

JULIE BOUCHER

**ASPECTS BIOPHYSIQUES DE
L'INTERACTION DE LA RECOVERINE AVEC DES
PHOSPHOLIPIDES EN MONOCOUCHE**

Mémoire présenté
à la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en chimie
pour l'obtention du grade de Maître ès Science (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE CHIMIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

© Julie Boucher, 2009

RÉSUMÉ

Lors du processus de phototransduction visuelle, la recoverine est responsable de la régulation de la phosphorylation de la rhodopsine. Notre objectif est de comprendre ce qui favorise son interaction avec les membranes des photorécepteurs et d'évaluer l'importance du calcium sur cette liaison.

La recoverine est injectée sous une monocouche formée de différents phospholipides et son adsorption est mesurée par la variation de pression de surface. Des mesures de spectroscopie infrarouge par modulation de polarisation ont aussi été effectuées pour connaître la conformation qu'adopte la recoverine lors de son adsorption aux monocouches.

La recoverine démontre une affinité marquée pour des phospholipides possédant une longue chaîne hydrocarbonée, plusieurs insaturations et une tête polaire de charge nette nulle. Cela met en évidence comment la composition lipidique membranaire est essentielle à l'ancrage de la recoverine dans la membrane. D'autre part, la présence du myristoyl de la recoverine semble être une condition presque essentielle à sa liaison aux membranes des photorécepteurs.

REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur de recherche, M. Christian Salesse, pour m'avoir donné autant d'opportunités lors de mes études graduées. Grâce à son appui, sa disponibilité et sa rigueur, j'ai pu développer les atouts nécessaires à l'achèvement de ce mémoire. Il m'a donné la chance de présenter mes résultats de recherche dans différents colloques ainsi qu'au congrès annuel de l'ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2006. Par ces expériences j'ai pu grandement améliorer mes habiletés d'élocution.

J'adresse un second merci à M. Bernard Desbat pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir initié au PM-IRRAS lors de ce stage de deux semaines à l'Université Bordeaux I. J'ai bénéficié d'agréables visites, notamment sur la dune du Pilat ainsi qu'au village de St-Émilion. Merci également aux membres de son laboratoire pour leur chaleureux accueil et au Réseau Vision Vision pour le financement permettant de concrétiser ce voyage.

Un merci spécial à Stéphane Pezennec, chercheur de l'INRA, pour avoir assuré le transfert de connaissances des travaux de Philippe Desmeules lors de mon arrivée au laboratoire. Merci aussi à Philippe D. pour avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions, malgré ses occupations professionnelles à l'extérieur du laboratoire.

Merci aux différents professionnels de recherche qui m'ont chacun apporté leur expertise spécifique, soit Dominique Gauvin (HPLC, CHUL), Sabine Castano (Bordeaux I), Patricia Basque et François Lapointe (CERSIM).

J'aimerais mentionné tous mes collègues étudiants : Éric, Marc-André, Mario, Solange et Sylvain (et Amélie, bien sûr!) ainsi que les stagiaires et assistants de recherche : Jennifer, Sophie, Marie-Lou et Marjorie. Ils ont contribué à rendre ces années de maîtrise formidables par leur belle amitié; que ce soit lors de discussions enflammées à la Place Laurier ou pendant un match de volley-ball.

Un merci à mes amis de Québec qui ont su me divertir et me faire aimer la ville de Québec. Un dernier merci à ma famille et mes parents qui m'ont, tout au long de ce périple, apporté le support et l'appui nécessaire.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 L'ŒIL	1
1.2 LA RÉTINE	1
1.2.1 Morphologie et fonctionnement.....	1
1.2.2 Les cellules photoréceptrices : les cônes et les bâtonnets	3
1.3 LES BÂTONNETS RÉTINIENS.....	5
1.3.1 Structure	5
1.3.2 Composition lipidique des membranes discales	5
1.3.3 Photoréponse des bâtonnets en présence et en absence de lumière	8
1.3.4 La phototransduction visuelle	9
1.3.4.1 La photoactivation.....	9
1.3.4.2 Inactivation du processus visuel.....	11
1.3.4.3 Retour à l'état basal à la noirceur.....	12
1.4 LA RECOVERINE	13
1.4.1 Structure et caractéristiques de la recoverine.....	13
1.4.2 La myristoylation de la recoverine.....	15
1.4.3 Le rôle de la recoverine dans le processus visuel	16
1.5 OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	18
1.5.1 Objectifs spécifiques.....	18
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	20
2.1 SUREXPRESSION DE LA RECOVERINE DANS ESCHERICIA COLI.....	20
2.1.1 Surexpression et purification de la recoverine myristoylée et non myristoylée	20
2.1.2 Description du matériel.....	22
2.1.3 Détermination de la pureté de la recoverine et de sa concentration.....	22
2.1.3.1 Évaluation de la pureté de la recoverine	22
2.1.3.2 Détermination de la concentration en recoverine par la méthode de Bradford.....	24
2.1.4 Détermination du taux de myristoylation de la recoverine	24
2.2 FILMS MONOMOLÉCULAIRES À L'INTERFACE AIR-EAU ET MESURES DE PRESSION DE SURFACE	26
2.2.1 Principe des films de Langmuir	26
2.2.2 Mesure de l'adsorption de la recoverine	28
2.2.2.1 Description du matériel.....	29
2.2.3 Pression critique d'insertion.....	30
2.3 ISOTHERMES D'ADSORPTION DE LA RECOVERINE À DES MONOCOUCHE DE PHOSPHOLIPIDES À AIRE MOLÉCULAIRE VARIABLE.....	33
2.4 SPECTROSCOPIE DE RÉFLEXION-ADSORPTION PAR MODULATION DE POLARISATION EN INFRAROUGE (PM-IRRAS) À L'INTERFACE AIR-EAU	34
2.4.1 Montage expérimental.....	34
2.4.1.1 Attribution des bandes spectrales en PM-IRRAS	37
2.4.2 Application de la spectroscopie PM-IRRAS à l'étude de l'orientation moléculaire	39
2.4.3 Mesure de spectres PM-IRRAS au cours de l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de phospholipides à l'interface air/eau	39

CHAPITRE 3: RÉSULTATS ET DISCUSSION	43
3.1 PRESSION CRITIQUE D'INSERTION DE LA RECOVERINE	43
3.1.1 Effet de la tête polaire des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine	43
3.1.2 Effet de la longueur de la chaîne grasse et du nombre d'insaturations sur l'adsorption de la recoverine	45
3.1.3 Effet de la force ionique de la sous-phase sur l'adsorption de la recoverine	47
3.1.4 Discussion	50
3.2 MESURES D'ADSORPTION À AIRE MOLÉCULAIRE VARIABLE	52
3.2.1 Le système recoverine/DMPC	52
3.2.2 Le système recoverine/DOPC	54
3.2.3 Le système recoverine/DDPC	56
3.2.4 Force d'éjection de la recoverine de la monocouche	58
3.2.5 Discussion	62
3.3 ÉTUDE STRUCTURALE DE LA RECOVERINE EN MONOCOUCHE PAR SPECTROSCOPIE PM-IRRAS	63
3.3.1 Mesures en compression	64
3.3.1.1 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPC	64
3.3.1.2 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPS	67
3.3.1.3 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DDPC	70
3.3.1.4 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DDPS	73
3.3.2 Mesures à aire moléculaire fixe	78
3.3.2.1 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPC	78
3.3.2.2 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPS	80
3.3.3 Discussion	84
CHAPITRE 4: CONCLUSIONS	88
CHAPITRE 5: PERSPECTIVES DE RECHERCHE	90
CHAPITRE 6: BIBLIOGRAPHIE	92

Liste des figures

Figure 1 : Coupe transversale de l'œil humain sous forme schématique	2
Figure 2 : Schéma de la rétine humaine	2
Figure 3 : Spectre d'adsorption des cellules photoréceptrices : les cônes et les bâtonnets.....	4
Figure 4 : Schéma du bâtonnet rétinien humain.....	6
Figure 5 : Pourcentage molaire de lipides di-saturés, saturé-insaturé et di-insaturés dans les segments externes des membranes discales.....	7
Figure 6 : Cycle complet de la phototransduction visuelle dans les disques des photorécepteurs.....	10
Figure 7 : Rôle de la recoverine dans la phototransduction visuelle.....	12
Figure 8 : Schéma d'un motif hélice-boucle-hélice "EF-hand" liant un ion Ca^{2+}	14
Figure 9 : Structure de la recoverine myristoylée déterminée par RMN en solution.....	14
Figure 10 : Gel SDS-PAGE de la recoverine myristoylée	23
Figure 11 : Profil d'élution d'une fraction de la recoverine myristoylée	25
Figure 12 : Cuve de Langmuir	27
Figure 13 : Bain Kibron composé de micropuits de verre	29
Figure 14 : Structure moléculaire des têtes polaires de la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine	31
Figure 15 : Cinétique d'adsorption de la recoverine myristoylée à une monouche de DOPE.....	32
Figure 16 : Montage expérimental du spectromètre PM-IRRAS à l'interface air-eau.	35
Figure 17 : Composantes de la spectroscopie PM-IRRAS : le polariseur et le modulateur photoélastique	35
Figure 18 : Deux modes vibrationnels du groupement amide présents dans les protéines, soit les modes amide I et amide II.....	38
Figure 19 : Structure de la recoverine myristoylée (Ames et al., 1997).....	40
Figure 20 : Simulation des spectres PM-IRRAS des hélices- α de la recoverine myristoylée selon différentes orientations	41
Figure 21 : Montage expérimental du bain de PEEK utilisé lors des mesures d'adsorption de la recoverine à aire fixe	42
Figure 22 : Histogramme de la PCI de la recoverine myristoylée pour différents phospholipides	44
Figure 23 : Histogramme de la PCI de phospholipides portant différentes longueurs de chaînes grasses et d'insaturations.....	46
Figure 24 : Graphique de la différence de pression de surface en fonction de la pression initiale de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DDPE	48
Figure 25 : Histogramme de la PCI en fonction de la force ionique de la sous-phase, soit 5, 100 et 300 mM pour les deux phospholipides, le DPPS et le DPPC.	49
Figure 26 : Isotherme de pression de surface du DMPC et isothermes de recompression des systèmes binaires recoverine myristoylée/DMPC et recoverine non myristoylée	53
Figure 27 : Isotherme de pression de surface de la DOPC et courbes de recompression des systèmes binaires recoverine myristoylée/DOPC et recoverine non myristoylée	55
Figure 28 : Isotherme de pression de surface du DDPC pur et isothermes de recompression des systèmes binaires recoverine myristoylée/DDPC et recoverine non myristoylée/ DDPC.....	57
Figure 29 : Agrandissement de la zone où a lieu le changement de pente pour la DDPC	59
Figure 30 : Graphique de la différence d'aire moléculaire maximale entre l'isotherme de recompression de la recoverine myristoylée/phospholipide et non myristoylée/phospholipide et celle des 3 phospholipides purs (DMPC, DOPC et DDPC).	59
Figure 31 : Cinétique d'adsorption de la recoverine myristoylée et non myristoylée à une monocouche de DMPC à une pression de surface initiale de 5 mN/m.....	61
Figure 32 : Graphique de la différence d'aire moléculaire maximale entre l'isotherme de recompression de la recoverine myristoylée (trait plein) et non myristoylée (trait pointillé) de celle des 3 phospholipides (DMPC, DOPC et DDPC).	61
Figure 33 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DMPC/recoverine myristoylée avec un bain de monocouche en PEEK.....	65
Figure 34 : Compression, arrêt et poursuite de la compression d'une monocouche de DMPC avec un bain de monocouche de la compagnie Kibron	65

Figure 35 : Spectres PM-IRRAS du système binaire DMPC/recoverine myristoylée.....	66
Figure 36 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DMPS/recoverine myristoylée.....	69
Figure 37 : Spectres PM-IRRAS du système binaire DMPS/recoverine myristoylée.....	69
Figure 38 : Spectres PM-IRRAS du système binaire DMPS/recoverine myristoylée.....	70
Figure 39 : Orientation de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DMPS à différentes pressions de surface.....	71
Figure 40 : Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DDPC.....	72
Figure 41 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DDPC/recoverine myristoylée.....	72
Figure 42 : Spectres PM-IRRAS du système DDPC/recoverine myristoylée.....	74
Figure 43 : Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DDPS.....	74
Figure 44 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée au cours de son adsorption à une monocouche de DDPS.....	75
Figure 45 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DDPS/recoverine myristoylée.....	76
Figure 46 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DDPS en cours de compression.....	76
Figure 47 : Orientation de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DDPS à différentes aires moléculaires.....	77
Figure 48 : Spectres PM-IRRAS au cours de l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DMPC à aire moléculaire fixe à différentes pressions de surface initiales.....	79
Figure 49 : Spectre PM-IRRAS de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DMPC à une pression de surface de 20 mN/m.....	81
Figure 50 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée au cours de son adsorption à une monocouche de DMPS à aire moléculaire fixe et à différentes pressions de surface initiales.....	82
Figure 51 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DMPS à une pression de surface de 20 mN/m.....	85

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition lipidique et en acides gras des membranes discales des segments externes des bâtonnets rétinienens bovins.....	7
Tableau 2 : Liste des phospholipides utilisés lors des mesures d'adsorption de la recoverine.....	31
Tableau 3 : Position des bandes amide I et II selon la structure secondaire de la protéine.....	67

Liste des acronymes

Π_i	Pression de surface initiale
Π_c	Pression de surface critique d'insertion (PCI)
Π_e	Pression de surface maximale, ou à l'équilibre
$\Delta\pi$	Delta pression de surface
ADN	Acide désoxyribonucléique
Arr	Arrestine
BSA	Bovine sérum albumine
CNC	Canaux nucléotiques cycliques
DD	Didocosahexaénoyl
DM	Dimyristoyl
DP	Dipalmitoyl
DDPC	Didocosahexaénoylphosphatidylcholine
DDPE	Didocosahexaénoylphosphatidyléthanolamine
DDPS	Didocosahexaénoylphosphatidylsérine
DHA	Acide docosahéxaénoïque
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPE	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine
DMPS	Dimyristoylphosphatidylsérine
DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
DOPE	Dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOPS	Dioléoylphosphatidylsérine
DPA	Acide docosapentaénoïque
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPE	Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine
DPPS	Dipalmitoylphosphatidylsérine
E.coli	Eschericia coli
EGTA	Éthylène – glycol-bis-(b-amino-éthyl-éther) N,N'-tétra acide acétique
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
GDP	Guanosine diphosphates
GMPC	Guanosine cyclique 3'-5-monophosphate
GTP	Guanosine triphosphates
HÉPES	N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthane acide sulfonique
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
LB	Luria Bertani
LE	Liquide expansée (phase)

NMT	N-myristoyl transférase
PC	Phosphatidylcholine
PCE	Pression critique d'exclusion
PCI	Pression critique d'insertion
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phosphatidyléthanamine
PEEK	Polyéthylétherkétone
PM-IRRAS	Spectroscopie de réflexion-absorption par modulation de polarisation en infrarouge.
PS	Phosphatidylsérine
RecMyr	Recoverine myristoylée
RecNMyr	Recoverine non myristoylée
R-K	Rhodopsine kinase
Rh*	Rhodopsine photoactivée
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rv	Recoverine
SEB	Segment externe du bâtonnet
SC	Solide condensée (phase)
SIB	Segment interne du bâtonnet
TFA	Acide trifluoroacétique
T α	Transducine

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 L'œil

L'œil est l'organe sensoriel périphérique responsable de la vision. Les différentes composantes de l'œil sont représentées à la figure 1 (Spence et Mason, 1983). La pupille est l'orifice qui permet à la lumière d'entrer; elle paraît noire à cause des cellules pigmentées de la rétine qui tapissent le fond de l'œil. Son diamètre est contrôlé par l'iris, un muscle circulaire dont la contraction permet de s'adapter aux différentes conditions d'éclairage. Les photons qui entrent par la cornée, cette couche protectrice de l'œil, passent ensuite par le cristallin qui est une lentille biconvexe localisée entre l'humeur aqueuse et le corps vitré. Il focalise l'image inversée sur la rétine (Ali et Klyne, 1986). L'image prétraitée est alors transmise via le nerf optique vers les aires visuelles du cerveau.

1.2 La rétine

1.2.1 Morphologie et fonctionnement

La figure 2 (Jacob, 1998) illustre les différentes composantes de la rétine. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est constitué de cellules épithéliales riches en mélanine qui absorbe les rayons éparés. C'est à l'intérieur des cellules photoréceptrices, les cônes et les bâtonnets, qu'a lieu le processus de phototransduction visuelle. Ce processus convertit un stimulus lumineux en un influx nerveux qui se propage par le biais de neurotransmetteurs au niveau des terminaisons synaptiques (Ali et Klyne, 1986). On considère que le système visuel fait partie intégrante du système nerveux central. En effet, tout comme le reste du système nerveux central, la rétine est constituée de neurones et est largement vascularisée. Les impulsions visuelles progressent des cellules photoréceptrices vers les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires et se propagent au travers des fibres nerveuses qui constituent le nerf optique. Ces voies de transmission cellulaire sont un élément important de l'acuité et de la sensibilité visuelle (Ali et Klyne, 1986).

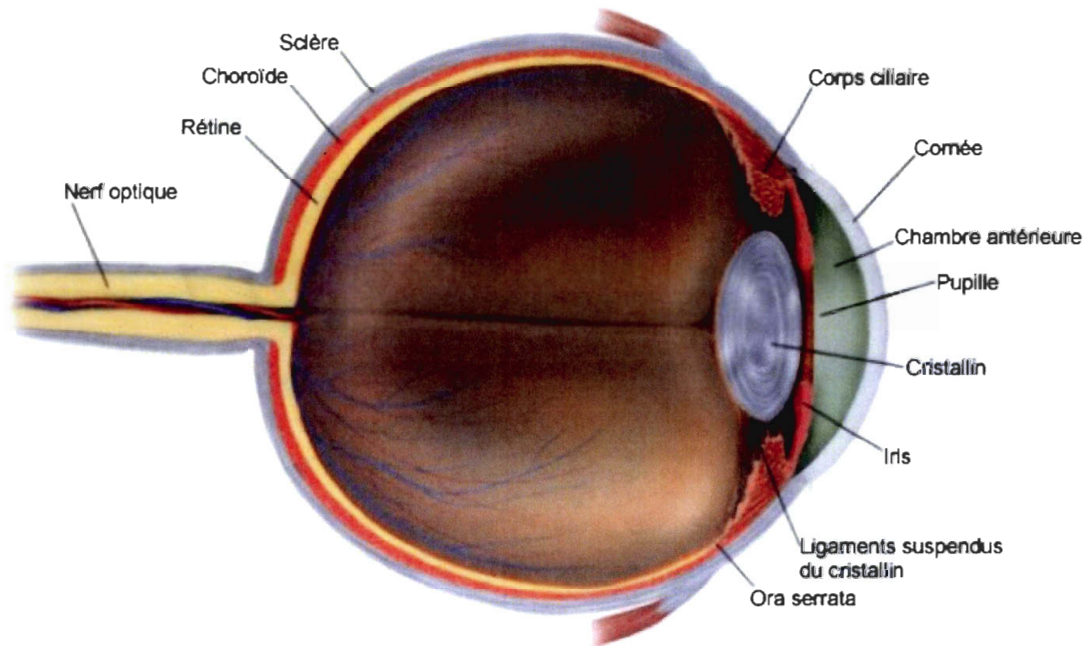


Figure 1 : Coupe transversale de l'œil humain sous forme schématique.

