 are different from the well-known sPLA2, cPLA2 and iPLA2 forms.

4.5.4 Release of fatty acids results from PLA2 activation in RPE

Given that PLCs are also ubiquitous enzymes [45-46] acting on phospholipids, and that arachidonic acid may be generated through the sequential action of PLC and DAG lipases, we measured both PLC and PLA2 hydrolysis products in our assay conditions. Since RPE-PLA2 was not strictly selective for arachidonoyl-containing phospholipids (see above), [¹⁴C]DOPC with both chains radiolabelled was used as the substrate (in mixed vesicles with DMPM).

In order to separate all possible PLA2- and PLC/DAG lipase hydrolysis products, we developed a rapid and simple modified version of the TLC technique which we called bf-TLC. As described in the Materials and Methods section, the first solvent system allowed the separation of lysoPC (R_{F1} 0.15), phosphatidylcholine (R_{F1} 0.33), phosphatidic acid (R_{F1} 0.43), and phosphatidylmethanol (R_{F1} 0.52)

in the "forth" dimension, whereas the second solvent system allowed the separation of 1,2-DAGs (R_{F2} 0.25) and free fatty acids (R_{F2} 0.5) in the "back" dimension. Thus, parallel formation of [^{14}C]lysoPC and [^{14}C]oleic acid would indicate PLA2 activity, whereas the formation of [^{14}C]DAG or only [^{14}C]oleic acid would indicate PLC or PLC plus DAG lipase activity. Moreover, as suggested by the migration pattern of the phosphatidic acid standard, this technique would also allow us to detect PLD activity.

The production of [^{14}C]oleic acid and [^{14}C]lysoPC with RPE increased similarly with time (Figure 4.1), thus confirming the presence of PLA2 activity. There was also a small increase in [^{14}C]DAG with time, which is likely to be due to PLC activity. If there had been a concerted action of a PLC and a DAG lipase, then the amount of [^{14}C]DAG should have decreased as the amount of [^{14}C]oleic acid increased, which did not happen. Figure 4.1 shows that the contribution of PLC/DAG lipase activities to the accumulation of [^{14}C]oleic acid is negligible, since the level of [^{14}C]DAG remained almost constant over time. Since there was no production of phosphatidic acid, we conclude that there is no PLD activity in RPE in our assay conditions (not shown). Figure 4.1 thus shows that, in our assay conditions, the release of [^{14}C]-labelled fatty acids was a direct consequence of PLA2 activity.

4.5.5 RPE contains different types of PLA2-active fractions

Elution of a high salt extract of RPE on a cation-exchange chromatography column revealed the presence of more than one PLA2-active fraction. Figure 4.2A shows a typical elution profile of proteins whereas Figure 4.2B shows the distribution of PLA2 activity among the diverse fractions tested. There were

two types of PLA2-active fractions in RPE: RPE-1, which was eluted with unbound proteins by a low salt buffer, and RPE-10, which bound to the column and was eluted by a high salt buffer. Although RPE-1 and RPE-10 originate from different elution peaks and should thus contain different types of proteins (Figure 4.2A), they had similar levels (26 and 36%) of PLA2 activity (Table 4.2). Thus, the elution time, the low protein content and the high activity content of both RPE-1 and RPE-10, as well as the decrease in PLA2 activity from fractions 1 to 8 suggest that PLA2 activity in RPE-10 is not due to overloading of the column with PLA2 activity from RPE-1 (Figure 4.2, Table 4.2). Together, these results suggest that RPE-1 and RPE-10 could contain different types of PLA2, and both were thus selected for further characterization.

4.5.6 RPE probably contains two different PLA2 enzymes

Since the different types of PLA2 so far characterized differ in their sensitivity to Ca^{2+} /EGTA, DTT, pBPP and heat [10-13], we have tested the effects of these agents on the selected PLA2-active fractions, namely RPE-1 and RPE-10 (Figure 4.2, Table 4.2). As can be seen in Table 4.3, RPE-PLA2 activity is essentially Ca^{2+} -dependent since EGTA caused $99.3 \pm 1.1\%$ and $94.8 \pm 4.6\%$ inhibition in RPE-1 and RPE-10, respectively. This is consistent with the $89.0 \pm 0.0\%$ inhibition observed for the whole cytosol. Moreover, it indicates that there are probably two types of PLA2 enzymes in RPE, since PLA2 activity found in RPE-1 was DTT-resistant whereas that in RPE-10 was DTT-sensitive ($14.5 \pm 7.8\%$ and $75.4 \pm 12.2\%$ inhibition, respectively). Again, this is consistent with the intermediate response ($62.0 \pm 11.3\%$ inhibition) of the whole cytosol (Table 4.3). Concerning the effect of pBPP, PLA2 activity in RPE-cytosol, RPE-1, and RPE-10 was completely abolished ($100.0 \pm 0.0\%$ inhibition in all cases, determined in comparison with a

vehicle control) by this histidine modifying reagent well-known as an inhibitor of type I and II sPLA2.

PLA2 activity of both RPE-1 and RPE-10 is essentially thermo-resistant, as shown by the $89.7\pm 5.3\%$ and $92.7\pm 7.4\%$ activity still remaining after the heat-treatment. This is slightly different from what we observed for RPE-cytosol which showed only $57.5\pm 10.6\%$ activity after such a treatment (Table 4.3). Although we have no definite explanation for this decrease, it might be due to a non-specific aggregation or trapping of PLA2 enzymes by thermo-sensitive proteins. Since over 90% of the proteins were removed by cation-exchange chromatography (Figure 4.2 and Table 4.2), aggregating proteins would probably be absent from the RPE-1 and RPE-10 fractions, leaving the thermo-resistant RPE-1- and RPE-10-PLA2 activity. Moreover, these results were very reproducible, and purified cPLA2 and sPLA2 were included in the assay as well-characterized positive (heat-sensitive) and negative (heat-resistant) controls, respectively. These two points strongly argue against the possibility of spurious results. Table 4.3 thus strengthens our conclusion from Figure 4.2 and Table 4.2 that RPE possesses more than one type of PLA2 enzyme, probably two.

4.5.7 Summary of evidence for RPE-PLA2 being different from sPLA2, cPLA2 and iPLA2

Table 4.4 summarizes our results from Table 4.3 and shows that: 1) RPE-1 PLA2 is Ca^{2+} -dependent, pBPB-sensitive, and heat- and DTT-resistant, 2) RPE-10 PLA2 is also Ca^{2+} -dependent, pBPB-sensitive and heat-resistant, but it is DTT-sensitive. These results strongly argue for the presence of two different PLA2 in RPE and suggest that they are different from the already known forms of the

enzyme. Indeed, there are actually three groups of PLA2 that can be distinguished according to their sensitivity to Ca^{2+} /EGTA, DTT, pBPB, heat, H_2SO_4 , nucleotides and different substrates [9-13, 18]: sPLA2 (subgroups I, II and III), cPLA2 and iPLA2 (subgroups I, II and III). In the future, this operational classification will have to be refined as more PLA2 enzymes are cloned and characterized, and other groups (or subgroups) delineated [14-16]. When we compare the characteristics of RPE-PLA2 with those of sPLA2, cPLA2 and iPLA2 (Table 4.4), we conclude that RPE-PLA2 enzymes are different. They appear to share some of the characteristics of sPLA2 and cPLA2 at the same time. The most prominent point is that RPE-PLA2 enzymes are all pBPB-sensitive, like sPLA2, whereas they are all inactivated by H_2SO_4 extraction, like cPLA2. This suggests that RPE-PLA2 may have to be included in either a new group or subgroup of PLA2. Further experiments are certainly needed to confirm our results, but it could be significant that the eye is a closed organ because of the blood/ocular barrier, and retinal cells may have evolved expressing PLA2 of a new group (or subgroup). Two interesting recently published papers [47, 48] support this idea by demonstrating that transducin, a heterotrimeric G-protein present in rod cells, also shares some characteristics with the small monomeric "Ras-like" G-proteins.

In summary, RPE-PLA2 enzymes have been shown to be H_2SO_4 -sensitive, like cPLA2, but pBPB-sensitive, like sPLA2. Moreover, RPE-PLA2 activity is partly inhibited by GTP[S] and ATP (see text), unlike cPLA2 and iPLA2, which are known to be stimulated by these nucleotides. RPE-PLA2 have also been shown to be regulated by an endogenous PLA2 inhibitor which could be removed by PBS extraction and to exhibit substrate selectivity different from that of sPLA2,

cPLA2 and iPLA2. This means that RPE-PLA2 probably represent novel types of PLA2, and may form either a new group or a new subgroup of PLA2. Of course, it will be of prime importance to purify and sequence these RPE-PLA2 in order to classify them. Considering that this study constitutes the first report on RPE-PLA2, we expect the purification of one or another of these enzymes to now be possible. In this regard, one should note that, after five freeze-thaw cycles, RPE homogenate still exhibit $81\pm 19\%$ of untreated control PLA2 activity. Moreover, of the different protease inhibitors tested, namely E-64, pepstatin, aprotinin, PMSF, Pefabloc, EDTA, leupeptin and α -macroglobulin, only Pefabloc was found to strongly inhibit PLA2 activity of RPE homogenate, leaving only $29\pm 2\%$ of control PLA2 activity.

4.6 REFERENCES

- 1 Sehran, C. N. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 1-25
- 2 Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1128**, 117-131
- 3 Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R. and Lefkovith, J. B. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 69-102
- 4 Irvine, R. F. (1982) *Biochem. J.* **204**, 3-16
- 5 Exton, J. H. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 26-42
- 6 Wang, X. B., Osugi, T. and Uchida, S. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 483-489
- 7 Wood, J. N. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 785-786
- 8 Wolf, M. J., Izumi, Y., Zorumski, C. F. and Gross, R. W. (1995) *FEBS Letters* **377**, 358-362
- 9 Davidson, F. F. and Dennis, E. A. (1990) *J. Mol. Evol.* **32**, 228-238
- 10 Ackermann, E. J. and Dennis, E. A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1259**, 125-136

- 11 Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13057-13060.
- 12 Glaser, K. B., Mobilio, D., Chang, J. Y. and Senko, N. (1993) *Trends Pharm. Sci.* **14**, 92-98
- 13 Mayer, R. J. and Marshall, L. A. (1993) *The FASEB J.* **7**, 339-348
- 14 Thomson, F. J. and Clark, M. A. (1995) *Biochem. J.* **306**, 305-309
- 15 Buhl, W.J., Eisenlohr, L.M., Preuss, I. and Gehring, U. (1995) *Biochem. J.* **311**, 147-153
- 16 Soubeyrand, S., Khadir, A., Brindle, Y. and Manjunah, P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 222-227
- 17 Jacob, M., Weech, P.K. and Salesse, C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19209-19218
- 18 Apitz-Castro, R. J., Mas, M. A., Cruz, M. R. and Jain, M. K. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 63-71
- 19 Bayburt, T., Yu, B. Z., Street, I., Ghomashchi, F., Laliberté, F., Perrier, H., Wang, Z., Jain, M. K. and Gelb, M. H. (1995) *Anal. Biochem.* **232**, 7-23
- 20 Hara, S., Kudo, I., Chang, H. W., Matsuta, K., Miyamoto, T. and Inoue, K. (1989) *J. Biochem.* **105**, 395-399

- 21 Horigome, K., Hayakawa, M., Inoue, K. and Nojima, S. (1987) *J. Biochem.* **101**, 53-61
- 22 Miljanich, G. P. (1978) Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane. Ph.D. Thesis, University of California, Santa Cruz, p. 28-29.
- 23 Spanner, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **3**, 43-65
- 24 Zimmerman, W. F., Godchaux, W. III and Belkin, M. (1983) *Exp. Eye Res.* **36**, 151-158
- 25 Swartz, J. G. and Mitchell, J. E. (1973) *Biochemistry* **12**, 5273-5278
- 26 Kim, D., Lewis, D. L., Graziadei, L., Neer, E. J., Bar-Sagi, D. and Clapham, D. E. (1989) *Nature* **337**, 557-562
- 27 Silk, S. T., Clejan, S. and Witkom, K (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21466-21469
- 28 Cockcroft, S., Nielson, C. P. and Stutchfield, J. (1991) *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 333-336
- 29 Rubin, R. P. 919, 40-41 Withiam-Leitch, M. and Laychock, S. G. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 22-26

- 30 Ando, M., Furui, H., Suzuki, K. Taki, F. and Takagi, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 708-713
- 31 Ponzoni, M. and Cornaglia-Ferraris, P. (1993) *Biochem. J.* **294**, 893-898
- 32 Hazen, S. L., Stuppy, R. J. and Gross, R. W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10622-10630
- 33 Margalit, A., Livne, A. A., Funder, J. and Granot, Y. (1993) *J. Membrane Biol.* **136**, 303-311
- 34 Ramanadham, S., Wolf, M. J., Jett, P. A., Gross, R. W. and Turk, J. (1994) *Biochemistry* **33**, 7442-7452
- 35 Ackermann, E. J., Kempner, E. S. and Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9227-9233
- 36 Casey, P. J. (1994) *Curr. Biol.* **6**, 219-225
- 37 Yamane, H. K. and Fong, B. K. K. (1993) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 201-241
- 38 Hepler, J. R. and Gilman, A. G. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 383-387
- 39 Spiegel, A. M., Backlund Jr, P. S., Butrynski, J. E., Jones, T. L. Z. and Simonds, W. F. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16**, 338-341

- 40 Neer, E. J. and Clapham, D. E. (1988) *Nature* **333**, 129-134
- 41 Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A. and Lin, L. L. (1995) *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **12**, 83-117
- 42 Van Den Bosch, H., Aarsman, A. J., Van Schaik, R. N. H., Schalkwijk, C. G., Neijs, F. W. and Sturk, A. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 781-784
- 43 Dekker, C. J., Geurts Van Kessel, W. S. M., Klomp, J. P. G., Pieters, J. and De Kruijff, B. (1983) *Chem. Phys. Lipids* **33**, 93-106
- 44 Marsh, D. (1990) *CRC Handbook of Lipid Bilayers*, pp. 265-273, CRC Press, Boston
- 45 Cockcroft, S. and Thomas, G. M. H. (1992) *Biochem. J.* **288**, 1-14
- 46 Rhee, S. G., Suh, P.-H., Ryu, S.-H. and Lee, S. Y. (1989) *Science* **244**, 546-550
- 47 Malinski, J. A., Zera, E. M., Angleson, J. K. and Wensel, T. G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19919-19924
- 48 Zera, E. M., Molloy, D. P., Angleson, J. K., Lamture, J. B., Wensel, T. G. and Malinski, J. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19925-19931

4.7 LEGENDS TO FIGURES

Figure 4.1 Discrimination between PLA2 and PLC activity.

Aliquots of RPE-cytosol were incubated for different periods of time with [^{14}C]DOPC+DMPPM as the substrate. Hydrolysis products were extracted, separated by bf-TLC, identified, scraped and quantified. Production of [^{14}C]oleic acid and [^{14}C]lysoPC reflected PLA2 activity whereas production of [^{14}C]diacylglycerol and/or [^{14}C]oleic acid reflected PLC activity. These results are mean \pm S.D. of duplicate determinations from two separate experiments.

Figure 4.2 Cation-exchange chromatography of RPE-cytosol.

RPE-cytosol was applied to a Fractogel EMD SO_3^- -650S column. After elution of unbound proteins with PBS1x pH 6.0, bound proteins were eluted with 2 M NaCl, as indicated by the arrow. Flow rate was 1 ml/min. Aliquots of eluted fractions were assayed for PLA2 activity using 10PyPM. Incubation time was 30 min. PLA2 activity was expressed as pmol of 10Py-decanoic acid hydrolyzed/20 μl of sample. **(A)**. Protein elution profile. **(B)**. PLA2 activity elution profile. The width of each bar in **(B)** corresponds to the total volume collected in that fraction.

Table 4.1 Subcellular distribution of PLA2 activity in RPE

The different supernatant and wash fractions were sequentially extracted from RPE homogenate with isotonic (PBS1x), hypertonic (PBS6x), and OG-containing (PBS1xOG) buffers. Aliquots of each fraction were then incubated for 30 min with [¹⁴C]PAPC+DMPM as the substrate. The results are mean±S.D. of triplicate determinations from two experiments. The percentage of PLA2 activity extracted was calculated on the basis that the homogenate contained 100% of PLA2 activity, whereas the relative percentage of PLA2 activity extracted was obtained by taking the sum of all cytosol and wash fractions to be equal to 100%.

Fractions	PLA2 activity extracted (%)	relative percentage of PLA2 activity extracted
homogenate-PBS1x	100.0 ± 12.2	
supernatant-PBS1x	15.6 ± 0.2	6.6 ± 0.1
wash-PBS1x	60.8 ± 1.1	25.5 ± 0.4
supernatant-PBS6x	94.3 ± 5.5	39.6 ± 2.3
wash-PBS6x	52.7 ± 13.1	22.1 ± 5.5
supernatant-PBS1xOG	8.3 ± 0.1	3.5 ± 0.1
wash-PBS1xOG	6.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1
total	238.4 ± 20.1	100.0 ± 8.4

Table 4.2 Characteristics of RPE-PLA2 active fractions eluted from a cation-exchange chromatography column
RPE-1 and RPE-10 were collected from cation-exchange column, and tested for PLA2 activity in comparison to RPE-cytosol. Aliquots of each fraction were incubated for 60 min with 10PyPM. Protein concent and PLA2 activity of each fraction were calculated on the basis that the cytosols contained 100% of the proteins and PLA2 activity, respectively. The results are mean±S.D. of triplicate determinations from four separate experiments.

Fractions	Protein concentration (mg/ml)	Specific activity (pmol/h per mg)	Purification factor	% of total proteins	% of total PLA2 activity
RPE-cytosol	2.28	1878 ± 486		(100)	(100)
RPE-1	0.53	6701 ± 745		8	26
RPE-10	0.02	882 160 ± 34 919	470	0.08	36

Table 4.3 Effects of EGTA, DTT, pBPB and heat on RPE-PLA2 activity

Aliquots of RPE-cytosol, RPE-1 and RPE-10 were either heated or pretreated with EGTA, DTT or pBPB before PLA2 assay with 10PyPM as the substrate. PLA2 activity is expressed as a percentage of control (presence of 2 mM Ca²⁺) PLA2 activity. The results are mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

Fractions	PLA2 activity (% of control)			
	EGTA	DTT	pBPB	heat
RPE-cytosol	11.0 ± 0.0	38.0 ± 11.3	0.0 ± 0.0	57.5 ± 10.6
RPE-1	0.7 ± 1.1	85.5 ± 7.8	0.0 ± 0.0	89.7 ± 5.3
RPE-10	5.2 ± 4.6	24.6 ± 12.2	0.0 ± 0.0	92.7 ± 7.4

Table 4.4 Comparison of the characteristics of sPLA2, cPLA2, iPLA2 and RPE-PLA2

	H ₂ SO ₄	Ca ²⁺	DTT	pBPB	heat
sPLA2 ^a	-	+ (mM)	+	+	-
cPLA2 ^a	+	+ (μM)	-	-	+
iPLA2 ^{a, b}	n.a. ^c	-	-	-	+
RPE-1	+	+	-	+	-
RPE-10	+	+	+	+	-

^a See references [10-13] for reviews on the characteristics of sPLA2, cPLA2 and iPLA2

^b See references [30-35] for additional information on the characteristics of iPLA2

^c n.a. = not available

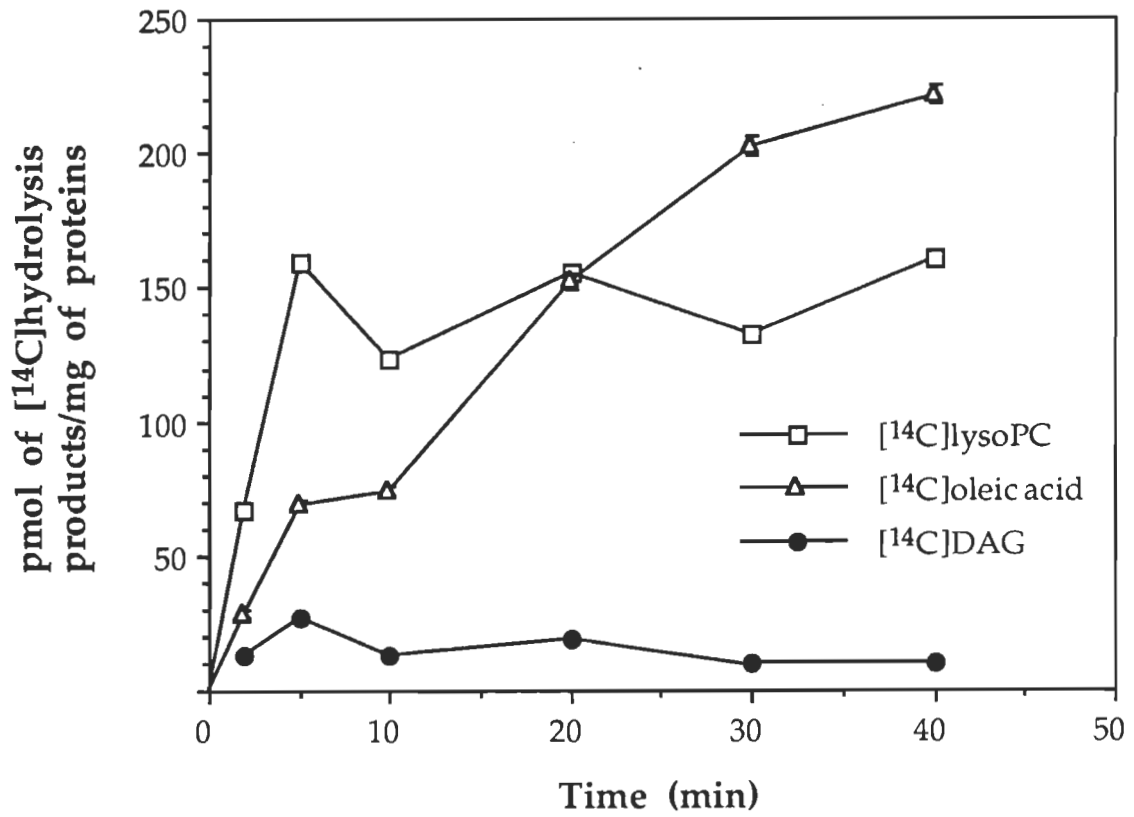


Figure 4.1: Discrimination between PLA2 and PLC activity

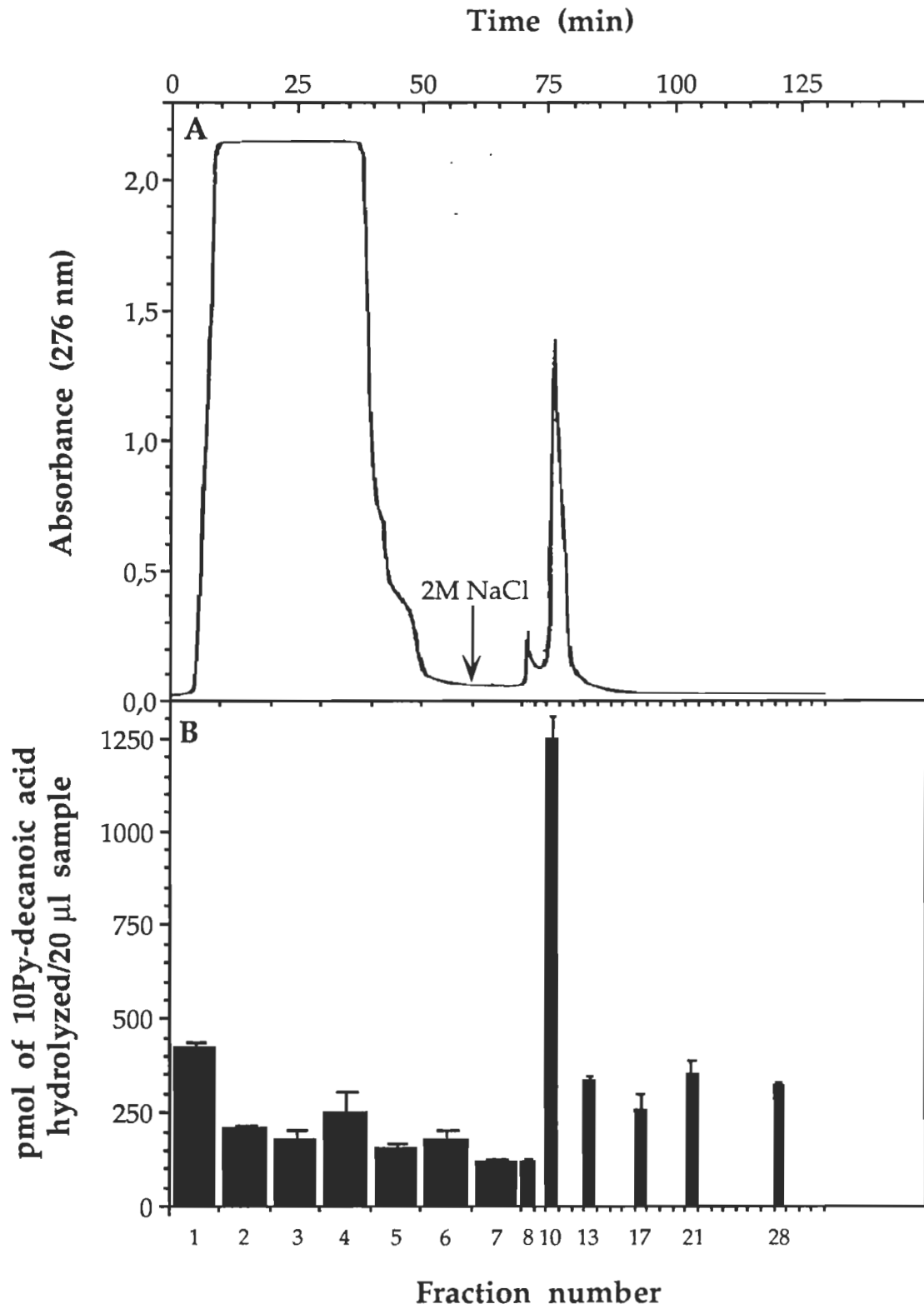


Figure 4.2: Cation-exchange chromatography of RPE-cytosol

CHAPITRE 5

PHOSPHOLIPASES A2 OF ROD OUTER SEGMENT-FREE BOVINE RETINAE
ARE DIFFERENT FROM WELL-KNOWN PHOSPHOLIPASES A2

sous presse dans:

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

(Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Biochim. Biophys. Acta. 1998)

**PHOSPHOLIPASES A2 OF ROD OUTER SEGMENT-FREE BOVINE RETINAE
ARE DIFFERENT FROM WELL-KNOWN PHOSPHOLIPASES A2**

Michèle Jacob^a, Philip K. Weech^b and Christian Salesse^a

GREIB^a, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Boul. des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7;
Merck Frosst Centre for Therapeutic Research^b, C.P. 1005, Pointe-Claire-Dorval, Québec, Canada, H9R 4P8.

RUNNING TITLE: PHOSPHOLIPASE A2 IN ROS-FREE RETINAE

KEYWORDS: PHOSPHOLIPASE A2, CHARACTERIZATION, RETINA, TLC

5.1 LIST OF ABBREVIATIONS

[¹⁴ C]PAPC	1-palmitoyl-2-[¹⁴ C ₁]arachidonoyl phosphatidylcholine
[¹⁴ C]PAPE	1-palmitoyl-2-[¹⁴ C ₁]arachidonoyl phosphatidylethanolamine
[¹⁴ C]DOPC	1[¹⁴ C ₁]-oleoyl-2-[¹⁴ C ₁]oleoyl phosphatidylcholine
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMPM	dimyristoyl phosphatidylmethanol
DTT	dithiothreitol
E-64	trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane
GTP γ S	guanosine 5'-O-(3-thio)triphosphate
lysoPC	lysophosphatidylcholine
MAG	monoacylglycerol
OG	n-octyl glucoside
P200	rod outer segment-free retinal pellet collected at 200 g, which contains neuronal cells, Müller cells and rod inner segments.
PA	phosphatidic acid
pBPB	p-bromophenacylbromide
PBS	phosphate buffered saline
PE	phosphatidylethanolamine
PLA2	phospholipase A2
cPLA2	cytosolic PLA2
iPLA2	calcium-independent PLA2
sPLA2	secretory PLA2
PLC	phospholipase C

PLD	phospholipase D
10PyPM	1-O-hexadecyl-2-[pyrene ₁₀]decanoyl-sn-3-phosphomethanol
10Py-decanoic acid	[pyrene ₁₀]decanoic acid
SAPC	1-stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidylcholine
bf-TLC	"back-and-forth"-thin layer chromatography

5.2 SUMMARY

We have recently demonstrated the presence of phospholipase A2 (PLA2) activity in a rod outer segment-free retinal fraction which we called P200 and which contains neuronal cells, Müller cells and rod inner segments. We report here our results on the characterization of this P200-PLA2 activity. We show that P200 probably contains more than one type of PLA2, as indicated by the results obtained with different chromatographically eluted PLA2-active fractions which were treated with either Ca^{2+} , EGTA, dithiothreitol or p-bromophenacyl bromide, or heated. Moreover, the results from PLA2 assays using different substrates, as well as those obtained after treatment of the homogenate with H_2SO_4 , guanosine 5'-O-(3-thio)triphosphate and ATP, suggest that P200-PLA2 are different from well-known secretory PLA2, cytosolic PLA2 and Ca^{2+} -independent PLA2. Control experiments using our "back-and-forth"-TLC technique allowed us to confirm that, in our assay conditions, the release of fatty acids was due to PLA2 enzymes. These results, which constitute the first characterization of PLA2 of the neural retina, thus suggest that it contains novel types of PLA2 enzyme, in contrast to well-known PLA2.

5.3 INTRODUCTION

Phospholipases A2 (PLA2) catalyze the hydrolysis of sn-2 fatty acyl chains. They are thus important enzymes which are responsible for the production of lysophospholipids and fatty acids (ex. arachidonic acid) which both are precursors in the synthesis of inflammatory lipid mediators [1-4]. Alternatively, fatty acids so generated could act as second messengers in signal transduction [5-8]. Three groups of PLA2 are actually distinguished on the basis of their Ca²⁺-requirement, substrate selectivity, and sensitivity to denaturing treatments such as H₂SO₄, dithiothreitol (DTT), p-bromophenacyl bromide (pBPPB), and heat [9-13]. These groups are sPLA2 (secretory PLA2 with subgroups I, II and III), cPLA2 (cytosolic PLA2) and iPLA2 (Ca²⁺-independent PLA2 with subgroups I, II and III), and other groups (or subgroups) will certainly be included as more PLA2 are discovered and cloned [14-17].

We have recently [17] presented evidence for the presence of novel types of phospholipases A2 (PLA2) in one of two bovine subretinal fractions which were previously found [18] to contain PLA2 activity. Retinal pigment epithelial cells (RPE) were indeed shown [17] to contain two different types of PLA2 enzymes, on the basis of the aforementioned criteria. This operational classification is widely accepted and used to characterize PLA2 [9-13]. We thus present here the first report on the operational characterization of PLA2 activity from P200, a rod outer segment-free subretinal fraction [18] which contains neuronal cells, Müller cells and rod inner segments.

This study led us to conclude that P200 probably contains four types of

PLA2 enzyme, based on results showing the effects of H₂SO₄, guanosine 5'-O-(3-thio)triphosphate (GTP γ S) and ATP on the homogenate, as well as those showing the effects of Ca²⁺, EGTA, DTT, pBPB and heating on different PLA2-active fractions eluted from cation exchange chromatography. Moreover, control experiments using our "back-and-forth" (bf)-TLC technique [17] allowed us to confirm that, in our assay conditions, the hydrolysis of fatty acids was not due to the combined action of PLC and DAG lipase but rather to PLA2. Then, when comparing the properties of P200-PLA2 with those of sPLA2, cPLA2 and iPLA2, P200-PLA2 appear to be quite different, suggesting the presence of novel types of PLA2. P200-PLA2 could thus be part of either a new group or subgroup of PLA2.

5.4 MATERIALS AND METHODS

5.4.1 Materials

1-Palmitoyl-2-[$^{14}\text{C}_1$]arachidonoyl phosphatidylcholine ([^{14}C]PAPC), 1-[$^{14}\text{C}_1$]oleoyl-2-[$^{14}\text{C}_1$]oleoyl phosphatidylcholine ([^{14}C]DOPC) and 1-palmitoyl-2-[$^{14}\text{C}_1$]arachidonoyl phosphatidylethanolamine ([^{14}C]PAPE) were from Dupont Canada. Their radiochemical and optical purity was always higher than 97% (as checked by TLC and GC by the manufacturer). [Pyrene₁₀]decanoic acid (10Py-decanoic acid) and 1-O-hexadecyl-2-[pyrene₁₀]decanoyl-sn-3-phosphomethanol (10PyPM) were from Molecular Probes. Dimyristoyl phosphatidylmethanol (DMPM), 1-palmitoyl-2-arachidonoyl phosphatidylethanolamine (PAPE), egg lysophosphatidylcholine (lysoPC) and egg phosphatidic acid were from Avanti Polar Lipids. 1-Stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidylcholine (SAPC), NaN_3 , fatty acid-free BSA and pBPB were from Sigma. Aprotinin, trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64), leupeptin, n-octyl glucoside (OG), EGTA, EDTA, DTT, ATP, $\text{GTP}\gamma\text{S}$, 1,2-diolein and arachidonic acid were from Boehringer Mannheim. Chloroform, methanol, heptane, isopropyl ether, acetic acid and H_2SO_4 were from Fisher Scientific. TLC plates were LK6D silica gel 60Å from Whatman.

5.4.2 Preparation of P200

P200 fraction was prepared from fresh bovine eyes as described previously [18] and was either used immediately or aliquoted and stored at -80°C . Protein concentration was determined using the Lowry protein assay kit (Sigma).

5.4.3 Extraction of P200

After addition of protease inhibitors (2.8 μM E-64, 0.06 μM aprotinin, 1 μM leupeptin and 100 μM EDTA final concentrations), P200 was homogenized ten times with three volumes of PBS6x (50 mM Na_2HPO_4 /600 mM NaCl, pH 7.5) in a tight-fitting glass homogenizer. After centrifugation of the homogenate (140 000 g, 4°C, 1h; Beckman 70.1 Ti rotor), the resulting supernatant (PBS6x extract) was collected and used for all experiments, except those measuring the effects of ATP and $\text{GTP}\gamma\text{S}$ which were done on the homogenate. H_2SO_4 extraction was done according to Apitz-Castro *et al.* [19]. Proteins were quantitated as described above.

5.4.4 Radiometric measurement of PLA2 activity

PLA2 assays with [^{14}C]PAPC, [^{14}C]PAPC+DMPPM, [^{14}C]DOPC+DMPPM, or [^{14}C]PAPE+DMPPM were performed as described previously [18]. Where indicated, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (200 μM) or ATP (10 mM) was included. Incubation was done at 37°C with 1.85 nmol of phospholipid and 75 μg of proteins in a total volume of 200 μl . PLA2 activity was expressed as pmol of [^{14}C]arachidonic or [^{14}C]oleic acid released/mg of proteins and was corrected for the presence of unlabeled DMPPM, if present, as described in section 3.3. Control tubes (having no PLA2) allowed us to determine that the [^{14}C]fatty acid eluates never contained more than 2% of contaminating [^{14}C]phospholipids, which was negligible. Moreover, zero-time values were subtracted. When the homogenate was assayed, PLA2 activity was corrected for the presence of endogenous phospholipids as previously described [18].

5.4.5 Fluorimetric measurement of PLA2 activity

PLA2 assays with 10PyPM were performed as previously described [17]. Incubation time was 30 min. PLA2 activity was expressed as pmol of 10Py-decanoic acid released/mg of proteins. Zero-time values were subtracted. For Table 2, protein samples were first incubated for 15 min at 37°C (as described by Hara *et al.* [20]) with either 2 mM Ca²⁺ (controls), 3 mM DTT, 1 mM pBPB, or 3 mM EGTA and then cooled to 4°C, prior to addition of the substrate and transfer to 22°C. Heat-treated samples (20 min at 60°C [21]) were also cooled to 4°C before addition of 10PyPM and transfer to 22°C for the activity measurements.

5.4.6 Discrimination between PLA2 and PLC activity using bf-TLC

To determine whether [¹⁴C]fatty acids were released as a consequence of PLA2 activity or phospholipase C (PLC) coupled to diacylglycerol (DAG) lipase activity, we proceeded with our bf-TLC method as described [17]. The "forth" dimension allowed for the separation of [¹⁴C]lysoPC, [¹⁴C]DOPC and DMPM, whereas [¹⁴C]oleic acid, [¹⁴C]monoacylglycerol (MAG) and [¹⁴C]DAG migrated with the solvent front [22]. The "back" dimension then allowed for the separation [¹⁴C]oleic acid, [¹⁴C]MAG and [¹⁴C]DAG [23] without overlapping the compounds separated in the first migration. Separation was visualized with I₂ vapours. Spots co-migrating with fatty acid, DAG, lysoPC and SAPC standards were marked (whether visible or not), individually scraped and collected in scintillation vials for liquid scintillation counting (after I₂ was allowed to evaporate). PLA2 activity was expressed as pmol of [¹⁴C]hydrolysis products/mg of proteins and was corrected for the presence of unlabeled DMPM.

5.4.7 Cation-exchange chromatography

P200-PBS6x extract was adjusted to pH 6.0, agitated for 1h at 4°C and centrifuged (140 000 g, 4°C, 1h; Beckman 70.1 Ti rotor). The resulting supernatant was then collected, mixed with Sephadex G10 (1.5 ml of swollen gel/50 ml), gently agitated for 1h at 4°C to adsorb suspended lipids and centrifuged again as described above. Cleared supernatant was filtered (1 µm Whatman filters) and then injected onto a Fractogel EMD SO₃⁻-650S column (150 X 10 mm) which was equilibrated with PBS1x pH 6 (50 mM Na₂HPO₄/100 mM NaCl). Unbound proteins were eluted with PBS1x pH 6 and a single-step gradient (50 mM Na₂HPO₄/2 M NaCl, pH 6.0) was then applied to elute bound proteins. Proteins were quantitated using the ISS Protein-Gold from Integrated Separation System.

5.5 RESULTS

5.5.1 P200-PLA2 activity is inactivated by H₂SO₄ but unaffected by GTP γ S and ATP

Given that sPLA2 but not cPLA2 may be acid-extracted without inactivation [19], we measured PLA2 activity in a P200-H₂SO₄ extract, using [¹⁴C]PAPC+DMPM as the substrate in the radiometric assay. The absence (0.0 \pm 1.0%) of PLA2 activity in the neutralized P200-H₂SO₄ extract, as measured by total [¹⁴C]arachidonic acids released in comparison to untreated controls, indicates that P200-PLA2 activity was totally inactivated by H₂SO₄. This suggests that P200-PLA2 are not of the sPLA2 type. We also tested the effects of GTP γ S and ATP on PLA2 activity of the homogenate because of reports on the regulation of cPLA2 and iPLA2 by these nucleotides [24-33]. Again, [¹⁴C]PAPC+DMPM was used as the substrate in the radiometric assay. Since we did not observe a significant effect of GTP γ S or ATP (93.0 \pm 8.0% and 143.1 \pm 47.5% of untreated controls' activity, respectively), it suggests that P200-PLA2 activity is probably not regulated by GTP γ S or ATP. Results are mean \pm S.D. of triplicates from two separate experiments.

The ineffectiveness of ATP to clearly stimulate P200-PLA2 activity suggests that P200 does not contain iPLA2 of the myocardial, macrophage, pancreatic or platelet type (as described by Hazen *et al.* [33], Ackermann *et al.* [32], Ramadham *et al.* [31], and Margalit *et al.* [30], respectively), which were shown to be stimulated two- to six-fold by ATP. However, we have to be careful with this interpretation because of the relatively large standard deviation associated with

the effect of ATP, which could be due to the nature of P200 (see below). Indeed, this large standard deviation could mean that P200-PLA2 activity is sensitive to the presence of ATP but, due to the viscous nature of this fraction, ATP is not always freely accessible to the enzyme. These results thus suggest that P200 may possess PLA2 activity of the cPLA2 type that is not regulated by GTP γ S.

5.5.2 P200-PLA2 activity is mostly extracted with PBS6x

All PLA2 measurements, except those with ATP and GTP γ S (as well as the H₂SO₄ extraction), were done using aliquots of P200-PBS6x extracts which were found to contain 76.2 \pm 0.7% of the "extractable" activity. Sequential extraction of the homogenate with 1) PBS1x, 2) PBS6x and 3) PBS1xOG indeed allowed us to recover 18.9 \pm 0.2%, 16.0 \pm 0.2% and 10.9 \pm 0.1% of PLA2 activity, respectively (see "% of PLA2 activity extracted" in Table 5.1). That is only 45.8 \pm 0.5% of the total activity initially detected in the homogenate. These results were obtained by measuring the amount of [¹⁴C]arachidonic acid released from [¹⁴C]PAPC+DMPM substrate vesicles which were incubated with aliquots of PBS1x, PBS6x or PBS1xOG extracts, in comparison to the whole homogenate.

Although this low level of PLA2 activity recovering could be due to the loss of an endogenous PLA2 activator during extraction, it is very likely to be due to the nature of P200 which was very dense, viscous and thus, very difficult to homogenize. This was especially true when PBS6x was used, suggesting that P200 cannot be completely extracted. We also tried to homogenize P200 in 1 M KBr, as suggested by Tremblay *et al.* [34], but even after 12h of centrifugation at 140 000 g, the soluble and membrane fractions were not separated. Moreover,

as shown in Table 5.1, addition of a detergent (1% OG) to PBS1x did not substantially increase the percentage of PLA2 activity extracted from the homogenate. Then, considering that PBS6x unavoidably extracts soluble proteins from P200 homogenate which were not extracted with PBS1x before, in addition to weakly membrane-associated proteins, the results in Table 5.1 mean that: 1) extracting P200 homogenate directly with PBS6x allowed us to recover $76.2\pm 0.7\%$ ($41.3\pm 0.4\%$ plus $34.9\pm 0.3\%$) of the extractable activity and 2) extracting P200 homogenate directly with PBS6x allowed us to extract almost twice as much activity ($76.2\pm 0.7\%$) as PBS1x ($41.3\pm 0.4\%$). PBS6x thus allowed us to extract most of P200 PLA2 activity.

5.5.3 P200-PLA2 have a substrate selectivity that is different from that of sPLA2, cPLA2 and iPLA2

Since sPLA2 are known to have a preference for phosphatidylethanolamine over phosphatidylcholine without being selective for the sn-2 fatty acid, whereas cPLA2 and soluble iPLA2 are selective for sn-2 arachidonic acid but not for polar headgroups [10-13, 35, 36], we measured and compared PLA2 activity of the P200-PBS6x extract towards the following substrates: [^{14}C]PAPC, [^{14}C]PAPC+DMPM, [^{14}C]PAPE+DMPM and 10PyPM.

We observed a two-fold increase in the hydrolysis of [^{14}C]PAPC+DMPM (717.3 ± 71.3 pmol/mg/h) over [^{14}C]PAPC alone (354.9 ± 68.2 pmol/mg/h). In fact, total disintegration counts recovered in [^{14}C]fatty acid eluates were found to be very similar whether pure (92.5 μM [^{14}C]PAPC) or mixed vesicles (46.2 μM [^{14}C]PAPC: 46.2 μM DMPM) were used. Then, this suggests that: 1) P200-PLA2

bind more tightly to negatively charged substrate vesicles (containing DMPM) and 2) twice as much [^{14}C]fatty acids were released from mixed vesicles on a [^{14}C]PAPC molar basis. Accordingly, PLA2 activity was multiplied by 2 whenever such mixed vesicles were used. A similar two-fold increase in the hydrolysis of 10PyPM (707.6 ± 89.2 pmol/mg/h) over [^{14}C]PAPC alone (see above) was observed. Thus, these results suggest that P200-PLA2 bind more tightly to negatively charged substrate vesicles (phosphomethanol) as compared to neutral zwitterionic vesicles (phosphocholine). They also suggest that P200-PLA2 are not selective for sn-2 arachidonic acid, unlike cPLA2 and soluble iPLA2. Alternatively, this could indicate a preference of P200-PLA2 for saturated acyl-containing phospholipids over polyunsaturated acyl-containing phospholipids. However, no PLA2 was yet shown to be selective for fatty acids other than polyunsaturated fatty acids (10-13, 35, 36). Results with radiolabelled substrates are representative mean \pm S.D. of triplicate determinations from two separate experiments; those with 10PyPM are mean \pm S.D. of triplicate determinations from five separate experiments.

Comparing the hydrolysis rate of [^{14}C]PAPC with that of 10PyPM may not seem relevant because 10PyPM is not a physiological molecule. However, this experiment was designed to identify suitable substrates in order to characterize and, eventually, purify retinal PLA2. We wanted to compare the hydrolysis rate of zwitterionic (neutral) and negatively charged vesicles. Using negatively charged vesicles of 10PyPM then becomes relevant because phospholipid's negative charge may be physiologically important for retinal PLA2 activity.

[^{14}C]PAPE+DMPM does not seem to be a good substrate for P200-PLA2, as

evidenced by the 20-fold reduction in the hydrolysis of [^{14}C]PAPE+DMPM (34.4 ± 4.4 pmol/mg/h) as compared to [^{14}C]PAPC+DMPM (see above). At first glance, one might think that this low level of [^{14}C]arachidonic acid release from [^{14}C]PAPE+DMPM substrate vesicles is due to a property of PE bearing unsaturated fatty acid(s) at the sn-1 and/or sn-2 position(s). Indeed, "unsaturated PE" has a natural tendency to form hexagonal_{II} (H_{II}) phases at low temperatures in an aqueous environment, instead of lamellar (L) phases (37). Given that the L-to-H_{II} transition temperature of PAPE has not been determined yet (38) and that saturated fatty acids are known to hinder this natural H_{II} phase-forming tendency of unsaturated PE (37, 38), DMPM (50% molar ratio) was added to [^{14}C]PAPE in the PLA2 assay. Also, ^{31}P -nuclear magnetic resonance of this equimolar mixture (PAPE:DMPM) allowed us to determine that, in our assay conditions, PAPE was essentially organized into lamellar structures (to be published elsewhere). Then, this means that, even in the presence of DMPM which assures the formation of mixed vesicles, [^{14}C]PAPE is still not a good substrate for P200-PLA2, unlike sPLA2. Considering that P200-PLA2 were found to bind much less tightly to zwitterionic [^{14}C]PAPC vesicles than to negatively charged [^{14}C]PAPC+DMPM vesicles (see above), that [^{14}C]PAPE is also a zwitterionic phospholipid, and that the hydrolysis rate of [^{14}C]PAPE+DMPM is already much lower than that of [^{14}C]PAPC+DMPM (see above), we did not measure the hydrolysis rate of [^{14}C]PAPE alone. Together, these results thus suggest that P200-PLA2 enzymes are not of the sPLA2, cPLA2 or iPLA2 type.

5.5.4 In P200, the release of fatty acids resulted from PLA2 activation

Given that arachidonic acid may be generated through the sequential

action of a PLC and a DAG lipase [39-40], we measured PLC and PLA2 hydrolysis products in our assay conditions. Since P200-PLA2 enzymes did not prove to be selective for arachidonoyl-containing phospholipids (see above), [^{14}C]DOPC with both chains radiolabelled was used as the substrate (in mixed vesicles with DMPM, 50% molar ratio).

In order to separate all PLA2- and PLC/DAG lipase-hydrolysis products, we used a rapid and simple TLC technique which was recently [17] developed in our laboratory and which we called bf-TLC. As described in the methods section, the first solvent system allowed for the separation of lysoPC (R_{F1} 0.15), PC (R_{F1} 0.33) and PM (R_{F1} 0.52) in the "forth" dimension, whereas the second solvent system allowed for the separation of DAGs (R_{F2} 0.25) and free fatty acids (R_{F2} 0.5) in the "back" dimension. Thus, parallel formation of [^{14}C]lysoPC and [^{14}C]oleic acid would indicate PLA2 activity whereas formation of [^{14}C]DAG only would indicate PLC activity. On the other hand, an increase of the [^{14}C]DAG level followed by its decrease and a concomitant increase of the [^{14}C]oleic acid level would indicate PLC activity coupled to DAG lipase activity. Alternatively, formation of [^{14}C]oleic acid without a concomitant increase in [^{14}C]lysoPC would indicate the presence of PLA2 enzymes having a lysophospholipase activity, as described for cPLA2 (reviewed by Clark *et al.* [35]). As suggested by the migration pattern of the phosphatidic acid standard (R_{F1} 0.43), this technique would also allow to detect PLD activity. However, this would not allow to separate monoacylglycerols (R_{F2} 0.05) properly.

Interestingly, Figure 5.1 shows that: 1) the level of [^{14}C]oleic acid considerably increased with time, 2) the level of [^{14}C]lysoPC significantly decreased

with time, 3) the level of [^{14}C]DAG only slightly increased with time and 4) the preparations of substrate vesicles used in the enzymatic assay initially contained 57 ± 3 pmol of [^{14}C]oleic acid, 71 ± 3 pmol of [^{14}C]lysoPC and 19 ± 1 pmol of [^{14}C]DAG, as indicated by the 0 time values (see Figure 5.1). This suggests that the release of [^{14}C]oleic acid in P200 is due to PLA2 enzymes which also possess lysophospholipase activity [35]. The substantial hydrolysis of [^{14}C]lysoPC (57% after 5 min) originally present in the substrate preparations, as indicated by the decrease of [^{14}C]lysoPC below its 0 time level (see Figure 5.1), indeed strongly argues for the presence in P200 of such a lysophospholipase activity. Since [^{14}C]DOPC (used as the substrate in mixed vesicles with DMPM, 50% molar ratio) is radiolabelled on both acyl chains, its hydrolysis by PLA2/lysophospholipase enzymes can lead to the formation of two [^{14}C]oleic acid without a [^{14}C]lysoPC. Then, it is not surprising that the maximum [^{14}C]lysoPC level is much lower than that of [^{14}C]oleic, instead of being equimolar.

Although there was a slight increase of [^{14}C]DAG with time, which is likely to be due to PLC activity, this is inconsistent with the production of [^{14}C]oleic acid by PLC plus DAG lipase activities. In fact, if there had been a concerted action of PLC and DAG lipase, then the amount of [^{14}C]DAG should have decreased as the amount of [^{14}C]oleic acid increased, which did not happen (see Figure 5.1). If there had been a very active DAG lipase which did not allow us to detect PLC generated-DAGs (in our measurement timescale), then we should have observed a decrease of the [^{14}C]DAG level initially present in the substrate preparations below its 0 min-level (similarly to [^{14}C]lysoPC), which did not happen either. As shown in Figure 5.1, the [^{14}C]DAG level slightly increased. Since production of DAG by PLC is the rate-limiting step for the DAG lipase activi-

ty, a slow degrading DAG lipase (which only hydrolyzes the sn-1 acyl chain) could not have accounted for such a high level of [^{14}C]oleic acid (see Figure 5.1). Then, this suggests that the PBS6x extract of P200 did not contain significant DAG lipase activity. The absence of [^{14}C]phosphatidic acid also suggests that there is neither PLD activity nor DAG kinase activity³⁵ in P200 in our assay conditions (not shown). The results in Figure 5.1 thus show that, in our assay conditions, the release of [^{14}C]fatty acids was a direct consequence of PLA2 activity.

5.5.5 P200 contains three major PLA2-active fractions

Elution of the PBS6x extract on a cation-exchange chromatography column revealed the presence of more than one PLA2-active fraction in P200. Figure 5.2A shows the typical elution profile of P200-proteins, whereas Figure 5.2B shows the distribution of PLA2 activity amongst the diverse fractions tested. As can be seen, there were three major PLA2-active fractions in P200. Two of them, P200-1 and P200-3, were eluted with unbound proteins by a low salt buffer whereas the other one, P200-36, was tightly bound to the column and eluted by a high salt buffer (see Figure 5.2). Since these three individual fractions together contained 3.7-fold more activity than originally measured in the whole cytosol (see Table 5.2), we suggest that P200-PLA2 activity is, at least partly, negatively regulated by soluble and/or peripheral factors which were coextracted by PBS6x but removed by cation-exchange chromatography (see Table 5.2). Note that, when 20 μl sample aliquots of P200-cytosol, P200-1, P200-3 and

³⁵ Since DAG kinases phosphorylate DAGs to generate phosphatidic acid, the low level of DAGs that we detected could have been due to the presence of DAG kinases in P200. However, the unchanged level of [^{14}C]phosphatidic acid argues against this possibility.

P200-36 were used in the fluorimetric assay as described in Table 5.2, PLA2 activity of each fraction was found to be linear over 90 min (not shown).

The significant decrease of PLA2 activity between P200-1 and P200-3 (see Figure 5.2B) suggested to us that both of these fractions may contain a different type of PLA2 activity. Similarly, the progressive decrease followed by an increase of PLA2 activity between P200-3 and P200-36 indicated that each fraction may possess a different type of PLA2 enzyme. Thus, considering the distribution of both total PLA2 activity and proteins in P200-1, P200-3 and P200-36 (see Figure 5.2), Table 2 suggests that P200 could contain three different types of PLA2 enzyme. These three PLA2-active fractions were thus selected for further characterization.

Figure 5.2B shows that many fractions, in addition to P200-1, P200-3 and P200-36, exhibit a significant level of PLA2 activity. This is typical of crude homogenate which are likely to contain hundreds of proteins at the first chromatographic step. According to this, it may seem surprising that P200-2 was not selected for further characterization. However, P200-2 was very likely to be highly contaminated with P200-1 and P200-3 PLA2 activity and was not characterized. Since one objective of this experiment was the eventual purification of the minimum number of P200-PLA2 enzymes, we wanted P200-fractions having both the lowest possible protein content and the highest possible PLA2 activity. For this reason, fractions P200-4 to P200-7 were not combined with P200-3. Fractions P200-22 to P200-34 also exhibit a high level of PLA2 activity and, although they were not extensively characterized, we expect that their properties would be similar to those of P200-36 (see Figure 5.2 and Table 5.2).

5.5.6 P200 probably contains four different types of PLA2 enzyme

Since sPLA2, cPLA2 and iPLA2 differ in their sensitivity to Ca^{2+} , EGTA, DTT, pBPB, and heat [10-13], we have tested the effects of these agents on the selected PLA2-active fractions, namely P200-1, P200-3 and P200-36 (see Figure 5.2 and Table 5.2). As shown in Table 5.3, P200 may contain at least three types of PLA2, two of them being Ca^{2+} -dependent whereas the other one is Ca^{2+} -independent. Indeed, P200-3 seems to contain both Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent PLA2 activities, as indicated by the $53.1 \pm 9.1\%$ activity still detected after EGTA treatment (see Table 5.3). On the other hand, P200-1 and P200-36 would be highly enriched in Ca^{2+} -dependent PLA2 activity since EGTA caused $87.5 \pm 3.6\%$ and $100.0 \pm 0.0\%$ inhibition, respectively.

At first sight, the presence of Ca^{2+} -dependent PLA2 activity in P200-1, P200-3 and P200-36 may seem surprising given that the activity of P200-cytosol appeared fully Ca^{2+} -independent. However, considering the reproducibility of this result and its very small standard deviation, it seems very unlikely to be due to experimental errors. We would rather favour the possibility that the endogenous P200-PLA2 inhibitor, seemingly present in the P200-cytosol (see text above, as well as Table 5.2), selectively affects one (or all) of the Ca^{2+} -dependent P200-PLA2 activities. In fact, P200-1 and P200-36 together contained more than 82% of the total recovered P200-PLA2 activity (see Table 5.2) and this was clearly shown to be Ca^{2+} -dependent (see Table 5.3). Thus, selective masking of Ca^{2+} -dependent PLA2 activity in P200-cytosol would have led us to detect only the Ca^{2+} -independent PLA2 activity, i.e. without any inhibition by EGTA. Subsequent removal of these inhibitors by chromatography would then have un-

masked the EGTA-sensitive PLA2 activities (see Tables 5.2 and 5.3).

As is the case for sPLA2, P200-1, P200-3 and P200-36 were strongly inhibited by pBPB (100.0±0.0%, 99.7±0.6% and 98.5±2.1% inhibition, respectively), which is in agreement with the 90.3±13.8% inhibition obtained with the cytosol (see Table 5.3). Whereas PLA2 activity in P200-3 and P200-36 is clearly DTT-resistant, that in P200-1 seems to be only partially DTT-resistant (see Table 5.3). This is evidenced by the 102.2±18.3%, 134.5±24.1% and 47.2±3.9% activity remaining in each DTT-treated fraction, respectively. Since these fractions are enriched but not purified ones, and since PLA2 either contain disulfide bridges and are DTT-sensitive (like sPLA2) or do not contain disulfide bridges and are DTT-resistant (like cPLA2 and iPLA2) [10-13], the partial sensitivity of P200-1-PLA2 activity to DTT is likely to be due to the concomitant presence of DTT-sensitive and DTT-resistant enzymes in this fraction. The latter enzyme would then probably be the same as the Ca²⁺-dependent one found in P200-3 (see Table 5.3). Once again, the fully DTT-resistant nature of P200-cytosol could be explained by the selective inhibition (see text above) of Ca²⁺-dependent PLA2 activities, including the DTT-sensitive one in P200-1.

The heat-treatment also argues for the presence of more than one type of P200-PLA2 activities (see Table 5.3). Indeed, P200-1- and P200-3-PLA2 were both strongly inactivated (94.8±1.8% and 78.0±4.9% inhibition, respectively) by heating whereas P200-36-PLA2 was not (23.5±17.0% inhibition). Taken together, results in Table 5.3 thus strengthen our conclusion from Figure 5.2 and Table 5.2 that P200 may contain more than one type of PLA2, suggesting that it probably contains four.

5.6 DISCUSSION

This work was initially undertaken to characterize PLA2 activity from P200-36 which was found to contain the lowest level of proteins and the highest level of activity³⁶ (see Figure 5.2 and Table 5.2). However, as PLA2 activity in P200-36 was revealed to be undoubtedly Ca²⁺-dependent whereas that in the whole cytosol was clearly Ca²⁺-independent, we started to look for the presence of Ca²⁺-independent PLA2 activity in chromatographically eluted fractions other than P200-36. Then, we identified two fractions, P200-1 and P200-3, which contain significant levels of PLA2 activity with rather low protein levels. We thus selected P200-1, P200-3 and P200-36 for further characterization.

Table 5.4 summarizes the results from Table 5.3 and Figure 5.2 and depicts that: 1) P200-1 is likely to contain PLA2 activity which is Ca²⁺-dependent, DTT-, pBPB- and heat-sensitive, as well as PLA2 activity which is also Ca²⁺-dependent, pBPB- and heat-sensitive, but DTT-resistant, 2) P200-3 probably contains Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent PLA2 activities that are both pBPB-sensitive, DTT-resistant and heat-inactivated, 3) the Ca²⁺-dependent and DTT-resistant component of PLA2 activity in P200-1 and P200-3 would likely be due to the same enzyme which is present in both fractions, and 4) P200-36-PLA2 is Ca²⁺-dependent, pBPB-sensitive, DTT- and heat-resistant. This strongly argues for the presence of four different types of PLA2 in P200.

At first sight, it may seem surprising that P200 contains as many as four

³⁶ This justifies our choice for Fractogel EMD SO₃⁻-650S chromatography and explains why the volume collected in P200-36 is so large as compared to that in other fractions, including P200-1 and P200-3.

different types of PLA2 enzymes. However, one has to remember that P200 is a very heterogeneous fraction containing four types of neuronal cells (bipolar, ganglion, horizontal and amacrine), as well as Müller cells and rod inner segments, all of which have a specific role in the retina. Moreover, it has been demonstrated very clearly that one cell type may possess more than type of PLA2 [reviewed in 11, 13].

Tables 5.3 and 5.4 not only suggest that P200 contains four types of PLA2, but also that these PLA2 could be different from well-known PLA2. Indeed, there are actually three groups of PLA2 that may be distinguished according to their sensitivity to Ca^{2+} , EGTA, DTT, pBPB, heat, H_2SO_4 and nucleotides, as well as their preference for different substrates and their primary structure [9-13, 19]. These are sPLA2 (subgroups I, II and III), cPLA2 and iPLA2 (subgroups I, II and III). In the future, this operational classification will certainly be refined as more PLA2 are cloned and characterized [14-17], and other groups (or subgroups) delineated.

When we compare the characteristics of P200-PLA2 with those of sPLA2, cPLA2 and iPLA2 (see Table 5.4), we conclude that they are different. In fact, they seem to share some of the characteristics of sPLA2 and cPLA2 (or iPLA2) at the same time. The most prominent point is that they all appeared pBPB-sensitive, like sPLA2, whereas they were all inactivated by H_2SO_4 -extraction, like cPLA2 (see text, as well as Tables 5.3 and 5.4). This suggests that P200-PLA2 might have to be included in either a new group or subgroup of PLA2. Further experiments are certainly needed to confirm our results, and it will be of prime importance to purify and sequence these P200-PLA2 in order to classify them,

but one should keep in mind that, due to the blood-ocular barrier, the eye is a closed organ and retinal cells may have evolved expressing their own specific type of PLA2. According to this, three interesting papers from two different laboratories were recently published [41-43] which support this idea. Two of them demonstrated that transducin, a heterotrimeric G-protein present in retinal rod cells, also shares some characteristics with the small monomeric "ras-like" G-proteins [41, 42]. The other one reported the presence in lens fiber cells of G-proteins which are different from the well-known monomeric and heterotrimeric ones [43]. Moreover, we recently reported data on the presence of two novel types of PLA2 in bovine retinal pigment epithelial cells (RPE) [17].

In summary, P200 (which is constituted by four types of neuronal cells, as well as Müller cells and rod inner segments) may contain four types of PLA2 enzymes, some of which (the Ca^{2+} -dependent ones) are likely to be regulated by a soluble (or peripheral) endogenous inhibitor which was chromatographically separated from P200-PLA2 (see text, as well as Figure 5.2 and Table 5.2). None of these appear to be identical to well-known sPLA2, cPLA2, and iPLA2, as indicated by their different sensitivity to H_2SO_4 , ATP, $\text{GTP}\gamma\text{S}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$, pBPP, DTT and heat (see text, as well as Tables 5.3 and 5.4). This means that P200-PLA2 could represent novel types of PLA2 which could be part of either a new group or subgroup of PLA2. Moreover, none of the P200-PLA2 was found to be identical to RPE-PLA2 [17], supporting our hypothesis that retinal cells may have evolved expressing their own specific type of PLA2. Considering that this is the first report on the characterization of P200-PLA2 activity, we expect the purification of one or another of these PLA2 will now be possible. In that sense, one should note that PLA2 activity of P200 homogenate is not affected by 5 freeze-

thaw cycles, exhibiting $115\pm 27\%$ of untreated controls. Moreover, amongst the different protease inhibitors tested (E64, pepstatin, aprotinin, PMSF, Pefabloc, EDTA, leupeptin and α -macroglobulin), only Pefabloc was found to strongly inhibit PLA2 activity of P200 homogenate, leaving only $39\pm 3\%$ of control activity.

5.7 REFERENCES

- [1] Sehran, C. N. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 1-25
- [2] Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131
- [3] Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R. and Lefkovith, J. B. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* 55, 69-102
- [4] Irvine, R. F. (1982) *Biochem. J.* 204, 3-16
- [5] Exton, J. H. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 26-42
- [6] Wang, X. B., Osugi, T. and Uchida, S. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 483-489
- [7] Wood, J. N. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* 18, 785-786
- [8] Wolf, M. J., Izumi, Y., Zorumski, C. F. and Gross, R. W. (1995) *FEBS Letters* 377, 358-362
- [9] Davidson, F. F. and Dennis, E. A. (1990) *J. Mol. Evol.* 32, 228-238
- [10] Ackermann, E. J. and Dennis, E. A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1259, 125-136

- [11] Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13057-13060.
- [12] Glaser, K. B., Mobilio, D., Chang, J. Y. and Senko, N. (1993) *Trends Pharm. Sci.* 14, 92-98
- [13] Mayer, R. J. and Marshall, L. A. (1993) *The FASEB J.* 7, 339-348
- [14] Thomson, F. J. and Clark, M. A. (1995) *Biochem. J.* 306, 305-309
- [15] Soubeyrand, S., Khadir, A., Brindle, Y. and Manjunah, P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 222-227
- [16] Buhl, W.J., Eisenlohr, L.M., Preuss, I. and Gehring, U. (1995) *Biochem. J.* 311, 147-153
- [17] Jacob, M., Weech, P. K. and Salesse, C. (1997) *Biochem. J.* 327, 455-460
- [18] Jacob, M., Weech, P.K. and Salesse, C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19209-19218
- [19] Apitz-Castro, R. J., Mas, M. A., Cruz, M. R. and Jain, M. K. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 63-71
- [20] Hara, S., Kudo, I., Chang, H. W., Matsuta, K., Miyamoto, T. and Inoue, K. (1989) *J. Biochem.* 105, 395-399

- [21] Horigome, K., Hayakawa, M., Inoue, K. and Nojima, S. (1987) *J. Biochem.* 101, 53-61
- [22] Spanner, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 3, 43-65
- [23] Kates, M. *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids.* vol. 3. Elsevier Science Publishers. New York. 1986. pp. 326-328
- [24] Kim, D., Lewis, D. L., Graziadei, L., Neer, E. J., Bar-Sagi, D. and Clapham, D. E. (1989) *Nature* 337, 557-562
- [25] Silk, S. T., Clejan, S. and Witkom, K (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 21466-21469
- [26] Cockcroft, S., Nielson, C. P. and Stutchfield, J. (1991) *Biochem. Soc. Trans.* 19, 333-336
- [27] Rubin, R. P. 919, 40-41 Withiam-Leitch, M. and Laychock, S. G. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 22-26
- [28] Ando, M., Furui, H., Suzuki, K. Taki, F. and Takagi, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 708-713
- [29] Ponzoni, M. and Cornaglia-Ferraris, P. (1993) *Biochem. J.* 294, 893-898
- [30] Margalit, A., Livne, A. A., Funder, J. and Granot, Y. (1993) *J. Membrane Biol.* 136, 303-311

- [31] Ramanadham, S., Wolf, M. J., Jett, P. A., Gross, R. W. and Turk, J. (1994) *Biochemistry* 33, 7442-7452
- [32] Ackermann, E. J., Kempner, E. S. and Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9227-9233
- [33] Hazen, S. L., Stuppy, R. J. and Gross, R. W. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10622-10630
- [34] Tremblay, N. M., Kennedy, B. P., Street, I. P., Kaupp, W. J., Laliberté, F. and Weech, P. K. (1993) *Prot. Express. Purificat.* 4, 490-498
- [35] Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A. and Lin, L. L. (1995) *J. Lipid Mediators Cell Signalling* 12, 83-117
- [36] Van Den Bosch, H., Aarsman, A. J., Van Schaik, R. N. H., Schalkwijk, C. G., Neijs, F. W. and Sturk, A. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* 18, 781-784
- [37] Dekker, C. J., Geurts Van Kessel, W. S. M., Klomp, J. P. G., Pieters, J. and De Kruijff, B. (1983) *Chem. Phys. Lipids* 33, 93-106
- [38] Marsh, D. (1990) *in CRC Handbook of Lipid Bilayers*, pp. 265-273, CRC Press, Boston
- [39] Cockcroft, S. and Thomas, G. M. H. (1992) *Biochem. J.* 288, 1-14

- [40] Rhee, S. G., Suh, P.-H., Ryu, S.-H. and Lee, S. Y. (1989) *Science* 244, 546-550
- [41] Malinski, J. A., Zera, E. M., Angleson, J. K. and Wensel, T. G. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19919-19924
- [42] Zera, E. M., Molloy, D. P., Angleson, J. K., Lamture, J. B., Wensel, T. G. and Malinski, J. A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19925-19931
- [43] Rao, P. V., Zigler, J. S. Jr and Garland, D. *Exp. Eye Res.* (1997) 64, 219-227

5.8 LEGENDS TO FIGURES

Figure 5.1 Discrimination between PLA2 and PLC activity.

Aliquots of P200-PBS6x extract were incubated for different periods of time with [^{14}C]DOPC+DMPPM as the substrate. Hydrolysis products were extracted, separated by bf-TLC, identified, scraped and quantitated. Parallel formation of [^{14}C]oleic acid and [^{14}C]lysoPC reflected PLA2 activity; formation of [^{14}C]DAG only reflected PLC activity; formation of [^{14}C]oleic acid without [^{14}C]lysoPC indicated PLA2 having a lysophospholipase activity; formation of [^{14}C]DAG followed by its disappearance and the concomitant appearance of [^{14}C]oleic acid indicated PLC coupled to DAG lipase activity. These results are mean \pm S.D. of duplicate determinations from 2 separate experiments.

Figure 5.2 Cation-exchange chromatography of P200-cytosol.

P200-PBS6x extract was applied onto a Fractogel EMD SO_3^- -650S column. After elution of unbound proteins with PBS1x pH 6.0, bound proteins were eluted with 2 M NaCl, as indicated by the arrow. Flow rate was 1 ml/min. Aliquots of eluted fractions were assayed for PLA2 activity using 10PyPM. Incubation time was 30 min. PLA2 activity was expressed as pmol of 10Py-decanoic acid hydrolyzed/20 μl of sample. Figure 2A. Protein elution profile. Figure 2B. PLA2 activity elution profile. The width of each bar in Figure 2B corresponds to the total volume (ml) collected in that fraction. This result is typical of 4 separate injections.

Table 5.1 Subcellular distribution of PLA2 activity in P200

The different supernatant and wash fractions were sequentially extracted from P200 homogenate with 1) PBS1x (isotonic buffer), 2) PBS6x (hypertonic buffer), and 3) PBS1xOG (detergent-containing buffer). Aliquots of each fraction were then incubated for 30 min with [¹⁴C]PAPC+DMPM as the substrate. The results are mean±S.D. of triplicate determinations from two experiments. The sum of PLA2 activity from supernatant and wash fractions is given for each extraction buffer used. The % of PLA2 activity extracted was calculated on the basis that the homogenate contained 100% of PLA2 activity. The relative % of PLA2 activity extracted was obtained by considering the sum of all cytosol- and wash-fractions equal to 100%.

Fractions	% of PLA2 activity extracted	relative % of PLA2 activity extracted
homogenate-PBS1x	100.0 ± 12.8	
PBS1x extract	18.9 ± 0.2	41.3 ± 0.4
PBS6x extract	16.0 ± 0.2	34.9 ± 0.3
PBS1xOG extract	10.9 ± 0.1	23.8 ± 0.3
total	45.8 ± 0.5	100.0 ± 1.0

Table 5.2 Characteristics of P200-PLA2 active fractions eluted from cation-exchange chromatography

P200-1, P200-3 and P200-36 were collected from cation-exchange chromatography and tested for PLA2 activity using 10PyPM, in comparison to P200-cytosol. Incubation time was 60 min. Protein and PLA2 activity content of each fraction were calculated on the basis that the cytosol contained 100% of proteins and PLA2 activity, respectively. The results are mean±S.D. of triplicate determinations from 4 separate experiments.