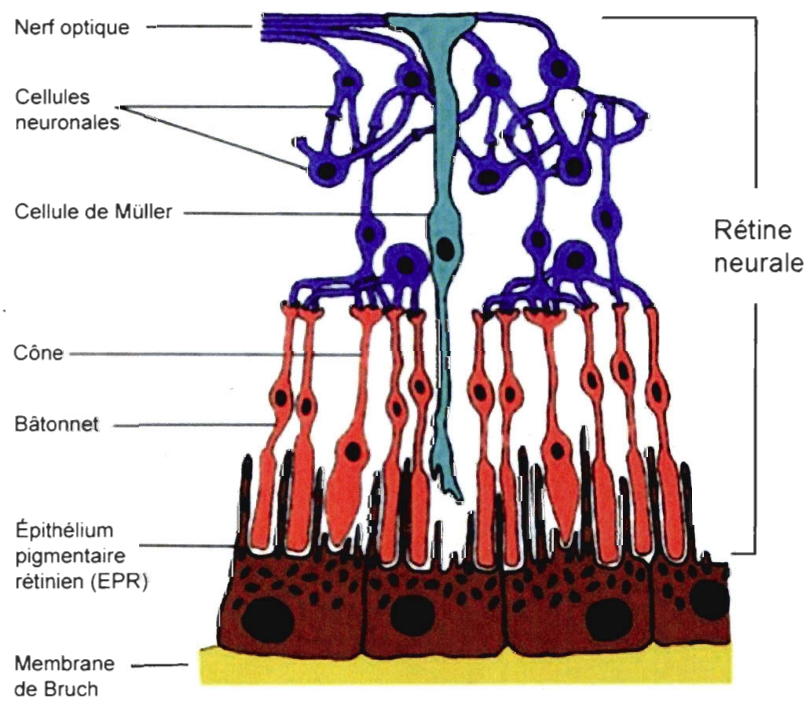


Figure 2 : Schéma de la rétine humaine.

1.2.2 Les cellules photoréceptrices : les cônes et les bâtonnets

L'intensité lumineuse à la surface de la planète varie par un facteur de 10^{11} durant le cycle normal jour/nuit (Rodieck, 1998). Les cônes et les bâtonnets couvrent entièrement cette plage d'intensité lumineuse. Il existe en effet une importante variation dans l'étendue de l'intensité de la lumière détectable entre ces deux types de photorécepteurs. Les bâtonnets sont impliqués dans la vision nocturne puisqu'ils sont extrêmement sensibles et qu'ils arrivent à détecter un seul photon (Fu et Yau, 2007). A l'inverse, les cônes sont moins sensibles quoiqu'ils possèdent une limite de saturation lumineuse plus élevée, ce qui est en accord avec leur fonction physiologique optimale de jour (Hisatomi et Tokunaga, 2002, Fu et Yau, 2007). C'est la combinaison de ces deux types de récepteurs qui nous permet de détecter la lumière sur une grande étendue d'intensité lumineuse (Hisatomi et Tokunaga, 2002).

Un deuxième facteur distinctif entre ces deux types de cellules est leur sensibilité à la longueur d'onde de la lumière, que l'on nommera *sensibilité spectrale*. Ce facteur dépend avant tout du spectre d'adsorption du pigment visuel de chaque cellule photoréceptrice. Le pigment visuel est constitué du chromophore (11-cis-rétinal¹) et de l'opsine, la partie protéique. La longueur d'onde du maximum d'adsorption de cette molécule correspond à la dite sensibilité spectrale. La distribution typique des longueurs d'onde pour les vertébrés s'étend entre 350-650 nm (voir figure 3). Cette étendue spectrale peut être expliquée par les différentes interactions entre le système chromophore-opsine (Yokoyama, 1995). Brièvement, ce sont les interactions et la position dans l'espace de la base de Schiff protonée (entre le rétinol et une lysine de l'opsine) et son contre-ion le glutamate ainsi que l'influence des quelques acides aminés spécifiques au pourtour de cette liaison qui modulent la position du maximum d'adsorption du pigment visuel (Fu et Yau, 2007). Chez l'humain, on trouve la rhodopsine ($\lambda_{\text{max}} = 496 \text{ nm}$) dans le bâtonnet et trois autres types de pigments sont présents dans les cônes bleus, verts et rouges dont la longueur d'onde d'adsorption se situe à 419, 531 et 559 nm, respectivement (Darnall et al., 1983) (voir figure 3). Ces différentes classes d'opsines permettent d'élargir notre champ spectral et

¹ Le précurseur du 11-cis-rétinal est le tout-trans-rétinol (vitamine A). Cela explique pourquoi une diète riche en vitamine A est cruciale pour une bonne vision.

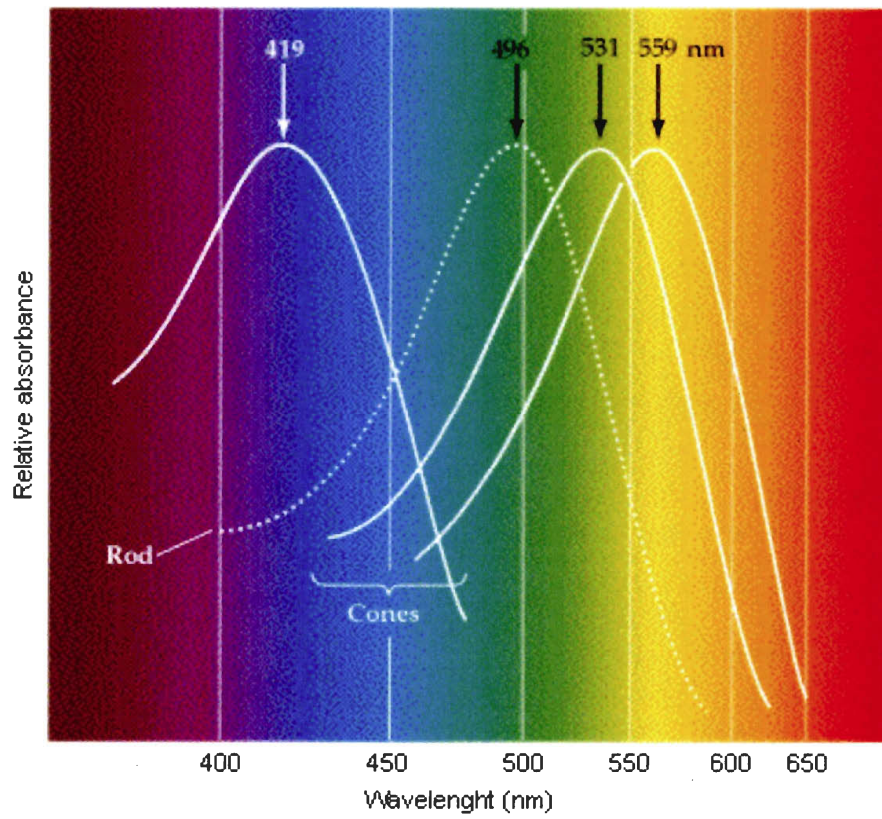


Figure 3 : Spectre d'adsorption des cellules photoréceptrices : les cônes et les bâtonnets. Le maximum d'adsorption de la rhodopsine des bâtonnets se situe à 496 nm alors que celui des cônes bleus, verts et rouges est positionné à 419, 531 et 559 nm, respectivement (Purves et al., 2001).

nous procure ainsi les outils moléculaires nécessaires à la discrimination des couleurs (Hisatomi et Tokunaga, 2002). Le processus de phototransduction visuelle est moins bien connu chez les cônes par rapport aux bâtonnets. Cependant, les cônes possèdent des protéines similaires à celles des bâtonnets, ce qui suggère que le processus est semblable dans ces deux types de cellules. Une analyse détaillée des protéines de la phototransduction révèle des différences entre les propriétés des classes d'opsines, ce qui pourrait expliquer la différence entre la réponse physiologique des cônes et des bâtonnets (Hisatomi et Tokunaga, 2002). Dans nos travaux de recherche, on s'attardera essentiellement au processus inhérent aux bâtonnets.

1.3 Les bâtonnets réiniens

1.3.1 Structure

La figure 4 montre les différentes composantes des bâtonnets réiniens. Le bâtonnet est divisé en quatre parties : le segment externe (SEB), le segment interne (SIB), le noyau et la terminaison synaptique. Le SEB permet de transformer l'énergie du photon en un signal électrique. Le SIB est responsable du métabolisme et de la synthèse de protéines tandis que la transcription se produit dans le noyau et la signalisation synaptique dans la terminaison synaptique des bâtonnets (Krizaj et Copenhagen, 2002). Toutes les protéines servant à fabriquer le SEB passent par le cilium connecteur (voir figure 4) qui se situe à la jonction entre le SIB et le SEB.

Le SEB est composé de disques qui sont des organelles intracellulaires séparées de 28 nm (figure 4) (Fu et Yau, 2007). La densité élevée d'empilement des disques augmente la probabilité d'adsorption du photon incident par la rhodopsine qui se retrouve au niveau des membranes de ces disques (figure 4) (Krizaj et Copenhagen, 2002). Ces disques contiennent aussi d'autres protéines impliquées dans la phototransduction. La rhodopsine est la protéine la plus abondante dans le SEB (~3,5 mM) (Fu et Yau, 2007).

1.3.2 Composition lipidique des membranes discales

Les membranes discales possèdent une composition en phospholipides bien différente de celle des autres membranes du corps humain. En effet, cette différence se situe majoritairement au niveau de la composition en phospholipides polyinsaturés qui est beaucoup plus élevée, soit tout près de 60% de la composition totale (Miljanich et al., 1979). Ces insaturations confèrent de la fluidité aux membranes et pourraient favoriser l'interaction de protéines acylées comme la recoverine (Lipowsky et Sackmann, 1995). Le tableau 1 illustre les différents phospholipides présents dans les SEB ainsi que leur composition en acides gras les plus importants. Ces phospholipides possèdent chacun deux chaînes grasses qui peuvent différer l'une par rapport à l'autre pour une même tête polaire. La figure 5 montre précisément dans quelles proportions on trouve ces chaînes grasses dans les SEB pour la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC) et la di-

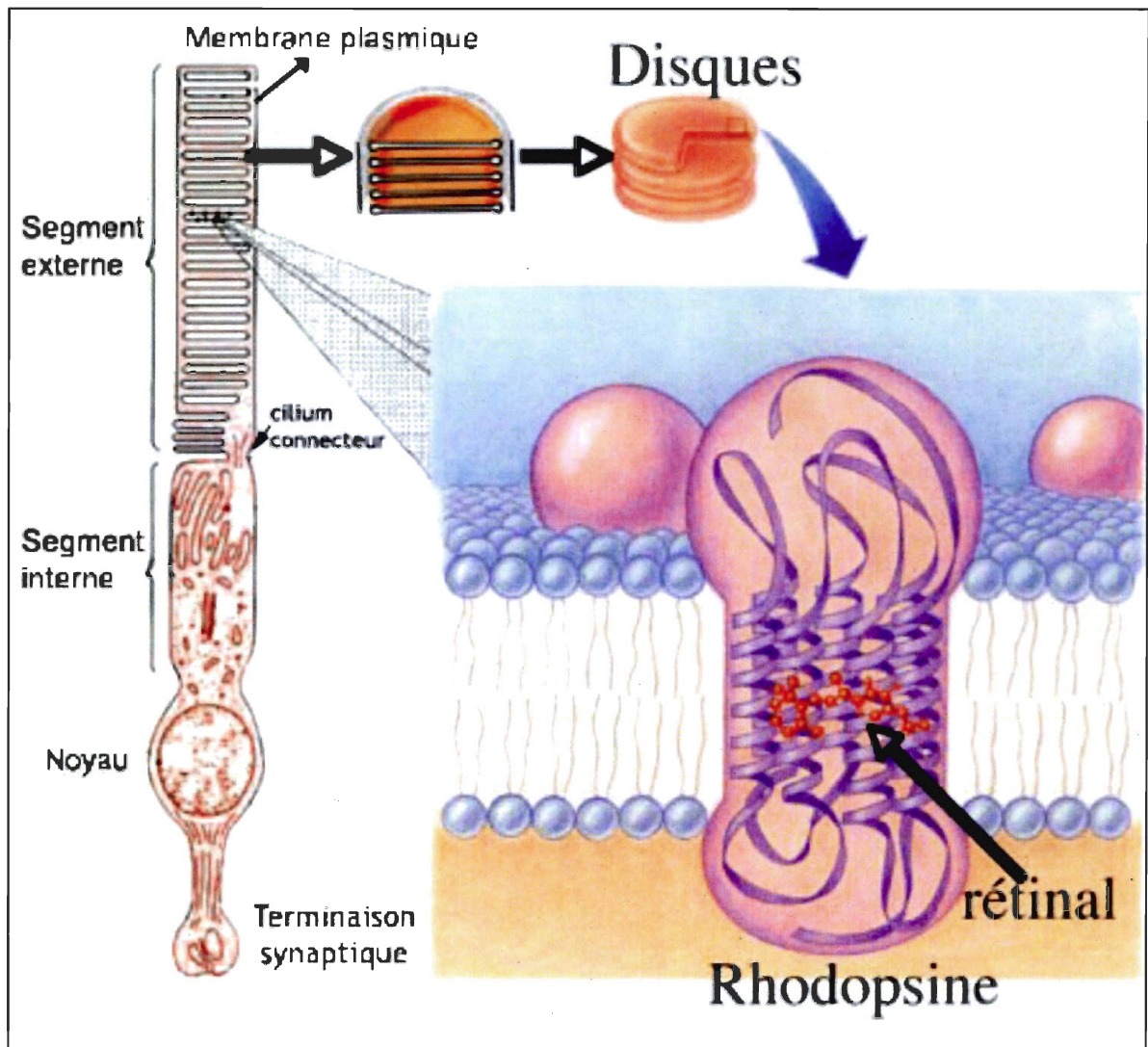


Figure 4 : Schéma du bâtonnet rétinien humain.

Le bâtonnet est composé d'un segment externe et d'un segment interne (contenant les mitochondries et le réticulum endoplasmique) qui sont liés ensemble via un mince cilium connecteur, ainsi que d'un noyau et d'une terminaison synaptique. Le segment externe contient un empilement de disques où se trouve le pigment visuel, la rhodopsine. La rhodopsine est constituée d'une opsine composée de 7 hélices α transmembranaires et du 11-cis rétinal, le chromophore, lié de façon covalente par une base de Schiff à la lysine 296 (figure modifiée de Marieb, 1999).

Lipides	%	Acides gras	%
Phosphatidyléthanolamine	35,7	22 :6 ω 3	48,9
Phosphatidylcholine	33,5	18 :0	18,4
Phosphatidylsérine	12,3	16 :0	12,6
Cholestérol	9,1	18 :1 ω 9	3,5
Acides gras libres	6,8	24 :5	2,6
Phosphatidylinositol	1,6	22 :5 ω 3	2,4
Sphingomyéline	1,1	24 :4	0,9

Tableau 1 : Composition lipidique et en acides gras des membranes discales des segments externes des bâtonnets réiniens bovins (tiré de Miljanich et al., 1979).

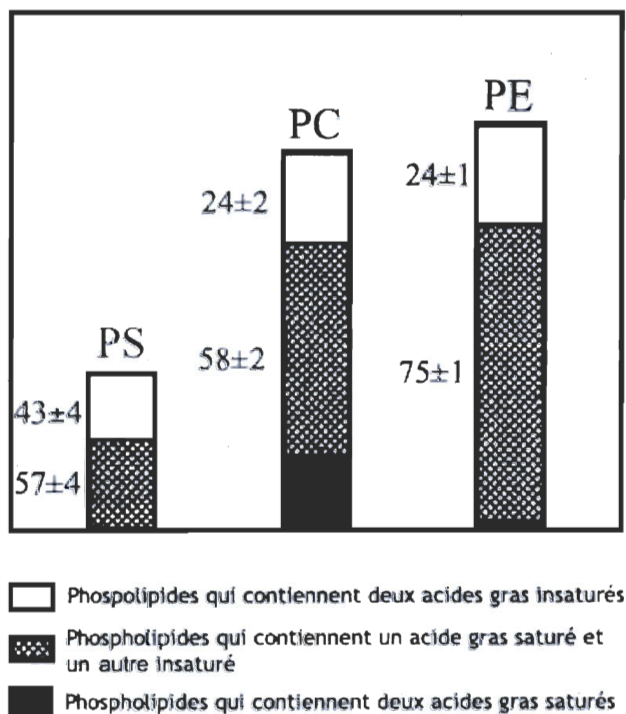


Figure 5 : Pourcentage molaire de lipides di-saturés, saturé-insaturé et di-insaturés dans les segments externes des membranes discales. (PS = phosphatidylsérine, PC = phosphatidylcholine, PE = phosphatidyléthanolamine) (tiré de Miljanich et al., 1979).

phosphatidyléthanolamine (PE). Dans un premier temps, on remarque que les chaînes grasses insaturées sont réparties, soit sous forme di-insaturée ou saturée-insaturée. Cette distribution confère beaucoup de fluidité à la membrane. En second lieu, les chaînes grasses di-saturées existent presque exclusivement pour la phosphatidylcholine. Les particularités de cette composition lipidique des membranes discales soulèvent des questions à propos de leur impact sur les interactions membranaires avec les protéines périphériques, telle que la recoverine myristoylée.

1.3.3 Photoréponse des bâtonnets en présence et en absence de lumière

Dans l'obscurité, il y a un courant interne constant au niveau de la membrane plasmique du SEB qui est produit par la conductance des cations. On y retrouve majoritairement le sodium (70%) et, en plus faible proportion, le calcium (15%), le magnésium (5%) et le potassium (10%) (Kaupp et Koch, 1992). En effet, le canal GMPC (guanosine cyclique 3'-5-monophosphate) dépendant est ouvert et un flux d'ions sodium et calcium peut s'écouler vers l'intérieur de la cellule, ce qui contribue à dépolariser le bâtonnet. La concentration maximale en sodium et en calcium se situe respectivement autour de 110 et de 500 mM (Kaupp et Koch, 1992). Cette concentration est suffisamment élevée pour réguler la machinerie enzymatique de la phototransduction dans le segment externe, mais est aussi suffisamment basse pour prévenir une cytotoxicité (Edward et al., 1991; Frasson et al., 1999).