Fractions	Protein concentration (mg/ml)	Specific activity (pmol/h per mg)	Purification factor	% of total proteins	% of total PLA2 activity
P200-cytosol	8.17	727 ± 112		(100)	(100)
P200-1	1.24	12 250 ± 2 094		3	51
P200-3	4.66	1825 ± 207		23	57
P200-36	0.0033	2 947 461 ± 229 426	4054	0.06	262

Table 5.3 Effects of EGTA, DTT, pBPB and heat on P200-PLA2 activity

Aliquots of P200-cytosol, P200-1, P200-3 and P200-36 were either heated or pretreated with EGTA, DTT or pBPB, prior to PLA2 assay with 10PyPM as the substrate. PLA2 activity is expressed as a % of control (presence of 2 mM Ca²⁺) PLA2 activity. The results are mean±S.D. of triplicate determinations from 3 separate experiments.

Fractions	% of control PLA2 activity			
	EGTA	DTT	pBPB	heat
P200-cytosol	113.5 ± 9.3	117.0 ± 0.7	9.7 ± 13.8	18.5 ± 0.7
P200-1	12.5 ± 3.6	47.2 ± 3.9	0.0 ± 0.0	5.2 ± 1.8
P200-3	53.1 ± 9.1	102.2 ± 18.3	0.3 ± 0.6	22.0 ± 4.9
P200-36	0.0 ± 0.0	134.5 ± 24.1	1.5 ± 2.1	76.5 ± 17.0

Table 5.4 Effects of various reagents on the activity of sPLA2, cPLA2, iPLA2 and P200-PLA2

	H ₂ SO ₄	Ca ²⁺	DTT	pBPB	heat
sPLA2 ^a	-	+ (mM)	+	+	-
cPLA2 ^a	+	+ (μM)	-	-	+
iPLA2 ^{a, b}	n.a. ^c	-	-	-	+
P200-1	+	+	± ^d	+	+
P200-3	+	± ^d	-	+	+
P200-36	+	+	-	+	-

^a See references [10-13] for reviews on the characteristics of sPLA2, cPLA2 and iPLA2

^b See references [29-36] for additional information on the characteristics of iPLA2

^c n.a. = not available

^d ± contains both sensitive and insensitive PLA2 activities

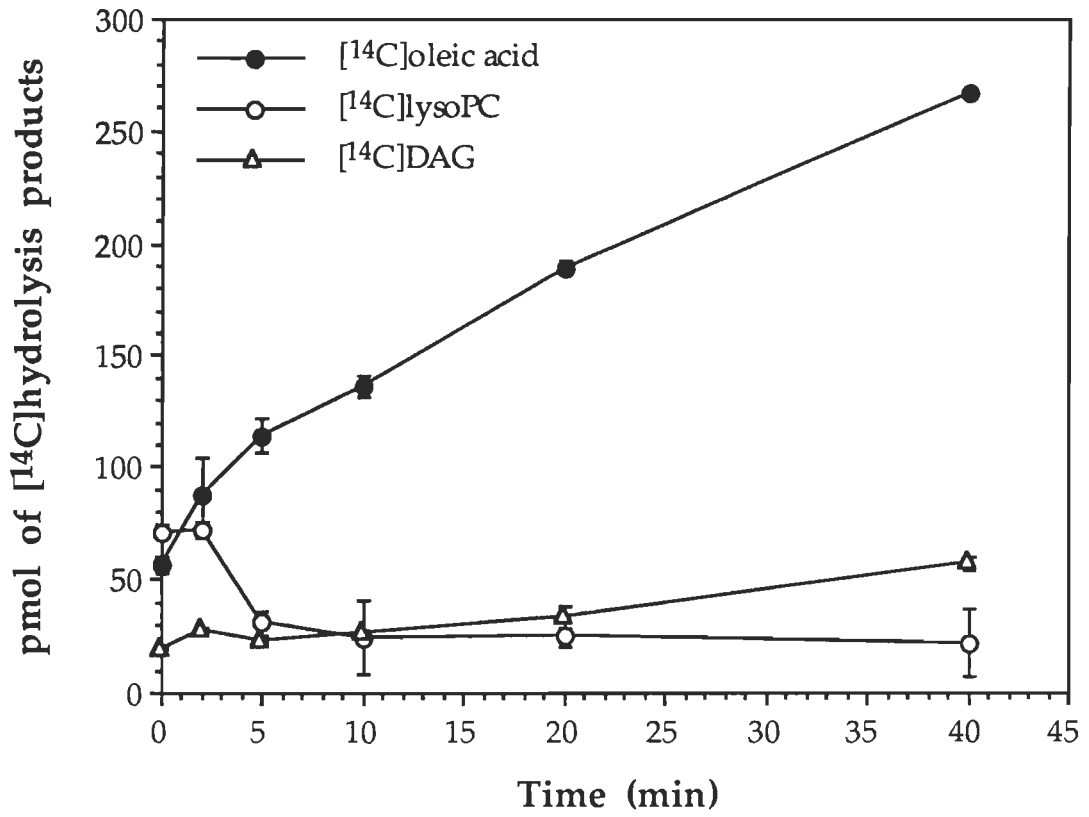


Figure 5.1: Discrimination between PLA2 and PLC activity

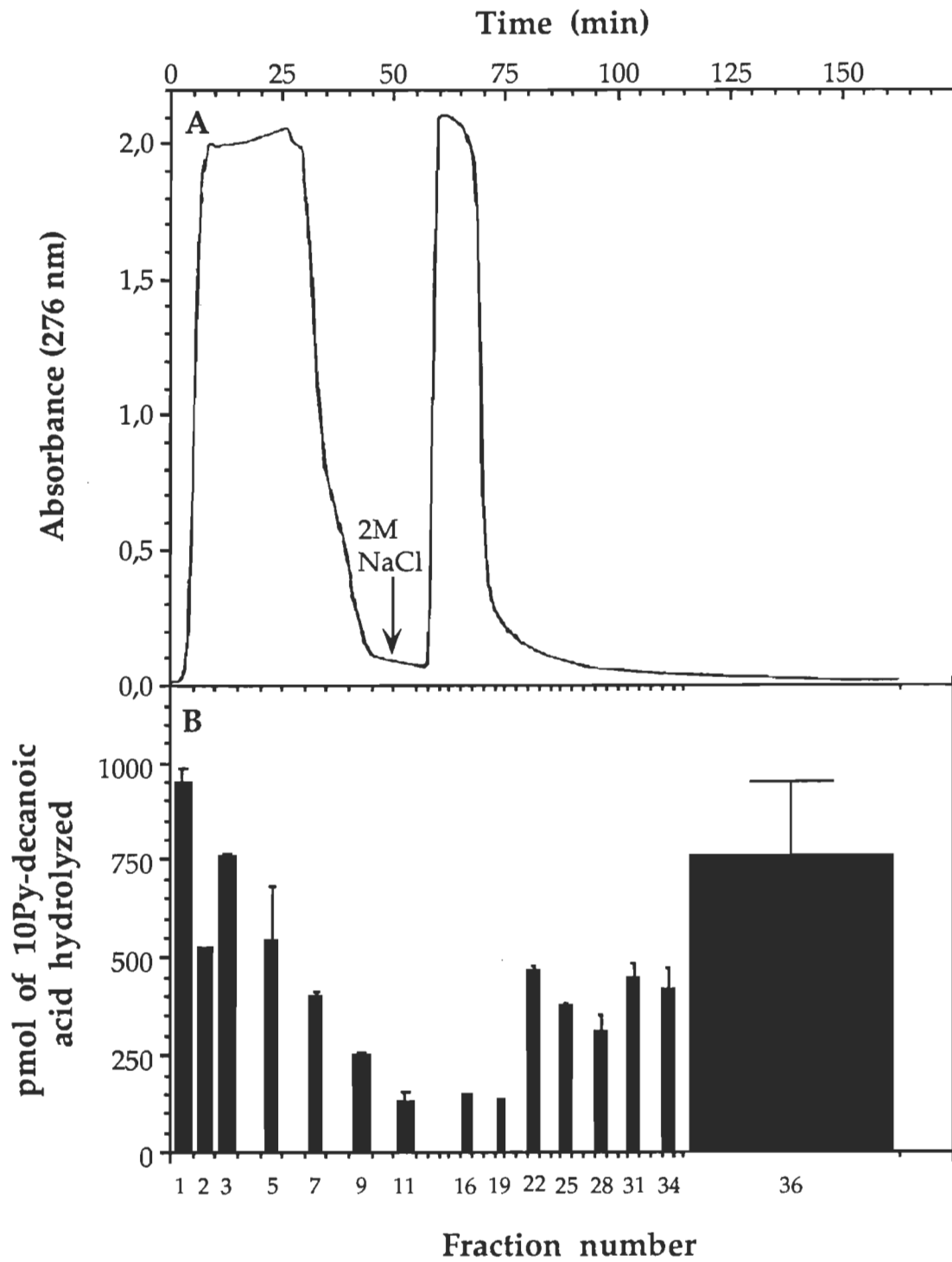


Figure 5.2: Cation-exchange chromatography of P200-cytosol

CHAPITRE 6

PURIFICATION PARTIELLE DE LA PLA2 DU P200-36

6.1 Introduction

L'ensemble des résultats des chapitres 2 et 3 contribue de façon importante à l'avancement des connaissances dans le domaine de la vision car, tel que déjà mentionné, ces résultats ont permis de: 1) faire le point sur la controverse entourant la présence d'activité PLA2 dans les ROS et 2) fournir une explication simple, plausible et plus que probable à l'origine de cette controverse. Parce qu'ils représentent les premières mesures directes d'activité PLA2 (optimale à pH alcalin) dans le RPE et le P200, qu'ils constituent les premiers travaux de caractérisation de ces PLA2 et qu'ils suggèrent la présence de nouveaux types de PLA2 dans les deux fractions en question, les résultats des chapitres 4 et 5 apportent également une contribution importante au domaine de la vision. Par ailleurs, ces résultats sont tout aussi intéressants et prometteurs dans le domaine des PLA2. En effet, la présence de nouveaux types de PLA2 dans la rétine pourrait soulever de nouvelles possibilités relativement au rôle pathophysiologique des PLA2, en plus de mener au raffinement du schéma de classification actuel, i.e. à la classification des PLA2 rétiniennes dans de nouveaux groupe(s) et/ou sous-groupe(s).

Le travail de caractérisation opérationnelle des PLA2 rétiniennes, tel que présenté dans les chapitres 4 et 5, ne permet toutefois pas de d'affirmer hors de tout doute que le RPE et le P200 expriment de nouveaux types de PLA2. Il faut, pour ce, étendre notre connaissance des PLA2 rétiniennes et en déterminer les caractéristiques structurelles aussi fondamentales que le poids moléculaire, le point isoélectrique et la séquence d'acides aminés (structure primaire). Le patron de migration électrophorétique est tout aussi important parce qu'advenant une réelle hétérogénéité des PLA2 présentes dans le RPE et le P200, il peut faire

ressortir des modifications post-traductionnelles pouvant éventuellement s'avérer cruciales pour la régulation adéquate de chaque type d'enzyme. Or puisque ces expériences requièrent l'utilisation d'une quantité minimale de la protéine purifiée, l'isolement des PLA2 rétiniennes devient alors essentiel. La purification de chacune des PLA2 rétiniennes constitue effectivement la voie logique à suivre car le séquençage des protéines n'est possible qu'après les avoir obtenues sous une forme purifiée. Et une fois cette étape franchie, on peut envisager l'étude de chacune des enzymes dans leur contexte cellulaire. Ainsi, on peut préparer des sondes d'ADN et ARN; les sondes d'ADN vont notamment permettre de cloner le gène codant pour l'enzyme et, de concert avec les sondes d'ARN, vont permettre d'en étudier le mode de régulation de l'expression. Du coup, on peut envisager d'étudier l'effet de la surexpression de l'enzyme ou de sa répression complète ("gene knockout") sur la physiologie cellulaire. On peut également générer des anticorps hautement spécifiques pour ensuite étudier la distribution cellulaire de l'enzyme, de même que la variation du taux d'enzyme, de son activité ou de sa distribution dans différentes pathologies.

Au moment d'entreprendre l'isolement des PLA2 rétiniennes, il fallait choisir une PLA2 d'intérêt et donc, une fraction cellulaire, ainsi qu'une fraction chromatographique d'intérêt. En considérant que: 1) les propriétés de toutes les fractions PLA2-actives dérivées du RPE et du P200 et étudiées étaient différentes de celles des PLA2 connues jusqu'à maintenant (voir les tableaux 4.4 et 5.4), 2) il n'y avait aucune évidence flagrante de l'importance pathologique ou physiologique de l'une ou l'autre de ces fractions PLA2-actives et 3) il est plus que probable qu'une large proportion de l'enzyme soit perdue au cours des essais de purification (jusqu'à ce qu'une procédure optimisée soit disponible), il est alors lo-

gique et indispensable d'utiliser la source d'enzyme la plus abondante (voir les figures 4.2 et 5.2, ainsi que les tableaux 4.2 et 5.2). Ceci est d'autant plus logique que la présence accrue d'un type de PLA2 par rapport à d'autres suggère inévitablement la possibilité d'un rôle pathophysiologique plus important.

Le chapitre 6 résume donc les premières expériences réalisées afin de mettre en évidence les propriétés chromatographiques de la PLA2 présente dans la fraction subrétinienne P200-36 (voir Figure 5.2 et Tableau 5.2), propriétés devant faciliter l'isolement de cette PLA2 des autres protéines rétiniennes.

6.2 Matériel et Méthodes

6.2.1 Matériel

Les Fractogel EMD SO₃⁻-650S et Fractogel EMD DEAE-650 proviennent de la compagnie E. Merck Darmstadt. Les Phényl Sépharose (HiLoad 26/10), Séphadex G75 SF, HiTrap SP, HiTrap Q et HiTrap HIC proviennent de Pharmacia Biotech. L'Aquapore butyl provient de Applied Biosystems. L'acétonitrile (grade HPLC) et l'acide trifluoroacétique (TFA) ont pour leur part été achetés chez Sigma. Tous les tampons utilisés pour les chromatographies (sauf celui utilisé pour la chromatographie en phase inverse) ont été filtrés (Nalgene Disposable Filter Unit CA/CN, 0,2 µm). Le P200-cytosol a également été filtré (Whatman Polydisc AS, 1 µm).

6.2.2 Essais chromatographiques préliminaires sur colonnes Hi-Trap SP, Hi-Trap Q et Hi-Trap HIC

Pour identifier le type de chromatographie à utiliser afin de purifier la PLA2 du P200-36, des essais préliminaires ont d'abord été faits sur des colonnes

Hi-Trap SP, Hi-Trap Q et Hi-Trap HIC contenant chacune 1 ml des matrices Sépharose-SO₃⁻, Sépharose-DEAE et Phényl Sépharose, respectivement.

Pour étudier le profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur une colonne de chromatographie échangeuse de cations (CEC), la colonne Hi-Trap SP a été utilisée. Elle était équilibrée avec 5 ml de tampon Pipes/0 M NaCl³⁷ (20 mM Pipes; 1 mM EDTA; 0,02% NaN₃; pH 6,0), à la suite de quoi 1,5 ml de P200-cytosol dialysé³⁸ (8,17 mg/ml) était injecté. Après avoir élué les protéines non-liées à la colonne avec 3 ml de tampon Pipes/0 M NaCl, les protéines liées étaient séquentiellement éluées avec 2 ml des tampons Pipes/0,1 M NaCl, Pipes/0,2 M NaCl, ..., et Pipes/1 M NaCl, de façon à établir un gradient de sel. Pour s'assurer de l'élution totale des protéines, la colonne était ensuite lavée avec 2 ml de Pipes/2 M NaCl. Le débit était de 1 ml/min et le volume des fractions recueillies de 1 ml. Le dosage ISS-Protein Gold permettait de déterminer la concentration de protéines des diverses fractions alors que le dosage fluorimétrique décrit à la section 5.4.5 permettait d'en mesurer l'activité PLA2. Ces deux techniques ont par ailleurs été utilisées pour mesurer, respectivement, la concentration de protéines et l'activité PLA2 des différentes fractions éluées de tous les types de chromatographies décrits dans ce chapitre. Notez également que, hormis les dosages (protéines et activité PLA2) et la chromatographie en phase inverse (RPC) (voir la section 6.2.7), toutes les manipulations ont été effectuées à 4°C³⁹.

³⁷ Voir la discussion (section 6.4) pour la justification de l'utilisation du Pipes.

³⁸ Les aliquots de P200-cytosol utilisés pour les tests d'élution sur les colonnes Hi-Trap SP et Hi-Trap Q ont été préalablement dialysés contre le tampon Pipes 0 M NaCl ou Tris 0 M NaCl (voir le texte), respectivement, pour éviter que la forte concentration de NaCl initialement présente dans l'échantillon (600 mM) interfère dans le processus d'élution.

³⁹ Considérant la très faible concentration de protéines (incluant de possibles protéases) de l'échantillon injecté sur la colonne de RPC, la rapidité d'élution de la PLA2 et sa stabilité thermique (voir Tableau 5.3 et Figure 6.13), il n'était pas indispensable de travailler à 4°C.

Le profil d'élution de l'activité PLA2 du P200-36 sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions (AEC) a pour sa part été déterminé à l'aide d'une colonne Hi-Trap Q. La procédure suivie était telle que décrite pour la colonne Hi-Trap SP, bien que les tampons utilisés aient été différents. Ainsi, la colonne était équilibrée avec 5 ml de tampon Tris/0 M NaCl (20 mM Tris base; 1 mM EDTA; 0,02% NaN₃; pH 7,5), après quoi 1,5 ml de P200-cytosol dialysé (8,17 mg/ml) était injecté. Les protéines non-retenues étaient éluées avec 3 ml de tampon Tris/0 M NaCl, alors que les protéines retenues, i.e. liées à la colonne, étaient éluées avec 2 ml de chacun des tampons Tris/0,1 M NaCl, Tris/0,2 M NaCl, ..., et Tris/1 M NaCl. La colonne était finalement lavée avec 2 ml de Tris/2 M NaCl pour s'assurer de l'élution complète des protéines. Un essai similaire, pour lequel l'échantillon de départ consistait en l'éluat PLA2-actif de la CEC décrite à la section 6.2.3 (12 ml; 280 µg/ml), a également été effectué dans les mêmes conditions. L'activité PLA2 et la concentration de protéines des différentes fractions générées ont été mesurées tel que sus-mentionné.

Enfin, les essais permettant de vérifier le profil d'élution de l'activité PLA2 du P200-36 sur une colonne de chromatographie à interactions hydrophobes (HIC) ont été réalisés sur des colonnes HiTrap HIC. Deux de ces colonnes ont en fait été placées et utilisées en tandem pour en augmenter le pouvoir de résolution. Les colonnes étaient équilibrées avec 5 ml d'eau contenant 1 M NaCl et 20% (NH₄)₂SO₄ (niveau de saturation). L'échantillon de départ consistait en un aliquot de l'éluat PLA2-actif recueilli de la CEC (12 ml; 280 µg/ml; voir la section 6.2.3). Après y avoir ajouté 3 ml de (NH₄)₂SO₄ 100% (niveau de saturation) pour obtenir une concentration finale de 20% (NH₄)₂SO₄, 14 des 15 ml d'échantillon résultants ont été injectés sur le tandem de colonnes, soit 3,1

mg de protéines. Le 1 ml restant devait servir dans les différents tests (dosages de protéines et d'activité PLA2, électrophorèse). Les protéines non-liées ont été éluées avec 6 ml de 1 M NaCl contenant 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tandis que les protéines liées ont été séquentiellement éluées avec 6 ml d'eau et 6 ml d'éthylène glycol 30% (v/v). Le débit était de 1 ml/min et le volume des fractions récoltées de 2 ml. Un essai similaire a été fait avec 1,5 ml de P200-cytosol non-dialysé (8,17 mg/ml) comme échantillon de départ. Dans ce cas, 380 μl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100% (niveau de saturation) ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. L'activité PLA2 et la concentration de protéines ont été mesurées tel que décrit ci-haut et ce, dans chacune des fractions recueillies.

6.2.3 Chromatographie échangeuse de cations éluee avec un gradient discontinu de NaCl à deux plateaux (CEC)

En ce qui concerne la procédure de purification de la PLA2 du P200-36 sur des colonnes préparatives (voir le résumé de la procédure à la Figure 6.1), la première étape consistait en une chromatographie échangeuse de cations (CEC). Pour ce faire, le P200 a tout d'abord été homogénéisé dans 350 ml de PBS 3x pH 7,5, à la suite de quoi le P200-cytosol pH 6,0 a été préparé tel que décrit plus tôt (voir la section 5.4.3). L'élution du P200-cytosol non-dialysé⁴⁰ sur la colonne de Fractogel EMD SO_3^- -650S (CEC) a ensuite été effectuée tel que décrit à la section 5.4.7, à 20 ml/min. La colonne était couplée à un appareil à HPLC permettant la purification de protéines à grande échelle (Jones Chromatography Ltd, Pays de Galle). Un aliquot de 1 ml a été gardé pour servir de référence dans les différents tests (dosages de protéines, activité PLA2 et électrophorèse) et les 349 ml

⁴⁰ Les essais préliminaires ont démontré que la PLA2 du P200-36 n'est pas éluee de la CEC par 600 mM NaCl (voir Figure 6.2).

restants (4 266 µg/ml) ont été injectés sur la colonne contenant 150 ml de la matrice sus-indiquée. Les protéines non-retenues sur la colonne ont d'abord été éluées avec le tampon d'équilibration de la colonne (50 mM Na₂HPO₄/100 mM NaCl/pH 6,0) et recueillies dans deux fractions de 250 ml. Les protéines retenues ont ensuite été éluées avec un tampon 50 mM Na₂HPO₄/2 M NaCl/pH 6,0, tel que décrit à la section 5.4.7, et récupérées dans sept fractions de 50 ml, plus une de 125 ml. L'absorbance à 276 nm permettait de suivre l'élu-tion des protéines. Après que l'activité PLA2 des fractions résultantes ait été dosée (voir la section 6.2.2), les fractions PLA2-actives sélectionnées ont été combinées en une seule fraction, soit le CEC-actif (430 ml; 280 µg/ml). La concentration de protéines du CEC-actif a été déterminée tel que décrit à la section 6.2.2. En comparant le profil d'élu-tion du CEC-actif (voir Figure 6.5) et du P200-36 (voir Figure 5.2), on constate qu'il s'agit en fait d'une seule et même fraction.

6.2.4 Chromatographie à interactions hydrophobes (HIC)

L'étape subséquente de purification de la PLA2 du P200-36 sur colonne de chromatographie préparative a été effectuée sur une colonne de Phényl Sépharose Haute Performance contenant 53 ml de matrice (voir Figure 6.1). Cette colonne était aussi couplée à l'appareil à HPLC provenant de Jones Chromatography Ltd (voir la section 6.2.3). Un aliquot de CEC-actif de 2 ml (280 µg/ml; voir la section 6.2.3) a été conservé pour les différents tests (voir ci-dessus). Les 416 ml restants⁴¹ ont d'abord été traités tel que décrit à la section 6.2.2 pour ce type d'échantillon, de façon à en ajuster la concentration de (NH₄)₂SO₄ à 20%, puis

⁴¹ 12 ml de CEC-actif avaient en effet été utilisés pour les tests préliminaires d'élu-tion sur colonne de HIC (voir la section 6.2.2). Ainsi, 2 ml (utilisés pour les tests de protéines et d'activité) + 416 ml (injectés sur colonne préparative de HIC) + 12 ml (utilisés pour les tests préliminaires d'élu-tion) = 430 ml de CEC-actif au départ (voir la section 6.2.3).

injectés. Les protéines non-liées à la colonne ont été éluées avec 1 M NaCl contenant 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et récupérées dans trois fractions de 250 ml. Les protéines liées ont quant à elles été éluées avec de l'eau⁴² et séquentiellement récupérées dans six fractions de 35 ml, plus une de 30 ml et une autre de 170 ml. Le débit était de 10 ml/min et l'absorbance à 276 nm permettait de suivre l'éluion des protéines. Après que l'activité PLA2 des diverses fractions éluées ait été mesurée (voir la section 6.2.2), les fractions PLA2-actives ont été combinées pour donner le HIC-actif (65 ml; 73,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

6.2.5 Chromatographie échangeuse de cations éluee avec un gradient continu de NaCl (CECg)

Dans le cas où un gradient de NaCl continu a été appliqué pour raffiner la procédure de purification de la PLA2 sur CEC (CECg), une colonne de type HiTrap SP (1 ml de matrice Sépharose- SO_3^-) a été utilisée (voir Figure 6.1). Cela devait également permettre de bénéficier de la capacité de concentration des échantillons inhérente à la CEC. La colonne était couplée à un appareil à HPLC Waters 650E provenant de la compagnie Waters. L'échantillon à injecter consistait en l'éluat PLA2-actif de la HIC, i.e. le HIC-actif (65 ml; 73,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$; voir la section 6.2.4) servait d'échantillon de départ. Des volumes de 64 et 1 ml ont respectivement été utilisés pour la CECg et les différents tests (dosage de protéines et d'activité PLA2, et électrophorèse). Puisque le HIC-actif était élué dans l'eau et donc non-tamponné (voir la section 6.2.4), une quantité suffisante de Na_2HPO_4 200 mM pH 6,0 lui a été ajoutée (avant injection), de façon à en ajuster la concentration à 20 mM Na_2HPO_4 et ainsi donner une charge positive aux

⁴² Les tests préliminaires ont démontré que l'eau suffisait à éluer l'activité PLA2 de la colonne de HIC (voir Figure 6.4).

protéines⁴³. Les protéines non-liées à la colonne étaient tout d'abord éluées avec du PBS6x (2-3 volumes de colonnes), à la suite de quoi la concentration de NaCl augmentait linéairement jusqu'à 1 M (en 60 min). La concentration de NaCl passait ensuite directement à 2 M pour être ainsi maintenue pendant 6 min. Le débit était de 0,5 ml/min et le volume des fractions éluées avec le gradient était de 0,5 ml. Les fractions éluées PLA2-actives, identifiées grâce au dosage d'activité fluorimétrique (voir la section 6.2.2), étaient combinées en une fraction appelée CECg-actif (5,5 ml; 61,1 µg/ml). La concentration de protéines du CECg-actif était déterminée tel que décrit à la section 6.2.2.

6.2.6 Chromatographie par filtration moléculaire sur gel de Séphadex G75 SF (GFC)

À cette étape, 5,3 des 5,5 ml de CECg actif recueilli (61,1 µg/ml; voir la section 6.2.5) ont été élués sur une colonne de GFC contenant 39 ml de matrice et ce, en deux étapes: 1) 3 ml (GFC₁) et 2) 2,3 ml (GFC₂) (voir Figure 6.1). L'aliquot de 0,2 ml restant a été conservé pour les différents tests (dosage de protéines et d'activité PLA2 et électrophorèse). Le tampon d'équilibration de la colonne et d'éluion des protéines contenait 30 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0,02% NaN₃ (pH 7,5). Le débit était de 0,3 ml/min et des fractions de 0,6 ml ont été recueillies. L'activité PLA2 et la concentration de protéines des différentes fractions ont été déterminées selon les méthodes décrites à la section 6.2.2. Les fractions PLA2-actives ont été combinées en ce qui était ensuite appelé le GFC-actif: 1,8 ml de GFC₁-actif (0,31 µg/ml) et 1,8 ml de GFC₂-actif (0,25 µg/ml) qui ont toujours été conservés séparément.

⁴³ Les résultats préliminaires ont en effet démontré qu'à pH 6,0, l'activité PLA2 se lie à la colonne de CEC (dont le groupement est le SO₃⁻). Ceci signifie qu'à pH 6,0, l'enzyme responsable de l'activité PLA2 en question est chargée positivement.

6.2.7 Chromatographie en phase inverse (RPC)

En vue de cette cinquième étape de purification de la PLA2 que représente la chromatographie en phase inverse (RPC) (voir Figure 6.1), deux aliquots de 0,5 ml de GFC₁-actif ont été dialysés (4 h à 4°C; un changement de tampon) contre 1 l de tampon 10 mM NH₄HCO₃, lyophilisés, puis resuspendus dans 250 µl de TFA 0,1%. L'échantillon ainsi préparé a été injecté sur RPC (colonne contenant 1,6 ml de matrice Aquapore butyl). Les protéines non-retenues ont d'abord été éluées avec le solvant A (0,1% TFA dans l'eau), après quoi un gradient d'acétonitrile (CH₃CN) permettait d'éluer progressivement les protéines retenues. L'augmentation du pourcentage de solvant B (CH₃CN:H₂O, 70:30 v/v, contenant 0,1% TFA) se faisait comme suit, par étapes successives de gradients linéaires: 1) 0% B à 0 min, 2) de 0% B à 2 min jusqu'à 20% B à 7 min, 3) de 20% B à 7 min jusqu'à 60% B à 47 min, 4) de 60% B à 47 min jusqu'à 100% B à 57 min, puis 5) constant à 100% B jusqu'à 63 min (voir Figure 6.15 pour une représentation graphique du gradient). Le débit était de 0,2 ml/min et le volume des fractions récoltées variait entre 150 et 300 µl, selon l'importance des pics de protéines à être recueillis. L'absorbance à 276 nm permettait de suivre l'élution des protéines. L'activité PLA2 des différentes fractions générées a été mesurée tel que décrit à la section 6.2.2.

6.3 Résultats

Qu'il s'agisse de Tojo *et al.* (1984), Loeb et Gross (1986), Ulevitch *et al.* (1988), Gassama-Diagne *et al.* (1989), Clark *et al.* (1990), Diez et Mong (1990), Gronich *et al.* (1990), Hazen *et al.* (1990), Wright *et al.* (1990), Yoshihara et Watanabe (1990), Kramer *et al.* (1991), Hirashima *et al.* (1992), Jordan et Russo-Marie (1992), Rönkkö et Räsänen (1992), Spaargaren *et al.* (1993), Kim et Bonventre

(1993), Minami *et al.* (1993), Rehfeldt *et al.* (1993), Tojo *et al.* (1993), Tremblay *et al.* (1993), Buhl *et al.* (1995), Thompson et Clark (1995) ou Wolf et Gross (1996), tous ont utilisé une combinaison de diverses chromatographies pour purifier (partiellement ou à homogénéité) une PLA2. Tous ont utilisé au moins deux des types de chromatographies suivants: échangeur cationique, échangeur anionique, tamis moléculaire (pour filtration sur gel), chromatographie en phase inverse et chromatographie à interactions hydrophobes. Ces nombreux précédents justifiaient donc l'utilisation de ces différents types de chromatographies dans l'élaboration de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36.

6.3.1 Profil d'élution de l'activité PLA2 sur les colonnes de chromatographie échangeuse de cations (CEC), échangeuse d'anions (AEC) et à interactions hydrophobes (HIC)

Afin de bien juger de l'utilité des CEC et AEC dans une procédure de purification de la PLA2 du P200-36, des essais préliminaires ont été réalisés pour lesquels la concentration de NaCl était augmentée de façon graduelle mais discontinue, soit par plateaux de 100 mM NaCl. La Figure 6.2 montre qu'une concentration de 800 mM NaCl suffit à éluer la majeure partie de l'activité PLA2 du P200-36 ($69\pm 5\%$) de la CEC. Elle montre aussi qu'une concentration de 600 mM NaCl n'élue que très peu d'activité PLA2 ($21\pm 7\%$). Ceci suggère que le P200-cytosol, contenant 600 mM NaCl parce qu'extrait avec du PBS6x, peut être injecté directement sur CEC, sans besoin d'une dialyse pour éliminer le NaCl et sans risque de perte majeure d'activité PLA2. La CEC a donc subséquentement été mise à profit dans l'élaboration de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36. La Figure 6.3 montre quant à elle qu'il n'y a aucun avantage à employer l'AEC pour purifier la PLA2 du P200-36 puisqu'aucun pic d'activité rai-

sonnablement fin n'a été observé à l'une ou l'autre des concentrations de sel utilisées. Au contraire, l'activité PLA2 est éluée de l'AEC en un pic très large qui s'étend de 400 mM à 2 M NaCl. Ceci signifie qu'il faudrait récupérer, à la sortie de la colonne, la quasi totalité de ce qui a été initialement injecté. Compte tenu que des résultats similaires ont été obtenus en injectant sur l'AEC un échantillon semi-purifié, soit un aliquot de CEC-actif (voir Figure 6.3 pour un résultat représentatif), ce type d'échangeur n'a pas été utilisé pour la mise au point de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36.

D'autres tests préliminaires ont démontré que plus de 80% de l'activité PLA2 était perdue lorsque le pH était inférieur à 6,0. Des dosages effectués sur des échantillons préalablement dialysés (16 h à 4°C; un changement de tampon) contre des tampons acétate (pH 4,5), citrate (pH 5,0 et 5,5), Pipes (pH 6,0 et 6,5) et Tris base (pH 7,0 et 7,5)⁴⁴ -et ayant pour but de déterminer le pH minimum auquel le P200-cytosol pouvait être injecté sur CEC- ont en effet indiqué qu'il y avait 83±8% d'inhibition de l'activité PLA2 à pH 4,5, 90±1% à pH 5,0, et 83±6% à pH 5,5. Au contraire, il n'y avait pas d'inhibition significative à pH ≥ 6,0. Ces expériences suggéraient aussi que la diminution d'activité observée à pH ≤ 5,5 était due à la dénaturation de la PLA2, et non à une agrégation non-spécifique par d'autres protéines car tous les échantillons dialysés contenaient un précipité, mais seuls ceux dialysés à pH 4,5-5,5 subissaient une perte importante d'activité. Ces résultats indiquent qu'un pH inférieur à 6,0 ne permet pas de conférer à la PLA2 une charge positive (requisse pour la liaison aux ions SO₃⁻ de la CEC) tout en la maintenant native et active, d'où l'utilisation de la CEC à pH 6,0⁴⁵.

⁴⁴ Tous ces tampons avaient une concentration de 20 mM, en plus des 1 mM EDTA et 0,02% NaN₃.

⁴⁵ L'AEC a été utilisée à pH 7,5, comme pour la purification d'autres PLA2 (Diez et Mong. 1990; Gronich *et al.* 1990; Jordan et Russo-Marie. 1992; Spaargaren *et al.* 1992; Rehfeldt *et al.* 1993).

En ce qui concerne la HIC, la Figure 6.4 démontre que la PLA2 du P200-36 se lie, via des interactions de type hydrophobe à la matrice de phényl sépharose et que la grande majorité de l'activité PLA2 est éluée en présence de H₂O. Ainsi, l'activité PLA2 totale éluée en présence d'éthylène glycol 30% (fractions #15, 16 et 17 combinées) représente moins de 38% de celle éluée en présence de H₂O (fractions #12, 13 et 14 combinées) (voir Figure 6.4), ce qui suggère que les interactions hydrophobes qui interviennent dans la liaison de l'enzyme à la matrice sont plutôt faibles. La HIC offre donc un bon pouvoir de résolution de la PLA2 du P200-36; c'est pourquoi elle a été ultérieurement utilisée pour l'élaboration de la procédure de purification de cette PLA2.