Le canal GMPC dépendant situé dans la membrane plasmique des SEB (figure 4) appartient à la famille des canaux nucléotiques cycliques (CNC) qui sont non-sélectifs (Kaup et Seifert, 2002). À faible intensité lumineuse, une concentration basale de une à plusieurs micromoles de GMPC garde un certain pourcentage des canaux CNC ouverts. La diminution de la concentration en GMPC après l'illumination conduit à la fermeture rapide de ces canaux avec un délai près des milli-secondes (Fu et Yau, 2007). Puisque le sodium intracellulaire est continuellement pompé à l'extérieur par un échangeur $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ et que l'influx entrant de sodium et de calcium s'arrête, on observe une diminution de la concentration de ces ions dont le niveau dépend du nombre de canaux GMPC fermés. Cela représente une diminution de la concentration en calcium d'un facteur égal à presque dix fois la concentration initiale (Krizaj et Copenhagen, 2002). L'adsorption de lumière par les

SEB résulte donc en une diminution de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} , ce qui aura un effet sur certaines protéines du cycle visuel dont la fonction dépend de cet ion, incluant la recoverine. De plus, il en résulte aussi une diminution de la concentration cytoplasmique de Na^+ qui cause l'hyperpolarisation de la membrane dont le potentiel passe alors de -40 à -70mV. Tel que constaté par Tomita (1970), les photorécepteurs répondent à la stimulation dans un sens opposé aux neurones du SNC qui, à l'inverse, tendent plutôt à se dépotariser lorsqu'ils sont activés.

1.3.4 La phototransduction visuelle

La plupart des fonctions biologiques sont accomplies par un système approprié où entrent en jeu de multiples protéines. La cascade enzymatique de la phototransduction représente un exemple de ces systèmes complexes (Hisatomi et Tokunaga, 2002).

1.3.4.1 La photoactivation

Au cours de la première étape du processus visuel, le photon incident est absorbé par les cellules photoréceptrices. En conséquence, comme mentionné ci-dessus, une partie des canaux GMPc dépendants se ferment et il se produit une hyperpolarisation de la membrane des SEB et une réponse électrochimique est transmise au cerveau par le nerf optique via plusieurs types de neurones (Hisatomi et Tokunaga, 2002).

Au niveau moléculaire, la lumière induit d'abord une isomérisation du chromophore 11-cis-rétinal en tout-trans-rétinal. Cette isomérisation provoque un changement conformationnel de la rhodopsine qui correspond à son état activé, nommé métarhodopsine II. La figure 6 illustre le processus de phototransduction visuelle au niveau de la membrane plasmique et discalé des SEB (Chabre, 1998). La rhodopsine photoactivée (Rh^*) interagit d'abord avec la sous-unité alpha de la transducine ($\text{T}\alpha$) qui comporte aussi des sous-unités β et γ (Pellicone et al., 1985). Cette liaison permet alors l'échange du GDP (guanosine diphosphate) pour le GTP (guanosine triphosphate) et de former le complexe $\text{T}\alpha$ -GTP (Hamm et Gilchrist, 1996), tel que montré sur la figure 6. Cet échange provoque la dissociation de la sous-unité $\text{T}\alpha$ de ses sous-unités $\beta\gamma$ ($\text{T}\beta\gamma$). La sous-unité $\text{T}\alpha$ liera ensuite chaque sous-unité inhibitrice γ de la GMPc-phosphodiesterase (PDE) (Fung et al., 1981). La PDE est une protéine tétramérique possédant 2 sous-unités catalytiques, alpha et bêta, et

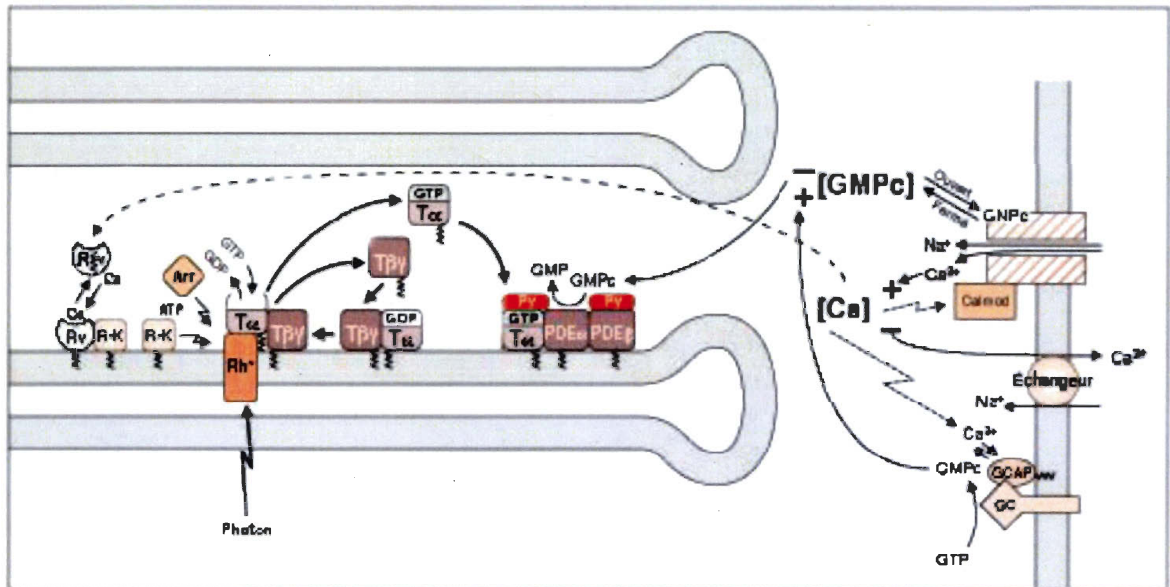


Figure 6 : Cycle complet de la phototransduction visuelle dans les disques des photorécepteurs. La phototransduction débute par la photoactivation de la rhodopsine par l'adsorption d'un photon jusqu'à l'hyperpolarisation de la membrane et l'inactivation du processus par la chute de la concentration en calcium (Rh* = rhodopsine activée, T α = sous-unité alpha de la transducine, T $\beta\gamma$ = sous-unités bêta et gamma de la transducine, Arr = arrestine, Rv = recoverine, R-K = rhodopsine kinase, PDE = phosphodiesterase, GC = guanylate cyclase, GCAP = protéine activatrice de la guanylate cyclase, GTP = guanosine triphosphate, GDP = guanosine diphosphate, PDE α = sous-unité alpha de la GMPC-phosphodiesterase, PDE β = sous-unité bêta de la GMPC-phosphodiesterase, P γ = sous-unité gamma de la phosphodiesterase) (figure tirée de Chabre, 1998).

deux sous-unités gamma identiques (Deterre et Bigay., 1986). La liaison de la T α aux sous-unités γ active la PDE qui hydrolyse ensuite le GMPC (Stryer, 1985). Comme mentionné à la section 1.3.3., cette hydrolyse causera l'hyperpolarisation de la membrane plasmique des SEB (Arshavsky et al., 2002).

La sensibilité absolue de la vision est basée sur le principe que le nombre de photons absorbés doit provoquer une transduction du signal dont le niveau excède le bruit de fond à l'état d'obscurité. La cascade de phototransduction visuelle dans les bâtonnets est sensible à des niveaux lumineux très faibles à un point tel que chaque photoisomérisation produit un signal détectable (Burns et Baylor, 2001). Grâce à cette sensibilité, on atteindra une amplitude de réponse maximale à un niveau relativement faible d'intensité lumineuse. En fait, cette dépendance entre la réponse et l'intensité lumineuse est non-linéaire; la réponse

augmente suivant approximativement le log de l'intensité (Burns et Baylor, 2001). Au niveau moléculaire, il suffit d'une molécule de rhodopsine photoexcitée pour générer un signal électrique macroscopique (Burns et Baylor, 2001). Cette amplification du signal est assurée de trois façons, soit l'activation de plusieurs transducines (environ 500 molécules) par une seule rhodopsine photoexcitée, l'hydrolyse d'une grande quantité de GMPc par une PDE activée (2×10^3 molécules de GMPc hydrolysées/seconde) et la réponse des multiples canaux GMPc-dépendants suite à la chute de la concentration en GMPc, puisque chaque canal fermé empêche l'entrée d'une grande quantité de cations dans les SEB (Burns et Baylor 2001).

1.3.4.2 Inactivation du processus visuel

Tout comme l'amplification du signal est nécessaire pour effectuer la transduction de la lumière en une réponse macroscopique, l'inactivation de cette réponse est importante pour assurer une bonne résolution temporelle (Fu et Yau, 2007). Bref, cette étape permet de ramener le photorécepteur à son état initial de la noirceur pour qu'une nouvelle activation puisse se produire à la suite de l'adsorption d'un nouveau photon (Burns et Baylor, 2001). Cela requiert l'inactivation efficace de toutes les composantes de la phototransduction : métarhodopsine II, transducine et PDE.

Le photointermédiaire de la rhodopsine activée, la métarhodopsine II, est d'abord phosphorylée par la rhodopsine kinase (Kuhn et al., 1984). Dans le domaine C-terminal de la rhodopsine, il y a plusieurs sites de phosphorylation (les acides aminés sérine et thréonine en C-terminal) : six chez la souris et sept chez le bovin. De récentes études physiologiques ont démontré que ces 6 ou 7 sites doivent être phosphorylés pour effectuer une inactivation normale de la rhodopsine photoexcitée (Burns et Baylor, 2001; Fu et Yau, 2007).

Cette réaction de phosphorylation est assurée par l'activation de la rhodopsine kinase (R-K) qui est liée à la membrane (voir figure 7). Celle-ci est inhibée à la noirceur par une protéine, la recoverine (Rv) (Dizhoor et al., 1991) qui lie deux ions calcium à la noirceur. La diminution de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} au cours de la phototransduction visuelle provoque la libération des deux Ca^{2+} de la recoverine et sa dissociation de la rhodopsine kinase (voir figure 7). Par conséquent, le temps de vie de la rhodopsine

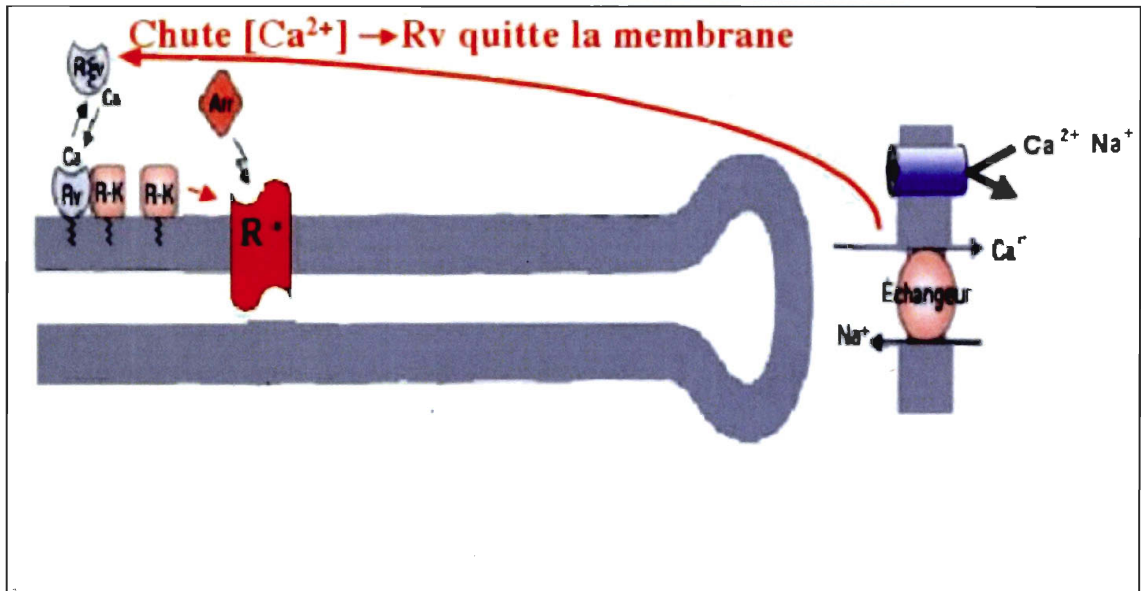


Figure 7 : Rôle de la recoverine dans la phototransduction visuelle. Lorsque la concentration en calcium est élevée, la recoverine se lie à la membrane et inhibe la rhodopsine kinase. Lorsque la concentration en calcium chute, la recoverine change de conformation, se dissocie de la membrane et de la rhodopsine kinase (Rv = recoverine, R-K= rhodopsine kinase, R*= rhodopsine activée).

photoactivée (Kamawura, 1993) et de la PDE (Koutalos et Yau, 1996) devient plus court (la liaison de la recoverine aux membranes discales qui dépend du calcium sera présentée dans la section 3.0). L'arrestine (Arr) lie ensuite la rhodopsine phosphorylée pour empêcher toute activation subséquente de la transducine (Palczewski, 1994).

L'étape limitante pour l'inactivation de la transducine est le taux de GTP hydrolysé par celle-ci. Tant et aussi longtemps que le GTP n'est pas hydrolysé par la transducine, celle-ci continue d'activer la PDE par la liaison de sa sous-unité gamma (He et al., 1998). L'hydrolyse du GTP en GDP par la sous-unité alpha de la transducine cause sa dissociation de la sous-unité gamma de la PDE permettant l'inhibition des sous-unités catalytiques de la PDE et l'arrêt de l'hydrolyse du GMPc (Burns et Baylor, 2001).

1.3.4.3 Retour à l'état basal à la noirceur

Le retour du bâtonnet dans son état basal à la noirceur nécessite la synthèse de GMPc pour ramener sa concentration au niveau prévalant à la noirceur et permettre l'ouverture conséquente du canal CNC. Dans les photorécepteurs, ceci est effectué par la guanylate

cyclase (GC) qui synthétise le GMPc à partir du GTP (figure 6) (Pugh et al., 1997). L'activité de la GC est contrôlée par la protéine activatrice de la guanylate cyclase (GCAP-1, -2 et -3) dont l'activité est aussi modulée par la concentration en calcium. La structure de la GCAP est d'ailleurs similaire à celle de la recoverine.

1.4 La recoverine

1.4.1 Structure et caractéristiques de la recoverine

La recoverine est une protéine de 23 kDa qui possède 190 acides aminés, 11 hélices alpha et 2 courts feuillet bêta anti-parallèles. La structure primaire de la recoverine révèle quatre motifs "EF-hand" dont deux seulement lient un ion calcium (Ames et al., 1996). La première protéine "EF-hand" cristallisée fut la parvalbumine (Kretsinger et Nockolds, 1973). Celle-ci montrait par diffraction des rayons-X, six régions en hélices- α , nommées suivant l'ordre alphabétique, de *A* à *F* (Moews et Kretsinger, 1975). Ce sont les hélices *E* et *F* qui représentent la structure dite "EF-hand" caractéristique d'un motif de 29 acides aminés organisé en hélice-boucle-hélice (Kretsinger et Nockolds, 1973), tel que montré à la figure 8 (Branden et Tooze, 1999). Ces deux hélices sont représentées par l'index et le pouce de la main droite et elles sont perpendiculaires l'une de l'autre (figure 8). Chez la recoverine, seulement les EF-2 et EF-3 lient le calcium avec une affinité respective de 110 nM et 6,9 μ M (Calvert et al., 1995). Sept atomes d'oxygène provenant des acides aminés à proximité du site de liaison du calcium sont impliqués dans la coordination de cet ion calcium (Johnson et al., 1997). Il est impossible pour le calcium de lier les EF-1 et EF-4. En effet, l'EF-1 contient une proline (Pro40) qui change la conformation de cette hélice et des résidus chargés positivement (Lys37 et Cys39) qui repoussent l'ion Ca^{2+} . Par ailleurs, l'EF-4 contient un pont hydrogène entre les résidus Lys161 et Glu171, ce qui inhibe la liaison du calcium (Ames et al., 1996).

La structure tri-dimensionnelle de la recoverine myristoylée en présence de calcium en solution a été déterminée par spectroscopie RMN (Tanaka et al., 1995, Ames et al., 1997, Flaherty et al., 1993) (voir figure 9). Cette figure montre les conformations adoptées par la recoverine en présence et en absence de calcium. En effet, en absence de calcium,

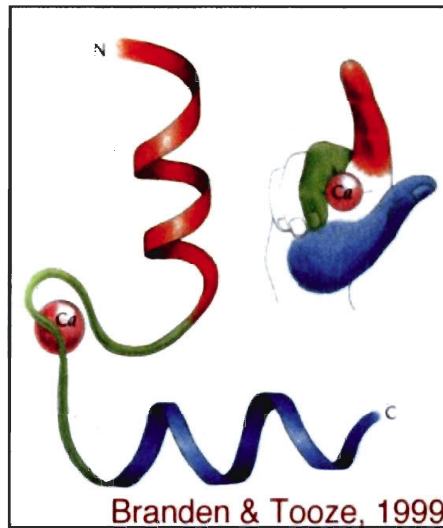


Figure 8 : Schéma d'un motif hélice-boucle-hélice "EF-hand" liant un ion Ca^{2+} (Branden et Tooze, 1999).

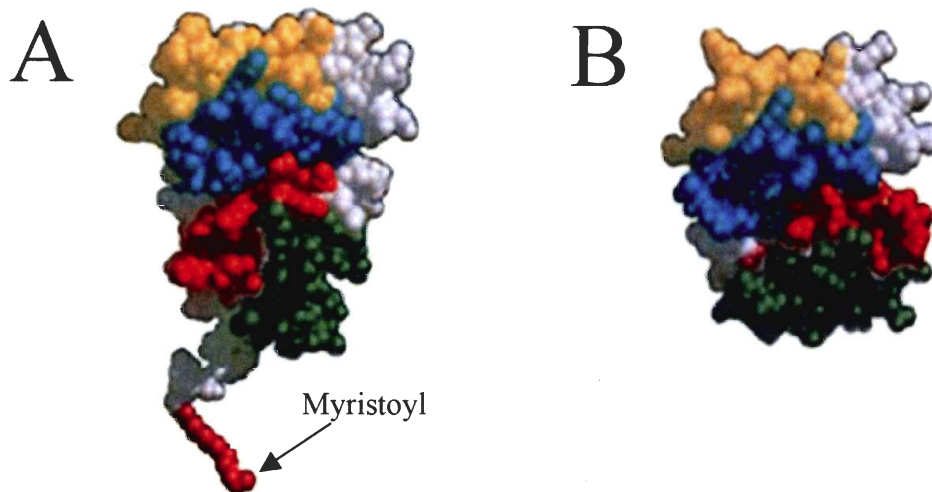


Figure 9 : Structure de la recoverine myristoylée déterminée par RMN en solution (Figure tirée de Ames et al., 1997; 1jsa.pdb. A) La liaison du calcium par la recoverine provoque l'extrusion de son myristoyl alors qu'en absence de calcium B) le myristoyl est enfoui à l'intérieur de la protéine.

le groupement myristoyl est enfoui à l'intérieur de la structure de la recoverine dans un environnement hautement hydrophobe (Zozulya et Stryer, 1992; Dizhoor et al. 1993) (voir figure 9B). La liaison de deux ions Ca^{2+} à la recoverine expose le myristoyl et produit une rotation de 45 degrés de deux domaines exposant aussi plusieurs résidus hydrophobes (Zozulya et Stryer, 1992; Dizhoor et al. 1993) (voir figure 9A). Ce changement structural est à l'origine de l'appellation "calcium-myristoyl switch" attribuée aux protéines dépendantes au calcium qui possèdent un groupement myristoyl, tel que la recoverine (Ames et al., 1997).

La structure de la recoverine non myristoylée déterminée par spectroscopie RMN et diffraction des rayons-X (Flaherty et al., 1993) est similaire à celle de la recoverine myristoylée au niveau de la région hydrophobe qui contient le myristoyl. La recoverine myristoylée et non myristoylée ont une structure identique en présence de calcium (Ames et al., 1996).

1.4.2 La myristoylation de la recoverine

L'acylation des protéines sert en principe à les stabiliser ou bien à les ancrer à la membrane. Cet ancrage peut être permanent ou partiellement permanent, dépendant des conditions physiologiques du milieu (Ames et al., 1996). Dans le cas d'un ancrage partiellement permanent, il donne lieu à une réponse dynamique qui permet un processus de signalisation. Plus de 200 protéines liées aux membranes et impliquées dans divers processus de transduction des signaux sont co-translationnellement modifiées par une liaison covalente d'acide myristique en N-terminal (Valentine et al., 2003). Les protéines destinées à être acylées commencent par la séquence Met-Gly. La méthionine initiatrice est co-translationnellement enlevée par une amino-peptidase et la liaison du myristate à la Gly2 est catalysée par la N-myristoyl transférase (NMT) (Resh, 1991).

La recoverine est modifiée à son extrémité N-terminal par une acylation où le myristate (C14 :0)² est lié de façon covalente à la glycine par la NMT (Resh, 1991). Cette enzyme peut également acyler la recoverine avec les acides gras C14 :1 , C14 :2 et C12 :0 en des proportions variables (chez le bovin, on retrouve 0% de C12 :0 , 10% de C14 :0 , 48%

² Cette nomenclature désigne le nombre de carbones et le nombre d'insaturation de la chaîne hydrocarbonée. C14 :0 correspond à une chaîne de 14 carbones et de 0 insaturation.

de C14:1 et 43% C14:2; DeMar et al., 1999). Ces différentes formes acylées de la recoverine pourraient moduler l'affinité de la liaison de la recoverine aux membranes (Johnson et al., 1997). La raison et la nature exacte de cette acylation hétérogène reste encore inconnue (Anderson et al., 2002).

La myristoylation de la recoverine permet son ancrage aux membranes (Desmeules et al., 2007; Koch, 2000). Plusieurs facteurs peuvent moduler l'affinité de la recoverine pour les membranes. Malgré la présence majoritaire de la recoverine sous la forme acylée dans les SEB, on la trouve aussi sous la forme non-acylée. Celle-ci lie également les membranes mais avec une cinétique de liaison nettement inférieure à celle de son homologue myristoylé (Desmeules et al., 2007). De plus, elle inhibe aussi efficacement la phosphorylation de la rhodopsine à haute concentration de calcium que la forme non myristoylée de la recoverine (Kawamura, 1993; Calvert et al., 1995).

Il a été postulé que l'association de la recoverine avec les membranes ne serait pas essentielle pour son rôle d'inhibition de la R-K (Calvert et al., 1995). Cela peut être expliqué par le modèle de Calvert et al. (1995) où il est proposé qu'un des sites de liaison du calcium est responsable de l'inhibition de la rhodopsine kinase et l'autre de l'association membranaire. La myristoylation à elle seule pourrait être insuffisante pour assurer la stabilité de la liaison membranaire de la recoverine (Alland et al., 1994). Certains résidus en périphérie de la recoverine pourraient interagir avec les têtes polaires des phospholipides membranaires par des interactions de type hydrophobe ou électrostatique. En effet, lorsque le myristoyl interagit avec les membranes de concert avec des résidus basiques (v.g. Arg ou Lys), les forces hydrophobes et électrostatiques agissent ainsi en synergie (Resh, 1991). La région en N-terminal de la recoverine montre un pourcentage élevé de résidus glutamate, par rapport aux lysines, et contient peu d'arginine et d'histidine. Ces résidus glutamate pourraient donc être impliqués dans ce type d'interaction ainsi que les résidus chargés positivement en C-terminal (Senin et al., 2007).

1.4.3 Le rôle de la recoverine dans le processus visuel

Comme on a vu précédemment, l'extrusion du myristoyl provoque un changement conformationnel permettant à la recoverine de lier la membrane et ainsi d'inhiber la rhodopsine kinase (voir figure 6) (Kawamura, 1993). Ce changement conformationnel est

réversible puisque la diminution de la concentration en calcium modifie la conformation de la recoverine et provoque sa dissociation membranaire. Bref, lorsque la concentration en calcium est élevée, à la noirceur, le complexe recoverine- $2Ca^{2+}$ lie la membrane et la rhodopsine kinase et inhibe la phosphorylation de la rhodopsine. Ce n'est que sous l'effet de la lumière, lorsque la concentration de Ca^{2+} diminue que l'affinité entre la rhodopsine kinase et la recoverine est réduite en conséquence de sa dissociation membranaire, ce qui mène à la phosphorylation de la rhodopsine photoactivée (Fu et Yau, 2007). Cependant, cette hypothèse a été contredite par une étude *in vitro* qui suggère que la phosphorylation de la rhodopsine n'est pas affectée par la lumière et par le changement de concentration en calcium (Otto-Bruc et al., 1998). Cette controverse a finalement été résolue par une étude effectuée sur les disques de grenouilles³ (Makino et al., 2004) qui a démontré que le complexe recoverine- $2Ca^{2+}$ joue un rôle dans la phosphorylation de la rhodopsine.

Ce sont les résidus 1 à 31 de la rhodopsine kinase qui sont impliqués dans l'interaction avec le domaine de liaison de la recoverine tel que démontré par Higgins et al. (2006). Cette étude révèle que la recoverine empêche la phosphorylation de la rhodopsine en liant une région spécifique de la rhodopsine kinase qui est essentielle pour la reconnaissance du site de phosphorylation de la rhodopsine photoactivée (Higgins et al., 2006).

Par immunobuvardage de type western, il a été déterminé que la recoverine est localisée principalement dans les bâtonnets et les cônes avec une petite fraction seulement dans les cellules bipolaires (Dizhoor et al., 1991). La majorité de la recoverine dans les bâtonnets est située dans le segment interne. De façon surprenante, la lumière induit une redistribution significative de la recoverine du segment externe et interne vers la terminaison synaptique (Strissel et al., 2005). Par contre, la rhodopsine kinase et la rhodopsine restent dans le segment externe, peu importe les conditions d'illumination. Le rôle physiologique attribué à cette translocation de la recoverine est encore inconnu. Une hypothèse proposée par le groupe de Strissel et al. (2005) stipule que lorsque la concentration de calcium chute sous l'effet de la lumière, la recoverine dissociée de la membrane se redistribue selon son affinité avec les disques des SEB ou encore se lie préférentiellement à une molécule de transport.

³ L'homologue de la recoverine chez la grenouille est la S-moduline.

1.5 Objectifs des travaux de recherche

La vision est parmi les processus du corps humain les plus rapides et où l'amplification du signal est le plus important (Mitchell et al., 2001). La composition lipidique des membranes discales contribue à l'optimisation de cette cinétique puisqu'elle joue un rôle actif dans l'organisation des membranes et la modulation des propriétés des protéines membranaires (Mitchell et al., 2001; Mouritsen et al., 1998). Les travaux de Niu et al. (2004) ont montré la première évidence directe qu'une déficience en DHA (22 :6w3, acide docosahexaénoïque) réduit l'efficacité de la première étape de la phototransduction visuelle, soit le couplage de la rhodopsine photoactivée avec la transducine, causant une perte de l'acuité visuelle (SanGiovanni et al., 2000). En effet, le remplacement du DHA par le DPA (22 :5, acide docosapentaénoïque) est suffisant pour induire un déficit fonctionnel dans le processus de phototransduction visuelle même si cette modification résulte en la réduction d'une seule double liaison (Niu et al., 2004).

Qu'en est-il de l'influence des acides gras polyinsaturés des photorécepteurs sur la fonction de la recoverine myristoylée au cours de l'inactivation du processus visuel? Malgré les avancées notables dans la compréhension du processus visuel, plusieurs découvertes restent à faire, notamment au niveau de la cinétique et des bases structurales des interactions moléculaires de la recoverine myristoylée avec les membranes discales des photorécepteurs.

1.5.1 Objectifs spécifiques

Les paramètres responsables de la modulation de la liaison membranaire de la recoverine sont seulement partiellement connus. Nous souhaitons donc comprendre au niveau moléculaire quels paramètres favorisent l'interaction entre la recoverine et les membranes des photorécepteurs visuels en utilisant le système des monocouches comme modèle membranaire.

Compte tenu de la composition spécifique de la membrane discale, nous avons voulu déterminer l'importance des phospholipides des photorécepteurs visuels dans l'interaction de la recoverine myristoylée avec les membranes. Puisque la nature de la tête polaire et de

la chaîne grasse varient, ces paramètres ont aussi été variés de façon à évaluer ce qui module cette interaction.

Nos objectifs spécifiques de recherche consistaient donc 1) à déterminer l'effet de l'insaturation et de la longueur des chaînes grasses des phospholipides sur la liaison de la recoverine myristoylée aux membranes en présence de calcium, 2) à déterminer l'importance de la myristoylation dans la liaison de la recoverine aux membranes par des mesures avec la recoverine myristoylée et non myristoylée, et 3) à déterminer l'effet de l'entassement des phospholipides sur l'orientation de la recoverine myristoylée.

CHAPITRE 2: MATÉRIEL et MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Surexpression de la recoverine dans *Eschericia coli*

On peut extraire la recoverine des tissus rétiniens mais ce n'est pas avantageux puisqu'elle s'y trouve en très faible quantité. On a donc opté pour une méthode permettant d'atteindre un meilleur rendement de production, soit la surexpression dans un système bactérien.

Les systèmes d'expression bactériens permettent la production de plusieurs copies d'une protéine désirée à partir d'un vecteur d'expression inséré dans une cellule hôte. Un vecteur d'expression est un plasmide bactérien (une courte chaîne d'ADN circulaire) qui contient toute la génétique codante nécessaire pour produire la protéine, incluant un promoteur approprié, une séquence de terminaison de la transcription et une séquence codante pour la liaison des ribosomes (Purves et al., 2001). Le vecteur d'expression pET a été développé par Studier et Moffat (1986). Ce système est très utilisé pour son habileté à produire de grandes quantités de protéines grâce à sa spécificité au promoteur T7 qui lie seulement l'ARN polymérase T7 et pour sa facilité d'utilisation (Unger, 1997). C'est grâce à ce promoteur qu'on évite l'expression d'ARN polymérase bactérien. La réplication est initiée par l'ajout d'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) qui sert à éliminer un répresseur de réplication. Un gène de résistance à certains antibiotiques (ampiciline et kanamicine) est aussi ajouté au vecteur d'expression qui permet ainsi la réplication seulement des bactéries ayant incorporé ce vecteur, lorsque ces antibiotiques sont présents dans le milieu de culture.

2.1.1 Surexpression et purification de la recoverine myristoylée et non myristoylée

La recoverine myristoylée est exprimée par les bactéries *E. coli*, soit le système BL21(DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI) qui ont été transformées avec les plasmides pET11a-Rec et pBB131 (provenant de James B.Hurley, University of Washington, Seattle, WA) codant respectivement pour la recoverine et la N-myristoyltransférase (Ray, al., 1992). La transformation des bactéries avec ces vecteurs consiste à mettre les cellules en

culture dans 250 mL d'un milieu LB (Luria Bertani) à 37°C en présence d'ampicilline (100 µg/ml, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) et de kanamycine (50 µg/ml, Sigma Aldrich). Lorsque la croissance bactérienne atteint une absorbance de 0,3 à 600 nm, on induit la réplication par l'ajout de 1 mM d'IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside, Fisher Sci.); les cellules sont incubées pendant 3 heures supplémentaires à température de la pièce (Desmeules et al., 2006). Pour permettre la N-myristoylation de la recoverine, on ajoute un excès d'acide myristique (Sigma Aldrich) dissous dans l'éthanol (4% v/v) vingt minutes avant l'induction. Les cellules sont ensuite centrifugées et resuspendues dans 10 mL de tampon A (50 mM Hépes (N-[2-hydroxyéthyl])pipérazine-N'-[2-éthane acide sulfonique), pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ et 5 mM β-mercaptoéthanol) (Desmeules et al, 2006). Après sonication et centrifugation (20 000 g durant 30 min à 4°C), le lysat est purifié par chromatographie à interactions hydrophobes.

La méthode de purification est basée sur la propriété intrinsèque de la recoverine myristoylée, soit son changement conformationnel induit par la liaison du calcium (Ray et al., 1992). En présence de calcium, sa conformation expose le myristoyl et les acides aminés hydrophobes en périphérie (voir figure 9A), ce qui permet à la recoverine de lier la colonne composée d'une résine hydrophobe de phényl sépharose. Le passage du tampon contenant du calcium dans la colonne servira donc à lier la recoverine myristoylée et à éliminer les autres composés présents dans le lysat suite à l'étape de surexpression. La recoverine myristoylée ou non myristoylée sera éluée seulement après l'ajout d'un tampon d'éluion contenant un agent chélatant, tel que l'EGTA ((éthylène – glycol-bis-(b-amino-éthyl-éther)) N,N'-tétra acide acétique), puisque la conformation adoptée par la recoverine myristoylée change en absence de calcium où son myristoyl devient enfoui à l'intérieur de la protéine (voir figure 9B), ce qui réduit ses interactions hydrophobes avec la phényl sépharose et permet son éluion (Desmeules et al., 2006; Ray et al., 1992).

La colonne utilisée (Econo-column, BioRad, Hercules, CA) contient 5 mL de phényl sépharose (6 Fast flow, low sub resin; Amersham Biosciences, Fairfield, CT) et est pré-équilibrée avec le tampon A (Desmeules et al., 2006). La récoverine est éluée à un débit de 0,4 mL/min avec le tampon B (5 mM Hépes, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol et 5 mM EGTA) (Desmeules et al., 2006). On collecte 0,4 mL de chaque

fraction dont la concentration est déterminée par la méthode de Bradford et le degré de myristoylation par HPLC.

2.1.2 Description du matériel

Le milieu de culture LB est composé de bactotryptone 1% (p/v) (VWR Canlab, West Chester, PA), de bacto levure 0,5 % (p/v) (VWR Canlab) et de NaCl 1% (p/v) (Sigma Aldrich). L'eau déionisée utilisée pour la préparation des solutions est purifiée avec un appareil de purification NanoPure (Barnstead). La résistivité de cette eau est supérieure ou égale à 18.2 M Ω *cm et sa tension de surface est \geq 72 mN/m à 21 °C. Les réactifs pour la préparation des tampons A et B sont le chlorure de sodium (NaCl) ultrapur (99,9%) qui provient de J.T. Baker (Phillipsburgh, NJ). L'Hépès (99,5%), le 2-mercaptoéthanol et l'EGTA proviennent de Sigma. Le chlorure de calcium (CaCl₂) et l'éthanol sont respectivement obtenus de Fluka (Buschs SG, Switzerland) et Baxter Corp. (Dallas, TX).

2.1.3 Détermination de la pureté de la recoverine et de sa concentration

2.1.3.1 Évaluation de la pureté de la recoverine

On peut évaluer qualitativement la pureté de nos fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, communément appelée SDS-PAGE (voir figure 10). Cette méthode permet de séparer les protéines d'un mélange par leur taille ou leur mobilité électrophorétique sous l'influence d'un champ électrique appliqué aux extrémités du gel. La mobilité électrophorétique (μ) est proportionnelle à la charge nette et inversement proportionnelle à la grosseur de la molécule qui est déterminée par son rayon (Foley, 1990). En effet, les petites molécules migrent à une vitesse supérieure aux grosses molécules et plus leur charge est importante, plus celles-ci se déplaceront rapidement.

Les gels de polyacrylamide sont moulés entre des plaques de verre en polymérisant une solution de monomères d'acrylamide (BioRad). La taille des pores du gel est ajustée par la concentration de polyacrylamide et du réactif de réticulation (fixés à 12,1% et 0,2%, respectivement). La longueur des chaînes de polymère est déterminée par le TEMED (BioRad), qui agit à titre de catalyseur. On ajoute aussi un détergent ionique au gel, le dodécylsulfate de sodium (SDS, BioRad), qui dénature les protéines de façon à les faire

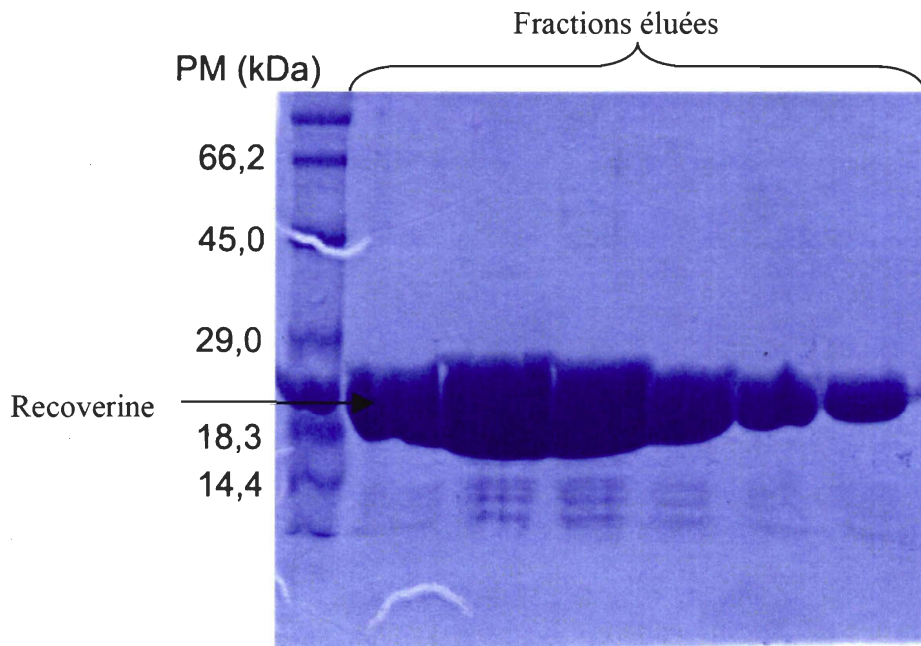


Figure 10 : Gel SDS-PAGE de la recoverine myristoylée. Quelques fractions d'élution de la recoverine au cours de la chromatographie sur phényl sépharose. Le poids moléculaire des standards (en kDa) sont indiqués à gauche.

migrer dans une conformation propre à leur grosseur, les unes par rapport aux autres et le persulfate d'ammonium (BioRad) à titre d'initiateur de la réaction. Bref, on s'assure de cette façon que la masse soit la cause déterminante de la migration. Les protéines sont colorées sur le gel avec le bleu de Coomassie (BioRad) et sont donc visibles à l'œil nu. On détermine le poids moléculaire obtenu par comparaison à un standard de protéines qui aura aussi migré sur le gel en même temps que la protéine. On peut apprécier sur la figure 10 la pureté de quelques fractions de la recoverine myristoylée, suite à sa purification par chromatographie sur colonne de phényl sépharose. La bande est située à ~23 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire de la recoverine myristoylée. De plus, la dimension et l'intensité de la bande indiquent que la recoverine a été exprimée en grande quantité. Par ailleurs, la présence d'une infime quantité de contaminants démontre la très grande pureté de nos échantillons de recoverine (> 99%).