6.3.2 Mise au point de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36

À cause de 1) leur grande capacité de liaison (en termes de mg de protéines/ml de gel), 2) leur pouvoir élevé de résolution des protéines et 3) leur pouvoir de concentration des échantillons dilués, la CEC et l'AEC sont de puissantes méthodes de séparation des biomolécules (Harris et Angal. 1995; Pharmacia Biotech. 1996a). Or compte tenu que les résultats préliminaires sur AEC se sont avérés non-concluants (voir Figure 6.3), la CEC a constitué la première étape de purification de la PLA2 du P200-36. La Figure 6.5 montre tout d'abord la présence de deux pics de protéines: les protéines non-retenues, éluées avec 100 mM NaCl (voir la section 5.4.7), et les protéines retenues, éluées avec 2 M NaCl. La Figure 6.6 confirme quant à elle les résultats de la Figure 6.2, à savoir que l'activité PLA2 du P200-36 est retenue sur la colonne jusqu'à élution par une forte concentration de sel. De plus, les résultats inhérents aux figures 6.5 et 6.6 permettent de déterminer que la simple application d'un gradient de NaCl à deux plateaux (600 mM et 2 M) sur la CEC entraîne l'élimination de plus de

90% (92%) des protéines non-voulues (voir Tableau 6.1). Les fractions PLA2-actives récupérées à la sortie de la CEC, soit les fractions #4-10 (voir Figure 6.6) ont donc été combinées en une seule fraction, le CEC-actif, dont les caractéristiques sont résumées au Tableau 6.1. Ainsi, on note un enrichissement de l'activité spécifique du CEC-actif de 45 fois, relativement à celle du P200-cytosol, ce qui correspond à un facteur de purification de 45. On remarque également une augmentation de près de 3,6 fois de l'activité totale du CEC-actif comparativement au P200-cytosol, ce qui se traduit par un rendement de 359%.

Le CEC-actif a ensuite été injecté sur HIC et élué tel que décrit à la section 6.2.4. Les figures 6.7 et 6.8 confirment d'une part les résultats de la Figure 6.4, i.e. l'éluion par le H₂O de la PLA2 avec les protéines liées à la colonne, et montrent d'autre part que la HIC permet elle aussi d'éliminer plus de 90% (96%) des protéines initialement injectées sur cette colonne (voir Tableau 6.1). Les fractions PLA2-actives #9-10 ont été combinées en ce qui s'appelait dès lors le HIC-actif. Le Tableau 6.1 résume les caractéristiques du HIC-actif; il rend compte d'un facteur de purification de 1949 et d'un rendement de 620%.

Ne pouvant tirer profit de l'AEC et n'ayant pas exploité au maximum le pouvoir de résolution de la CEC, une autre étape de purification a été effectuée sur ce dernier type de colonne, en y appliquant cette fois un gradient continu de NaCl (voir Figure 6.9, ainsi que la section 6.2.5). Tel qu'illustré sur les figures 6.9 et 6.10, cette CECg a permis de raffiner l'isolement de la PLA2 du P200-36. L'activité PLA2 se retrouvait principalement dans les fractions #34-44 (voir Figure 6.10) qui, une fois combinées pour former le CECg-actif, contenaient moins de 7% des protéines initialement injectées sur cette colonne (voir Ta-

bleau 6.1). La CECg a donc permis d'augmenter le facteur de purification de la PLA2 de 1949 à 13 500, indiquant que des protéines non-voulues ont effectivement été éliminées (voir Tableau 6.1). Le rendement calculé de la CECg était quant à lui de 303% (voir Tableau 6.1).

Compte tenu que, tout comme dans le cas des CEC et HIC, l'activité PLA2 n'est pas éluée de la CECg dans un pic fin et bien isolé mais plutôt dans l'épaule du pic principal (voir Figure 6.9), cela indique que la PLA2 du P200-36 n'est pas, à cette étape, isolée de toutes les autres protéines. Le CECg-actif a donc été subséquentement injecté sur GFC. Or c'est à ce moment que l'intérêt d'utiliser la CECg comme étape préparatoire à la GFC prend tout son sens puisqu'un des avantages de la CECg, telle qu'utilisée (voir la section 6.2.5), réside dans sa capacité de concentration des échantillons. La CECg a ainsi permis de récupérer le CECg-actif dans un volume suffisamment petit (voir Figure 6.10 et Tableau 6.1) pour qu'une quantité appréciable de protéines puisse être injectée directement sur GFC⁴⁶. La Figure 6.11 représente un chromatogramme typique d'élu-tion du CECg-actif sur GFC. Les fractions #48-50 ont été combinées pour former le GFC-actif (voir les figures 6.11 et 6.12). Le rendement calculé de la GFC est de 27% (voir Tableau 6.1).

Bien que relativement élevé, ce rendement de 27% ne représente que 9% de l'activité totale récupérée dans le CECg-actif (voir Tableau 6.1). L'augmentation du rendement jusqu'à l'étape de CECg était tout à fait plausible et pouvait s'expliquer par l'élimination de substances interférant dans le dosage. La dimi-

⁴⁶ Dans ses recommandations relatives à l'utilisation de la GFC, la compagnie Pharmacia suggère que le volume de l'échantillon à appliquer soit d'environ 5% du volume total de gel contenu dans la colonne (Pharmacia. 1996b).

nution subséquente du rendement (à l'étape de GFC) était également plausible, voire même attendue, à cause des pertes de protéines qui surviennent au cours de la purification. Toutefois, la perte d'activité totale entre les étapes de CECg et GFC dépasse les 90%. On se doit donc de considérer la possibilité que l'activité PLA2 du GFC-actif ne constitue plus qu'une composante mineure de l'activité PLA2 initialement détectée dans le CECg-actif (étape précédente). Alternative-ment, il est aussi possible qu'un cofacteur essentiel, présent dans le CECg-actif, ait été perdu lors de l'élution sur GFC, causant ainsi une forte diminution de l'activité PLA2 du GFC-actif.

Bien que le GFC-actif contienne un peu moins de 0,0001% des protéines totales du P200-cytosol et que son facteur de purification soit particulièrement élevé (377 945) (voir Tableau 6.1), l'allure générale du chromatogramme indiquait que la GFC n'a pas permis de purifier la PLA2 du P200-36 jusqu'à homogénéité (voir Figure 6.11). En effet, elle n'a pas été éluée dans un pic fin et bien défini. Le GFC-actif a donc été injecté sur RPC, tel que décrit auparavant (voir la section 6.2.7). La Figure 6.13 montre la présence de plusieurs pics absorbant à 276 nm, ce qui confirme la présence anticipée de nombreuses protéines différentes dans le GFC-actif. La RPC aura donc permis d'éliminer plusieurs protéines contaminantes. La Figure 6.14 indique par ailleurs que la fraction #24 (voir Figure 6.13) est hautement enrichie en activité PLA2. Elle indique également qu'à ce stade-ci, la PLA2 ne représente qu'une très faible proportion des protéines totales injectées sur cette colonne⁴⁷. Aussi, compte tenu de la faible quantité d'enzyme obtenue, de la limite de détection du dosage de protéines ISS-Pro-

⁴⁷ L'argument évoqué pour expliquer la perte d'activité PLA2 dans le GFC-actif pourrait tout aussi bien s'appliquer ici.

tein Gold⁴⁸ (2 ng/10 µl), du désir d'éliminer les manipulations pouvant résulter en une perte d'enzyme (ex. concentration sur une membrane de filtration), et de la nécessité de vérifier la pureté de l'échantillon recueilli (RPC-actif) sur SDS-PAGE avant de prétendre à faire le séquençage de l'enzyme en question, la concentration de protéines du RPC-actif n'a pas été déterminée. C'est pour ces raisons que les caractéristiques du RPC-actif ne sont pas fournies dans le Tableau 6.1.

6.3.3 Évaluation de la pureté du RPC-actif

Tel que sus-mentionné, la pureté du RPC-actif a été vérifiée par électrophorèse, notamment sur des SDS-PAGE ayant soit un gradient de concentration d'acrylamide (8-25%), soit une concentration fixe (20%) et ce, selon la méthode de Laemmli (1970). Les résultats ne se sont toutefois pas avérés très concluants. Bien qu'une coloration des gels au AgNO₃ ait révélé quelques bandes (au moins trois), aucune ne migrerait vis-à-vis le standard de cPLA2. Et bien qu'au moins une bande semblait migrer vis-à-vis le standard de sPLA2 (l'autre type connu de PLA2 Ca²⁺-dépendante), les dosages d'activité de cette bande n'ont pas permis de confirmer la présence de PLA2. En effet, après avoir coupé la bande de gel (où les constituants du RPC-actif avait été séparés) en morceaux de 2 mm de large et incubés ceux-ci individuellement dans un minimum de tampon devant permettre l'élution et la renaturation de l'enzyme (Bhown et Bennett. 1983), aucune activité PLA2 n'a été détectée. Ces résultats⁴⁹ n'ont donc pas permis de statuer sur le P.M. de la PLA2 du P200-36, mais ils ont tout de mê-

⁴⁸ Notez que ce type de dosage est déjà plus sensible que les Bradford (250 ng/10 µl), Lowry (50 ng/10 µl) et micro-BCA (5 ng/10 µl) (Bollag et Edelstein. 1991).

⁴⁹ L'intensité de coloration des bandes révélées au AgNO₃ (seuil de détection de 2 ng/bande; Bollag et Edelstein. 1991) était excessivement faible, et les photographies prises à partir de ces gels n'ont pas permis de rendre compte de ces résultats. Par conséquent, ils ne sont pas présentés.

me permis de constater que la PLA2 éluée de la RPC n'était pas assez purifiée pour être séquencée "en masse". La spectroscopie de masse pourrait permettre d'obtenir plus d'informations.

6.3.4 Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-actif, HIC-actif, CECg-actif et GFC-actif en fonction de la concentration de protéines

Les résultats de la Figure 6.15 indiquent que tous les dosages d'activité PLA2 présentés dans les chapitres 5 et 6 ont été effectués avec une quantité de protéines adéquate, et donc dans des conditions optimales. Ainsi, puisqu'une quantité de protéines supérieure à 215 μg (50 μl) entraîne une inhibition substantielle de l'activité PLA2 du P200-cytosol (voir Figure 6.15A) et que le plus fort taux d'augmentation de l'activité est obtenu entre 43 (10 μl) et 108 μg (25 μl) de protéines (voir Figure 6.15A), des aliquots de P200-cytosol de 10-20 μl ont été dosés de façon routinière et ce, autant pour les expériences du présent chapitre que celles du chapitre 5. Un phénomène similaire, mais plus marqué, est observé avec le CEC-actif. En effet, bien que le substrat n'apparaisse pas comme un facteur limitant, l'activité PLA2 du CEC-actif décroît de façon quasi-linéaire avec l'augmentation de protéines (voir Figure 6.15B). Des aliquots de CEC-actif de 10 ou 20 μl (2,8-5,6 μg de protéines) ont donc été utilisés pour les dosages enzymatiques présentés dans les chapitres 5 et 6.

En ce qui concerne le HIC-actif, on observe une augmentation linéaire de l'activité PLA2 en fonction de la quantité de protéines (voir Figure 6.15C), ce qui signifie que des aliquots de 0,3-1,5 μg de protéines (4-20 μl) peuvent être utilisés sans problème dans les dosages. La Figure 6.14D montre pour sa part que l'activité PLA2 du CECg-actif atteint un plateau lorsque la quantité de protéines

dosée dépasse 0,3 μg (5 μl), ce qui suggère que le substrat devient alors limitant. Enfin, on note une augmentation de l'activité PLA2 du GFC-actif en fonction de la quantité de protéines, bien que le taux d'augmentation ne soit linéaire qu'entre 3 (10 μl) et 6 ng (20 μl) (voir Figure 6.15E). Des aliquots de 10 μl ont donc été dosés de façon routinière et ce, par souci d'économie d'un échantillon déjà peu abondant.

6.3.5 Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-actif, HIC-actif, CECg-actif et GFC-actif en fonction du temps

L'expérience résumée sur la Figure 6.16 a elle aussi été conçue pour s'assurer que les dosages d'activité PLA2 présentés dans les chapitres 5 et 6 ont été faits dans des conditions optimales. Puisque l'hydrolyse spontanée et non-spécifique du 10PyPM augmente légèrement en fonction du temps (résultat non-montré), il est important de vérifier que l'activité spécifique des échantillons PLA2-actifs a été mesurée sur une période correspondant à une augmentation linéaire de l'activité en fonction du temps. Sinon, l'activité réelle de l'échantillon dosé se trouve sous-estimée par une activité non-spécifique qui augmente à un rythme constant alors que l'activité spécifique plafonne. De plus, cela permet de s'assurer que, lors d'études de caractérisation biochimique comme celles présentées aux chapitres 4 et 5 (voir les tableaux 4.3 et 5.3), l'effet observé est bel et bien dû aux réactifs ajoutés (ex. EDTA, DTT, pBPB ou chaleur), et non à la dénaturation ou dégradation de l'enzyme dans le temps.

La Figure 6.16 montre que l'activité PLA2 du P200-cytosol (20 μl dosé; 86 μg de protéines), du CEC-actif (10 μl dosé; 2,8 μg de protéines) et du HIC-actif (20 μl dosé; 1,5 μg de protéines) croît de façon linéaire avec le temps et ce, jusqu'à 90

min (Figure 6.16A), 90 min (Figure 6.16B) et 60 min (Figure 6.16C), respectivement. Ceci indique qu'il n'y a aucun risque de mésestimer l'activité PLA2 spécifique lorsque l'incubation s'étend sur une période de 30 à 60 min, tel que décrit antérieurement pour le cytosol (voir les sections 5.4.5 et 6.2.2). La Figure 6.16D indique que l'activité PLA2 du CECg-actif (5 μ l dosé; 0,3 μ g de protéines) plafonne très rapidement, i.e. en 20 min seulement. Ceci signifie que, pour toute étude ultérieure de cinétique enzymatique et/ou de caractérisation biochimique (tel que présenté aux tableaux 4.3 et 5.3), le temps d'incubation de l'échantillon CECg-actif ne devrait pas excéder 20 min. Enfin, la Figure 6.16E montre que l'activité PLA2 du GFC-actif (10 μ l dosé; 3 ng de protéines) augmente de façon linéaire jusqu'à 40 min. Ainsi, puisqu'aucune des incubations inhérentes aux expériences décrites dans les chapitres 5 et 6 ne s'est prolongée au-delà de 45 min (voir les sections 5.4.5 et 6.2.2), les risques d'avoir sous-estimé l'activité PLA2 spécifique de chacun des échantillons sont plutôt faibles (sauf peut-être pour le CECg-actif). Cependant, d'autres mesures d'activité PLA2 (avec lecture continue de la fluorescence; voir la section 5.4.3) devront éventuellement être réalisées afin de déterminer les conditions optimales, en termes de quantité de protéines et de temps d'incubation, qui permettront d'étudier les cinétiques enzymatiques et les caractéristiques de ces échantillons⁵⁰.

6.4 Discussion

Bien que les résultats du présent chapitre montrent que la PLA2 du P200-36 n'a pas été obtenue sous une forme homogène, ce qui aurait permis d'en déterminer les principales caractéristiques (P.M., pI, séquence d'acides aminés,

⁵⁰ Ces études devraient en effet être faites dans des conditions telles que 10% ou moins du substrat total est hydrolysé. Ainsi, la concentration de substrat ne change pas de façon appréciable et n'a aucune influence sur les cinétiques enzymatiques (Price et Stevens. 1989; Pelmont. 1995).

etc.), ils indiquent néanmoins qu'une partie importante de l'isolement a été réalisée. Des valeurs d'activité spécifique de 12 $\mu\text{mol}/\text{min}$ par mg de protéines ont en effet été obtenues, ce qui représente un enrichissement très important puisque de telles valeurs sont souvent associées à des enzymes purifiées. Il faut toutefois se rappeler qu'il est possible que l'activité PLA2 du GFC-actif ne représente qu'une composante mineure de l'activité PLA2 du CECg-actif (voir la section 6.3.2).

Ainsi, les figures 6.15 et 6.16 démontrent que tous les dosages enzymatiques effectués pour obtenir les résultats des chapitres 5 et 6 ont été faits dans de bonnes conditions⁵¹. Par ailleurs, des informations très intéressantes peuvent être tirées des figures 6.2-6.14. Tout d'abord, les figures 6.2 et 6.3 suggèrent que le point isoélectrique (pI) de la PLA2 du P200-36 se situe probablement entre 6,0 et 7,5. En effet, lorsque le pH du tampon éluant est inférieur au pI de la protéine étudiée, celle-ci porte une charge nette positive et, par conséquent, elle se lie au groupement actif de la CEC qui porte une charge négative (SO_3^-) (Harris et Angal. 1995; Pharmacia Biotech. 1996a). De même, lorsque le pH du tampon éluant est supérieur au pI de la protéine étudiée, celle-ci porte une charge nette négative et se lie au groupement actif de l'AEC qui est chargé positivement ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) (Harris et Angal. 1995; Pharmacia Biotech. 1996a). Or puisqu'une concentration de 800 mM NaCl est nécessaire pour éluer l'activité PLA2 de la CEC à pH 6,0, ceci suggère que: 1) la PLA2 du P200-36 se lie à la colonne, 2) elle a une charge nette positive à pH 6,0 et 3) son pI est supérieur à 6,0. Par ailleurs,

⁵¹ Bien qu'il soit impossible, à ce stade-ci, de fournir une explication précise à la diminution d'activité des P200-cytosol et CEC-actif observée en présence de quantités élevées de protéines, il est plausible d'imaginer qu'une forte concentration de protéines est associée à une forte concentration de molécules pouvant causer une atténuation de la fluorescence émise au moment de l'hydrolyse du substrat par la PLA2.

puisque l'activité PLA2 n'est pas éluée de l'AEC à pH 7,5 en absence de NaCl, ceci suggère que: 1) la PLA2 du P200-36 n'est pas éluée avec les protéines non-liées, 2) elle a une charge nette négative à pH 7,5 et 3) son pI est inférieur à 7,5.

Le fait que les éluats récupérés de l'AEC en présence de 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 et 2000 mM NaCl contiennent pratiquement le même taux d'activité PLA2 (voir Figure 6.3), soit 10 ± 1 , 16 ± 0 , 15 ± 4 , 12 ± 1 , 11 ± 1 , 11 ± 1 et $13\pm 0\%$, respectivement, pourrait signifier que des interactions de nature autre qu'électrostatique modulent la liaison de la PLA2 du P200-36 à cette matrice. Ceci semble d'autant plus probable que la compagnie E. Merck Darmstadt, distributeur du Fractogel EMD DEAE-650, indique clairement que l'hydrophobicité du groupement actif de cette AEC, le DEAE, peut parfois causer ce type d'effet indésiré.

La Figure 6.2 révèle également que le tampon phosphate retrouvé dans les échantillons à différentes étapes de la procédure de purification (voir la légende des figures 6.4, 6.8 et 6.10) n'interfère pas dans les dosages. En effet, les ions phosphates auraient pu précipiter le Ca^{2+} présent dans le tampon de dosage de l'activité PLA2 et ainsi fausser certains résultats, entre autres ceux présentés au chapitre 5 (voir les tableaux 5.2 et 5.3). Or pour effectuer les tests dont les résultats sont illustrés à la Figure 6.2, l'échantillon utilisé (P200-cytosol) a été préalablement dialysé contre un tampon Pipes/0 M NaCl (voir la section 6.2.2) et centrifugé (20 min, 15 000 X g, 4°C; Microfuge Beckman). L'activité PLA2 de ce surnageant a ensuite été dosée et comparée à des contrôles non-dialysés. Les résultats obtenus indiquaient que l'activité PLA2 était in affectée par le phosphate (résultat non-montré) et suggéraient conséquemment que le P200-cytosol pouvait être injecté directement sur CEC, sans dialyse préalable. Toutes ces

informations ont donc été prises en considération lors la mise au point subséquente de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36 (voir les sections 6.2.3-6.2.7), laquelle est résumée à la Figure 6.1.

Lorsqu'on considère cette procédure de purification et les résultats qui en découlent (voir Tableau 6.1), ce qui surprend, à première vue, est sans aucun doute l'augmentation du rendement de purification. En effet, considérant que le rendement est déterminé à partir de l'activité totale des différents échantillons PLA2-actifs et qu'il est impossible de récupérer plus d'activité que ce qui est initialement contenu dans l'échantillon de départ, le P200-cytosol, on peut soulever la possibilité que ces résultats soient dus à des erreurs expérimentales. Cependant, si on les remet dans le contexte de la caractérisation du P200-36 (voir Tableau 5.1, ainsi que la section 5.5.5), on remarque que la même CEC a permis d'éliminer ce que nous croyons fortement être un inhibiteur de PLA2 endogène (Jacob *et al.* 1998). Il est donc tout à fait logique que le CEC-actif (voir Tableau 6.1) et le P200-36 (voir Tableau 5.1) aient des caractéristiques similaires (en termes d'augmentation de l'activité totale et du rendement) puisque, tel que mentionné auparavant, ces deux fractions sont équivalentes (voir les figures 5.2 et 6.5, ainsi que les tableaux 5.1 et 6.1). Par ailleurs, compte tenu du rôle important des PLA2 dans les cellules (voir la section 1.9), il est tout à fait probable qu'elles soient régulées de plusieurs façons, et par plus d'une protéine, ce qui pourrait expliquer l'augmentation additionnelle d'activité totale et de rendement observée pour le HIC-actif. Alternativement, il est possible que la différence dans la concentration et/ou le type de sel présent dans le CEC-actif (2 M NaCl) et le HIC-actif (1 M NaCl; 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) influence le comportement de

l'enzyme au moment du dosage d'activité⁵² (Hara *et al.* 1989; Reynolds *et al.* 1993; Shen et Cho. 1995).

Dans un autre ordre d'idée, la Figure 6.11 montre que la PLA2 du P200-36 est éluée en-dedans des limites de résolution du Séphadex G75 SF. Le pouvoir de résolution du Séphadex G75 SF utilisé à cette étape s'étend en effet de 3 à 70 kDa (Pharmacia Biotech. 1996b). Ceci signifie que toutes les protéines dont le P.M. est supérieur à 70 kDa vont être éluées dans le volume mort de la colonne alors que les protéines de moins de 3 kDa vont être éluées dans le volume total⁵³. Or considérant que le volume total de notre colonne était de 39 ml, que son volume mort était inférieur ou égal à 12 ml⁵⁴ et que l'activité PLA2 n'était éluee ni dans le volume mort ni dans le volume total, on peut conclure que le P.M. de la PLA2 du P200-36 se situe entre 3 et 70 kDa. Pour statuer sur son P.M., il faudra éventuellement calibrer la colonne avec différents standards de P.M. Il faudra également s'assurer que: 1) l'enzyme est éluee sous une forme monomérique et 2) qu'elle n'est pas retardée sur la colonne par des interactions avec la matrice de Séphadex.

Enfin, il peut sembler assez surprenant que l'activité PLA2 du P200-36 ait été éluee de la colonne de RPC (voir Figure 6.14) en présence de CH₃CN/TFA

⁵² Un aliquot de 10 µl de CEC-actif va donner une concentration finale en sel de 100 mM, alors qu'un aliquot de 20 µl de HIC-actif va donner une concentration finale de 250 mM.

⁵³ Le volume mort d'une colonne est défini comme le volume d'élution des molécules qui ne sont distribuées que dans la phase mobile du gel parce que leur taille (proportionnelle à leur P.M.) est supérieure aux pores du gel les plus grands. Par opposition, le volume total d'une colonne correspond au volume requis pour éluer les molécules dont la taille est assez petite pour leur permettre de se partitionner librement entre les phases mobile et stationnaire du gel (Pharmacia. 1996b).

⁵⁴ Il est difficile d'affirmer que le volume mort de notre colonne était de 12 ml parce qu'aucun standard de P.M. n'y a été élué. On peut toutefois affirmer qu'il n'était pas supérieur à 12 ml (40 min X 0,3 ml/min) puisque ça correspond au temps d'élution du pic de protéines (voir Figure 6.11).

(voir la section 6.2.7), parce que le P200-cytosol était au contraire complètement inactivé par une extraction au H_2SO_4 (voir la section 5.5.1). La Figure 6.13 montre cependant que l'activité PLA2 éluée de la RPC était contenue dans un pic de protéine mineur (#24 sur la Figure 6.13), lequel n'a pu être caractérisé davantage. Ceci concorderait d'ailleurs avec l'hypothèse voulant que la PLA2 du RPC-actif, et peut-être aussi celle du GFC-actif, ne corresponde pas à la PLA2 majeure du P200-36, laquelle serait encore présente dans le CECg-actif (voir la section 6.3.2). Des expériences supplémentaires s'avèrent donc nécessaires pour lever cette ambiguïté, mais ces résultats pourraient signifier que la RPC n'est pas très utile pour purifier la PLA2 du P200-36.

Il faut toutefois considérer que les concentrations de H_2SO_4 et TFA utilisées étaient de 0,4% (Apitz-Castro *et al.* 1979) et 0,1% (voir la section 6.2.6), respectivement. De plus, le H_2SO_4 est un acide inorganique dont le pKa est de -5,2 alors que le TFA est un acide organique (CF_3COOH) dont le pKa est de 0,2 (Pine *et al.* 1980), ce qui indique que, même à concentration égale, ces deux acides n'auraient pas nécessairement le même effet sur la structure et, par extension, l'activité de la PLA2. Combinés, ces deux arguments suggèrent fortement que cette différence de sensibilité de la PLA2 du P200-36 envers le H_2SO_4 et le TFA n'est pas artéfactuelle.

Pour résumer, notons que: 1) l'activité PLA2 a été enrichie à chaque étape de la purification (cytosol, CEC, HIC, CECg et GFC) car le facteur de purification et l'activité spécifique ont constamment augmenté et 2) les valeurs de rendement relatives aux quatre premières étapes de purification sont suffisamment élevées pour suggérer que la PLA2 majeure a été isolée. Cependant, la diminu-

tion du rendement aux étapes quatre (GFC) et cinq (RPC) de la purification, de même que la résistance à l'acide de l'activité PLA2 isolée à l'étape cinq (RPC) suggère que: 1) l'activité mesurée à la suite des dernières étapes de chromatographie (GFC et RPC) représente une composante mineure de l'activité PLA2 du cytosol (la composante majeure ayant pu être dénaturée par le TFA) ou 2) il y a eu une perte non-spécifique majeure de l'enzyme due à la faible concentration de protéines ou aux colonnes elles-mêmes ou 3) il y a perte spécifique de l'enzyme due à la perte d'un cofacteur.

6.5 Références

- Apitz-Castro, R.J., Mas, M.A, Cruz, M.R. et Jain, M.K. Isolation of homogeneous phospholipase A2 from human platelets. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1979. 91: 63-71.
- Bhown, A.S. et Bennett, J.C. High-sensitivity analysis of proteins recovered from sodium dodecyl sulfate gels. Methods in Enzymology. 1983. 91: 450-455.
- Bollag, D.M. et Edelstein, S.J. Protein Methods. New York: Wiley-Liss Inc., 1991.
- Buhl, W.-J., Eisenlohr, L.M., Preuss, I. et Gehring, U. A novel phospholipase A2 from human placenta. Biochemical Journal. 1995. 311: 147-153.
- Clark, J.D., Milona, N. et Knopf, J.L. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1990. 87: 7708-7712.
- Diez, E. et Mong, S. Purification of a phospholipase A2 from human monocytic leukemic U937 cells. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 14654-15661.
- Gassama-Diagne, A., Fauvel, J. et Chap, H. Purification of a new, calcium-independent, high molecular weight phospholipase A2/lysophospholipase (phospholipase B) from guinea pig intestinal brush-border membrane. The Journal of Biological Chemistry. 1989. 264: 9470-9475.

- Gronich, J.H., Bonventre, J.V. et Nemenoff, R.A. Purification of a high-molecular-mass form of phospholipase A2 from rat kidney activated at physiological calcium concentrations. Biochemical Journal. 1990. 271: 37-43.
- Harris, E.L.V. et Angal, S. Protein Purification Methods: A Practical Approach. United Kingdom: IRL Press/Oxford University Press, 1995.
- Hara, S., Kudo, I., Chang, H.W., Matsuta, K., Miyamoto, T. et Inoue, K. Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. Journal of Biochemistry. 1989. 105: 395-399.
- Hazen, S.L., Stuppy, R.J. et Gross, R.W. Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A2: A calcium-independent phospholipase with absolute *sn*-2 regiospecificity for diradyl glycerophospholipids. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 10622-10630.
- Hirashima, Y., Farooqui, A.A., Mills, J.S. et Horrocks, L.A. Identification and purification of calcium-independent phospholipase A2 from bovine brain cytosol. Journal of Neurochemistry. 1992. 59: 708-714.
- Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Phospholipases A2 of rod outer segment-free retinae are different from well-known phospholipases A2. Biochimica et Biophysica Acta. 1998. sous presse.
- Jordan, L.M. et Russo-Marie, F. Purification and partial characterization of

- phospholipase A2 isoforms from human placenta. Journal of Chromatography. 1992. 597: 299-308.
- Kim, D.K. et Bonventre, J.V. Purification of a 100 kDa phospholipase A2 from spleen, lung and kidney: antiserum raised to pig spleen phospholipase A2 recognizes a similar form in bovine lung, kidney and platelets, and immunoprecipitates phospholipase A2 activity. Biochemical Journal. 1993. 294: 261-270.
- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Manetta, J. et Putnam, J.E. The Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100-kDa protein in human monoblastic U937 cells. The Journal of Biological Chemistry. 1991. 266: 5268-5272.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970. 227: 680-685.
- Loeb, L.A. et Gross, R.W. Identification and purification of sheep platelet phospholipase A2 isoforms: Activation by physiologic concentrations of calcium ions. The Journal of Biological Chemistry. 1986. 261: 10467-10470.
- Minami, T., Tojo, H., Shinomura, Y., Matsuzawa, Y. et Okamoto, M. Purification and characterization of a phospholipase A2 from human ileal mucosa. Biochimica et Biophysica Acta. 1993. 1170: 125-130.
- Pelmont, J. Enzymes: Catalyseurs du Monde Vivant. Grenoble: Presses Universitaires de Grenoble, 1995.

Pharmacia Biotech. Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods.
Suède: Västra Aros Tryckeri, 1996a.

Pharmacia Biotech. Gel Filtration Chromatography: Principles and Methods.
Suède: Västra Aros Tryckeri, 1996b.

Pine, S.H., Hendrickson, J.B., Cram, D.J. et Hammond, G.S. Organic Chemistry.
4è édition. New York: McGraw Hill Inc., 1980.

Price, N.C. et Stevens, L. Fundamentals of Enzymology. New York: Oxford
University Press, 1989.

Rehfeldt, W., Resch, K. et Goppelt-Struebe, M. Cytosolic phospholipase A2
from human monocytic cells: characterization of substrate specificity and
Ca²⁺-dependent membrane association. Biochemical Journal. 1993. 293:
255-261.

Reynolds, L.J., Hughes, L.L., Louis, A.I., Kramer, R.M. et Dennis, E.A. Metal
ions and salt effects on the phospholipase A2, lysophospholipase, and
transacylase activities of human cytosolic phospholipase A2. Biochimica
et Biophysica Acta. 1993. 1167: 272-280.

Rönkkö, S. et Räsänen, M. Studies on phospholipase A2 in human seminal
plasma. International Journal of Biochemistry. 1992. 24: 987-992.

Shen, Z. et Cho, W. Membrane leakage induced by synergetic action of Lys-49

- and Asp-49 Agkistrodon piscivorus piscivorus phospholipases A2: Implications in their pharmacological activities. International Journal of Cell Biology. 1995. 27: 1009-1013.
- Spaargaren, M., Wissink, S., Defize, L.H.K., De Laat, S.W. et Boonstra, J. Characterization and identification of an epidermal growth factor-activated phospholipase A2. Biochemical Journal. 1992. 287: 37-43.
- Thompson, F.J. et Clark, M.A. Purification of a phosphatidic-acid-hydrolyzing phospholipase A2 from rat brain. Biochemical Journal. 1995. 306: 305-309.
- Tojo, H., Teramoto, T., Yamano, T. et Okamoto, M. Purification of intracellular phospholipase A2 from rat spleen supernatant by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry. 1984. 137: 533-537.
- Tojo, H., Ying, Z. et Okamoto, M. Purification and characterization of guinea pig gastric phospholipase A2 of the pancreatic type. European Journal of Biochemistry. 1993. 215: 81-90.
- Tremblay, N.M., Kennedy, B.P., Street, I.P., Kaupp, W.J., Laliberté, F. et Weech, P.K. Human group II phospholipase A2 expressed in *Trichoplusia ni* larvae: Isolation and kinetic properties of the enzyme. Protein Expression and Purification. 1993. 4: 490-498.

- Ulevitch, R.J., Watanabe, Y et Sano, M. Solubilization, purification, and characterization of a membrane-bound phospholipase A2 from the P388D₁ macrophage-like cell line. The Journal of Biological Chemistry. 1988. 263: 3079-3085.
- Wolf, M.J. et Gross, R.W. Expression, purification, and kinetic characterization of a recombinant 80-kDa intracellular calcium-independent phospholipase A2. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 30879-30885.
- Wright, G.W., Ooi, C.E., Weiss, J. et Elsbach, P. Purification of a cellular (granulocyte) and an extracellular (serum) phospholipase A2 that participate in the destruction of *Escherichia coli* in a rabbit inflammatory exudate. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 6675-6681.
- Yoshihara, Y. et Watanabe, Y. Translocation of phospholipase A2 from cytosol to membranes in rat brain induced by calcium ions. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1990. 170: 484-490.

6.6 Légendes des figures

Figure 6.1: **Résumé de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36.** La préparation du P200-cytosol et les différentes étapes de chromatographie ayant permis de purifier partiellement la PLA2 du P200-36 ont été effectuées selon les procédures détaillées aux sections 6.3-6.7, inclusivement.

Figure 6.2: **Élution de la PLA2 du P200-36 sur CEC en fonction d'une concentration croissante de NaCl.** Le volume des fractions éluées est de 1 ml. Le dosage fluorimétrique d'activité PLA2 a été fait tel que décrit à la section 5.4.5, avec 10 μ l de chacune des fractions éluées de la CEC. Chaque puits contenait 1,85 nmol de 10PyPM comme substrat. L'incubation était faite à la température de la pièce durant 15 min. Les valeurs des contrôles négatifs, obtenus en absence d'enzyme, ont été soustraites. L'activité est exprimée en unités de fluorescence détectée à 377 nm/ 10 μ l (volume d'échantillon dosé). Ces résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée en triplicata.

Figure 6.3: **Élution de la PLA2 du P200-36 sur AEC en fonction d'une concentration croissante de NaCl.** Le volume des fractions éluées est de 1 ml. Le dosage a été effectué tel que décrit dans la légende de la Figure 6.2, avec 10 μ l de chacune des fractions éluées de l'AEC. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences réalisées en triplicata.

Figure 6.4: **Élution de la PLA2 du P200-36 sur HIC en fonction de l'augmentation de l'hydrophobicité du tampon éluant.** Le volume des fractions éluées est de 2 ml. Les conditions de dosage sont telles que décrites dans la légende de la Figure 6.2. Des aliquots de 10 μ l de chacune des fractions éluées de la HIC ont

été dosés. La lecture de fluorescence a été prise après 40 min d'incubation à la température de la pièce. Ces résultats sont représentatifs d'une expérience réalisée en triplicata.

Figure 6.5: Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur CEC. Le P200-cytosol pH 6,0 a été préparé selon la méthode décrite à la section 6.2.3, injecté sur CEC, puis élué à 20 ml/min avec un gradient de NaCl à deux plateaux, soit 0,1 et 2 M. L'expérience se déroulait à 4°C. Le début de l'injection du P200-cytosol et de l'élution avec 0,1 et 2 M NaCl est indiqué par une flèche. Le volume des fractions 1 et 2 est de 250 ml chacune, celui des fractions 3-9 est de 50 ml chacune, et celui de la fraction 10 est de 125 ml. L'absorbance à 276 nm reflétait l'élution des protéines. Ce résultat est typique de quatre injections.

Figure 6.6: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la CEC. Le dosage a été effectué tel que décrit dans la légende de la Figure 6.2, avec 10 µl de chacune des fractions #1-10 éluées. Le temps d'incubation était de 40 min. Ces résultats sont typiques de deux expériences réalisées en triplicata.

Figure 6.7: Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur HIC. Le CEC-actif a été injecté sur HIC, puis élué à 10 ml/min. Le début de l'injection du CEC-actif, de même que le début de l'élution avec 1 M NaCl/20% (NH₄)₂SO₄ et H₂O est indiqué par une flèche. L'expérience se déroulait à 4°C. Le volume des fractions 1-3 est de 250 ml chacune, celui des fractions 4-9 est de 35 ml chacune, celui de la fraction 10 est de 30 ml, et celui de la fraction 11 est de 170 ml. L'absorbance à 276 nm permettait de suivre l'élution des protéines. Ce résultat est représentatif de deux injections.

Figure 6.8: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la HIC. Le dosage a été effectué tel que décrit dans la légende de la Figure 6.2, avec 20 μ l de chacune des fractions #1-11 éluées. Le temps d'incubation était de 40 min. Ces résultats sont typiques de deux expériences réalisées en triplicata.

Figure 6.9: Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur CECg. Le HIC-actif a été injecté sur CECg, puis élué à 0,5 ml/min. Le début de l'injection du HIC-actif et du lavage des protéines non-retenues avec le PBS est indiqué par une flèche. Le trait continu représente l'élution des protéines alors que le trait pointillé indique la progression du gradient de NaCl. L'expérience se déroulait à 4°C. Le volume des fractions éluées avec le gradient est de 0,5 ml.

Figure 6.10: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la CECg. Le dosage a été effectué tel que décrit dans la légende de la Figure 6.2, avec 5 μ l d'échantillon. Une fraction sur deux ou trois a été dosée et ce, en incubant pendant 30 min. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences réalisées en triplicata.

Figure 6.11: Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur GFC. Le CECg-actif a été injecté sur GFC, puis élué à 0,3 ml/min. Le début de l'injection du CECg-actif et de l'élution avec le PBS est indiqué par une flèche. L'absorbance à 276 nm permettait de suivre l'élution des protéines. L'expérience se déroulait à 4°C. Le volume des fractions éluées avec le PBS est de 0,6 ml. Ce résultat est représentatif de deux injections.

Figure 6.12: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la GFC. Le dosage a été effectué tel que décrit dans la légende de la Figure 6.2, avec 10 μ l d'échantillon. Une fraction sur deux a été dosée. Le temps d'incubation était de 10 min. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences effectuées en triplicata.

Figure 6.13: Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur RPC. Le GFC-actif a d'abord été dialysé, lyophilisé et resuspendu dans 250 μ l de TFA 0,1% tel que décrit à la section 6.2.7, avant d'être injecté sur GFC et élué à 0,3 ml/min avec un gradient d'acétonitrile. Le trait continu représente l'absorbance à 276 nm et donc l'élution des protéines, alors que le trait pointillé reflète l'augmentation de la concentration en acétonitrile. L'expérience se déroulait à la température de la pièce. Le volume des fractions recueillies variait de façon à ce que chaque pic de protéines (détecté par une augmentation de l'absorbance à 276 nm) soit récupéré séparément. Ce résultat est représentatif de deux injections.

Figure 6.14: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la RPC. Le dosage a été effectué tel que décrit dans la légende de la Figure 6.2, avec 20 μ l de chacune des fractions récoltées. Le temps d'incubation était de 30 min. Ces résultats sont typiques de deux expériences effectuées en triplicata.

Figure 6.15: Activité PLA2 des cytosol, CEC-, HIC-, CECg- et GFC-actif en fonction de la quantité de protéines. Pour chacun des échantillons PLA2-actifs, le dosage a été effectué tel que décrit dans la légende de la Figure 6.2 et ce, avec des quantités croissantes de protéines. Le temps d'incubation était de 30 min. Le trait plein et le trait pointillé indiquent la portion de la courbe pour laquelle

l'augmentation de l'activité PLA2 en fonction de quantité de protéines est linéaire et non-linéaire, respectivement. Ces résultats sont typiques de deux expériences réalisées en triplicata.

Figure 6.16: Activité PLA2 des cytosol, CEC-, HIC-, CECg- et GFC-actif en fonction du temps. L'activité de chacun des échantillons PLA2-actifs a été dosée selon la méthode décrite dans la légende de la Figure 6.2. Des lectures de fluorescence ont été prises aux temps indiqués. Le trait plein et le trait pointillé indiquent la portion de la courbe pour laquelle l'augmentation de l'activité PLA2 en fonction de quantité de protéines est linéaire et non-linéaire, respectivement. Ces résultats sont typiques de deux expériences faites en triplicata.

Tableau 6.1: Purification partielle de la PLA2 du P200-36

	Protéines ($\mu\text{g/ml}$)	Volume (ml)	Activité spécifique (nmol/min par mg)	Activité totale (nmol/min)	Purification	Rendement (%)
P200c	4266	350	0,03	49	1	100
CEC-actif	280	430	1,47	177	45	359
HIC-actif	73,3	65	64	306	1949	620
CECg-actif	61,1	5,5	446	150	13 500	303
GFC ₁ -actif ^a	0,31	1,8 (3,3)	12 472	7 (13)	377 945	14 (27)

^a Les valeurs entre parenthèses ont été obtenues par extrapolation. Ayant obtenu 1,8 ml de GFC-actif pour 3 ml de CECg-actif injecté, on peut prévoir obtenir 3,3 ml pour 5,5 ml injecté. De même, considérant une activité totale de 7 nmol/min pour 3 ml, on obtient 13 nmol/min pour 5,5 ml. Enfin, le quotient de l'une et l'autre valeurs d'activité totale du GFC-actif (extrapolée ou non) par celle du cytosol permet d'obtenir le rendement de la GFC (extrapolé ou non).

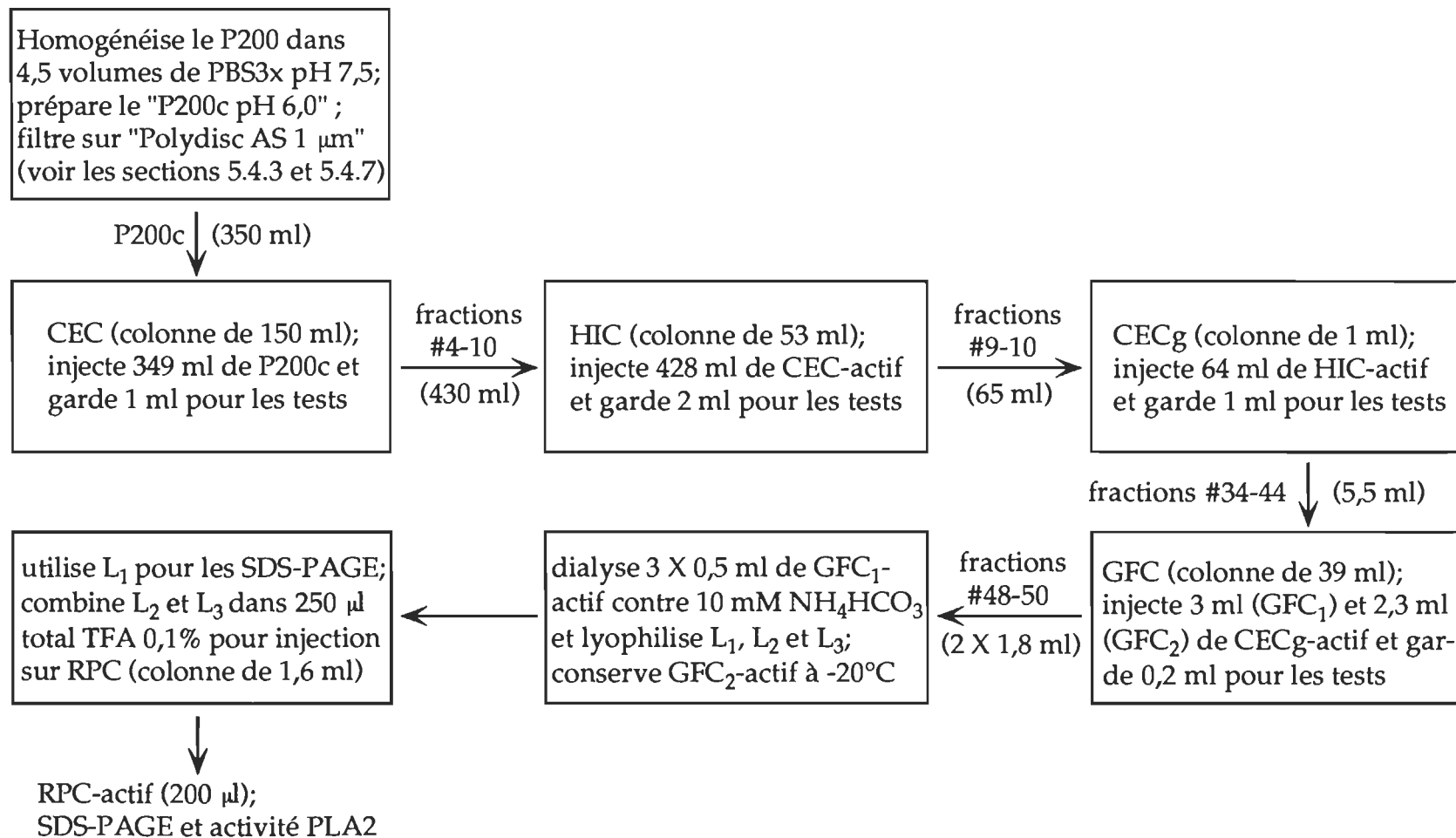


Figure 6.1: Résumé de la procédure de purification de la PLA2 du P200-36

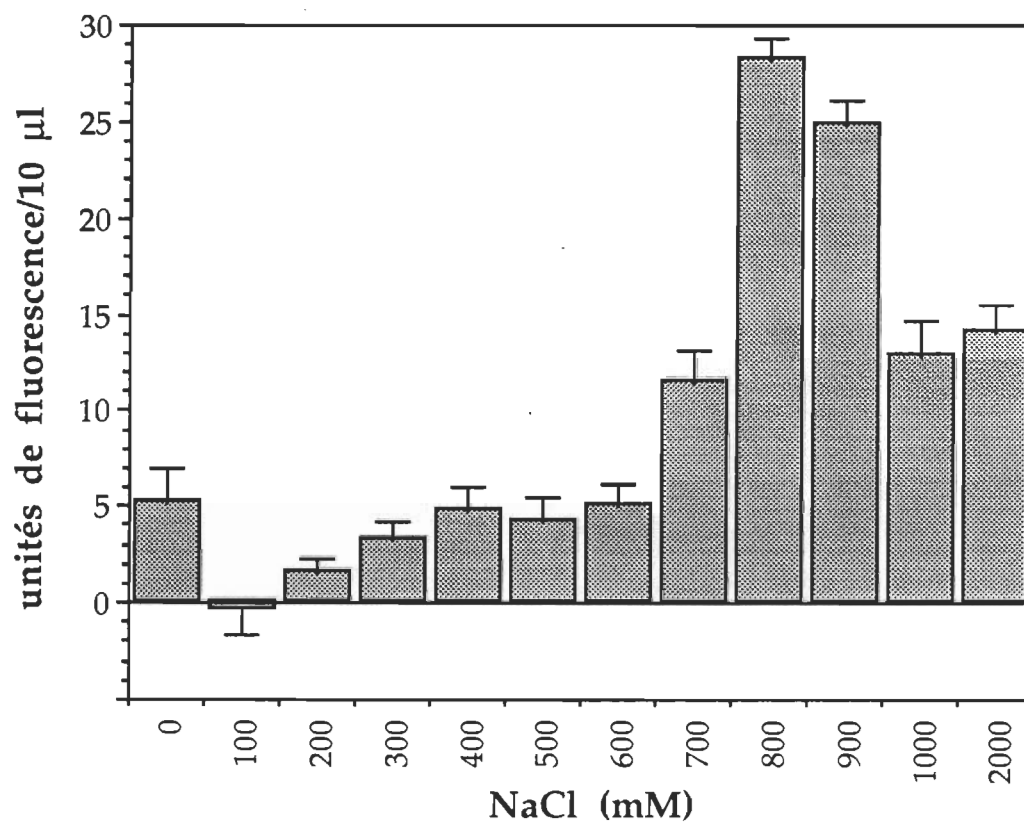


Figure 6.2: Éluion de la PLA2 du P200-36 sur CEC en fonction d'une concentration croissante de NaCl

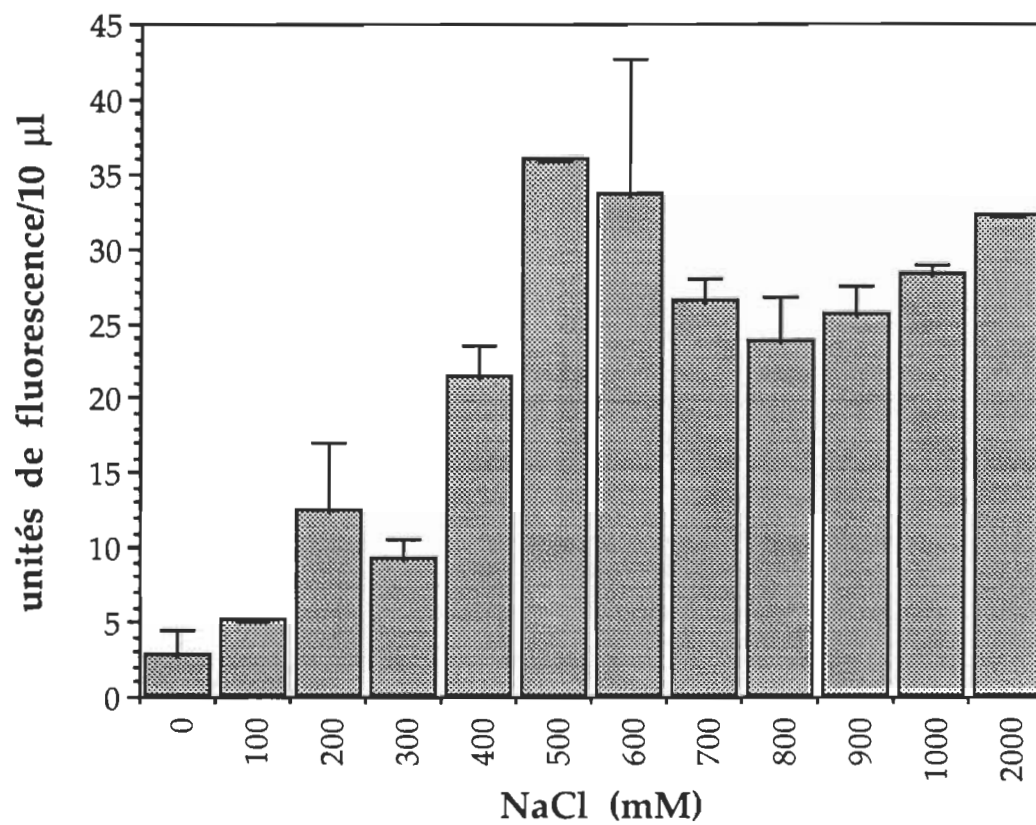


Figure 6.3: Élu­tion de la PLA2 du P200-36 sur AEC en fonction d'une concentration croissante de NaCl

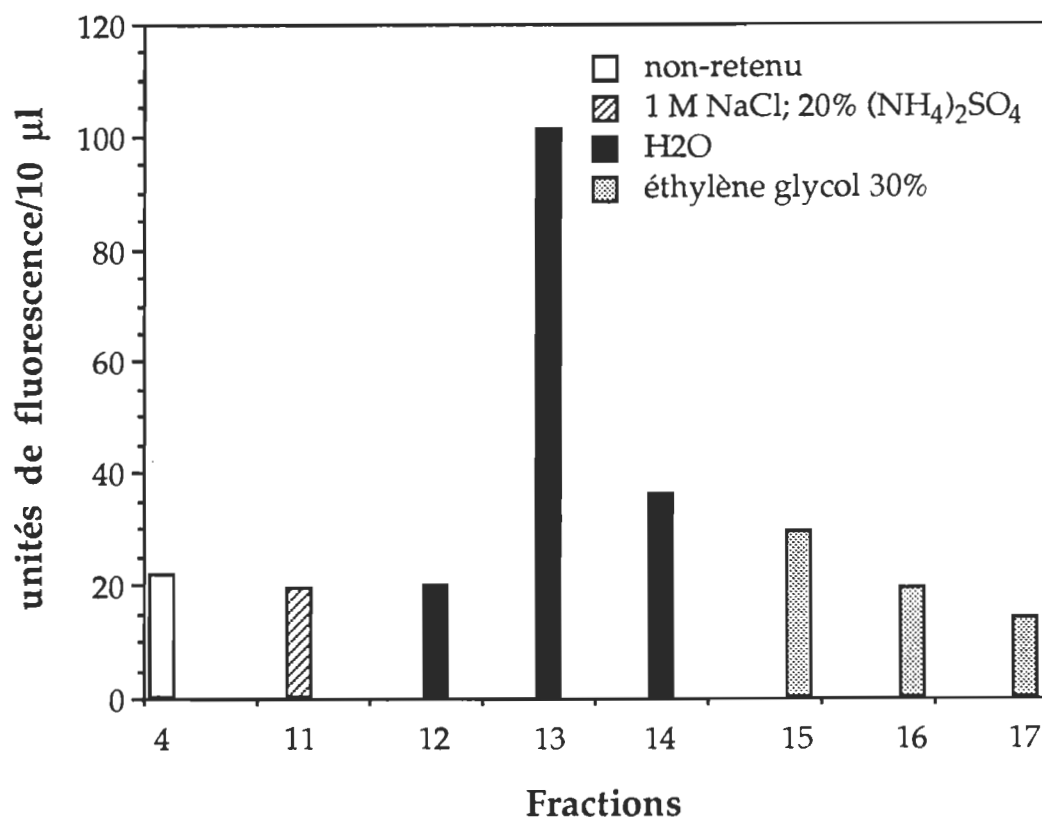


Figure 6.4: Éluion de la PLA2 du P200-36 sur HIC en fonction de l'augmentation de l'hydrophobicité du tampon éluant