2.1.3.2 Détermination de la concentration en recoverine par la méthode de Bradford

La concentration de protéine est déterminée par un dosage colorimétrique appelé méthode de Bradford (Bradford, 1976). Il s'agit d'ajouter du bleu de Coomassie (Biorad) à nos échantillons de protéine et la formation d'un complexe avec l'arginine et les autres acides aminés hydrophobes produira un changement de la longueur d'onde d'adsorption du colorant. Ce changement est quantifié par spectroscopie UV-visible à une longueur d'onde de 595 nm et est proportionnel à la quantité de colorant lié, ce qui permet de déterminer la concentration de protéines dans chacune des fractions avec un standard de BSA (albumine sérique bovine, Sigma Aldrich) de concentration connue.

2.1.4 Détermination du taux de myristoylation de la recoverine

Il est possible de quantifier le taux de myristoylation suite à l'expression de la recoverine par HPLC ("high pressure liquid chromatography") en phase inverse. La colonne apolaire retiendra davantage la forme myristoylée de la recoverine et permettra de la séparer de la forme non myristoylée grâce à son temps de rétention plus long (Desmeules et al., 2006).

On doit d'abord changer le tampon B dans lequel la recoverine a été purifiée pour un autre tampon (5 mM Hépes (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol) ne contenant pas d'EGTA. On ajoute ensuite 1 mM de CaCl_2 à la solution pour que la recoverine myristoylée se retrouve dans la conformation où son myristoyl est à l'extérieur de la protéine (voir figure 9A) ainsi que 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) qui agira à titre d'agent de pairage d'ions. En effet, le TFA formera des liaisons électrostatiques avec certains acides aminés, de façon à rigidifier la structure moléculaire et d'affiner la largeur du pic d'élution, ce qui permet une meilleure séparation (Winkler, 1987). On utilise un gradient d'élution de 0 à 80% d'acétonitrile (contenant 0,1% de TFA) pour faire la séparation (Desmeules et al., 2006). La colonne utilisée est une Jupiter 5 μ C4 300A (Phenomenex). On voit, sur la figure 11, un chromatogramme montrant que la recoverine myristoylée et non myristoylée sont éluées à environ 3 minutes d'intervalle. Les fractions les plus concentrées en recoverine, suite à la purification, contiennent un taux de myristoylation de ~97%.

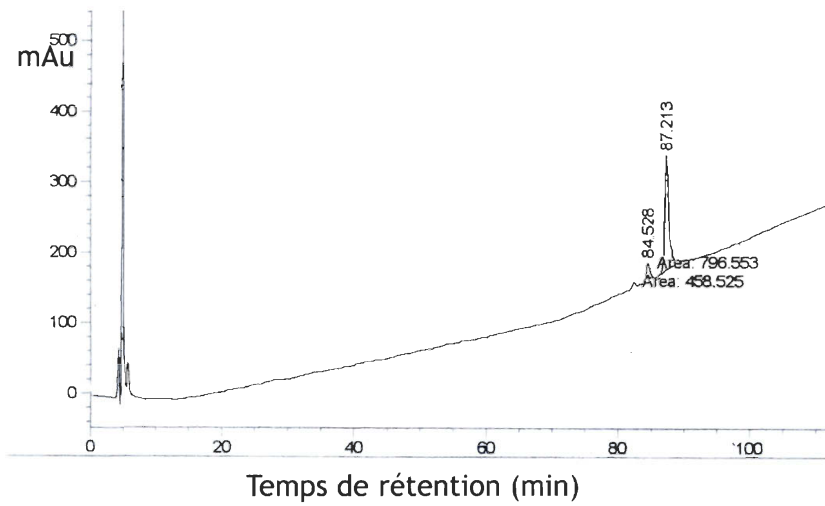


Figure 11 : Profil d'élution d'une fraction de la recoverine myristoylée. Les pics à 84,5 et 87,2 min correspondent à la recoverine non myristoylée et myristoylée, respectivement. Cet échantillon contient 63 % de recoverine myristoylée.

2.2 Films monomoléculaires à l'interface air-eau et mesures de pression de surface

Les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche de phospholipides dont les têtes polaires sont orientées vers le milieu aqueux et les chaînes hydrophobes interagissent ensemble, tel que présenté sur la figure 12. Comme on souhaite comprendre l'interaction entre la recoverine et les membranes des photorécepteurs, on doit trouver un modèle membranaire qui s'approchera le plus de cette réalité. Plusieurs approches ont été utilisées afin de créer un système modèle pour les bicouches lipidiques et ainsi tenter de mimer la membrane cellulaire (Cadenhead et al., 1977). Entre autres, la formation de vésicules (Ingelman-Sundburd et Glaumann, 1977) et la technique des films monomoléculaires à l'interface air-eau (Langmuir, 1936) ou communément appelés films de *Langmuir*, constituent des méthodes utilisées couramment. La méthode des films de Langmuir est celle que nous avons utilisée dans cette étude en raison des avantages qu'elle représente. En effet, cette méthode permet de varier plusieurs paramètres, dont le type de phospholipides et leur entassement moléculaire afin d'étudier leur effet sur la liaison de la recoverine. Dans la prochaine section, sera détaillé le principe de cette méthode, puis nous verrons par la suite l'aspect technique des différentes mesures effectuées.

2.2.1 Principe des films de Langmuir

Cette méthode s'appuie sur les propriétés tensioactives des phospholipides. En effet, lorsqu'on étale des phospholipides sur une surface aqueuse, ceux-ci s'organisent spontanément de façon à former une seule couche de molécules qu'on nommera monocouche (Adamson, 1976) (voir figure 12). Telle une membrane, les têtes polaires hydrophiles pointent vers l'eau et les chaînes hydrocarbonées vers l'air. Comme la tension de surface reflète le niveau d'organisation des molécules à l'interface il est intéressant d'effectuer cette mesure avec des diverses monocouches de molécules.

La tension superficielle est la force qui existe à l'interface entre deux milieux, soit liquide-gaz dans ce cas-ci (Gaines, 1966). Elle est exprimée par le rapport de l'énergie libre de Gibbs des molécules de surface sur la variation d'aire de surface, tel que représenté par l'équation 1 :

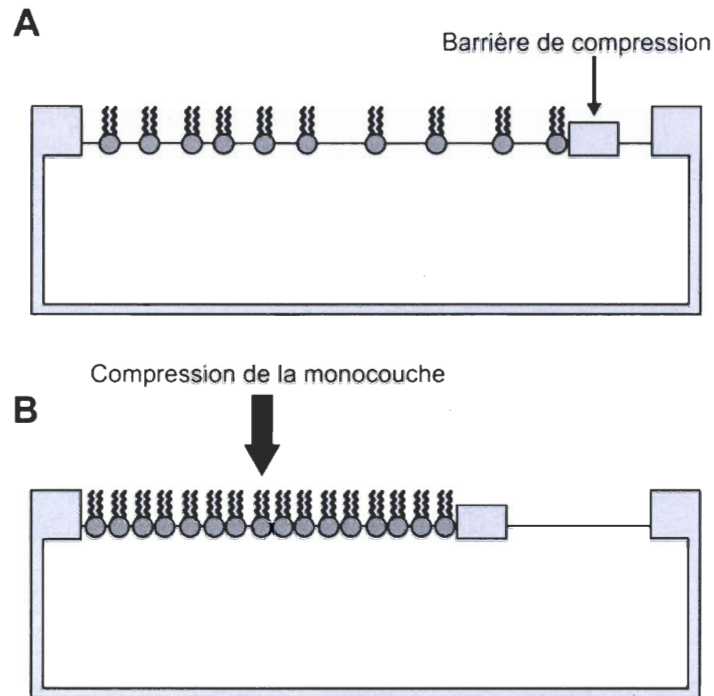


Figure 12 : Cuve de Langmuir. Cuve de Langmuir avec une monocouche de phospholipides étalés à l'interface air-eau. En A, la monocouche se situe à une aire moléculaire élevée, tandis qu'en B, une fois comprimée par la barrière de compression, elle est plus compacte.

$$\gamma = \left(\frac{\delta G}{\delta S} \right)_{T, P, n_i}$$

Équation 1 : Relation exprimant la tension superficielle (γ). δG = changement d'énergie libre de Gibbs, δS = diminution ou augmentation de la surface à T, P et n_i constants, soit la température, la pression et le nombre de molécules, respectivement.

En effet, au sein d'un liquide, les molécules exercent entre elles des forces intermoléculaires d'attraction qui sont égales dans toutes les directions. La force résultante de ces forces est donc nulle, contrairement aux molécules en surface qui subissent une force résultante vers le cœur de la phase (Gaines, 1966), puisqu'il n'y a pas de molécules voisines du même type dans la phase gazeuse. C'est ce qui détermine la forme qu'adoptent les liquides car ils tendent à former un ménisque pour réduire leur surface en contact avec l'air. L'ajout de phospholipides à l'interface air-eau contribue à stabiliser la surface et à

diminuer la tension superficielle car cela résulte en une réduction du nombre de molécules d'eau présentes à la surface.

La mesure de tension de surface est effectuée par la méthode de Wilhelmy qui a été développée en 1863 (Wilhelmy, 1863). On mesure la tension superficielle d'un liquide au moyen d'une sonde immergée dans la sous-phase. Le liquide monte par capillarité sur la sonde et, comme cette dernière est reliée à un système de pesée, on pourra déterminer la force⁴ exercée par la surface. Cette force est définie par l'équation 2 et elle est proportionnelle à la tension superficielle :

$$F = \gamma P \cos\theta$$

Équation 2 : Équation de Wilhelmy. F = force de mouillage du liquide, γ = tension superficielle, P = le périmètre de la sonde et θ = l'angle de contact entre le ménisque qui monte sur la sonde par capillarité. L'angle de contact est estimée à 0° , ce qui suggère un mouillage total du liquide sur la sonde.

Puisqu'un soluté est ajouté au liquide, on mesure plutôt la pression de surface (voir l'équation 3) qui est la différence de tension de surface entre le liquide pur et celui couvert de phospholipides (Gaines, 1966). Les unités de cette mesure sont des milli-Newton par mètre (mN/m).

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma$$

Équation 3 : Équation de la pression de surface (Π). γ_0 = tension de surface du liquide pur ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}} = 72,8 \text{ mN/m}$), γ = tension de surface du liquide recouvert du film.

2.2.2 Mesure de l'adsorption de la recoverine

La figure 13 montre un bain de monocouche de la compagnie Kibron, composé de micropuits avec lesquels les mesures d'adsorption ont été faites. Ces micropuits de 500 μL permettent de faire les mesures d'adsorption de la recoverine à aire moléculaire fixe, tout en minimisant la quantité de protéines à injecter.

⁴ Le poids de la sonde et la poussée d'Archimède contribuent à cette valeur de force, mais comme ces valeurs sont égales pour le film seul et en présence de soluté, ceux-ci s'annuleront.

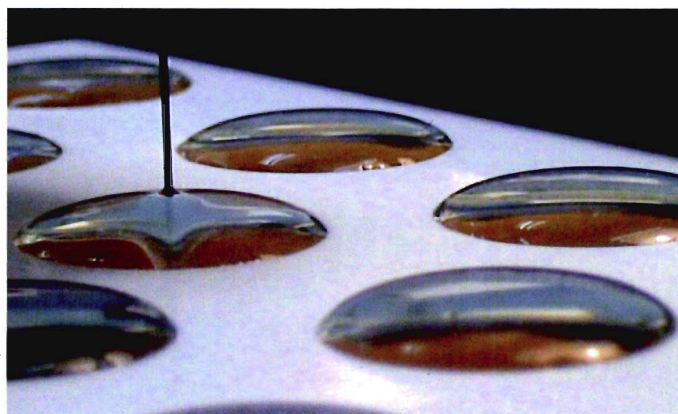


Figure 13 : Bain Kibron composé de micropuits de verre. Chaque puits contient 500 μL de sous-phase tamponnée. L'utilisation de verre est une condition *sinequanone*, car la recoverine se lie irréversiblement aux matériaux hydrophobes, tel le Téflon. La sonde au centre du puits permet de mesurer la pression de surface. Les phospholipides sont étalés à la surface de l'eau jusqu'à l'atteinte de la pression de surface visée.

2.2.2.1 Description du matériel

Le chloroforme (99,9%) est obtenu chez Fluka et Omega. L'hexane et l'éthanol proviennent respectivement de Commercial alcohols et Baxter Corporation. Les phospholipides proviennent de la compagnie Avanti Polar Lipids. Les autres composés utilisés ont été décrits dans la section 2.1.2.

Les phospholipides sont d'abord étalés à l'aide d'une microseringue (Hamilton) à la surface d'une solution aqueuse (Hépes 1 mM (pH 7.5), CaCl_2 1 mM, NaCl 100 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM) à partir d'une solution préparée dans le chloroforme pour les phosphatidyléthanolamines et phosphatidylcholines et d'une solution hexane/éthanol (9 :1) pour les phosphatidylsérines. On observe une augmentation de la pression de surface avec la quantité de phospholipides ajoutée, puis elle diminue ensuite légèrement avec l'évaporation du solvant pour se stabiliser à une valeur propre à l'entassement moléculaire à l'équilibre.

On injecte ensuite typiquement 5 μl de recoverine (la concentration finale dans le puits est de 52 nM) sous la monocouche à l'aide d'une microseringue (Hamilton) et on observe son adsorption à la monocouche de phospholipide par la mesure de l'augmentation de la pression de surface, jusqu'à une valeur qui dépendra de l'affinité du système recoverine-phospholipide et de la pression de surface initiale. Ces mesures d'adsorption

sont effectuées à différentes pressions de surface initiales et avec différents types de phospholipides. Ces phospholipides sont énumérés dans le tableau 2, ainsi que leurs caractéristiques moléculaires, telles la longueur des chaînes grasses hydrophobes, la charge nette de la tête polaire et le nombre d'insaturations. La structure moléculaire de la tête polaire des phospholipides utilisés est représentée à la figure 14.

2.2.3 Pression critique d'insertion

À une faible pression de surface initiale (Π_i), c'est à dire la pression correspondant à l'étalement d'une faible quantité de phospholipides, l'adsorption de la recoverine sera maximale, puisque l'entassement moléculaire est suffisamment lâche pour permettre l'insertion de molécules (voir figure 15). À l'inverse, lorsque la pression de surface initiale est élevée, l'adsorption de la recoverine sera minimale (voir figure 15). La pression critique d'insertion (PCI, Π_c) correspond à l'entassement des phospholipides (ou à la pression de surface) à partir duquel l'insertion de la recoverine devient impossible (Boucher et al., 2007). Bref, si on porte en graphique la différence de pression de surface suite à l'adsorption de la recoverine (pression de surface maximale (ou à l'équilibre) moins la pression de surface initiale ($\Pi_e - \Pi_i$)) en fonction de la pression de surface initiale, la PCI correspondra à la jonction de l'extrapolation de la droite de régression avec l'axe des x (voir encart de la figure 15). Cette valeur est donc reliée à l'affinité de la recoverine pour la monocouche; plus elle est élevée, plus cette affinité sera grande et vice-versa. De plus, la PCI est propre à l'interaction entre la recoverine et un phospholipide donné. Il est donc intéressant de comparer les valeurs de Π_c pour différents types de phospholipides incluant ceux présents dans les membranes discales des photorécepteurs.

Phospholipides	Abréviation	(# carbones : # d'insaturations)	Z nette
dimyristoylphosphatidylcholine	DMPC	(14 :0)	0
dimyristoylphosphatidylsérine	DMPS	(14 :0)	-1
dimyristoylphosphatidyléthanolamine	DMPE	(14 :0)	0
dipalmitoylphosphatidylcholine	DPPC	(16 :0)	0
dipalmitoylphosphatidylsérine	DPPS	(16 :0)	-1
dipalmitoylphosphatidyléthanolamine	DPPE	(16 :0)	0
dioléoylphosphatidylcholine	DOPC	(18 :1)	0
dioléoylphosphatidylsérine	DOPS	(18 :1)	-1
dioléoylphosphatidyléthanolamine	DOPE	(18 :1)	0
didocosaénoylphosphatidylcholine	DDPC	(22 :6)	0
didocosaénoylphosphatidylsérine	DDPS	(22 :6)	-1
didocosaénoylphosphatidyléthanolamine	DDPE	(22 :6)	0

Tableau 2 : Liste des phospholipides utilisés lors des mesures d'adsorption de la recoverine. On peut voir aussi la longueur des chaînes hydrocarbonées ainsi que leur insaturation. La charge nette (Z) de la tête polaire des phospholipides est aussi montrée.

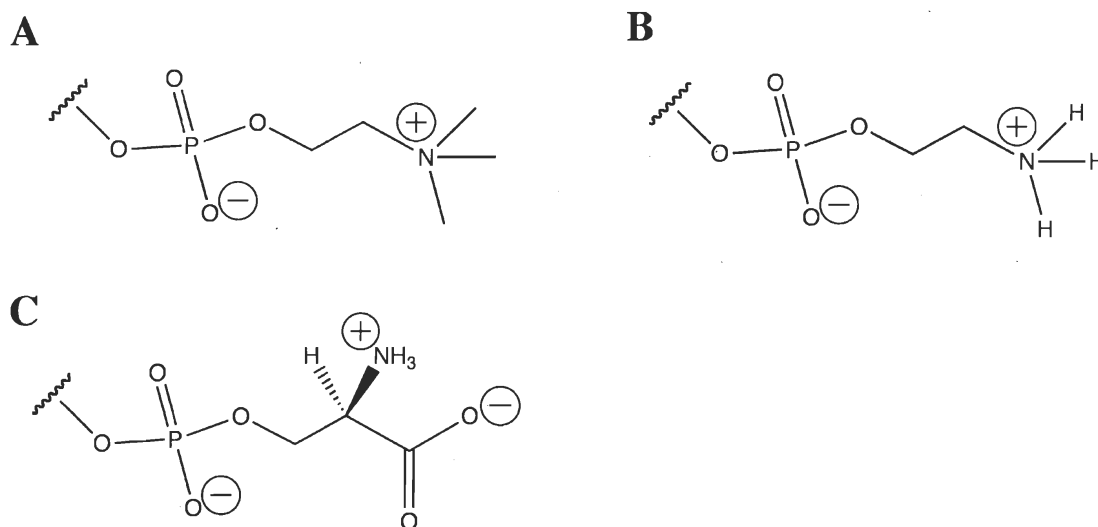


Figure 14 : Structure moléculaire des têtes polaires de la phosphatidylcholine (A), la phosphatidyléthanolamine (B) et la phosphatidylsérine (C).