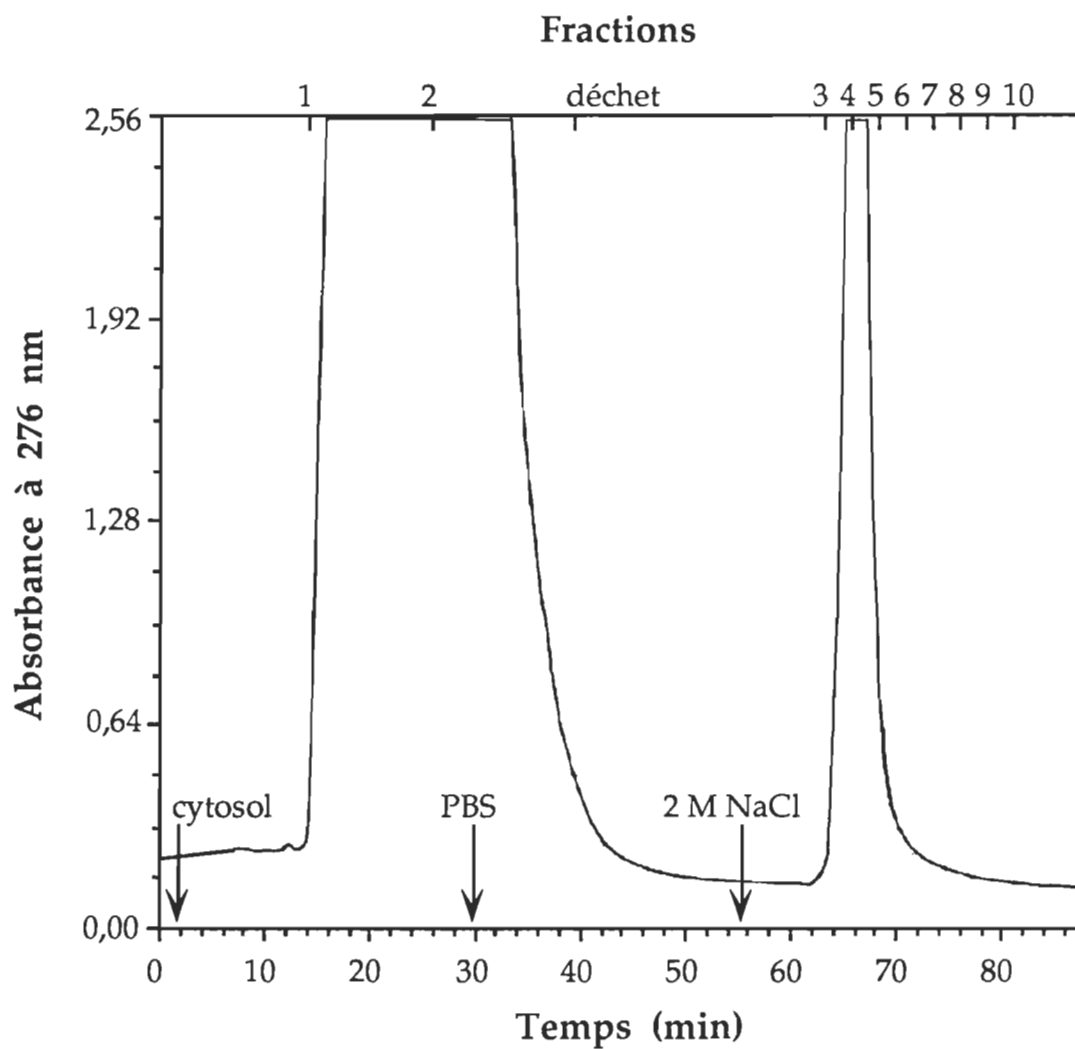


Figure 6.5: Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur CEC

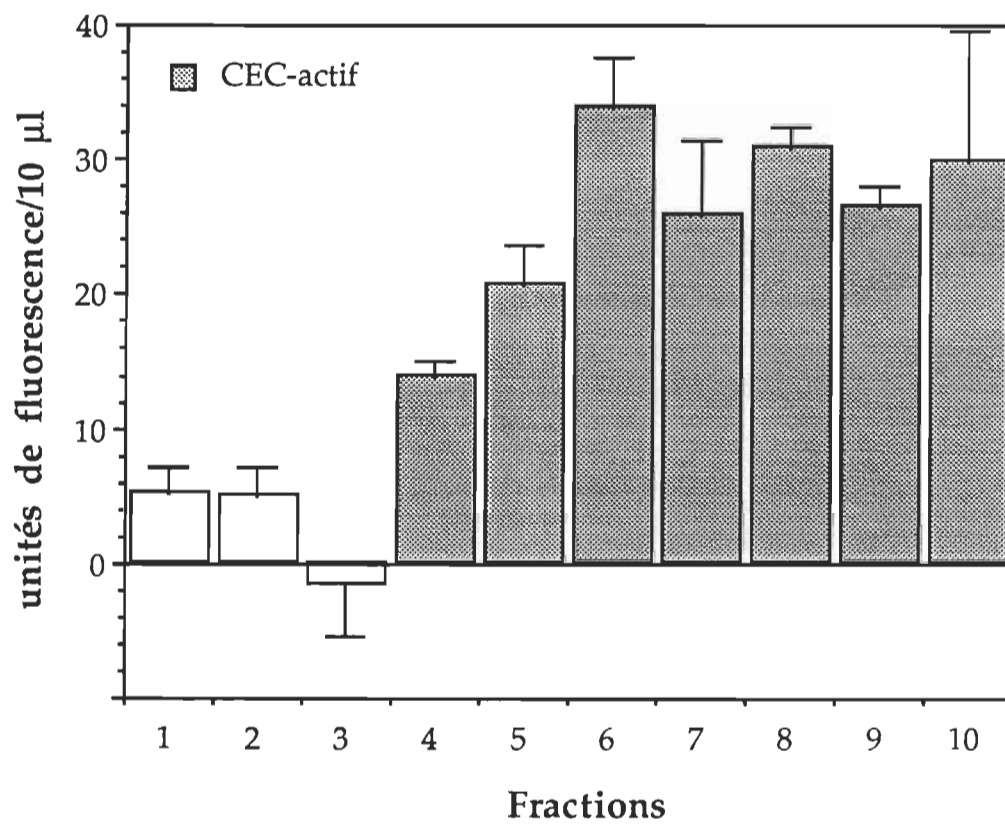


Figure 6.6: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la CEC

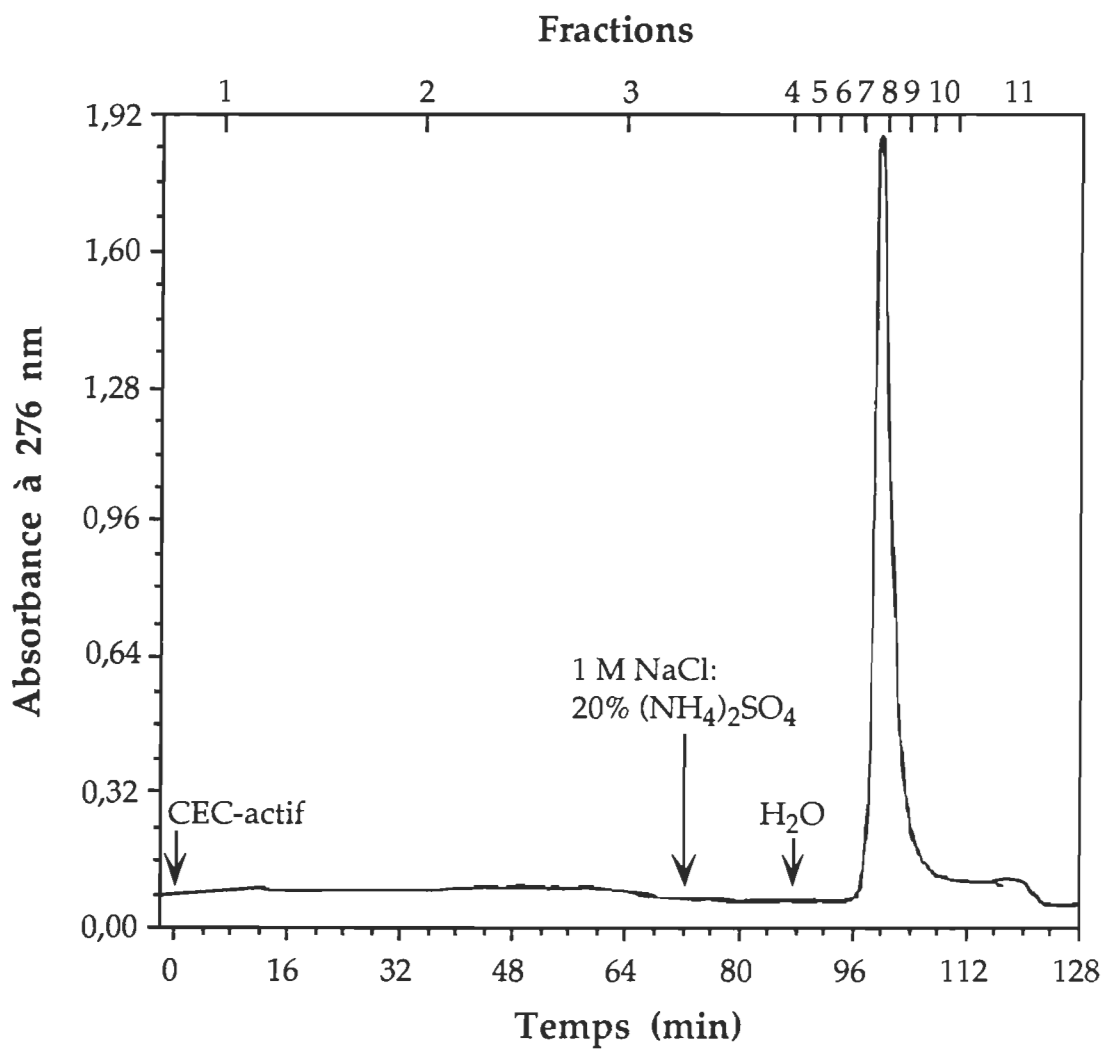


Figure 6.7: Profil d'éluion de la PLA2 du P200-36 sur HIC

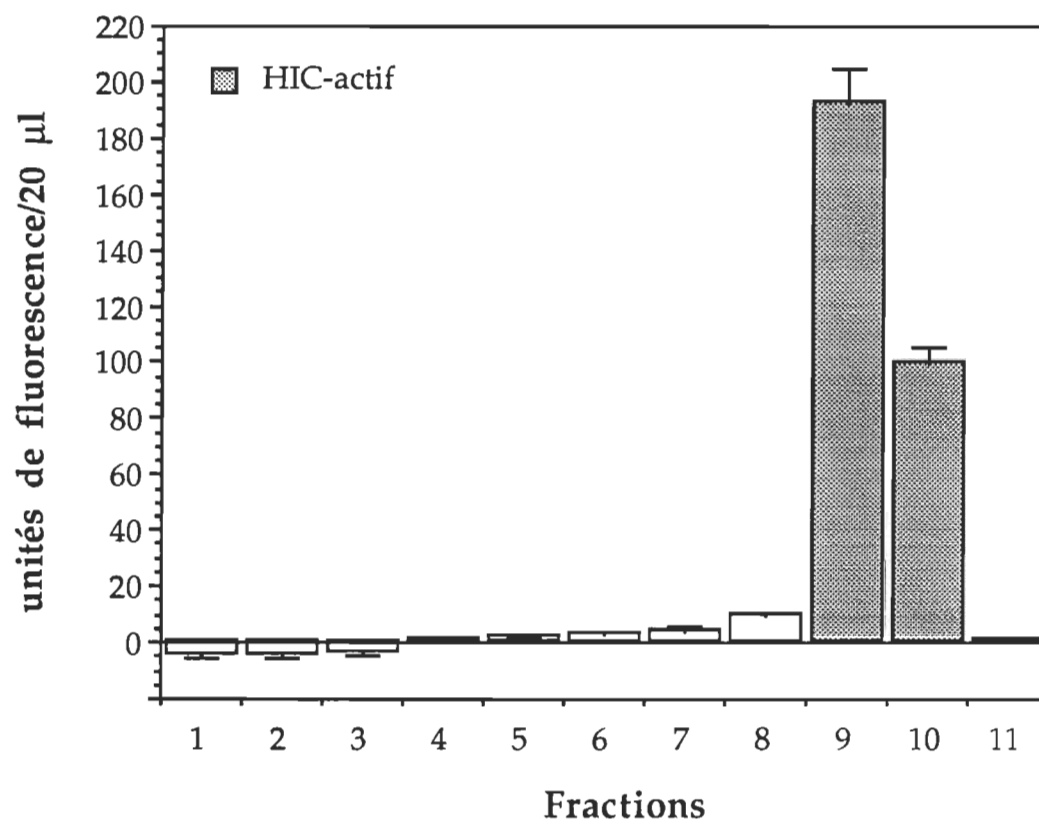


Figure 6.8: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la HIC

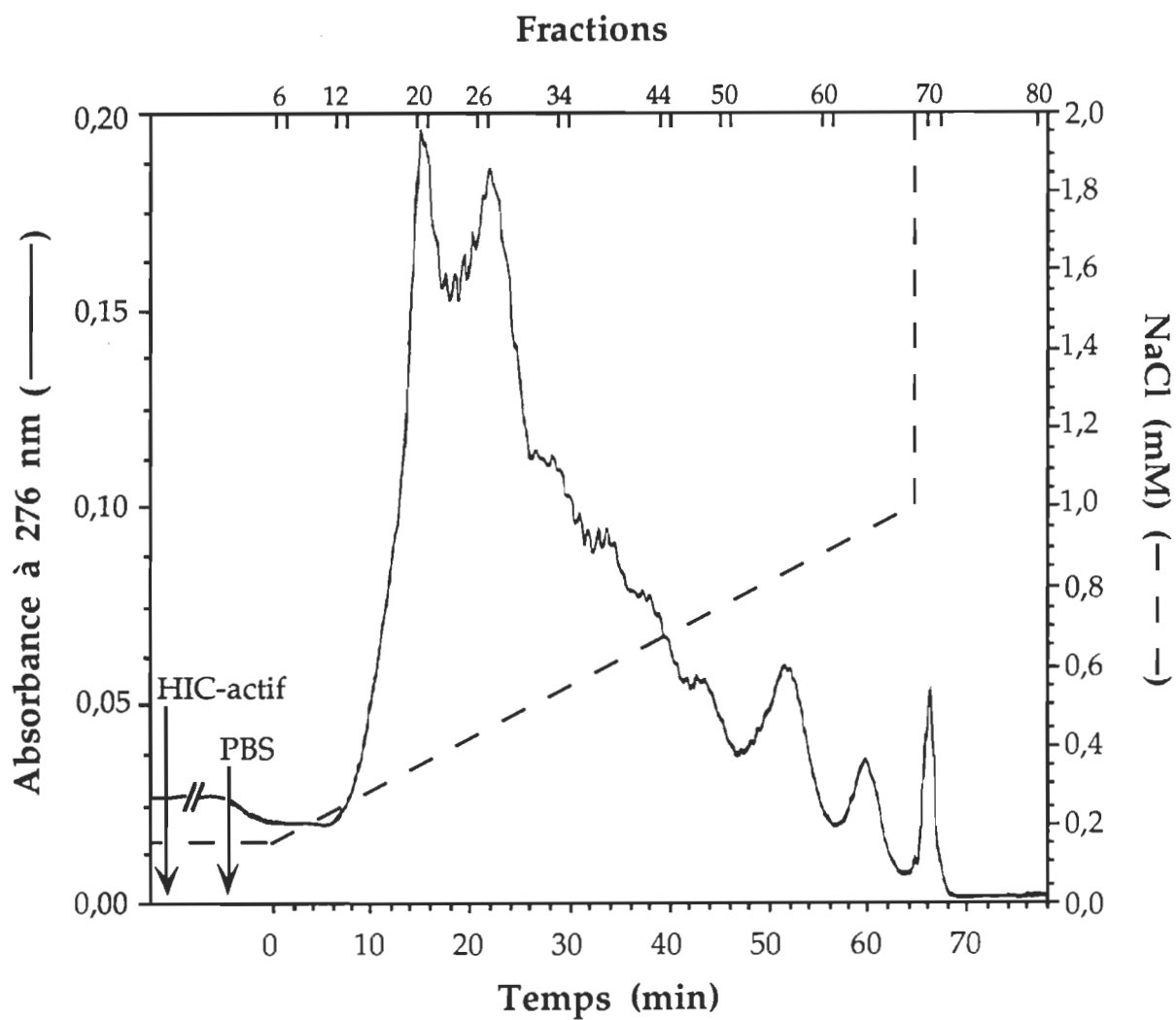


Figure 6.9: Profil d'éluion de la PLA2 du P200-36 sur CECg

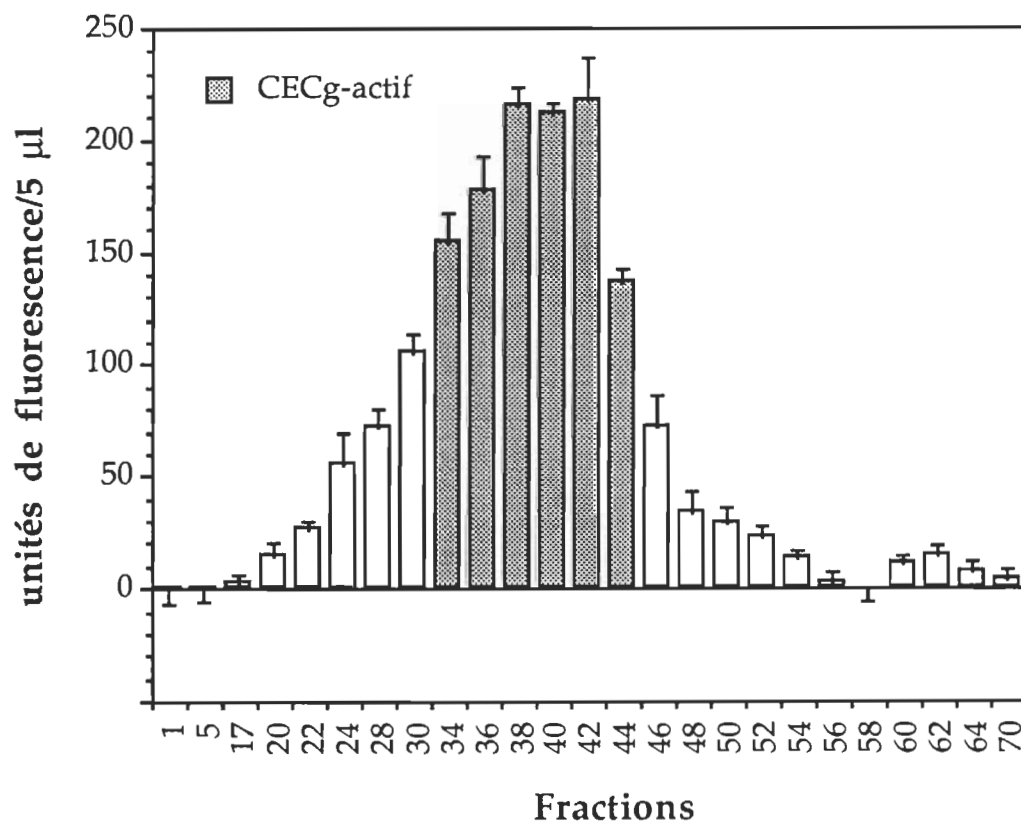


Figure 6.10: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la CECg

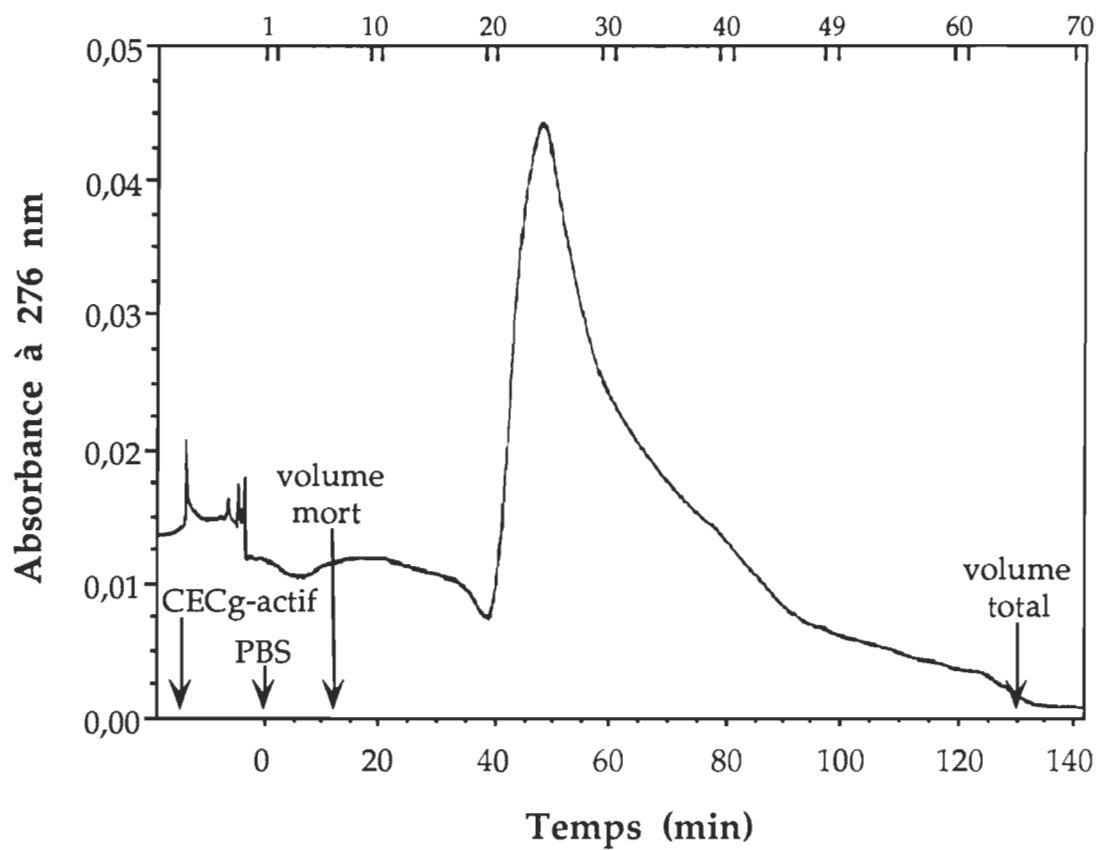


Figure 6.11: Profil d'éluion de la PLA2 du P200-36 sur GFC

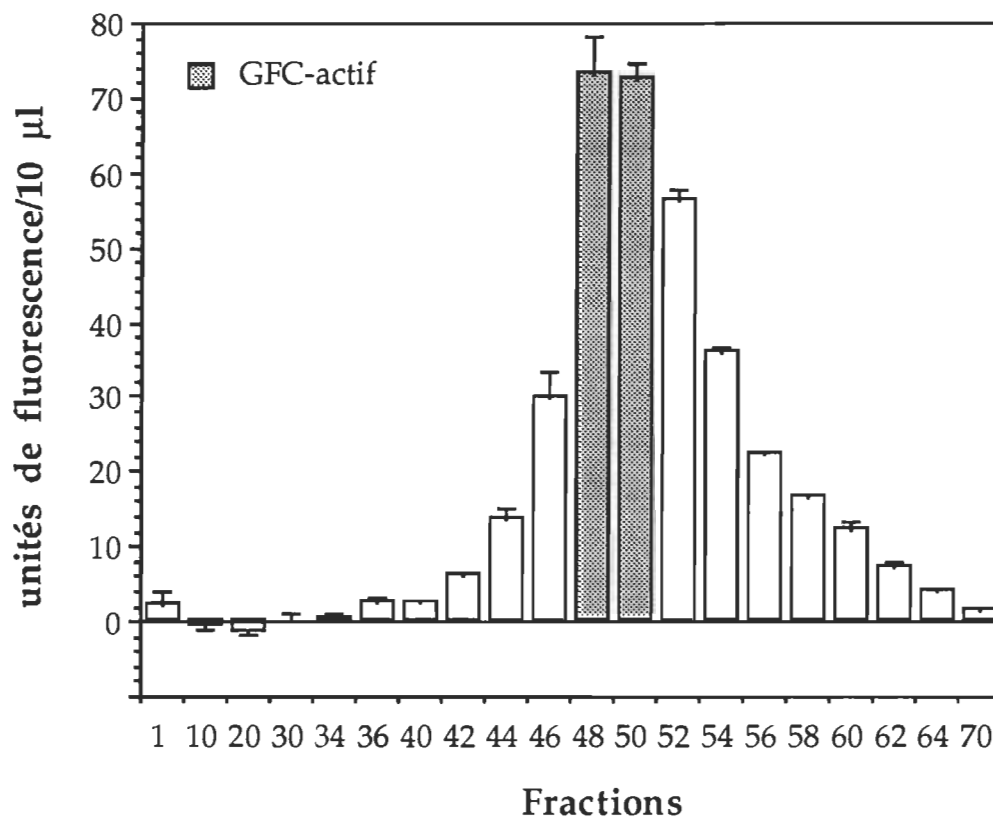


Figure 6.12: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la GFC

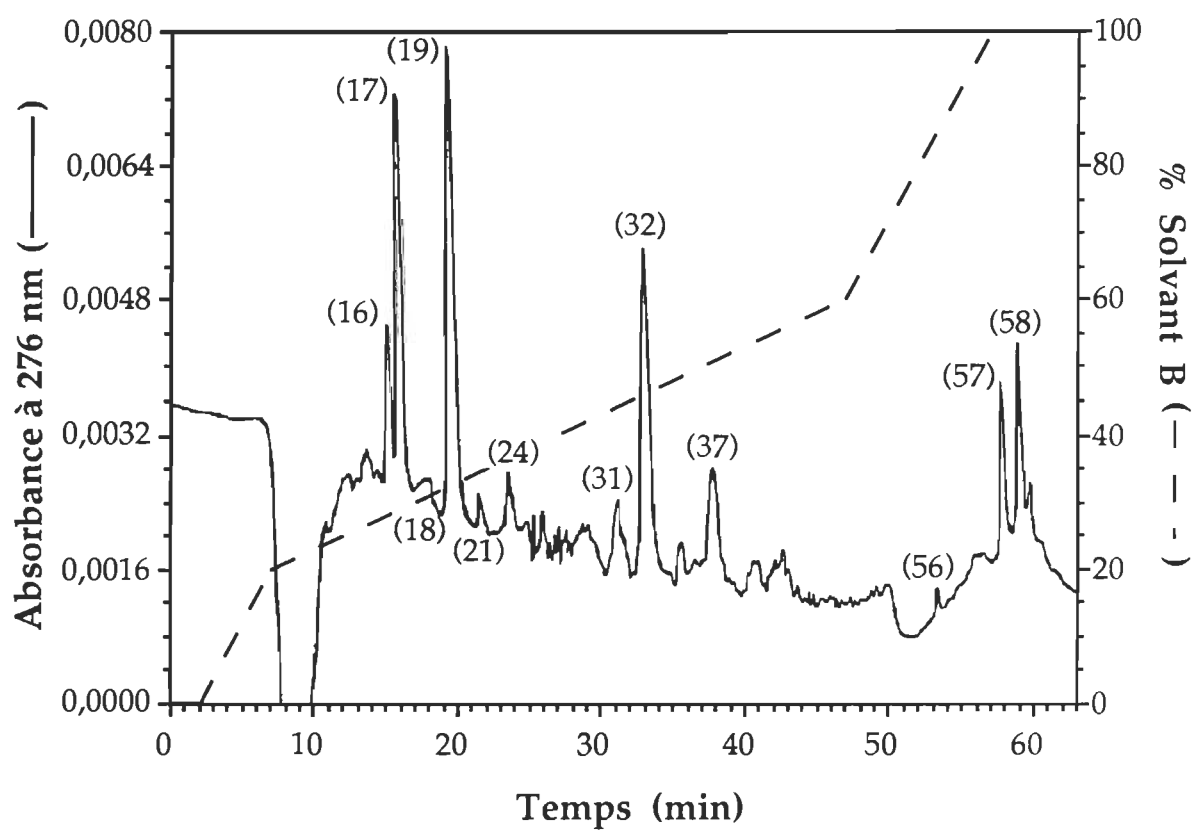


Figure 6.13: Profil d'élution de la PLA2 du P200-36 sur RPC

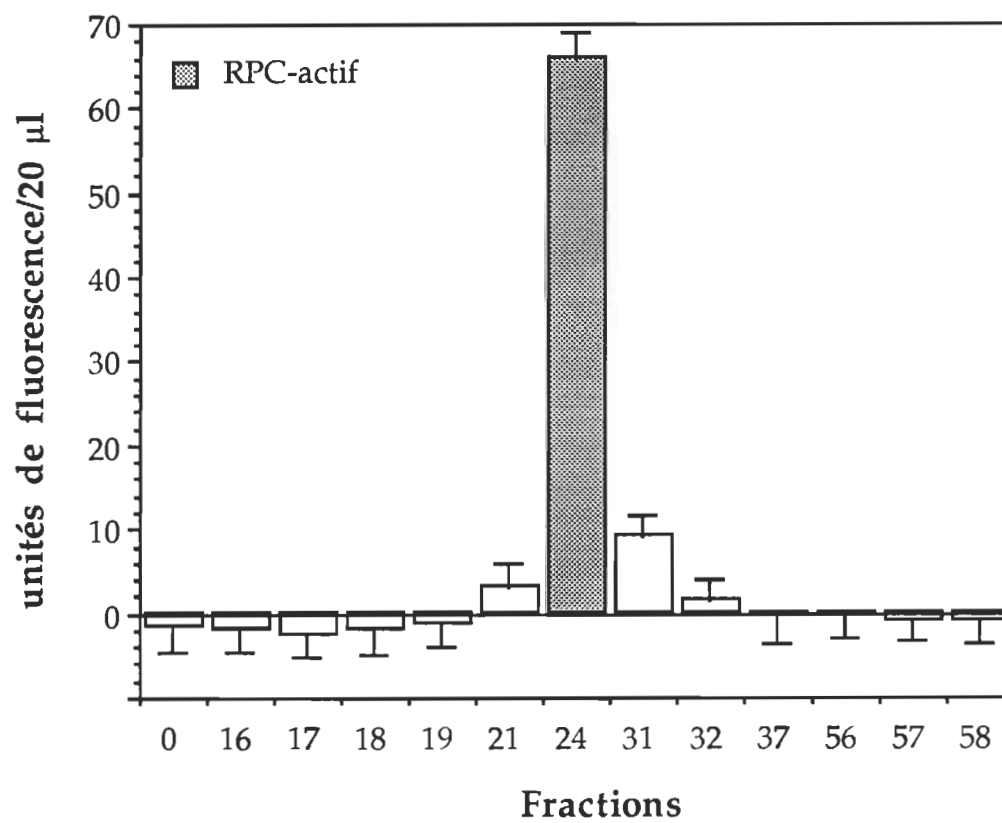


Figure 6.14: Distribution de l'activité PLA2 dans les fractions éluées de la RPC

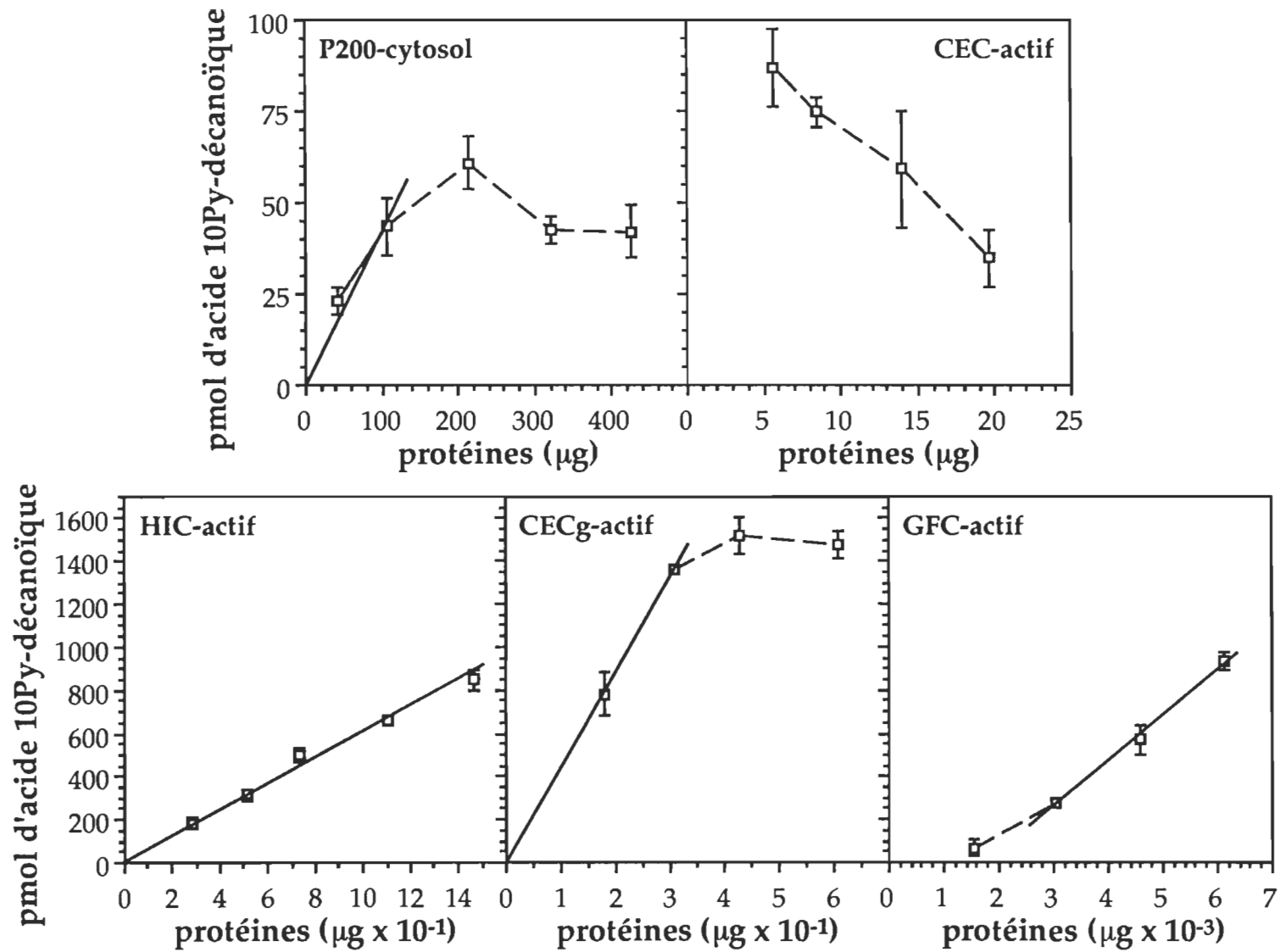


Figure 6.15: Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-, HIC-, CECg- et GFC-actif en fonction de la quantité de protéines

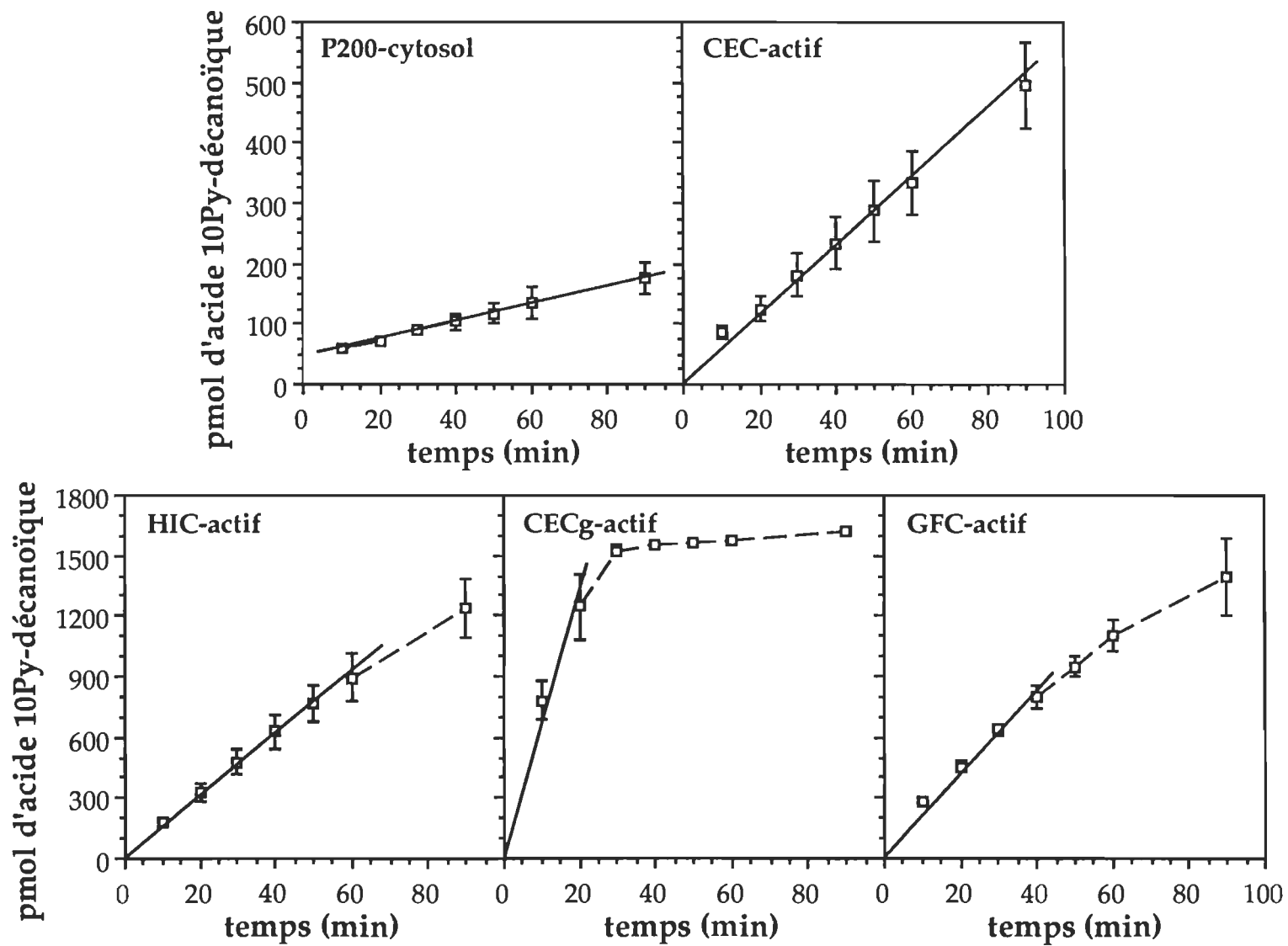


Figure 6.16: Activité PLA2 des P200-cytosol, CEC-, HIC-, CECg- et GFC-actif en fonction du temps

Chapitre 7

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Les résultats des chapitres 2 à 6 ont permis de démontrer que: 1) il n'y a pas d'activité PLA2 dans les ROS purifiés et intacts, 2) il y a probablement deux types de PLA2 différents (et peut-être plus) dans le RPE, une fraction fortement enrichie avec les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, 3) il y a probablement un minimum de quatre types de PLA2 différents dans le P200, une fraction très hétérogène qui contient présumément les cellules neuronales (bipolaires, horizontales, ganglionnaires et amacrines), les cellules de Müller et les segments internes de bâtonnets, et 4) la sensibilité des PLA2 du RPE et du P200 à divers traitements (H_2SO_4 , ATP, $GTP\gamma S$, EGTA, pBPB, DTT et chaleur) est telle qu'elles ne semblent appartenir à aucun groupe de PLA2 connues (sPLA2, cPLA2 et iPLA2). Ainsi, selon les résultats des chapitres 2 à 6, la classification des PLA2 rétiniennes pourrait éventuellement nécessiter l'ajout d'un ou plusieurs nouveau(x) groupe(s) et/ou sous-groupe(s) au schéma de classification actuel.

7.1 Hypothèses proposées pour le rôle des PLA2 dans le P200

Ayant démontré qu'il n'y avait pas d'activité PLA2 dans les ROS et que l'activité détectée par d'autres groupes (voir la section 1.12) était vraisemblablement due à une contamination de leurs préparations de ROS par les cellules du RPE et/ou du P200 (voir Chapitre 2), on peut facilement expliquer la variabilité relative au taux maximum d'activité rapporté par chacun des groupes par une variation du taux de contamination des ROS utilisés. Par ailleurs, en supposant que les préparations de ROS de Jelsema (1987) aient été davantage contaminées par les segments internes de bâtonnets⁵⁵ (présumément présents dans

⁵⁵ Il faut se rappeler que la méthode de préparation des ROS utilisées par Jelsema (1987) n'a jamais été décrite (voir la section 3.1).

le P200), on peut proposer une hypothèse expliquant l'absence de stimulation par la lumière dans nos conditions. En effet, il est possible qu'une PLA2 soit présente dans les segments internes de bâtonnets et qu'elle soit indirectement stimulée par la lumière, suite à l'activation de la cascade de phototransduction dans les ROS. Nous avons d'ailleurs vu antérieurement que l'activation de la cascade de phototransduction (au niveau du ROS) entraîne l'hyperpolarisation de tout le bâtonnet et en module la transmission synaptique (voir la section 1.4). Ceci suggère que certaines protéines des RIS, notamment celles qui sont responsables de l'exocytose des neurotransmetteurs, sont indirectement affectées par la lumière *in vivo* (i.e. lorsque les segments externe et interne des bâtonnets sont reliés l'un à l'autre).

Il est donc tout à fait probable et plausible d'imaginer que, lorsqu'il y a contamination des préparations de ROS par des segments internes⁵⁶ de bâtonnets et que ceux-ci sont reliés l'un à l'autre par le cil connectif, la lumière (captée au niveau du ROS) puisse indirectement activer une PLA2 propre aux segments internes. L'activation serait alors secondaire à la photoexcitation des ROS. Au contraire, lorsque les ROS sont bien purifiés et exempts de segments internes de bâtonnets, cet effet indirect de la lumière ne peut être détecté. Ceci pourrait expliquer la différence entre les résultats de Jelsema (1987) et Castagnet et Giusto (1993), qui ont observé un effet stimulateur de la lumière, et ceux de Zimmerman et Keys (1988) et Jacob *et al.* (1996), qui n'ont observé aucun effet de la lumière (voir Chapitre 2). Il sera donc intéressant d'isoler (éventuellement) des bâtonnets "entiers" pour s'assurer de la présence d'une PLA2 (ou

⁵⁶ Veuillez noter que, pour alléger le texte de la section 7.2, les noyau, terminaison synaptique et segment interne de bâtonnets sont indistinctement regroupés sous l'appellation "segment interne de bâtonnet".

plus) dans le segment interne et, advenant le cas, étudier sa régulation par la lumière, de même que son rôle. Il sera d'ailleurs tout aussi intéressant de déterminer sa localisation subcellulaire, car une PLA2 située dans la terminaison synaptique (voir Schéma 1.3) pourrait être impliquée dans la modulation de la transmission synaptique et/ou la régulation de l'exocytose des neurotransmetteurs (voir les sections 7.1.1 et 7.1.2, respectivement).

Bien sûr, les segments internes de bâtonnets ne représentent qu'un des six types de cellules que l'on présume être contenus dans le P200; les autres sont les quatre types de cellules neuronales (bipolaires, horizontales, ganglionnaires et amacrines) et les cellules gliales de Müller (voir la section 1.2). Il est donc plus que probable qu'un ou plusieurs types de cellules neuronales, ainsi que les cellules de Müller, expriment également au moins un type de PLA2. De plus, on sait en effet que l'hyperpolarisation des bâtonnets provoque la dépolarisation des cellules neuronales *in vivo* (i.e. lorsqu'elles sont connectées par une synapse) (voir la section 1.2). Cette réponse est donc également lumière-dépendante, quoiqu'indirectement. Considérant ceci, il est alors possible que l'activation de la PLA2 soit tertiaire à la photoexcitation des ROS. Une PLA2 localisée dans la terminaison synaptique des cellules neuronales pourrait ainsi être impliquée dans la modulation de la transmission synaptique et/ou l'exocytose des neurotransmetteurs, au même titre que la PLA2 des segments internes de bâtonnets (voir ci-dessus). Les caractéristiques biochimiques des différents types de PLA2 détectés dans le P200 (voir Chapitre 5), de même que leur mode de régulation (ex. lumière-dépendant ou non), dépendraient alors de l'environnement cellulaire propre à chacun des types de cellules neuronales sus-mentionnés.

7.1.1 Modulation de l'exocytose des neurotransmetteurs et de la transmission synaptique par l'acide arachidonique

Compte tenu de l'hétérogénéité cellulaire du P200, il est plutôt ardu de spéculer sur le rôle de chacune des PLA2 identifiées dans cette fraction subrétinienne (voir Chapitre 5). Cependant, plusieurs études ont démontré l'implication d'une PLA2 et/ou de l'acide arachidonique dans la modulation de l'activité synaptique des cellules nerveuses (Bazan. 1989; Herrero *et al.* 1992; Nicholls. 1992; Catania *et al.* 1993; Damron et Dorman. 1993; Durgerian *et al.* 1993; Mochizuki-Oda *et al.* 1993; Nakamura. 1993; Villaroel. 1993; Bramham *et al.* 1994; Farooqui et Horrocks. 1994; Hölscher et Rose. 1994; Lynch et Voss. 1994; Miyachi *et al.* 1994; Vasquez *et al.* 1994; Volterra *et al.* 1994). Par exemple, il a été démontré que l'activation des canaux potassiques (à l'origine du courant I_K) ou l'inhibition des canaux calciques (à l'origine du courant I_{Ca}), empêche l'exocytose des neurotransmetteurs dans certaines populations de neurones d'escargots (Durgerian *et al.* 1993). Or tel qu'illustré sur le Schéma 7.1, il semble qu'un dérivé métabolique de l'acide arachidonique⁵⁷ soit requis spécifiquement pour l'activation de ces canaux potassiques (Durgerian *et al.* 1993). D'un autre côté, Damron et Dorman (1993) et Mochizuki-Oda *et al.* (1993) ont observé un effet stimulateur de l'acide arachidonique sur les canaux calciques des cellules arborescentes d'hippocampe de rat et des cellules adrénales à chromaffine de boeuf, respectivement, activation qui résulterait en l'augmentation du Ca^{2+}_i et au relargage des neurotransmetteurs. Grâce à ses travaux réalisés avec des préparations de synaptosomes cérébrocorticaux de rats, l'équipe de Sanchez-Prieto a pour sa part remarqué une augmentation considérable de la sécrétion de glutamate, un

⁵⁷ Bien que le dérivé en question n'ait pas été clairement identifié, il s'agit d'un métabolite d'une lipoxygénase (Durgerian *et al.* 1993).

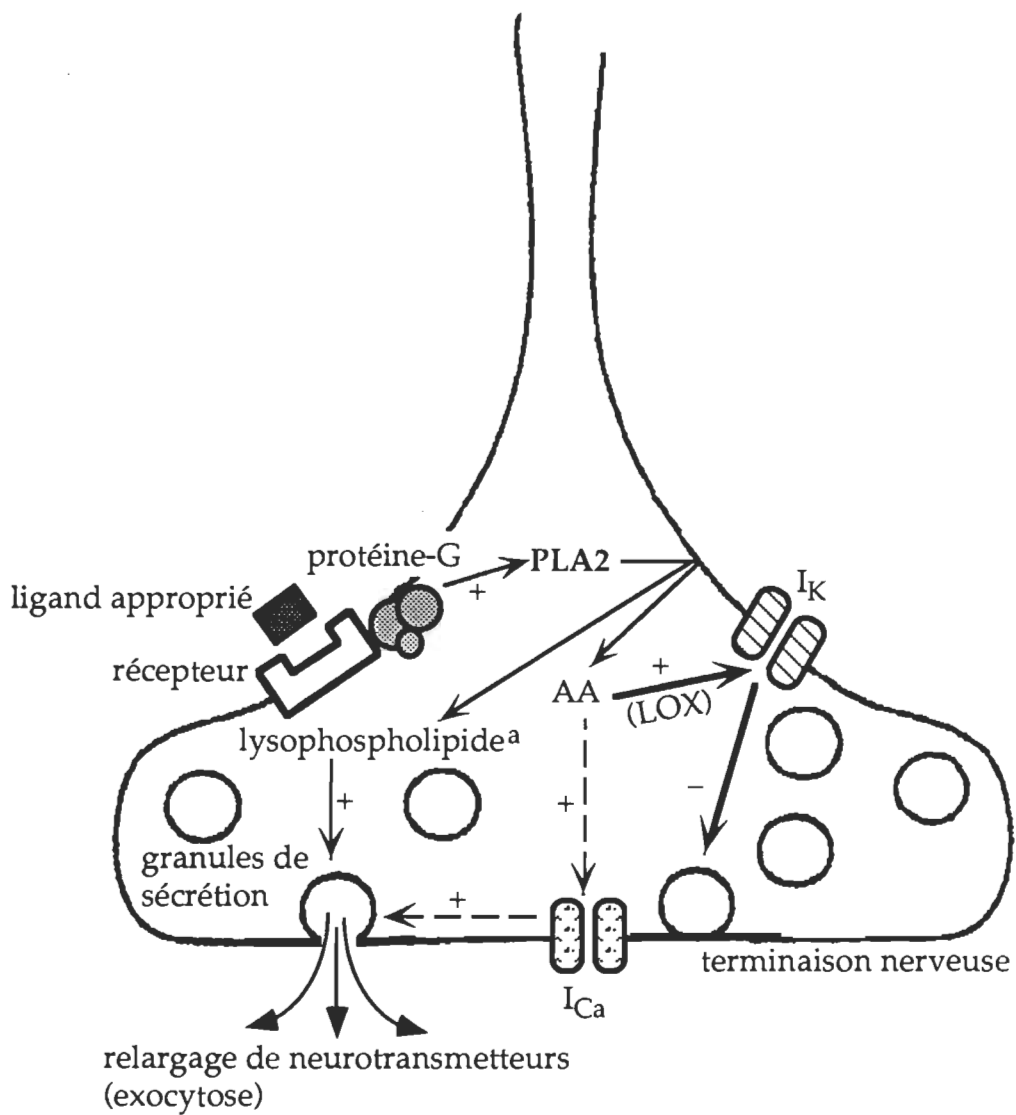


Schéma 7.1: Modulation de l'exocytose des neurotransmetteurs
et de la transmission synaptique

^a Notez que les lysophospholipides générés ne sont probablement pas libérés dans le cytoplasme. Ils sont seulement disposés ainsi pour le besoin de la cause.

acide aminé qui agit comme neurotransmetteur⁵⁸, en présence d'acide arachidonique (Herrero *et al.* 1992). De plus, ils ont noté que ce dernier n'avait aucun effet sur l'activité du récepteur à glutamate (Vasquez *et al.* 1994). Lynch et Voss (1994) ont également remarqué une corrélation entre la concentration d'acide arachidonique dans les membranes et la sécrétion de glutamate. Au contraire, les revues présentées par Farooqui et Horrocks (1994) et Volterra *et al.* (1994) font état de plusieurs travaux ayant montré une production d'acide arachidonique en réponse à l'activation des récepteurs à glutamate par le glutamate⁵⁹. Les travaux de Miller *et al.* (1992) suggèrent quant à eux que l'acide arachidonique, libéré en réponse à l'activation des récepteurs à glutamate (ou autres), potentialise l'activation de ces mêmes récepteurs. De plus, la récente revue de McEachern et Shaw (1996) met en lumière plusieurs autres résultats expérimentaux qui suggèrent l'implication d'une PLA2 dans la régulation de divers récepteurs post-synaptiques (autres que les récepteurs à glutamate).

Ainsi, malgré des différences de spécificité qui pourraient être dues au type de cellules nerveuses, au type d'animal (vertébré vs invertébré) ou au type de PLA2 étudié, les travaux sus-cités font tous état du rôle très important de l'acide arachidonique dans la régulation de la transmission synaptique et du processus inhérent d'exocytose des neurotransmetteurs. Ce rôle semble d'ailleurs d'autant plus important que de nombreux travaux ont permis d'associer diverses pathologies neurologiques (ex. la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie et

⁵⁸ Le glutamate est le principal neurotransmetteur de type acide aminé du système nerveux central (Farooqui et Horrocks. 1994) et il est également utilisé par les photorécepteurs, ainsi que les neurones rétiniens de type bipolaire et ganglionnaire (Berman. 1991; Wu. 1994; Kit Lam. 1997).

⁵⁹ Bien que l'objet de la présente discussion ne requiert pas de spécifications supplémentaires relativement au type de récepteur en question, notez qu'il en existe au moins cinq types, tous identifiables par leur agoniste sélectif (Farooqui et Horrocks. 1994).

l'ischémie) à une perturbation du métabolisme des phospholipides et une accumulation d'acides gras libres (revu par Bazan. 1989; Farooqui et Horrocks. 1994; Volterra *et al.* 1994). Il sera donc essentiel de poursuivre la purification de chacune des PLA2 du P200 afin d'en faire une caractérisation complète, d'identifier leur origine cellulaire et de générer des anticorps et/ou inhibiteurs spécifiques afin de mieux cerner leur rôle. Il sera notamment intéressant de comparer leur spécificité pour l'acide arachidonique *in vivo* et *in vitro*, ce qui permettra de vérifier l'implication de l'acide arachidonique dans le processus d'exocytose des neurotransmetteurs et de transmission synaptique (voir Schéma 7.1).

7.1.2 Modulation de l'exocytose des neurotransmetteurs et de la transmission synaptique par les lysophospholipides

En plus des nombreuses évidences relatives au rôle de l'acide arachidonique dans l'exocytose des neurotransmetteurs et la transmission synaptique qui s'ensuit (voir ci-haut), maints travaux suggèrent que les lysophospholipides générés par une PLA2 pourraient, eux aussi, jouer un rôle important dans ce processus. En effet, Kiyosue et Arita (1986), Burnashev *et al.* (1989), Oishi *et al.* (1990) et Eddlestone et Ciani (1991) ont observé un effet stimulateur des lysophospholipides sur l'activité de différents types de canaux ioniques. De plus, Lloret et Moreno (1995) ont démontré que les lysophospholipides, en particulier le lysophosphatidylsérine, induisent indirectement (via une augmentation du Ca^{2+}_i) la dégranulation des mastocytes et, conséquemment, l'exocytose de l'histamine.

Les résultats sus-décrits indiquent donc que les lysophospholipides générés par une (ou plusieurs) des PLA2 présentes dans le P200 pourraient, au mê-

me titre que l'acide arachidonique, agir comme messenger intracellulaire dans la régulation de l'exocytose des neurotransmetteurs et de la transmission synaptique. Ils indiquent également que ce sont les lysophospholipides mêmes, et non un dérivé métabolique, qui sont responsables des effets observés. Au contraire, une série d'études réalisées par l'équipe de Bazan (Bazan *et al.* 1993a; Bazan *et al.* 1993c; Kato *et al.* 1994; Bazan et Allan. 1996) a mis en valeur le rôle d'un métabolite des lysophospholipides, soit le "platelet-activating factor" ou PAF. Lors d'ischémie cérébrale, par exemple, la forte augmentation d'activité PLA2 est responsable (du moins en partie) de l'exocytose massive de glutamate, de l'activation des récepteurs à glutamate et de l'élévation du Ca^{2+} ; à des concentrations supraphysiologiques (Bazan et Allan. 1996). Or puisque le PAF a été identifié comme médiateur de ces effets, cela signifie qu'il serait à l'origine du mal-fonctionnement cellulaire découlant de la perturbation des cascades de signalisation Ca^{2+} -dépendantes. Le PAF pourrait donc moduler la transmission synaptique dans des conditions physiologiques, i.e. à faible concentration, et devenir neurotoxique dans des conditions pathologiques, i.e. à forte concentration.

Il sera donc important de déterminer la spécificité des différentes PLA2 du P200 (voir Chapitre 5), non seulement pour l'acide arachidonique (voir la section 7.1.1), mais également pour les différents types de phospholipides (voir la section 1.6). Il sera tout aussi important de déterminer les conséquences cellulaires physiologiques et/ou pathologiques de l'activation des PLA2 du P200 et d'en identifier le ou les médiateurs (acide arachidonique, lysophospholipide ou PAF)⁶⁰. Ceci devrait notamment permettre de 1) comparer les caractéristiques

⁶⁰ Les connaissances actuelles ne permettent pas de dire si les acide arachidonique, lysophospholipides et PAF sont produits par une seule et même PLA2 (Bazan *et al.* 1993c).

biochimiques et fonctionnelles des PLA2 de cette fraction subrétinienne avec celles des PLA2 sus-mentionnées (entre autres) et 2) vérifier l'implication des PLA2 du P200 dans la régulation du processus d'exocytose des neurotransmetteurs et de transmission synaptique découlant du processus de phototransduction (voir Schéma 7.1).

7.1.3 Cellules gliales, métabolisme de l'acide arachidonique et ischémie

Le P200 n'est pas seulement constitué de cellules nerveuses, mais aussi de cellules gliales, soit les cellules de Müller (voir Schéma 1.2, ainsi que la section 1.2). Or, sauf erreur, très peu de travaux ont porté sur l'étude des PLA2 dans ce type de cellule. Des articles de Chan et Fishman (1978), Unterberg *et al.* (1987) et Staub *et al.* (1994a, 1994b) ont toutefois mis en évidence le rôle de l'acide arachidonique, un produit d'hydrolyse des PLA2 (voir la section 1.10), dans l'induction (*in vivo* et *in vitro*) de la turgescence cytotoxique des cellules gliales de cerveau. Les études de Staub *et al.* (1994a et b), de même que celles de Kuwashima *et al.* (1976) et Hillered et Chan (1988), ont par ailleurs montré que l'acide arachidonique⁶¹ favorise la production d'énergie (ATP) via la glycolyse et ce, en inhibant la phosphorylation oxydative mitochondriale. Par conséquent, l'accumulation d'acide lactique qui résulte de la glycolyse provoque une acidose cellulaire. Chan *et al.* (1988) et Braugher et Hall. (1989) ont quant à eux montré la présence de dérivés peroxydés d'acide arachidonique dans les astrocytes, un autre type de cellules gliales⁶². Selon ces auteurs, la turgescence, l'acidose et la présence de dérivés lipidiques peroxydés sont trois symptômes cellulaires ob-

⁶¹ L'acide arachidonique était ajouté de façon exogène, à des concentrations équivalentes à celles qui prévalent lors d'ischémie cérébrale, mais était rapidement internalisé (Staub *et al.* 1994b).

⁶² Les astrocytes sont, tout comme les cellules de Müller, présents dans la rétine des mammifères (Chan-Ling, 1994). Leur nombre est toutefois bien inférieur, d'où leur absence sur le Schéma 1.2.

servables lors d'ischémie cérébrale.

À la lumière de ces résultats, on peut donc s'attendre à ce que les éventuelles analyses immunohistochimiques, réalisées sur des coupes de rétines avec divers anticorps anti-PLA2, révèlent la présence d'au moins une PLA2 dans les cellules de Müller. Évidemment, puisque les PLA2 du P200 semblent être différentes des PLA2 connues (voir Chapitre 5) et qu'elles pourraient appartenir à un nouveau groupe ou sous-groupe, il est fort possible que la purification des PLA2 rétiniennes doive être complétée avant de procéder aux analyses immunohistochimiques. Autrement dit, il faudra peut-être produire différents anticorps anti-PLA2 rétiniennes afin de les détecter spécifiquement. Et advenant la présence d'une telle PLA2 dans les cellules de Müller, leur mise en culture selon la méthode décrite par Staub *et al.* (1994a et b) et Härtig *et al.* (1995) pourrait alors permettre de 1) répéter certaines des expériences effectuées par les auteurs sus-mentionnés, 2) comparer les effets de l'acide arachidonique sur les cellules de Müller dans des conditions physiologiques et pathologiques, 3) comparer les effets de l'acide arachidonique sur les cellules de Müller et autres cellules gliales et 4) mieux comprendre le rôle de la PLA2 dans les cellules de Müller et dans les cellules gliales en général.

Les nombreux éléments d'information qui ont été tirés de la littérature et présentés à la section 7.1 suggèrent fortement que chacun des types de cellules retrouvé dans le P200 est susceptible de contenir au moins un type de PLA2. De plus, puisque plusieurs équipes ont noté une corrélation entre l'accumulation supraphysiologique des produits d'hydrolyse des PLA2 (ou leurs dérivés métaboliques) et diverses maladies neurodégénératives, on peut d'ores et déjà pré-

sumer que chacune des PLA2 du P200 joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle de la rétine. Nous avons d'ailleurs entrepris la purification de l'une d'entre elles (voir Chapitre 6), soit la PLA2 de la fraction P200-36, dont l'activité s'est avérée la plus enrichie lors d'une caractérisation préliminaire (voir Figure 5.2 et Tableau 5.2). Il faudra évidemment suivre une procédure similaire en utilisant les deux autres fractions PLA2-actives du P200, soit les P200-1 et P200-3, afin de séparer les trois PLA2 qui semblent y être présentes (voir Figure 5.2, ainsi que les tableaux 5.2-5.4). De même, il faudra répéter ce genre d'expérience avec le RPE qui, selon toute vraisemblance, contient un minimum de deux PLA2 différentes (voir Chapitre 5) pouvant chacune jouer un rôle tout aussi important.

7.2 Hypothèses proposées pour le rôle des PLA2 dans le RPE

Tel que décrit dans les sections 1.15 et 1.16, la contribution des cellules du RPE au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des ROS est extrêmement importante. À cause de sa grande capacité de phagocytose spécifique des ROS, le RPE joue en effet un rôle crucial dans le processus quotidien de renouvellement des ROS. Par ailleurs, de nombreuses études ont permis de démontrer que, suite à la dégradation des phagosomes (segments apicaux de ROS ayant été phagocytés) dans les cellules du RPE, il y a recyclage du DHA vers les segments internes de bâtonnets. L'idée qu'une PLA2 présente dans les cellules du RPE puisse être impliquée dans ce processus de recyclage du DHA apparaît donc particulièrement séduisante. Cette hypothèse semble d'autant plus intéressante que l'intervention d'une PLA2 pourrait être requise à deux niveaux: soit pour l'hydrolyse spécifique du DHA qui précède le recyclage, soit pour le processus de fusion membranaire permettant aux enzymes lysosomales du RPE

d'accéder à leur substrat (contenu dans les phagosomes). Une PLA2 située dans le RPE pourrait même hydrolyser et éliminer spécifiquement les DHA peroxydés présents dans les phagosomes, empêcher leur recyclage vers les segments internes de bâtonnets et empêcher la synthèse de disques défectueux (voir la section 1.3). Deux PLA2, respectivement sélectives pour les DHA natifs et peroxydés, pourraient ainsi permettre d'assurer 1) le recyclage des DHA natifs vers les segments internes de bâtonnets et 2) l'élimination des DHA peroxydés. Alternativement, une seule PLA2 pourrait hydrolyser les DHA natifs et peroxydés. Un mécanisme de tri des DHA natifs et peroxydés serait alors requis pour empêcher le recyclage de ces derniers. Enfin, tel que suggéré par certains auteurs, une PLA2 présente dans le RPE pourrait contribuer à la formation de docosanoïdes, des métabolites du DHA, qui pourraient avoir un rôle similaire à celui des eicosanoïdes (voir les sections 1.9 et 1.10) ou encore un rôle plus spécifique. Chacune de ces hypothèses est présentée dans les sections 7.2.1 à 7.2.4.

7.2.1 Recyclage des acides docosahexaénoïques natifs vers les segments internes de bâtonnets

Tel que mentionné antérieurement (voir la section 1.7), les phospholipides des ROS sont hautement enrichis en DHA. Or puisqu'il n'est pas synthétisé *de novo* par les cellules animales, le DHA, ou son précurseur (l'acide linoléique; 18:3 ω 3), doit être fourni par l'alimentation. Après élongation et désaturation de ce dernier au niveau du foie, le DHA résultant est libéré dans le plasma puis transporté vers la rétine, tout comme le DHA provenant de la diète. Le RPE, qui contrôle les échanges de nutriments entre la circulation sanguine et les photorécepteurs (voir Tableau 1.13), est alors responsable de l'internalisation et de la livraison sélective du DHA aux segments internes de photorécep-

teurs (au niveau desquels il y a synthèse des constituants des disques des ROS; voir la section 1.3). Il y a donc, en autant que le régime alimentaire le permette, une livraison régulière de DHA en provenance du foie et ce, via un mécanisme connu sous le nom de "longue boucle" (revu par Anderson *et al.* 1992; Bazan *et al.* 1993b). Des études ont toutefois démontré que, soumis à une diète déficiente en DHA, les ROS conservent tout de même un taux de DHA normal et ce, longtemps après que le DHA plasmatique ait atteint une concentration négligeable. C'est ce qui a permis aux équipes d'Anderson et de Bazan d'élaborer le modèle de recyclage du DHA entre le RPE et les segments internes de bâtonnets, via le mécanisme de la "courte boucle" qui n'est cependant pas encore entièrement résolu (voir Schéma 7.2) (Bazan *et al.* 1986; Stinson *et al.* 1991; Anderson *et al.* 1992; Gordon *et al.* 1992; Bazan *et al.* 1992a; Bazan *et al.* 1992b; Chen et Anderson. 1992; Wang et Anderson. 1992; Wang *et al.* 1992; Bazan *et al.* 1993b; Chen et Anderson. 1993).

Puisque le renouvellement des photorécepteurs est assuré par l'équilibre entre la phagocytose de l'apex des ROS et la synthèse de nouveaux disques à la sa base (voir la section 1.3), qu'il existe un mécanisme de conservation du DHA dans la rétine (courte boucle; voir Schéma 7.2) et que la quasi-totalité du DHA est acylée dans les phospholipides (voir la section 1.7), il est tout à fait probable qu'une PLA2 présente dans le RPE soit directement impliquée dans le recyclage du DHA. C'est-à-dire qu'au cours du processus de dégradation des phagosomes par le RPE (revu par Feeney. 1973; Chaitin et Hall. 1983; LaVail. 1983; Dudley *et al.* 1984; Besharse. 1986; Berman. 1991; Bosch *et al.* 1993; McLaughlin *et al.* 1994), une PLA2 pourrait hydrolyser spécifiquement le DHA natif (non-peroxydé), de

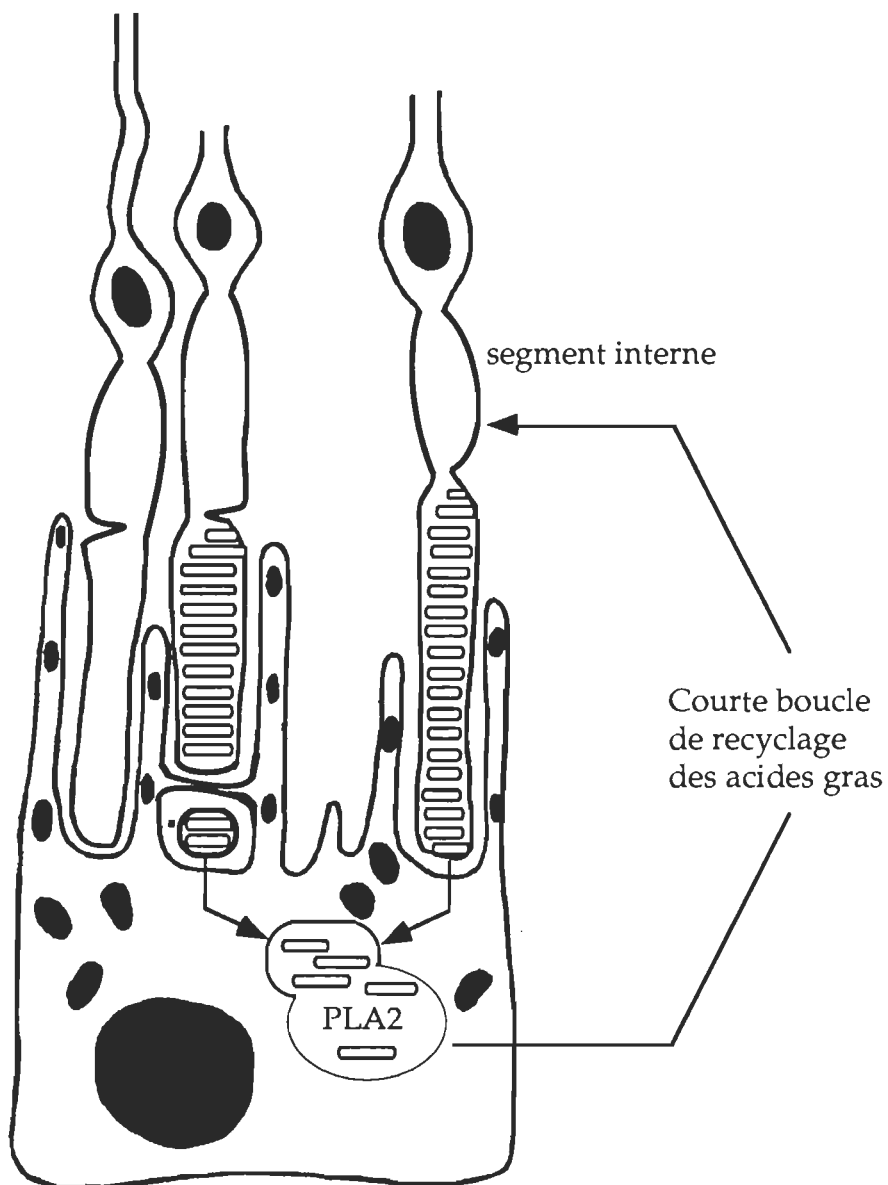


Schéma 7.2: Implication d'une PLA2 dans le mécanisme de recyclage du DHA vers les segments internes de bâtonnets

sorte qu'il devienne "exportable"⁶³, puis réutilisable par les segments internes de photorécepteurs (voir Schéma 7.2). Ainsi, le mal fonctionnement (ou l'absence) de cette PLA2 pourrait entraîner une accumulation de matériel phagosomal non-digéré dans le RPE, ralentir ou empêcher le processus de renouvellement des ROS et, ainsi, être en cause lors de certaines pathologies dégénératives de la rétine. La dégénérescence maculaire liée à l'âge et la rétinite pigmentaire sont d'ailleurs caractérisées par un engorgement des cellules du RPE (dû à l'accumulation de matériel incomplètement dégradé) et la dégénérescence des photorécepteurs (revu par Bazan et Scott. 1987; Converse *et al.* 1987; D'Amico. 1994; Daiger *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1995; Curcio *et al.* 1996).

7.2.2 Élimination des acides docosahexaénoïques peroxydés

Le rôle d'une des PLA2 du RPE pourrait tout aussi bien consister en l'hydrolyse spécifique des PUFA peroxydés (en particulier le DHA parce que majoritaire; voir Tableau 1.5). Cette hypothèse a déjà été évoquée pour expliquer le rôle possible d'une PLA2 dans les ROS (voir la section 1.13.1). Or bien qu'il n'y ait pas de PLA2 dans les ROS (voir Chapitre 2), les phospholipides des ROS n'en demeurent pas moins susceptibles à la peroxydation (voir les sections 1.8 et 1.13.1). Il est donc tout à fait probable que la PLA2 responsable d'éliminer les DHA peroxydés se retrouve dans le RPE (voir Schéma 1.10). Dans ce cas, on peut même envisager que le RPE puisse être responsable du tri du DHA. C'est-

⁶³ Le transport du DHA vers les photorécepteurs nécessite l'existence de protéines transporteuses d'acides gras (FABP pour "fatty acid binding protein"). Les FABP ont été mises en évidence dans de nombreux organes, tels que le foie, l'intestin, l'estomac, les reins, le cerveau, le coeur et autres (revu par Kaikus *et al.* 1990; Veerkamp *et al.* 1991; Borchers et Spener. 1994). Ainsi, le DHA en provenance du foie serait majoritairement transporté par l'albumine, une protéine plasmatique majeure qui contiendrait de deux à six sites de liaison pour les acides gras (Veerkamp *et al.* 1991). Le DHA recyclé via le RPE serait quant à lui vraisemblablement transporté par les IRBP ("interphotoreceptor retinoid binding protein"). D'autres FABP pourraient toutefois être aussi impliquées (Bazan *et al.* 1993b).

à-dire que si le DHA est natif, il est recyclé vers les segments internes des photorécepteurs via la courte boucle (voir Schéma 7.2). Au contraire, si le DHA est peroxydé, il est dégradé sur place ou éliminé.

7.2.3 Fusion membranaire menant à la formation des phagosomes et/ou des phagolysosomes

Toujours en rapport avec le processus quotidien de renouvellement des photorécepteurs et la dégradation des phagosomes qui s'y rattache, il est possible qu'une PLA2 présente dans les cellules du RPE puisse faciliter le mécanisme de fusion membranaire et ce, à deux étapes importantes. Tout d'abord, la PLA2 pourrait être impliquée dans la formation du phagosome. En effet, il semble qu'un phagosome soit formé par étranglement de la portion apicale d'un ROS; c'est la membrane des courtes microvilli, lesquelles enveloppent la portion apicale des ROS (voir la section 1.15), qui serait à l'origine de cet étranglement, menant ainsi à la ségrégation des disques apicaux des ROS. Il y aurait ensuite fusion des segments membranaires de microvillus en contact⁶⁴, de façon à former un phagosome proprement dit, i.e. une organelle isolée (voir Schéma 7.3) (revu par Bok et Young. 1979; Steinberg et Wood. 1979; Zinn et Benjamin-Henkind. 1983; Besharse. 1986; Clark. 1986; Berman. 1991).

La PLA2 -qu'il s'agisse de la même ou d'une autre- pourrait également

⁶⁴ Aucune des revues traitant de la formation des phagosomes ne fait allusion au mécanisme de "réparation" de la membrane plasmique du ROS au moment de la ségrégation de sa portion apicale. Or, puisqu'il n'y a pas de PLA2 dans les ROS pour faciliter un processus de fusion membranaire (voir le Chapitre 2), on peut supposer que, dû à l'absence de cytosquelette pour soutenir la membrane plasmique du ROS (voir la section 3.4), celle-ci est particulièrement fragile et donc, facilement rompue lors de l'étranglement du ROS par la microvillus du RPE. Elle pourrait ensuite se resceller automatiquement, comme cela se produit au niveau du cil connectif après isolement du ROS (voir la section 3.1).

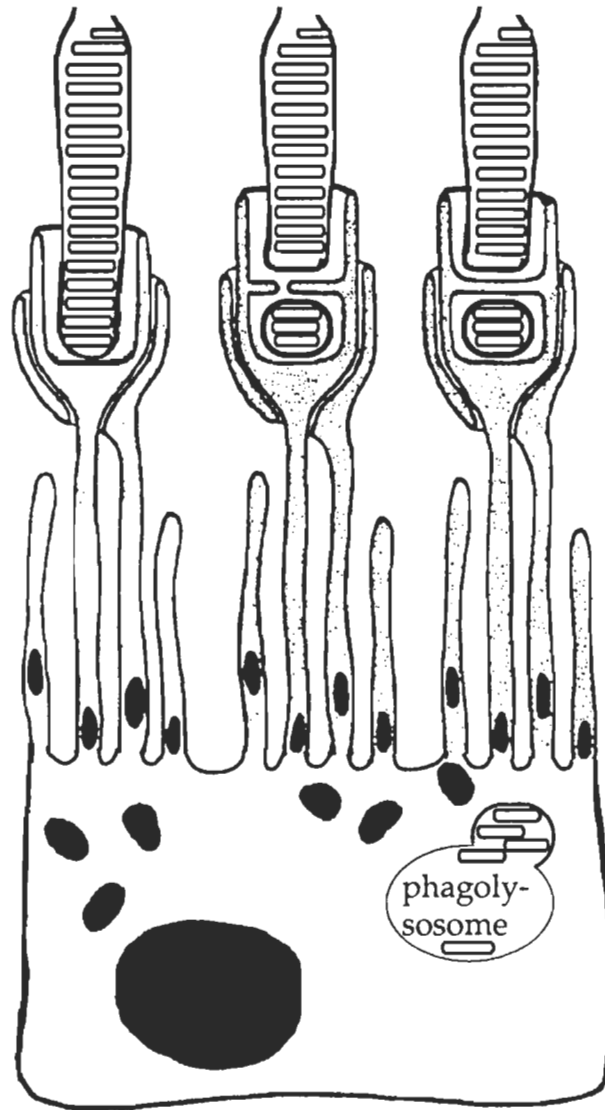
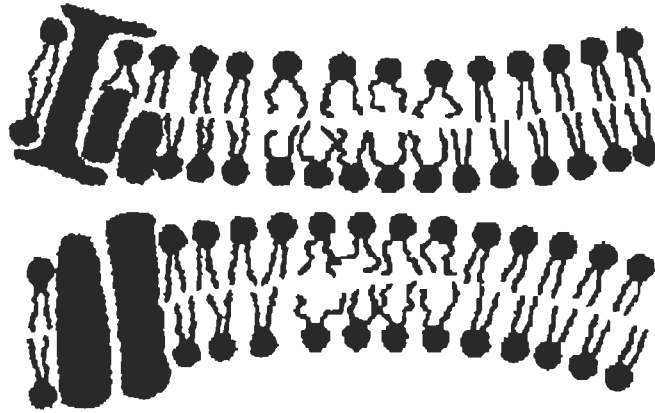


Schéma 7.3: Mécanisme de formation des phagosomes et des phagolysosomes

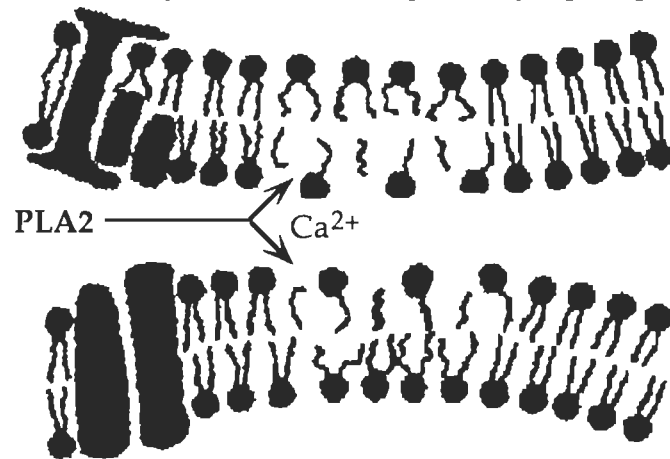
contribuer à la formation du phagolysosome en facilitant la fusion membranaire entre le phagosome et les lysosomes du RPE (voir les schémas 7.3 et 7.4). La dégradation des phagosomes par les enzymes lysosomales nécessitent le remilage du contenu des deux organelles et donc, la fusion de celles-ci. Or bien que le mécanisme de fusion membranaire ne soit pas encore élucidé (revu par Wilschut et Hoekstra. 1984; Papahadjopoulos *et al.* 1990; Wilson *et al.* 1991; Creutz. 1992; White. 1992; Söllner. 1995), il a été démontré que la présence d'une PLA2 ou d'un de ses principaux produits d'hydrolyse (l'acide arachidonique ou le lysophospholipide) induisait, ou du moins facilitait, la fusion membranaire entre deux populations différentes de vésicules lipidiques (Lavoie *et al.* 1991; Morin *et al.* 1992; Slomiany *et al.* 1992; Mayorga *et al.* 1993; Morgan *et al.* 1993; Paiement *et al.* 1994; Blackwood *et al.* 1996).

Dans un même ordre d'idée, une étude de Heth *et al.* (1995) a démontré qu'une défektivité dans le mécanisme d'ingestion des phagosomes par le RPE était à l'origine de la dégénérescence des photorécepteurs chez les rats dystrophiques de type RCS ("Royal College of Surgeons"). Il était déjà bien établi que la cause de cécité chez ces rats réside dans l'incapacité de leur RPE à phagocyter les ROS (Herron *et al.* 1969; Bok et Hall. 1971; LaVail *et al.* 1975). Cette étude a quant à elle permis de confirmer que la liaison des phagosomes à la membrane plasmique du RPE est normale, indiquant que les interactions extracellulaires ROS-RPE sont normales. Au contraire, le taux d'ingestion des phagosomes par le RPE est beaucoup plus faible chez les rats RCS. Cette étude a également permis de mettre en évidence qu'en induisant artificiellement la production d'IP₃ (inositol triphosphate; un second messenger intracellulaire) dans les cellules de RPE des rats RCS, on peut restaurer la capacité phagocytaire de ces cellules. Ces

A) Désordre membranaire (défaut d'entassement)



B) Hydrolyse des phospholipides par la PLA2 et libération des produits d'hydrolyse (acides gras et lysophospholipides)



C) Formation d'une structure membranaire intermédiaire

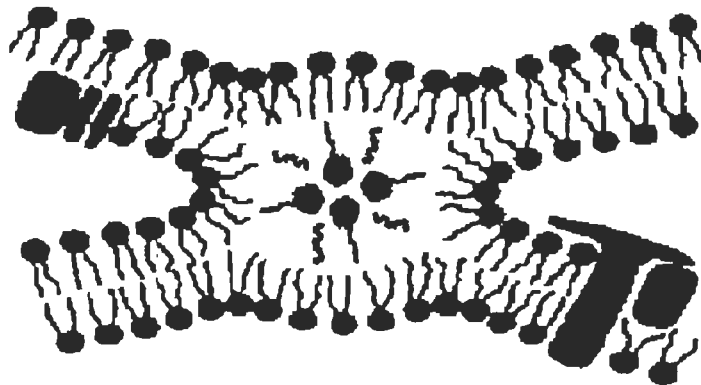


Schéma 7.4: Implication d'une PLA2 dans le processus de fusion membranaire

informations, de concert avec celles relatives à la présence d'activité PLA2 dans le RPE (voir Chapitre 5) et celles indiquant que le patron de phosphorylation des protéines du RPE est différent chez les rats RCS (Heth et Schmidt. 1992), cadrerait donc très bien avec l'implication d'une PLA2 dans le processus de fusion membranaire requis pour la ségrégation du phagosome, lequel est préalable à son ingestion. La PLA2 pourrait en effet être indirectement activée via une augmentation de la concentration de Ca^{2+}_i (conséquence à la production d' IP_3) et/ou sa phosphorylation par une protéine kinase (tel que décrit pour les cPLA2; voir Tableau 1.8). Une déficience qui empêcherait la formation d' IP_3 , l'augmentation subséquente de Ca^{2+}_i et la phosphorylation adéquate des protéines pourrait alors empêcher la formation et l'ingestion du phagosome (voir les schémas 7.2-7.5).

7.3 Activité optimale des PLA2s rétiniennes à pH alcalin et physiologie cellulaire

À la lumière des résultats rapportés à la section 1.10, le rôle des PLA2 du RPE et du P200 pourrait s'avérer bien différent de ce qui vient d'être discuté aux sections 7.1 et 7.2. Cependant, compte tenu des nombreuses particularités des cellules rétiniennes (composition phospholipidique des ROS, boucle spécifique de recyclage du DHA entre le RPE et les photorécepteurs, etc.), seules les hypothèses nous apparaissant les plus intéressantes dans ce contexte ont été décrites.

Une des particularités de la plupart des PLA2, incluant les PLA2 rétiniennes, est que leur activité enzymatique est optimale à pH alcalin (voir Figure 2.9, ainsi que les tableaux 1.7-1.9). Or ceci peut sembler assez surprenant, voire non-physiologique, lorsqu'on considère que le pH cellulaire normal est neutre (7,0-

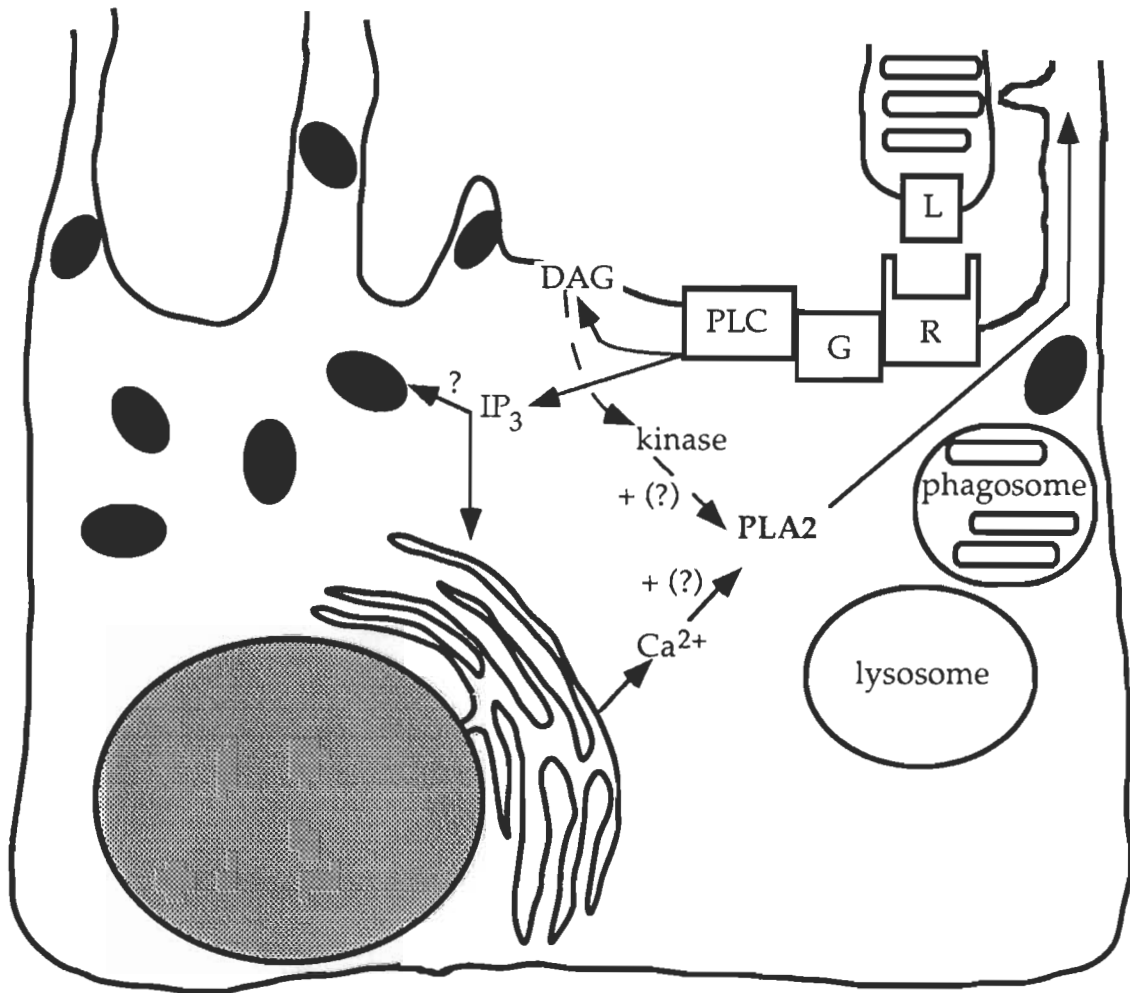


Schéma 7.5: Implication d'une PLA2 dans la formation des phagosomes^a

^a L, ligand; R, rhodopsine; G, protéine-G; PLC, phospholipase C; DAG, diacylglycérol; IP₃, inositol triphosphate; PLA2, phospholipase A2.

7,4). Ces PLA2 fonctionnent-elles à un pH inférieur à leur pH optimal? Existe-t-il une organelle cellulaire dont le pH est alcalin? Est-ce que la présence de domaines membranaires ayant une composition lipidique particulière serait suffisante pour créer des microenvironnements alcalins? Voilà trois hypothèses intéressantes. Il est en effet possible que les PLA2 ne fonctionnent pas exactement à la valeur optimale de pH ou encore que le pH optimum *in vivo* soit différent de celui mesuré *in vitro*.