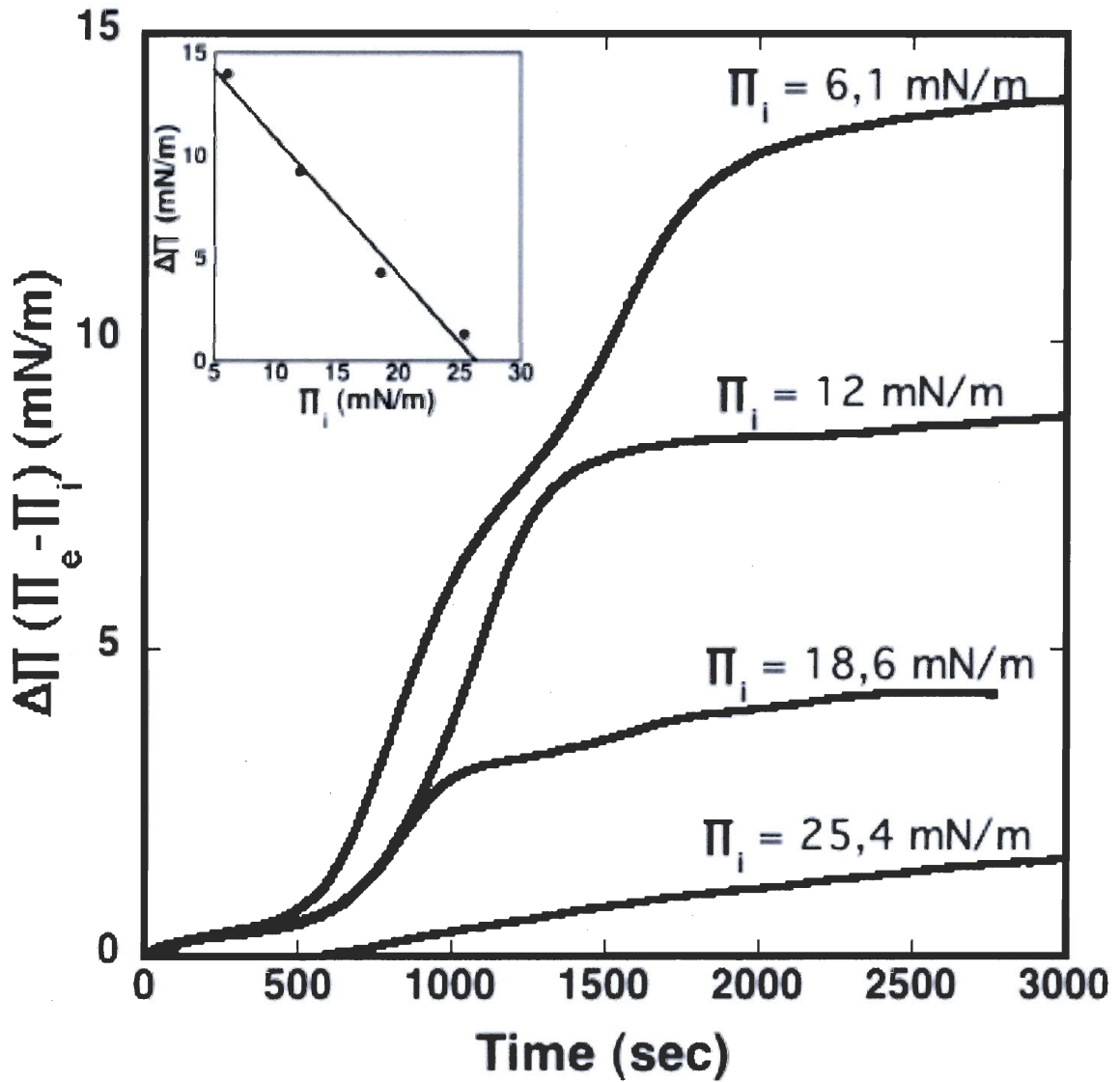


Figure 15 : Cinétique d'adsorption de la recoverine myristoylée à une monouche de DOPE. Différentes pression de surface initiales (Π_i) : (1) 6,1, (2) 12,0, (3) 18,6, (4) 25,4 mN/m. L'encart montre la valeur de la PCI déterminée par l'extrapolation du graphique de $(\Pi_e - \Pi_i)$ en fonction de Π_i à l'endroit où la droite croise l'axe des x (Boucher et al., 2007).

2.3 Isothermes d'adsorption de la recoverine à des monocouches de phospholipides à aire moléculaire variable

La technique de Langmuir permet de faire varier l'entassement moléculaire de la monocouche de différentes façons, soit en étalant différentes quantités de phospholipides ou soit en déplaçant la barrière mobile (voir figure 11) qui contrôle l'aire moléculaire de la monocouche. Ces mesures sont effectuées avec un bain Kibron (20,7 cm x 5,9 cm) muni de barrières mobiles.

Par ce type de mesure, on souhaite caractériser l'affinité de la recoverine pour différents phospholipides en comprimant la monocouche suite à l'adsorption de la recoverine (Lamarche et al., 1988). En effet le système binaire recoverine/phospholipides soumis à une force de compression se dissociera à une certaine valeur de pression de surface, correspondant à l'affinité et/ou la stabilité de l'adsorption. En comparant les propriétés interfaciales du lipide pur versus le système recoverine/phospholipide, on sera en mesure de décrire l'interaction entre ces molécules et d'étudier l'influence de la pression de surface sur la répartition de la protéine soluble entre la phase lipidique et aqueuse (Lamarche et al., 1988).

La méthode consiste d'abord à étaler le lipide à la surface de la phase aqueuse à une pression de surface de zéro qui correspond à l'aire moléculaire maximale du bain de monocouche. La monocouche est ensuite comprimée par la fermeture des barrières mobiles jusqu'à une valeur de pression de surface inférieure au collapse. On ouvre à nouveau les barrières jusqu'à l'aire moléculaire maximale pour ensuite les comprimer jusqu'au collapse. On a utilisé cette procédure pour le lipide seul et on porte en graphique la pression de surface (mN/m) en fonction de l'aire moléculaire (\AA^2) lors de ces trois étapes de compression/décompression. Pour les mesures avec la recoverine, on comprime la monocouche de phospholipides jusqu'à une pression de surface arbitraire, qu'on a fixée à 20 mN/m. On injecte la recoverine (la concentration finale est de 52 nM dans la sous-phase contenue entre les deux barrières) et on laisse la protéine s'adsorber. On continue ensuite la compression jusqu'à une valeur inférieure au collapse puis on décomprime la monocouche jusqu'à la valeur d'aire moléculaire maximale. Finalement, on comprime la monocouche recoverine/phospholipides jusqu'à l'atteinte du collapse. Lorsqu'on porte cette dernière série de mesures en graphique (pression de surface en fonction de l'aire moléculaire) et

qu'on superpose ces données à la série de mesures correspondant au lipide seul, on obtient des informations sur les interactions entre la recoverine et les phospholipides étudiés.

2.4 Spectroscopie de réflexion-adsorption par modulation de polarisation en infrarouge (PM-IRRAS) à l'interface air-eau

L'utilisation d'une méthode *in situ* qui procure directement de l'information moléculaire à partir d'une monocouche étalée à l'interface air/eau revêt un grand intérêt pour une meilleure compréhension de l'organisation structurale de protéines dans notre modèle membranaire. La méthode spectroscopique de réflexion-adsorption par modulation de polarisation en infrarouge (PM-IRRAS) convient très bien à l'étude de ce type de modèle membranaire (Blaudez et al., 1993b). Les dérives et instabilités expérimentales du montage ainsi que les très fortes bandes de vapeur d'eau dans la région spectrale étudiée, soit 2000-1300 cm^{-1} , constituent les principales contraintes que la technique PM-IRRAS arrive à corriger (Blaudez et al., 1993b), grâce au modulateur photoélastique (Golden, 1985). Cette méthode est décrite brièvement dans cette section, tant au niveau théorique que technique.

2.4.1 Montage expérimental

Le signal infrarouge est produit à l'aide d'un spectromètre IR-TF (infrarouge à Transformée de Fourier) classique. À la sortie de l'interféromètre, l'intensité du faisceau infrarouge est modulée à une fréquence ω_1 entre 0.1 et 1 kHz (voir figure 16). Le faisceau est d'abord polarisé en p (parallèle au plan d'incidence⁵) grâce au polariseur de sélénure de zinc puis passe dans le modulateur photoélastique qui module, à une fréquence fixe ($2\omega_1$) de 62 kHz, la polarisation du faisceau infrarouge de p à s (perpendiculaire au plan d'incidence) dans le moyen infrarouge (ν_1 varie de 500 à 4000 cm^{-1}). La figure 17 illustre le modulateur photoélastique, fait d'un cristal isotrope de ZnSe transparent dans le domaine spectral étudié, auquel on applique une contrainte mécanique au moyen de deux piézoélectriques en quartz, alimentés par une tension alternative $V_0 \cos(\omega t)$ (Blaudez, 1993a). Cette contrainte induit dans le cristal un déphasage périodique entre les deux composantes du champ, soit s et p . Cette procédure permet de sonder

⁵ Le plan d'incidence est défini par la direction de propagation de l'onde à l'interface

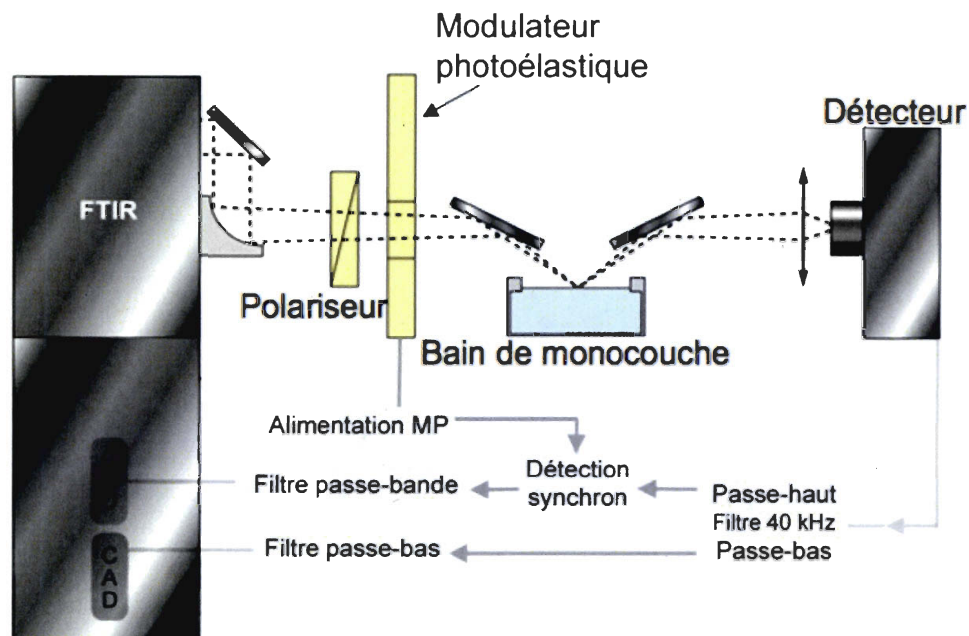


Figure 16 : Montage expérimental du spectromètre PM-IRRAS à l'interface air-eau.

Le faisceau émergent du spectromètre IR-TF passe par le polariseur et le modulateur photoélastique avant d'atteindre la cuve de Langmuir (bain). Celle-ci réfléchit une partie du faisceau qui sera focalisé par une lentille sur le détecteur MCT. Le traitement électronique nécessite d'abord une pré-amplification avant de sélectionner le signal avec des filtres et de démoduler un des deux signaux par la détection synchrone (tiré de Castano, 1998).

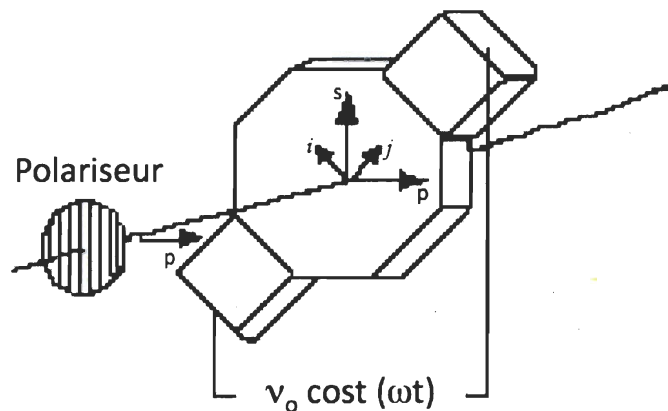


Figure 17 : Composantes de la spectroscopie PM-IRRAS : le polariseur et le modulateur photoélastique. Le polariseur à grille permet d'abord de polariser le faisceau dans un plan p . Le modulateur photoélastique est composé d'un cristal de ZnSe et de deux piézoélectriques en quartz auxquels on applique une tension à chaque extrémité. Cette tension permet de moduler le signal d'une polarisation de p à s à une fréquence fixe.

l'orientation des moments de transition des différents modes vibrationnels des molécules à la surface. L'angle d'incidence optimal du faisceau à la surface de l'eau est de 75 degrés (Blaudez, 1993a) par rapport à la normale du plan d'incidence. Finalement, le faisceau réfléchi est focalisé par une lentille de ZnSe sur le détecteur de type HgCdTe (MCT) photovoltaïque (voir figure 17). Pour limiter le bruit thermique et puisque le détecteur n'est pas conducteur à la température de la pièce, celui-ci est refroidi avec de l'azote liquide (77K).

D'une part, le signal pré-amplifié à la sortie du montage peut être divisé électroniquement par un filtre passe-haut et passe-bas en deux composantes du courant, soient l' I_{DC} et l' I_{AC} . L' I_{DC} correspond seulement à l'intensité de modulation induite par le miroir mobile du spectromètre IR-TF alors que l' I_{AC} contient aussi la modulation de polarisation induite par le modulateur photoélastique (Blaudez et al., 1993b). L' I_{AC} doit donc être démodulé au moyen d'une détection synchrone. D'autres filtres limitent la bande passante des deux signaux au domaine spectral étudié. Le ratio des signaux obtenus, soit I_{DC} sur I_{AC} (voir équation 4) correspond au signal PM-IRRAS, proprement dit.

$$S = \frac{I_{DC}}{I_{AC}} = \frac{(R_p - R_s) J_2(\phi)}{(R_p + R_s) + (R_p - R_s) J_0(\phi)}$$

Équation 4 : Expression théorique du signal (S) PM-IRRAS obtenu. I_{AC} = courant alternatif, I_{DC} = courant continu, R_p , R_s traduisent respectivement la réflectance suite à l'adsorption du faisceau infrarouge par la monocouche en polarisation p et s de façon à sonder tous les moments de transition à la surface, J_2 et J_0 représentent les fonctions de Bessel d'ordre 2 et 1 et traduisent l'efficacité du modulateur en fonction de la longueur d'onde, ϕ est l'amplitude du déphasage périodique entre les composantes du champ électrique.

Puisque les contributions isotropes sont les mêmes au numérateur qu'au dénominateur, elles vont se compenser et on obtient ainsi un signal qui fait référence uniquement au signal anisotrope de la surface en éliminant les contributions de l'eau (Blaudez et al., 1993b). On peut donc ainsi discriminer le très faible signal de la monocouche de la forte adsorption de l'environnement de vapeur d'eau.

Un substrat diélectrique tel que l'eau possède une forte adsorption dans l'infrarouge et sera responsable d'une part importante du bruit dans le signal (Blaudez, 1993a). Comme la contribution de la monocouche au signal est très faible, cela exige la soustraction du spectre de la phase aqueuse tamponnée du spectre de la monocouche, ce qui permet d'obtenir un signal d'intensité satisfaisante. De plus, la fonction de Bessel induite par le modulateur photoélastique, apparaissant sous la forme d'une cloche dans les deux spectres, est éliminée par cette normalisation ainsi que tous les artefacts expérimentaux permanents. Cette normalisation (voir équation 5) est le ratio entre le signal de la monocouche seule ($S(d) - S(0)$) et le signal de la phase aqueuse tamponnée ($S(0)$) (Blaudez, 1993a).

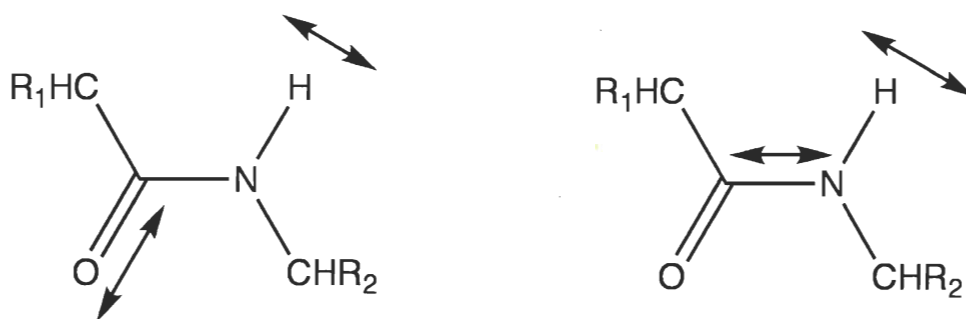
$$\text{Signal PM-IRRAS normalisé} = \frac{S(d) - S(0)}{S(0)}$$

Équation 5 : Équation permettant d'obtenir un signal PM-IRRAS normalisé. $S(d)$ est le signal en présence de la monocouche d'une épaisseur d alors que $S(0)$ correspond au signal de la sous-phase.

À la suite de ces transformations mathématiques, on obtient des bandes positives ou négatives par rapport à la ligne de base. Leur sens est dû aux différentes orientations des groupements moléculaires à la surface et de l'orientation des moments de transitions par rapport à l'interface. La bande sera positive si le moment de transition de la molécule à la surface est dans le plan de la monocouche et négative lorsque le moment de transition est perpendiculaire à ce même plan.