Le pH du milieu influence l'état d'ionisation de l'enzyme, i.e. sa stabilité. Il modifie également son association avec le substrat et, par conséquent, agit sur la vitesse de réaction catalytique. La diminution d'activité en-deçà de la zone de pH optimum est donc due soit à des interactions ioniques inappropriées entre l'enzyme et son substrat, soit à l'inactivation de l'enzyme, soit à une combinaison de ces deux effets (Segel. 1975; Price et Stevens. 1989; Pelmont. 1995). Or la stabilité d'une enzyme en fonction du pH dépend de nombreux facteurs, tels la température, la force ionique du milieu, la nature chimique du tampon, la concentration d'ions métaux contaminants, de même que la concentration de l'enzyme, de ses cofacteurs et du substrat. Ainsi, tous ces différents paramètres peuvent induire un changement conformationnel de l'enzyme, de façon à ce qu'elle soit plus ou moins résistante à la dénaturation par le pH. Chacun de ces paramètres peut également moduler les interactions enzyme-substrat et influencer la détermination du pH optimum. Par exemple, l'étude de Womack et Colowick (1979) a montré que l'aluminium, présent à l'état de contaminant dans les préparations commerciales d'ATP, inhibait l'activité de certaines hexokinases lorsque mesurée à un pH inférieur ou égal à 7 seulement. Aucun effet n'a été observé à un pH égal ou supérieur à 7,5. De même, Wells et Lees (1991)

ont noté un effet inhibiteur du tampon TES (utilisé à pH 6,5, 7,0 et 7,5) sur l'activité d'une amidohydrolase, comparativement aux tampons MES (utilisé à pH 6,5 et 7,0) et TAPS (utilisé à pH 7,5). Li *et al.* (1990) ont quant à eux remarqué un effet inhibiteur du Tris-HCl (par rapport à un tampon phosphate) sur l'activité d'une déshydratase, alors que nous-même avons rapporté un effet inhibiteur important des tampons Tris-HCl, cacodylate et imidazole (voir la section 2.5).

Il est tout aussi important de rappeler que les dosages enzymatiques sont généralement faits dans des conditions qui diffèrent considérablement de celles qui prévalent *in vivo*, l'organisation subcellulaire normale n'existant plus au moment de faire les mesures. Ce changement pourrait donc amplement suffire à modifier significativement les caractéristiques des enzymes. Quelques cas ont d'ailleurs été rapportés à ce sujet, pour lesquels l'étude *in vitro* des cinétiques enzymatiques (au pH optimal) a conduit à de mauvais résultats lorsqu'interprétés dans un contexte cellulaire physiologique, i.e. *in vivo* (Price et Stevens. 1989; Pelmont. 1995). D'un autre côté, les travaux de Li *et al.* (1990) et Schmitz *et al.* (1995) ont montré que, bien que le pH optimum des deux enzymes étudiées soit de 8, elles gardaient néanmoins plus de 50% (déshydratase) et 80% (racémase) de leur activité à des pH de 6 ou 10 et 6,5 ou 9, respectivement. Ceci suggère donc que les enzymes, incluant les PLA2, n'auraient peut-être pas nécessairement besoin de fonctionner à leur pH optimum pour remplir efficacement leur tâche. Alternativement, les PLA2 (et autres enzymes sus-mentionnées) pourraient bel et bien exercer leur rôle à leur pH optimum alcalin car il semble qu'il n' y ait pas seulement des compartiments acides tels les lysosomes, mais également des compartiments alcalins, soit les peroxisomes.

Plusieurs équipes ont caractérisé des enzymes cellulaires (autres que les PLA2) dont le pH optimum s'est avéré être alcalin⁶⁵, allant même jusqu'à 9,5 (Tolbert. 1981; Douma *et al.* 1987; Li *et al.* 1990; Engeland et Kindl. 1991a; Engeland et Kindl. 1991b; Wells et Lees. 1991; Schmitz *et al.* 1995; Ashmarina *et al.* 1996). Ces articles sont d'autant plus intéressants que les enzymes en question se retrouvent toutes dans les peroxisomes et sont impliquées dans le processus de β -oxydation des acides gras. La β -oxydation peroxisomale, qui diffère légèrement de la β -oxydation mitochondriale (revu par Tolbert. 1981), consiste en une première étape d'éliminations successives d'unités de deux carbones, sous forme d'acétyls de carnitine, lesquels sont libérés dans le cytoplasme pour y être transformés en acétyls CoA. Vient ensuite la seconde étape, i.e. l'oxydation des groupements acétyls CoA en H₂O et CO₂. Ces deux étapes génèrent un flot d'atomes d'hydrogène qui, couplé à différentes enzymes dont celles de la phosphorylation oxydative mitochondriale, permet la production d'énergie sous forme d'ATP (Tolbert. 1981; Lehninger. 1982). La β -oxydation des acides gras dans les peroxisomes constitue donc une voie métabolique importante et ce, particulièrement pour les acides gras à très longue chaîne.

La β -oxydation des acides gras à très longue chaîne, i.e. 22 carbones et plus (insaturés ou non), a lieu presque'exclusivement dans les peroxisomes (revu par Latruffe. 1992; Poulos. 1995). Par ailleurs, de nombreux auteurs ont mis en lumière une corrélation entre l'accumulation d'acides gras à très longue chaîne, surtout les PUFA, et différentes anomalies peroxisomales (Wanders *et al.* 1990;

⁶⁵ Les seules valeurs de pH intraperoxisomal disponibles révèlent un pH acide (5,8-6,0), mais concernent les peroxisomes de levures cultivées dans un milieu méthanolique (Nicolay *et al.* 1987; Waterham *et al.* 1990). Cela pourrait donc ne pas correspondre avec la réalité des peroxisomes de cellules animales dans leur milieu physiologique.

Roels *et al.* 1993; Martinez *et al.* 1994; Jaruratanasirikul *et al.* 1995; Poulos. 1995), alors que d'autres ont démontré qu'il existe probablement un système de transport des acides gras à très longue chaîne entre les peroxisomes et le réticulum endoplasmique (lieu de synthèse des lipides) (Tan *et al.* 1990; Baykousheva *et al.* 1995; Mohammed *et al.* 1995; Sprecher *et al.* 1995). Enfin, les résultats de Crane et Masters (1986) suggèrent la présence d'une PLA2 dans les peroxisomes.

Il serait donc intéressant de déterminer la localisation subcellulaire des PLA2 du RPE (voir Tableau 4.4) afin de vérifier la présence d'au moins l'une d'elles dans les peroxisomes du RPE (Zinn et Benjamin-Henkind. 1979; Zinn et Benjamin-Henkind. 1983; Berman. 1991). En considérant que le RPE soit métaboliquement conçu pour transporter le DHA natif (non-peroxydé) vers les photorécepteurs (Abran *et al.* 1997), on peut alors imaginer que les PLA2 acides des lysosomes puissent être impliquées dans l'hydrolyse spécifique des DHA natifs afin qu'ils soient recyclés vers les photorécepteurs. Les phospholipides comportant un DHA peroxydé pourraient quant à eux être envoyés aux peroxisomes, où ils seraient hydrolysés par une PLA2 alcaline. Les DHA peroxydés pourraient alors être partiellement ou complètement dégradés via la β -oxydation, ce qui permettrait d'utiliser les DHA non-recyclables pour générer de l'énergie. Ceci n'est d'ailleurs pas dénué de tout sens puisque Zinn et Benjamin-Henkind (1979) ont noté que les peroxisomes du RPE se retrouvent souvent à proximité des granules de lipofuscine, lesquels renferment notamment des déchets métaboliques d'origine lipidique qui ont été incomplètement digérés (revu par Feeney. 1978; Dorey *et al.* 1993; Kennedy *et al.* 1995).

Tel que mentionné auparavant, il est également possible que la présence

de domaines membranaires de composition lipidique particulière soit suffisante pour créer un microenvironnement alcalin. Les enzymes réagissent en fonction du pH local, lequel peut être passablement différent du pH ambiant (Pelmont. 1995). Ainsi, par exemple, un domaine membranaire constitué principalement de molécules chargées positivement (lipides et/ou protéines) va provoquer une certaine répulsion des protons dans le milieu environnant, entraînant une alcalinisation locale de ce microenvironnement (Israelachvili. 1985; Nicholls et Ferguson. 1992). Dans ce cas-ci, une PLA2 présente dans les lysosomes, puis éventuellement dans les phagolysosomes pourrait tout de même être active à pH alcalin, malgré le pH ambiant acide de ces organelles.

Les chapitres 2 à 6 l'auront démontré, une part appréciable du travail d'identification et de caractérisation des PLA2 rétiniennes a été accomplie jusqu'à présent. Il reste cependant beaucoup à faire avant d'élucider le rôle de chacune de ces PLA2 dans les différents types de cellules rétiniennes auxquels elles auront été associées. Et, à ce sujet, plusieurs des hypothèses apparaissent d'ores et déjà particulièrement intéressantes à approfondir.

7.4 Références

- Abran, D., Chemtob, S., Levy, E., Gavino, G. et Gavino, V.C. Metabolism of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in isolated perfused adult and newborn pig eyes. Biology of the Neonates. 1997. 72: 32-41.
- Anderson, R.E., O'Brien, P.J., Wiegand, R.D., Koutz, C.A. et Stinson, A.M. Conservation of docosahexaenoic acid in the retina. *dans* Neurobiology of Essential Fatty Acids. New York: Plenum Press, 1992.
- Ashmarina, L.I., Robert, M.F., Elsliger, M.A. et Mitchell, G.A. Characterization of the hydroxymethylglutaryl-CoA lyase precursor. a protein targeted to peroxisomes and mitochondria. Biochemical Journal. 1996. 315: 71-75.
- Baykousheva, S.P., Luthria, D.L. et Sprecher, H. Peroxisomal-microsomal communication in unsaturated fatty acid metabolism. FEBS Letters. 1995. 367: 198-200.
- Bazan, H.E.P., Ridenour, B., Birkle, D.L. et Bazan, N.G. Unique metabolic features of docosahexaenoate metabolism related to functional roles in brain and retina. *dans* Phospholipid Research and the Nervous System Biochemical and Molecular Pharmacology. Padova: Liviana Press, 1986.
- Bazan, N.G. Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. Annals of the New York Academy of Sciences. 1989. 559: 116.

- Bazan, N.G. et Allan, G. Platelet-activating factor in the modulation of excitatory amino acid neurotransmitter release and of gene expression. Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling. 1996. 14: 321-330.
- Bazan, N.G., Allan, G., Rodriguez de Turco, E.B. Role of phospholipase A2 and membrane-derived lipid second messengers in membrane function and transcriptional activation of genes: Implications in cerebral ischemia and neuronal excitability. Progress in Brain Research. 1993a. 96: 247-257.
- Bazan, N.G., Gordon, W.C. et Rodriguez de Turco, E.B. Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: Retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *dans* Neurobiology of Essential Fatty Acids. New York: Plenum Press, 1992a.
- Bazan, N.G., Gordon, W.C. et Rodriguez de Turco, E.B. The uptake, metabolism and conservation of docosahexaenoic acid (22:6 ω 3) in brain and retina: Alterations in liver and retinal 22:6 metabolism during inherited progressive retinal degeneration. *dans* Essential Fatty Acids and Eicosanoids. Champaign: AOCS, 1992b.
- Bazan, N.G. et Scott, B.L. Docosahexaenoic acid metabolism and inherited retinal degenerations. *dans* Degenerative Retinal Disorders: Clinical and Laboratory Investigations. New York: Alan R. Liss Inc., 1987.
- Bazan, N.G., Zorumski, C.F. et Clark, G.D. The activation of phospholipase A2 and release of arachidonic acid and other lipid mediators at the synapse:

The role of platelet-activating factor. Journal of Lipid Mediators. 1993c. 6: 421-427.

Berman, E.R. Biochemistry of the eye. New York: Plenum Press, 1991.

Besharse, J.C. Photosensitive membrane turnover: Differentiated membrane domains and cell-cell interaction. *dans* The Retina, Part I. New York: Academic Press Inc., 1986.

Blackwood, R.A., Transue, A.T., Harsh, D.M., Brower, R.C., Zacharek, S.J., Smolen, J.E. et Hessler, R.J. PLA2 promotes fusion between PMN-specific granules and complex liposomes. Journal of Leukocyte Biology. 1996. 59: 663-670.

Bok, D. et Hall, M.O. The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. Journal of Cell Biology. 1971. 49: 664-682.

Bok, D. et Young, R.W. Phagocytic properties of the retinal pigment epithelium. *dans* The Retinal Pigment Epithelium. Cambridge: Harvard University Press, 1979.

Börchers, T. et Spener, F. Fatty acid binding proteins. Current Topics in Membranes. 1994. 40: 261-294.

Bosch, E., Horwitz, J. et Bok, D. Phagocytosis of outer segments by retinal pig-

ment epithelium: Phagosome-lysosome interaction. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1993. 41: 253-263.

Bramham, C.R., Alkon, D.L. et Lester, D.S. Arachidonic acid and diacylglycerol act synergistically through protein kinase C to persistently enhance synaptic transmission in the hippocampus. Neuroscience. 1994. 60: 737-743.

Braugher, J.M. et Hall, E.D. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. Free Radicals in Biology and Medicine. 1989. 6: 289-301.

Burnashev, N.A., Undrovinas, A.I., Fleidervish, I.A. et Rosenshtraukh, L.V. Ischemic poison lysophosphatidylcholine modifies heart sodium channels gating inducing long-lasting bursts of openings. Pflügers Archives. 1989. 415: 124-126.

Castagnet, P.I. et Giusto, N.M. Properties of phospholipase A2 activity from bovine retinal rod outer segments. Experimental Eye Research. 1993. 56: 709-716.

Catania, M.V., Hollingsworth, Z., Penney, J.B. et Young, A.B. Phospholipase A2 modulates different subtypes of excitatory amino acid receptors: autoradiographic evidence. Journal of Neurochemistry. 1993. 60: 236-245.

Chaitin, M.H. et Hall, M.O. Defective ingestion of rod outer segments by cultured rat pigment epithelial cells. Investigative Ophthalmology & Visual

Science. 1983. 24: 812-820.

Chan, P.H., Chen, S.F. et Yu, A.C. Induction of intracellular superoxide radical formation by arachidonic acid and by polyunsaturated fatty acids in primary astrocytic cultures. Journal of Neurochemistry. 1988. 50: 1185-1193.

Chan, P.H. et Fishman, R.A. Brain edema: Induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. Science. 1978. 201: 358-360.

Chan-Ling, T. Glial, neuronal and vascular interactions in the mammalian retina. Progress in Retinal and Eye Research. 1994. 13: 357-389.

Chen, H. et Anderson, R.E. Lipids of frog retinal pigment epithelium: comparison with rod outer segments, retina, plasma and red blood cells. Current Eye Research. 1992. 11: 793-800.

Chen, H. et Anderson, R.E. Comparison of uptake and incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids by frog retinas. Current Eye Research. 1993. 12: 851-860.

Clark, V.M. The cell biology of the retinal pigment epithelium. *dans* The Retina, Part I. New York: Academic Press Inc., 1986.

Converse, C.A., McLachlan, T., Bow, A.C., Packard, C.J. et Shepherd, J. Lipid metabolism in retinitis pigmentosa. *dans* Degenerative Retinal Disorders: Clinical and Laboratory Investigations. New York: Alan R. Liss Inc.,

1987.

Crane, D.I. et Masters, C.J. The effect of clofibrate on the phospholipid composition of the peroxisomal membrane in mouse liver. Biochimica et Biophysica Acta. 1986. 876: 256-263.

Creutz, C.E. The annexins and exocytosis. Science. 1992. 258: 924-930.

Curcio, C.A., Medeiros, N.E. et Leigh Millican, C. Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1996. 37: 1236-1249.

D'Amico, D.J. Medical progress: Diseases of the retina. The New England Journal of Medicine. 1994. 331: 95-106.

Damron, D.S. et Dorman, R.V. Involvement of phospholipase A2 and arachidonic acid in the depolarization-evoked accumulation of Ca²⁺ in hippocampal mossy fiber nerve endings. Neurochemical Research. 1993. 18: 1231-1237.

Dorey, C.K., Staurenghi, G. et Delori, F.C. Lipofuscin in aged and AMD eyes. *dans* Retinal Degeneration. New York: Plenum Press, 1993.

Douma, A.C., Veenhuis, M., Sulter, G.J. et Harder, W. A proton-translocating adenosine triphosphate is associated with the peroxisomal membrane of yeasts. Archives of Microbiology. 1987. 147: 42-47.

- Dudley, P.A., Alligood, J.P. et O'Brien, P.J. Biochemical events related to circadian photoreceptor shedding. *dans* Molecular and Cellular Basis of Visual Acuity. New York: Springer-Verlag, 1984.
- Durgerian, S., Bahls, F., Richmond, J., Doyle, B.T., Larson, D.D. et Haydon, P.G. Roles for arachidonic and GTP-binding proteins in synaptic transmission. Journal of Physiology. 1993. 87: 123-137.
- Eddlestone, G.T. et Ciani, S. Lysophospholipids modulate the K(ATP) channel. Biophysical Journal. 1991. 59: 16.
- Engeland, K. et Kindl, H. Purification and characterization of a plant peroxisomal Δ^2, Δ^3 -enoyl-CoA isomerase acting on 3-*cis*-enoyl-CoA and 3-*trans*-enoyl-CoA. European Journal of Biochemistry. 1991a. 196: 699-705.
- Engeland, K. et Kindl, H. Evidence for a peroxisomal fatty acid β -oxidation involving D-3-hydroxyacyl-CoAs: Characterization of two forms of hydrolyase that convert D-(-)-3-hydroxyacyl-CoA. European Journal of Biochemistry. 1991b. 200: 171-178.
- Farooqui, A.A. et Horrocks, L.A. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. Journal of Neuroscience Research. 1994. 38: 6-11.
- Feeney, L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1978. 17: 583-600.

- Feeney, L. The phagolysosomal system of the pigment epithelium. A key to retinal disease. Investigative Ophthalmology. 1973. 12: 635-638.
- Gordon, W.C., Rodriguez de Turco, E.B. et Bazan N.G. Retinal pigment epithelial cells play a central role in the conservation of docosahexaenoic acid by photoreceptor cells after shedding and phagocytosis. Current Eye Research. 1992. 11: 73-83.
- Härtig, W., Grosche, J., Distler, C., Grimm, D., El-Hifnawi, E. et Reichenbach, A. Alterations of Müller (glial) cells in dystrophic retinæ of RCS rats. Journal of Neurocytology. 1995. 24: 507-517.
- Herrero, I., Miras-Portugal, M.T. et Sanchez-Prieto, J. Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. Nature. 1992. 360: 163-165.
- Herron, W.L., Riegel, B.W., Myers, O.E. et Rubin, M.L. Retinal dystrophy in the rat: A pigment epithelial disease. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1969. 8: 595-604.
- Heth, C.A., Marescalchi, P.A. et Ye, L. IP₃ generation increases rod outer segment phagocytosis by cultured Royal College of Surgeons retinal pigment epithelium. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1995. 36: 984-989.
- Heth, C.A. et Schmidt, S.Y. Protein phosphorylation in retinal pigment epithelium.

- lium of Long Evans and Royal College of Surgeons rats. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1992. 33: 2839-2847.
- Hillered, L. et Chan, P.H. Effects of arachidonic acid on respiration activities in isolated brain mitochondria. Journal of Neuroscience Research. 1988. 19: 94-100.
- Hölscher, C. et Rose, S.P. Inhibitors of phospholipase A2 produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. Behavioral and Neural Biology. 1994. 61: 225-232.
- Israelachvili, J.N. Intermolecular and surface forces. London: Academic Press, 1985.
- Jacob, M., Weech, P.K. et Salesse, C. Presence of a light-independent phospholipase A2 in bovine retina but not in rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 19209-19218.
- Jelsema, C.L. Light activation of phospholipase A2 in rod outer segments of bovine retina and its modulation by GTP-binding proteins. The Journal of Biological Chemistry. 1987. 262: 163-168.
- Jaruratanasirikul, S., Vasiknanont, P., Saetung, P. et Mitarnun, W. Zwellinger syndrome: First reported case in Thailand and Literature review. South-east Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1995. 26: 47-51.

- Kaikus, R.M., Bass, N.M. et Ockner, R.K. Functions of fatty acid binding proteins. Experientia. 1990. 46: 617-630.
- Kato, K., Clark, G.D., Bazan, N.G. et Zorumski, C.F. Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. Nature. 1994. 367: 175-179.
- Kennedy, C.J., Rakoczy, P.E. et Constable, I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: A review. Eye. 1995. 9: 763-771.
- Kit Lam, D.M. Neurotransmitters in the vertebrate retina. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1997. 38: 553-556.
- Kiyosue, T. et Arita, M. Effects of lysophosphatidylcholine on resting potassium conductance of isolated guinea pig ventricular cells. Pflügers Archives. 1986. 406: 296-302.
- Kuwashima, J., Fujitani, B., Nakamura, K., Kadokawa, T. et Yoshida, K. Biochemical changes in unilateral brain injury in the rat: A possible role of free fatty acid accumulation. Brain Research. 1976. 110: 547-557.
- Latruffe, N. Le(s) récepteur(s) nucléaire(s) de régulation des gènes de peroxisomes. C.R. Séances Soc. Biol. Fil. 1992. 186: 414-418.
- LaVail, M.M. Outer segment disc shedding and phagocytosis in the outer retina. Transactions of the Ophthalmology Society of U.K. 1983. 103: 397-

404.

LaVail, M.M., Sidman, R.L. et Gerhardt, C.O. Congenic strains of RCS rats with inherited retinal dystrophy. Journal of Heredity. 1975. 66: 242-244.

Lavoie, C., Jolicoeur, M. et Paiement, J. Accumulation of polyunsaturated free fatty acids coincident with the fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 1991. 1070: 274-278.

Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers Inc., 1982.

Li, J., Smeland, T.E. et Schulz, H. D-3-Hydroxyacyl coenzyme A dehydratase from rat liver peroxisomes: Purification and characterization of a novel enzyme necessary for the epimerization of 3-hydroxyacyl-CoA thioesters. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 13629-13634.

Lloret, S. et Moreno, J.J. Ca^{2+} influx, phosphoinositide hydrolysis, and histamine release induced by lysophosphatidylserine in mast cells. Journal of Cellular Physiology. 1995. 165: 89-95.

Lynch, M.A. et Voss, K.L. Membrane arachidonic acid concentration correlates with age and induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in the rat. European Journal of Neuroscience. 1994. 6: 1008-1014.

Martinez, M., Mougan, I., Roig, M. et Ballabriga, A. Blood polyunsaturated fatty

acids in patients with peroxisomal disorders: A multicenter study. Lipids. 1994. 29: 273-280.

Mayorga, L.S., Colombo, M.I., Lennartz, M., Brown, E.J., Rahman, K.H., Weiss, R., Lennon, P.J. et Stahl, P.D. Inhibition of endosome fusion by phospholipase A2 (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A. 1993. 90: 10255-10259.

McEachern, J.C. et Shaw, C.A. An alternative to the LTP orthodoxy: A plasticity-pathology continuum model. Brain Research Review. 1996. 22: 51-92.

McLaughlin, B.J., Cooper, N.G.F. et Shepherd, V.L. How good is the evidence that phagocytosis of ROS by RPE is receptor mediated? Progress in Retinal and Eye Research. 1994. 1: 147-164.

Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S.F. et Attwell, D. Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. Nature. 1992. 355: 722-725.

Miyachi, E.-I., Kato, C. et Nakaki, T. Arachidonic acid blocks gap junctions between retinal horizontal cells. NeuroReport. 1994. 5: 485-488.

Mochizuki-Oda, N., Negishi, M., Mori, K. et Ito, S. Arachidonic acid activates cation channels in bovine adrenal chromaffin cells. Journal of Neurochemistry. 1993. 61: 1882-1890.

- Mohammed, B.S., Sankarappa, S., Geiger, M. et Sprecher, H. Reevaluation of the pathway for the metabolism of 7,10,13,16-docosatetraenoic acid to 4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid in the rat liver. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1995. 317: 179-184.
- Morgan, A., Roth, D., Martin, H., Aitken, A. et Burgoyne, R.D. Identification of cytosolic protein regulators of exocytosis. Biochemical Society Transactions. 1993. 21: 401-405.
- Morin, C., Langlais, J. et Lambert, R.D. Possible implication of lysophosphatidylcholine in cell fusion accompanying implantation in rabbits. Journal of Reproduction and Fertility. 1992. 96: 827-836.
- Nakamura, S. Involvement of phospholipase A2 in axonal regeneration of brain noradrenergic neurones. NeuroReport. 1993. 4: 371-374.
- Nicholls, D.G. A retrograde step forward. Nature. 1992. 360: 106-107.
- Nicholls, D.G. et Ferguson, S.J. Bioenergetics 2. London: Academic Press, 1992.
- Nicolay, K., Veenhuis, M., Douma, A.C. et Harder, W. A ³¹P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. Archives of Microbiology. 1987. 147: 37-41.
- Oishi, K., Zheng, B. et Kuo, J.F. Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine,

and oleic acid. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 70-75.

Paiement, J., Lavoie, C., Gavino, G.R. et Gavino, V.C. Modulation of GTP-dependent fusion by linoleic and arachidonic acid in derivatives of rough endoplasmic reticulum from rat liver. Biochimica et Biophysica Acta. 1994. 1190: 199-212.

Papahadopoulos, D., Nir, SS. et Düzgünes, N. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 1990. 22: 157-179.

Pelmont, J. Enzymes: Catalyseurs du monde vivant. Grenoble: Presses Universitaires de Grenoble, 1995.

Poulos, A. Very long chain fatty acids in higher animals: A review. Lipids. 1995. 30: 1-14.

Price, N.C. et Stevens, L. Fundamentals of Enzymology. New York: Oxford University Press, 1989.

Roels, F., Fisher, S., et Kissling, W. Polyunsaturated fatty acids in peroxisomal disorders: a hypothesis and a proposal for treatment. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 1993. 56: 937.

Schmitz, W., Albers, C., Fingerhut, R. et Conzelmann, E. Purification and characterization of an α -methylacyl-CoA racemase from human liver. European Journal of Biochemistry. 1995. 231: 815-822.

- Segel, I.H. Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley & Sons Inc., 1975.
- Slomiany, A., Grzelinska, E., Kasinathan, C., Yamaki, K.-I., Palecz, D. et Slomiany, B.L. Function of intracellular phospholipase A2 in vectorial transport of apoproteins from ER to Golgi. International Journal of Biochemistry. 1992. 24: 1397-1406.
- Söllner, T. SNAREs and targeted membrane fusion. FEBS Letters. 1995. 369: 80-83.
- Sprecher, H., Luthria, D.L., Mohammed, B.S. et Baykousheva, S.P. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. Journal of Lipid Research. 1995. 36: 2471-2477.
- Staub, F., Winkler, A., Peters, J., Kempf, O. et Baethmann, A. Mechanisms of glial swelling by arachidonic. Acta Neurochirurgica. 1994a. 60: 20-23.
- Staub, F., Winkler, A., Peters, J., Kempf, O., Kachel, V. et Baethmann, A. Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 1994b. 14: 1030-1039.
- Steinberg, R.H. et Wood, I. The relationship of the retinal pigment epithelium to photoreceptor outer segments in human retina. *dans* The Retinal Pigment Epithelium. Cambridge: Harvard University Press, 1979.

- Stinson, A.M., Wiegand, R.D. et Anderson, R.E. Recycling of docosahexaenoic acid in rat retinas during n-3 fatty acid deficiency. Journal of Lipid Research. 1991. 32: 2009-2017.
- Tan, H., Okazaki, K., Kubota, I., Kamiryo, T. et Utiyama, H. A novel peroxisomal nonspecific lipid-transfer protein from *Candida tropicalis*. European Journal of Biochemistry. 1990. 190: 107-112.
- Tolbert, N.E. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxisomes. Annual Review of Biochemistry. 1981. 50: 133-157.
- Unterberg, A., Wahl, M., Hammersen, F. et Baethmann, A. Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. Acta Neuropathology. 1987. 73: 209-219.
- Vasquez, El. Herrero, I., Miras-Portugal, M.T. et Sanchez-Prieto, J. Role of arachidonic acid in the facilitation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes independent of metabotropic glutamate receptor responses. Neuroscience Letters. 1994. 174: 9-13.
- Veerkamp, J.H., Peters, R.A. et Maatman, R.G.H.J. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. Biochimica et Biophysica Acta. 1991. 1081: 1-24.
- Villaroel, A. Suppression of neuronal potassium A-current by arachidonic acid. FEBS Letters. 1993. 335: 184-188.

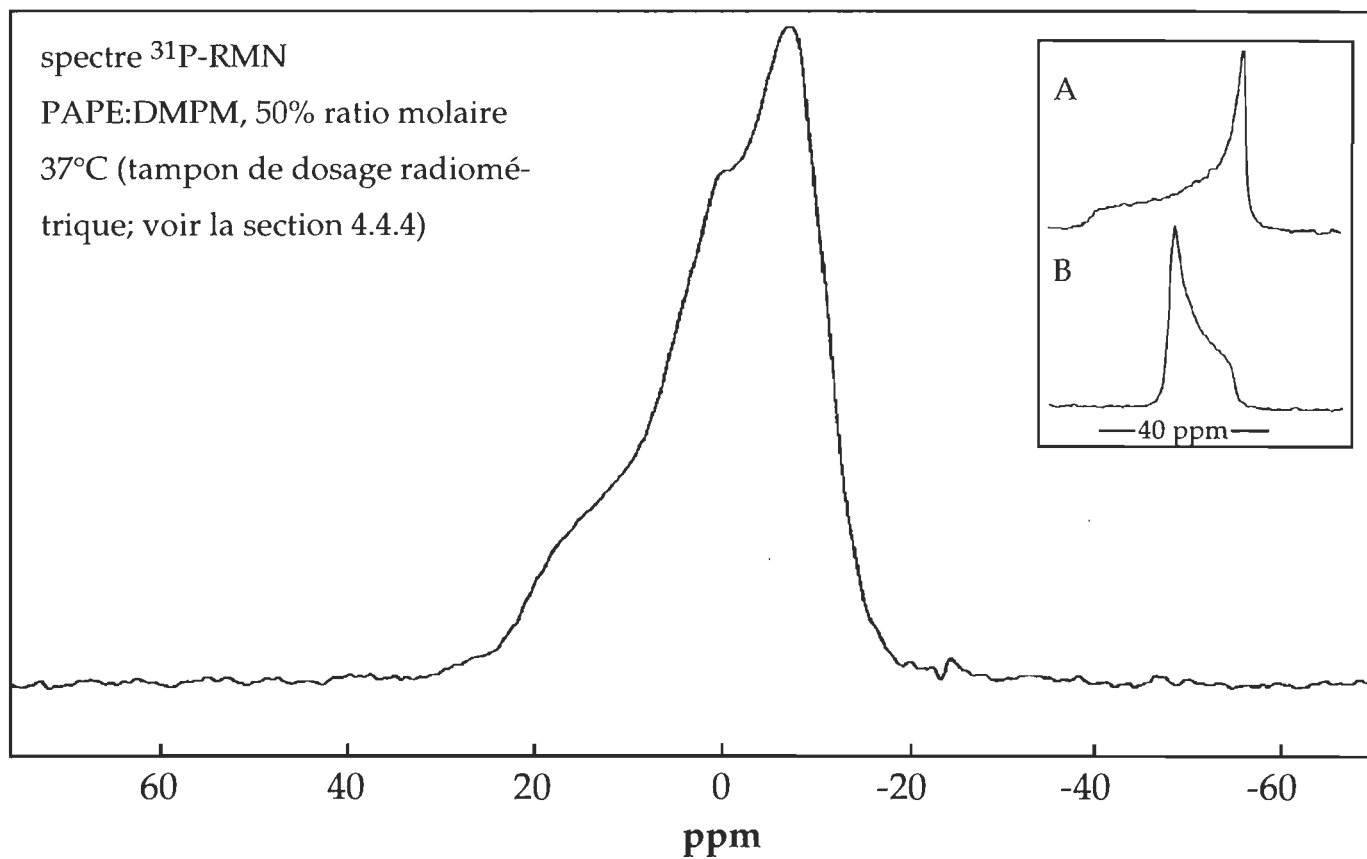
- Volterra, A., Trotti, D., Gambino, G. et Racagni, G. Convergent inhibition of glutamate uptake by arachidonic acid and oxygen free radicals: Molecular mechanisms and relevance to neurodegenerative pathologies. Neurodegenerative Disorders and Cognitive Dysfunction. 1994. 7: 129-137.
- Wanders, R.J., Van Roermund, C.W., Schutgens, R.B., Barth, P.G., Heymans, H.S., Van Den Bosch, H. et Tager, J.M. The inborn errors of peroxisomal beta-oxidation: A review. Journal of Inherited Metabolic Diseases. 1990. 13: 4-36.
- Wang, N. et Anderson, R.E. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from rat retinal pigment epithelium to rod outer segments. Current Eye Research. 1992. 11: 783-791.
- Wang, N., Wiegand, R.D. et Anderson, R.E. Uptake of 22-carbon fatty acids into rat retina and brain. Experimental Eye Research. 1992. 54: 933-939.
- Waterham, H.R., Keizer-Gunnink, I., Goodman, J.M., Harder, W. et Veenhuis, M. Immunocytochemical evidence for the acidic nature of peroxisomes in methylotrophic yeasts. FEBS Letters. 1990. 262: 17-19.
- Wells, X.E. et Lees, E.M. Ureidoglycolate amidohydrolase from developing french bean fruits (*Phaseolus vulgaris* [L.]). Archives of Biochemistry and Biophysics. 1991. 287: 151-159.
- White, J.M. Membrane Fusion. Science. 1992. 258: 917-923.

- Wilschut, J. et Hoekstra, D. Membrane fusion. From liposomes to biological membranes. Trends in Biochemical Sciences. 1984. 9: 479-483.
- Wilson, D.W., Whiteheart, S.W., Orci, L. et Rothman, J.E. Intracellular membrane fusion. Trends in Biochemical Sciences. 1991. 16: 334-337.
- Womack, F.C. et Colowick, S.P. Proton-dependent inhibition of yeast and brain hexokinases by aluminium in ATP preparations. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A. 1979. 76: 5080-5084.
- Wu, S.M. Synaptic transmission in the outer retina. Annual Review of Physiology. 1994. 56: 141-168.
- Yoshikami, S. et Hagsins, W.A. Light-induced calcium fluxes from outer segment layer of vertebrate retinas. Nature. 1980. 286: 395-398.
- Zhang, K., Nguyen, T.-H. E., Crandall, A. et Donoso, L.A. Genetic and molecular studies of macular dystrophies: Recent developments. Survey of Ophthalmology. 1995. 40: 51-61.
- Zimmerman, W.F. et Keys, S. Acylation and deacylation of phospholipids in isolated bovine rod outer segments. Experimental Eye Research. 1988. 47: 247-260.
- Zinn, K.M. et Benjamin-Henkind, J. Retinal pigment epithelium. *dans* Bio-medical Foundations of Ophthalmology. Philadelphia: Harper & Row

Publishers, 1983.

Zinn, K.M. et Benjamin-Henkind, J. Anatomy of the human retinal pigment epithelium. *dans* The Retinal Pigment Epithelium. Cambridge: Harvard University Press, 1979.

ANNEXE



Annexe 1: Organisation du mélange PAPE:DMPM (50% ratio molaire) en phases lamellaires^a

^a L'encart montre un spectre typique des phases lamellaire (A) et hexagonale II inverse (B) (Cullis *et al.* 1985; voir la section 1.18 pour la référence complète).