2.4.1.1 Attribution des bandes spectrales en PM-IRRAS

Les protéines présentent plusieurs bandes d'adsorption caractéristiques, dont des bandes situées entre $\sim 1600-1700 \text{ cm}^{-1}$ et entre $\sim 1510-1580 \text{ cm}^{-1}$, qui sont appelées bandes amide I et amide II, respectivement (Miyazawa et Blout, 1961). Ces bandes correspondent à deux modes vibrationnels du groupement fonctionnel amide. La figure 18 présente les vibrations associées à ces bandes. La vibration amide I est essentiellement due à l'élongation C=O couplée à une faible contribution provenant de la



Amide I

Amide II

Figure 18 : Deux modes vibrationnels du groupement amide présents dans les protéines, soit les modes amide I et amide II.

déformation du groupement N-H (voir figure 18). Dans le cas de la vibration amide II, c'est l'élongation C-N couplée à la déformation N-H qui l'emporte (Miyazawa et Blout, 1961; Krimm et Bandekar, 1986).

Ces bandes sont les plus intenses et donc les plus souvent exploitées dans l'analyse des protéines : on utilise très souvent la bande amide I pour révéler la structure secondaire d'une protéine (Dousseau et Pézolet, 1990). Les bandes amide I et II sont altérées par les modes vibrationnels de l'eau. Cet effet est réduit par la soustraction d'un spectre de vapeur d'eau mais certains groupements des chaînes latérales des acides aminés des protéines peuvent superposer cette bande. En effet, on peut voir apparaître le carbonyle ionisé de l'acide aspartique ($\sim 1584 \text{ cm}^{-1}$), l'arginine ionisée (~ 1577 et $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) ou encore un épaulement attribué à l'adsorption de la forme non-ionisée de la tyrosine (Chirgadze et al., 1975).

On observe aussi une bande négative à 1650 cm^{-1} qui correspond à la région de déformation des molécules d'eau de la sous-phase. Cette bande est attribuée à la différence d'indice de réfraction de la surface aqueuse versus la monocouche (Blaudez, 1993a). En effet, l'indice de réfraction de l'eau en absence du substrat est plus faible que celui de la monocouche.

2.4.2 Application de la spectroscopie PM-IRRAS à l'étude de l'orientation moléculaire

Un de nos objectifs principaux est d'utiliser les spectres vibrationnels pour la caractérisation orientationnelle et conformationnelle de films en monocouche. En fait, il existe une relation entre le rapport des bandes amide I et II et l'orientation de la protéine à l'interface. Cette relation pour la recoverine myristoylée a été établie par une modélisation mathématique qui permet de simuler l'orientation de la protéine en fonction du ratio amide I / amide II (Desmeules et al., 2007).

Les spectres de simulation ont été obtenus par un programme informatique développé afin de modéliser la réflectivité de monocouches absorbantes (Buffeteau et Desbat, 1989). La méthode matricielle de Berreman (Berreman, 1972) s'ajoute au modèle pour le traitement d'un système anisotrope, tel que la recoverine adsorbée à une monocouche lipidique. La simulation du spectre de la recoverine myristoylée a été faite à partir de sa structure tri-dimensionnelle (Ames et al., 1997) et tient compte du nombre total d'hélices- α , la longueur de chaque hélice et l'angle entre celles-ci et à l'axe z (voir figure 19). L'axe z a été fixé comme étant perpendiculaire à l'hélice- α H2 (figure 19) et choisi comme étant à 0° . On génère ensuite des spectres qui permettent de calculer un rapport d'intensité des bandes amide I/amide II qui correspond à une orientation de la recoverine myristoylée, tel que montré à la figure 20 (Desmeules et al., 2007).

2.4.3 Mesure de spectres PM-IRRAS au cours de l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de phospholipides à l'interface air/eau

Les mesures en PM-IRRAS au cours de l'adsorption de la recoverine en monocouche procurent de l'information sur sa structure secondaire et son orientation à la surface. Le bain utilisé est fait d'un polymère de PEEK⁶. Son aire (cm x cm) et son volume (20 ml) ont été réduits en positionnant un bloc de téflon (6 cm x 14,2 cm) derrière la barrière de compression (voir figure 21), de façon à limiter la quantité de protéine à injecter. La

⁶ Polyéthyléthérkétone

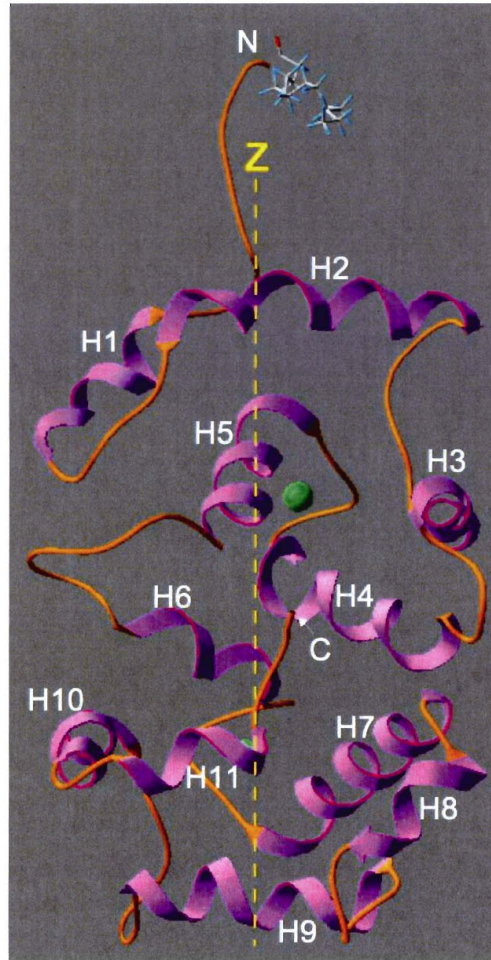


Figure 19 : Structure de la recoverine myristoylée (Ames et al., 1997).

Deux ions calcium (montrés en vert) sont liés à la recoverine. Les hélices sont numérotées de H1 à H11. C et N représentent les régions C- et N-terminal de la recoverine, respectivement. Le myristoyl est situé à l'extrémité N-terminal. L'axe z est fixé perpendiculairement à l'hélice H2 (Desmeules et al., 2007).

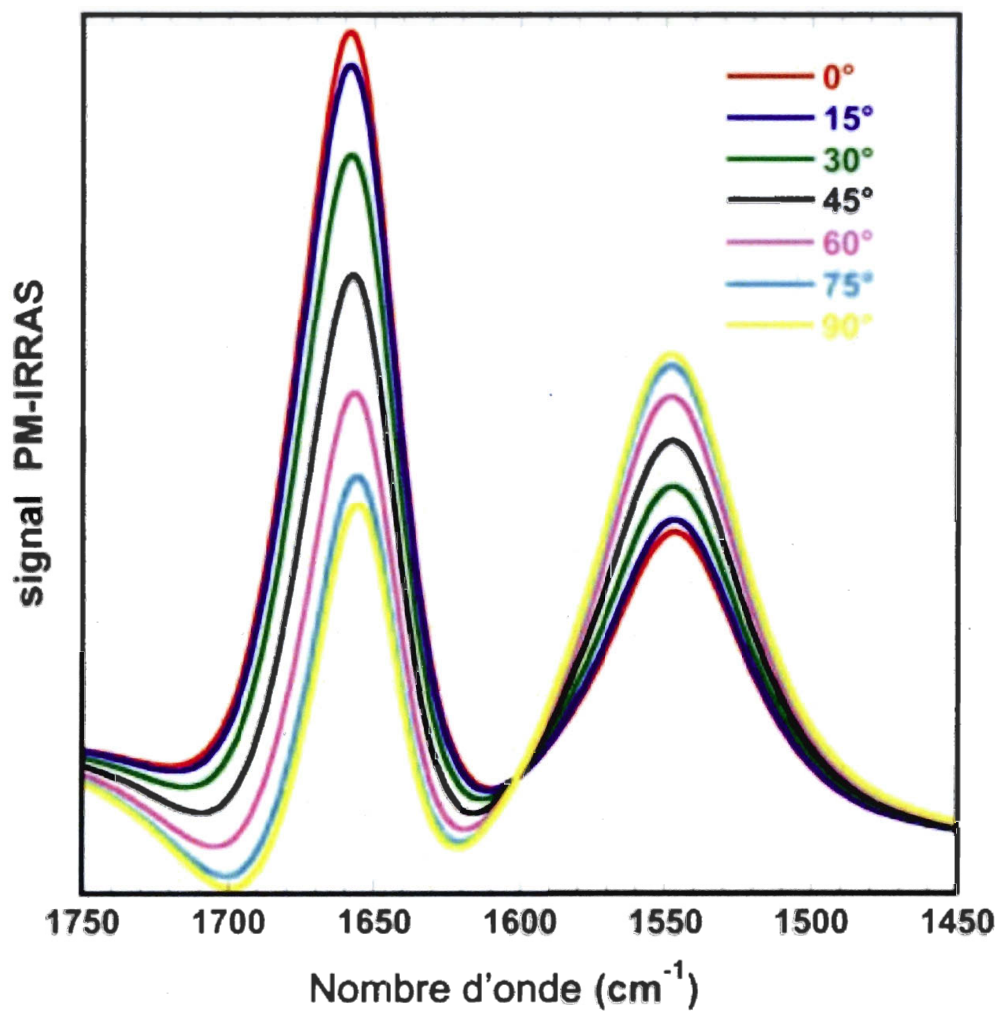


Figure 20 : Simulation des spectres PM-IRRAS des hélices- α de la recoverine myristoylée selon différentes orientations. L'angle θ , par rapport à l'axe z, varie de 0 à 90° (Desmeules et al., 2007).



Figure 21 : Montage expérimental du bain de PEEK utilisé lors des mesures d'adsorption de la recoverine à aire fixe.

concentration de recoverine myristoylée est de 52 nM et les conditions d'étalement ainsi que les solvants et réactifs utilisés sont les mêmes que ceux énumérés à la section 2.2.2. Le faisceau infrarouge est réfléchi à la surface de la monocouche et l'évaporation de l'eau est compensée pendant l'expérience par l'ajustement de la hauteur du bain.

Des mesures d'adsorption de la recoverine myristoylée ont d'abord été effectuées à aire moléculaire fixe à différentes valeurs de pression de surface initiale des monocouches de phospholipides. Un spectre infrarouge a été enregistré au début et à la fin de l'adsorption. D'autres mesures ont aussi été faites avec la recoverine adsorbée à la monocouche suite à quelques compressions successives à l'aide des barrières mobiles. Ces mesures permettent d'enregistrer un spectre PM-IRRAS à différentes valeurs d'aire moléculaire ce qui, dans un premier temps, donne de l'information quant à l'orientation de la recoverine au cours de son éjection de la monocouche, tant au niveau du signal de pression de surface que par l'analyse détaillée des bandes amide I et II. Les spectres obtenus ont été traités de façon à mieux dégager la bande amide I du reste du signal. Pour ce faire, à titre de référence, une sous-phase couverte du phospholipide seul a été enregistrée, dans les mêmes conditions que la mesure correspondante avec la recoverine. Le ratio entre la référence et la protéine adsorbée a donc été fait pour chacun des spectres.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS et DISCUSSION

3.1 Pression critique d'insertion de la recoverine

La PCI a été mesurée pour les phospholipides décrits dans le tableau 2. La détermination de la PCI nécessite l'enregistrement d'au minimum 4 mesures d'adsorption, c'est-à-dire à quatre pressions initiales différentes, de façon à tracer une courbe de régression ayant le plus petit écart-type possible.

Les phospholipides énumérés au tableau 2 sont tous présents dans les membranes discales des photorécepteurs (voir tableau 1), mis à part la DMPC, la DMPE et la DMPS. Il est intéressant dans un premier temps d'étudier les phospholipides majoritairement présents dans les membranes discales, puisque cela nous renseigne sur l'importance de cette composition lipidique pour la liaison membranaire de la recoverine myristoylée. Dans un deuxième temps, la DMPC a été ajoutée aussi à nos mesures puisque c'est un phospholipide bien caractérisé, il possède une grande stabilité en monocouche et sa transition de phase se situe à des pressions de surface élevées (Albrecht et al., 1979; Hui et al., 1975). De façon à faciliter leur comparaison, on a classé les lipides selon leur tête polaire, la longueur de la chaîne hydrocarbonée et le nombre d'insaturations. Les prochaines sous-sections montrent l'influence de chacun de ces paramètres structuraux sur la valeur de la PCI.

3.1.1 Effet de la tête polaire des phospholipides sur l'adsorption de la recoverine

Nous avons choisi d'étudier les phospholipides portant une tête polaire phosphatidylsérine (PS), phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) puisqu'ils constituent la portion majeure de la composition des membranes discales des bâtonnets (tableau 1) et qu'ils portent des charges différentes, soit une charge neutre (PC et PE) ou négative (PS) au pH étudié (7,5). La figure 22 montre un histogramme de la PCI pour ces phospholipides portant différentes chaînes hydrocarbonées.

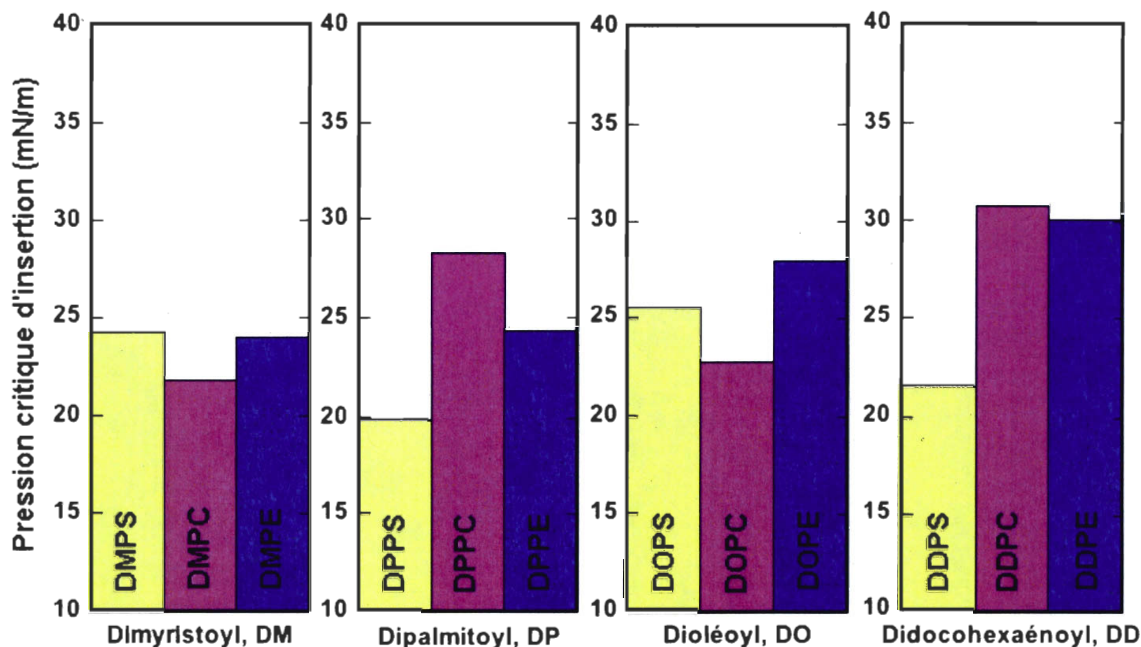


Figure 22 : Histogramme de la PCI de la recoverine myristoylée pour différents phospholipides. Ceux-ci sont représentés selon leur tête polaire, c'est-à-dire phosphatidylsérine (PS), phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE) pour différentes chaînes grasses, soit le dimyristoyl (DM, 14:0), le dipalmitoyl (DP, 16:0), le dioléoyl (DO, 18:1) et le didocosaénoyl (DD, 22:6 ω 3).

Pour les phospholipides à courtes chaînes (14 carbones), tels le dimyristoyl-PS, -PC et -PE, on note peu de différence au niveau de la valeur de la PCI. On constate donc que la nature de la tête polaire a très peu d'influence sur l'adsorption de la recoverine myristoylée pour ce type de chaîne grasse. Par contre, on note une importante variation de la PCI en fonction de la nature de la tête polaire pour le didocosaénoyl (voir figure 22). En effet, la PCI de la recoverine myristoylée est plus faible pour la DDPS (22 mN/m) que pour la DDPC (31 mN/m) et la DDPE (30 mN/m) (voir figure 22). Il semble donc que l'insertion de la recoverine myristoylée en monocouche soit plus influencée par les phospholipides portant des chaînes grasses polyinsaturées. On peut aussi conclure que les interactions électrostatiques avec la charge négative de la phosphatidylsérine ne sont pas favorisées et

que l'affinité de la recoverine myristoylée est maximale pour une tête polaire neutre (voir figure 14) comme la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine.

3.1.2 Effet de la longueur de la chaîne grasse et du nombre d'insaturations sur l'adsorption de la recoverine

À partir de ces valeurs de PCI, on peut maintenant comparer l'effet de la longueur de la chaîne grasse et du nombre d'insaturations. On a regroupé dans la même figure les valeurs de PCI pour une même tête polaire afin de montrer l'effet de l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée et du nombre d'insaturations (voir figure 23). Cependant, il n'a pas été possible d'utiliser des phospholipides di-saturés à longues chaînes ((18 :0) et (22 :0)) car ils forment des monocouches plutôt instables puisqu'ils se trouvent dans l'état solide-condensé à la température de la pièce (Mingotaud et al., 1996); ce sont donc leurs homologues insaturés (18 :1) et polyinsaturés (22 :6) qui ont été utilisés.

On remarque d'abord sur la figure 23 que la tendance est différente pour les trois types de têtes polaires. Pour ce qui est de la phosphatidylsérine, la PCI se situe à une valeur intermédiaire autour de 21-25 mN/m. L'augmentation de la longueur ou du nombre d'insaturations des chaînes grasses ne favorise pas l'interaction de la recoverine avec ce type de phospholipide. Cela suggère que la charge nette négative de la PS semble défavoriser son interaction avec la recoverine. Le cas de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine sont différents. En effet, l'affinité de la recoverine augmente avec la longueur et le nombre d'insaturations des chaînes hydrocarbonées (voir figure 23). Il faut cependant souligner que le DPPC ne suit pas la tendance prévue. Le DPPC, tout comme le DMPE, a une transition de phase à la température de la pièce en monocouche dont la position en pression de surface varie avec la température. Comme la température du local n'était pas rigoureusement la même d'une journée à l'autre, il est probable que le phospholipide ne se trouvait pas toujours dans le même état physique (solide-condensé (SC) ou liquide-expansé (LE)) influençant ainsi la valeur de la PCI. À des fins comparatives, il aurait donc été souhaitable de pouvoir faire des mesures en diminuant la température du bain de monocouche avec ces deux phospholipides pour déterminer si l'état physique de ces lipides avait un effet sur la valeur de la PCI. Depuis mon départ du laboratoire, de telles mesures ont été faites avec une autre protéine, la retinis pigmentosa 2

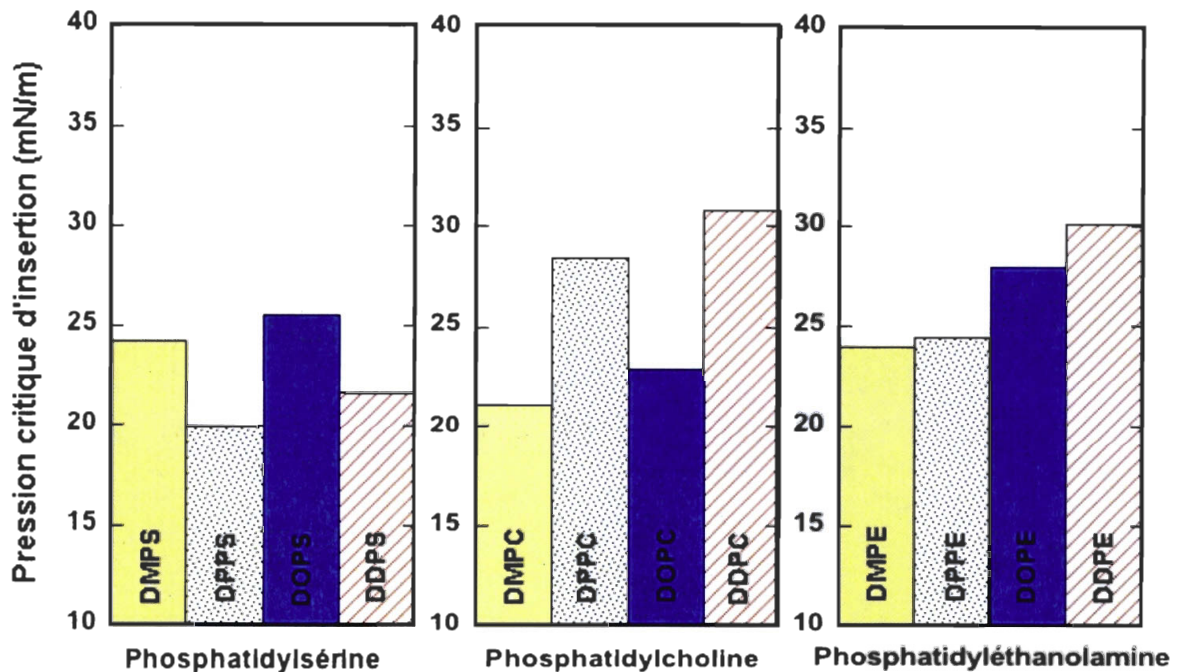


Figure 23 : Histogramme de la PCI de phospholipides portant différentes longueurs de chaînes grasses et d'insaturations. La PCI a été mesurée pour la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine. Les abréviations DMPE, DPPE, etc. ont été définies dans le tableau 2.

en utilisant le DPPC à 4 et à 24°C. Des valeurs de PCI différentes ont été obtenues pour ces deux températures, ce qui appuie l'explication proposée pour la valeur de PCI du DPPC qui se distingue de celle des autres PC. Tout de même ces résultats permettent d'affirmer que la recoverine myristoylée a une affinité importante avec un phospholipide possédant une longue chaîne hydrocarbonée et plusieurs insaturations.

Par le profil de transition de phase des phospholipides, on peut aussi interpréter les résultats décrivant l'affinité de la recoverine pour les phospholipides à un autre niveau. Prenons le cas où une augmentation de température survient. Cela a pour effet de déplacer les isothermes de pression de surface vers des pressions de surface plus élevées et, comme le DPPC montre une transition de phase qui s'étale sur une longue intervalle d'aire moléculaire (Mingotaud et al., 1993), on sera toujours dans cette région critique de coexistence. Suite à ce constat, on peut se douter qu'à la température du corps et à la pression latérale des membranaires, on sera dans cette région transitoire pour ce

phospholipide, tout comme dans la présente expérience. Nos résultats permettent d'affirmer que la coexistence de ces deux phases semble favoriser l'adsorption de la recoverine, puisque pour le DPPC on note une valeur de PCI supérieure à la moyenne pour les autres chaînes hydrocarbonées. Ce résultat est cohérent avec les travaux de recherches de Senin et al. (2004) qui affirment que la recoverine pourrait être associée à des «rafts» composés de phospholipides saturés. Il pourrait en effet s'agir du DPPC dans un état où la phase liquide expansée coexiste avec la phase solide.

Une valeur de PCI de près de 30 mN/m est atteinte pour la DDPE et la DDPC. Cette valeur correspond bien avec celle qui est postulée pour la pression latérale des membranes (30mN/m; Marsh, 1996), ce qui suggère que la recoverine myristoylée s'associe favorablement avec les phospholipides polyinsaturés des photorécepteurs.

Contrairement aux autres mesures d'adsorption, la recoverine agit différemment en présence de DDPE, tel qu'illustrée à la figure 24 qui présente la différence de pression de surface en fonction de la pression initiale. Cette figure montre qu'à partir de ~30 mN/m, l'affinité de la recoverine pour ce phospholipide est modifiée. Cela est illustré par une variation de la pente de la droite qui devient positive à plus de 30 mN/m. Comme la DDPE montre une certaine instabilité en monocouche, les deux derniers points pourraient être le reflet de cette instabilité et ne pas représenter une réelle augmentation de la PCI. Cela reste à vérifier.

3.1.3 Effet de la force ionique de la sous-phase sur l'adsorption de la recoverine

Comme on suppose l'existence d'interactions électrostatiques entre les groupements en périphérie de la recoverine myristoylée et la tête polaire des phospholipides en monocouche, il est intéressant de déterminer l'impact de la force ionique du tampon de la sous-phase sur les valeurs de PCI. Seulement deux phospholipides ont été étudiés, chacun possédant une tête polaire de charge différente, soit la phosphatidylsérine et la phosphatidylcholine qui portent une charge nette de -1 et 0, respectivement au pH étudié. Pour chacune des mesures, on a fait varier la force ionique entre des valeurs extrêmes, soit 5, 100 et 300 mM. On sait que la variation de la force ionique du tampon résulte en un changement de la force de liaison protéin-ligand si celle-ci implique des interactions

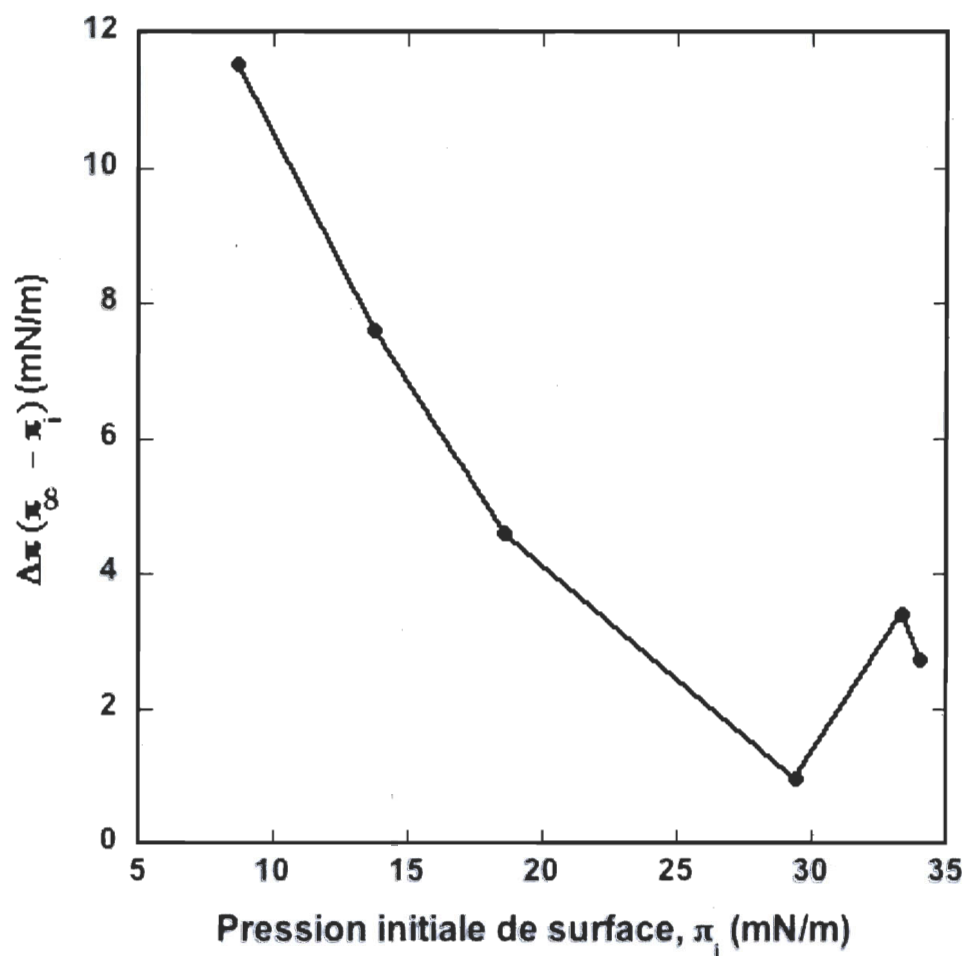


Figure 24 : Graphique de la différence de pression de surface en fonction de la pression initiale de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DDPE à 22 °C.

électrostatiques (Edsall et al., 1958). La figure 25 présente la variation de la PCI en fonction de la force ionique du milieu. Tout d'abord, dans le cas du DPPC, on remarque une diminution de la PCI avec l'augmentation de la force ionique. La phosphatidylcholine est constituée d'une charge négative au niveau du phosphate et d'une charge positive au niveau de la triméthylamine (voir figure 14). Lorsque la force ionique est élevée (300 mM), à la fois les charges de la monocouche de DPPC et celles des résidus en périphérie de la recoverine devraient être associées à des ions, ce qui devrait réduire les interactions entre ces deux molécules à pression de surface élevée et diminuer la valeur de PCI.

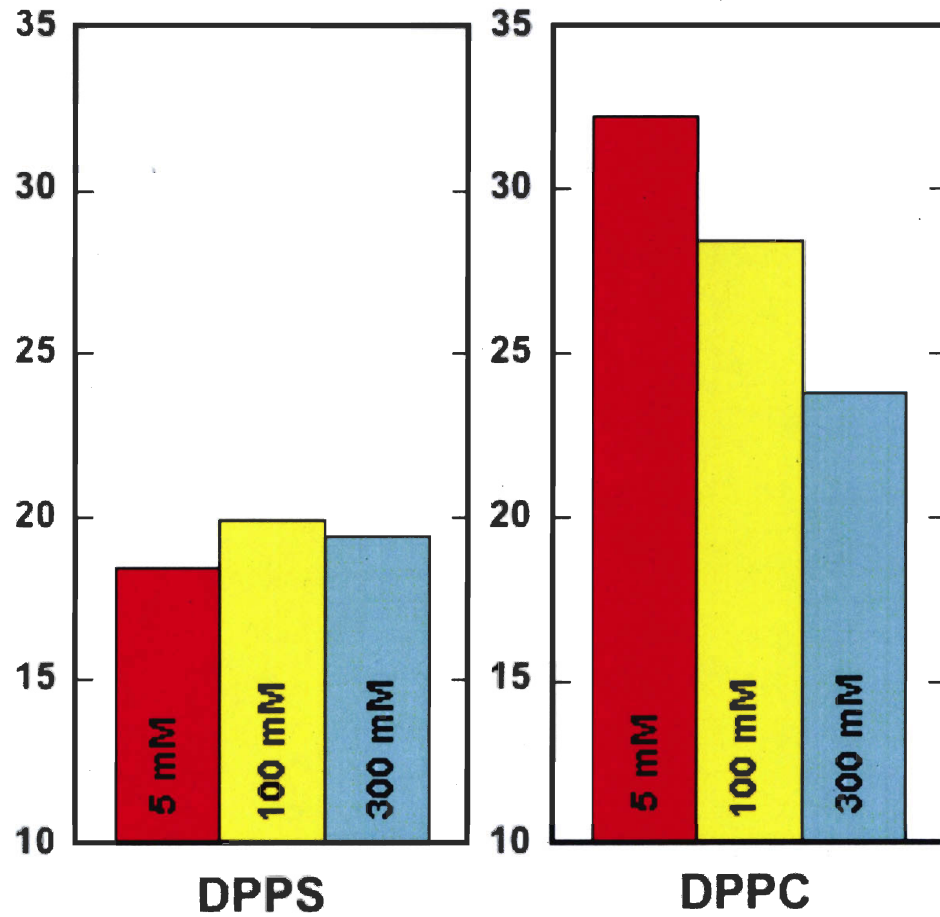


Figure 25 : Histogramme de la PCI en fonction de la force ionique de la sous-phase, soit 5, 100 et 300 mM pour les deux phospholipides, le DPPS et le DPPC.

En effet, à haute pression de surface, la densité de charge est importante et cet écrantage devrait réduire les interactions spécifiques. À l’opposé, lorsque la force ionique est faible, les contre-ions ne peuvent venir s’interposer et l’interaction devient maximale à plus haute pression de surface ou densité de charge. C’est exactement ce qu’on observe avec le DPPC. Pour ce qui est du DPPS, la figure 25 montre clairement une tendance bien différente. On voit peu ou presque aucune influence de la concentration en ions sur la PCI. Étant donné que l’interaction entre la recoverine myristoylée et le DPPS n’est pas favorisée à faible densité de charges, ce résultat suggère que certaines charges en périphérie de la recoverine seraient repoussées par la charge négative de la sérine. Globalement, la figure 25 suggère que des charges sont impliquées dans l’interaction entre la recoverine et la membrane. De plus, comme la phosphatidylsérine porte une charge nette négative, il est probable que des charges négatives en périphérie de la recoverine sont impliquées dans son interaction membranaire. Si des charges positives étaient impliquées dans cette interaction, un effet de la concentration en NaCl aurait été observé en figure 25. Par conséquent, sur la base des figures 23 et 25, il est possible de postuler que les charges négatives en N-terminal ne favorisent pas l’interaction membranaire de la recoverine.

3.1.4 Discussion

On a vu que la nature de la tête polaire n’influence pas à elle seule la liaison membranaire de la recoverine myristoylée avec les phospholipides saturés ou faiblement insaturés dont la longueur de la chaîne grasse est inférieure ou égale à 18 carbones. Par contre, la tête polaire a une influence majeure pour les phospholipides portant de longues chaînes polyinsaturées. Ce résultat suggère que, dans ce cas précis, le myristoyl de la recoverine pénètre plus profondément dans la monocouche, ce qui pourrait permettre des interactions entre la tête polaire des phospholipides et les groupements en périphérie de la recoverine. Ces interactions entre les groupements en périphérie de la recoverine myristoylée sont favorables pour la PE et la PC et ne sont pas favorables avec la charge nette négative de la PS.

L’état physique des phospholipides pourrait être un autre paramètre jouant un rôle dans l’affinité de la recoverine myristoylée pour les membranes. En effet, comme observé en figure 23, la coexistence des phases liquide-étendue (LE) et solide condensée (SC)

semble favoriser l'adsorption de la recoverine. Dans les membranes discales, à 37°C, la DPPC se trouve encore dans l'état "gel" (l'équivalent de l'état solide-condensé) car sa température de transition de phase est de 42°C. Il est donc possible que la DPPC soit localisée dans des *'raft'*, ce qui pourrait favoriser des interactions spécifiques de la recoverine. La DPPC compose 6,2% des lipides de la membrane discale des SEB (voir tableau 1). La très grande majorité des autres lipides des membranes des SEB se trouvent dans l'état liquide-cristallin étant donné leur contenu élevé en acides gras polyinsaturés (figure 9).

Les mesures à différentes forces ioniques permettent de postuler que des interactions électrostatiques sont impliquées dans la liaison entre la recoverine myristoylée et la phosphatidylcholine (figure 25). En contre partie, les charges en périphérie de la recoverine myristoylée ne sont pas électrostatiquement influencées par la phosphatidylsérine. Il a été proposé par Matsuda et al. (1999) que le C-terminal de la recoverine jouerait un rôle majeur dans sa liaison membranaire. Cette portion de la recoverine est chargée positivement et il a été proposé que la charge nette négative de la PS pourrait favoriser l'interaction membranaire de la recoverine. Cependant, le groupe de Senin et al. (2007) affirme que la portion C-terminale est impliquée mais pas très fortement dans la liaison de la recoverine, ce qui serait plus cohérent avec nos résultats.

Finalement, la recoverine myristoylée démontre une affinité marquée pour des phospholipides possédant une longue chaîne hydrocarbonée, plusieurs insaturations et une tête polaire dont la charge nette est nulle, c'est-à-dire la DDPC et la DDPE qui comportent 49 % des phospholipides des SEB en considérant que la PC et la PE comportent 69 % du contenu en chaînes grasses des phospholipides des SEB. Cela met en évidence comment la composition lipidique membranaire est essentielle à l'ancrage de la recoverine myristoylée dans la membrane, ce qui favorise son rôle inhibiteur sur la R-K.

3.2 Mesures d'adsorption à aire moléculaire variable

L'objectif de cette mesure est d'observer comment l'insertion de la recoverine myristoylée et non myristoylée affecte les monocouches lipidiques et, s'il y a lieu, d'observer leur éjection en cours de compression. En effet, il est intéressant d'évaluer l'importance du myristoyl dans la liaison de ces protéines par une mesure comparative entre la recoverine myristoylée et non myristoylée. Comme on injecte la recoverine lors de la première compression, seules les isothermes de recompression seront analysées car elles représentent une monocouche plus homogène. Nous comparerons ensuite ces isothermes avec celle du lipide seul correspondant.

Nous avons choisi de limiter cette étude à une série de phospholipides où on a fait varier la longueur et le nombre d'insaturations de la chaîne hydrocarbonée en conservant la même tête polaire. Ainsi, nous avons choisi la phosphatidylcholine car ce phospholipide ne porte aucune charge nette et forme une monocouche très stable. Pour les chaînes hydrocarbonées, nous avons choisi le dimyristoyl (DM), le dioléoyl (DO) et le didocosahexaénoyl (DD) phosphatidylcholine. Les analyses avec ces différents phospholipides seront détaillées dans les prochaines sous-sections.

3.2.1 Le système recoverine/DMPC

Comme montré à la figure 26, l'isotherme de pression de surface du DMPC (en noir) est presque identique aux isothermes de recompression des systèmes recoverine myristoylée/DMPC (en pointillé) et recoverine non myristoylée/DMPC (en rose). Cependant, on observe un changement de pente qui débute à ~ 20 mN/m dans les isothermes de recompression en présence de recoverine. On remarque dans un premier temps que ce changement de pente prend place approximativement au même endroit pour la recoverine myristoylée et non myristoylée. D'autre part, ces isothermes de recompression rejoignent l'isotherme du DMPC pur (en noir) à une pression de surface de 22 mN/m, ce qui devrait donc correspondre à la pression de surface à laquelle la recoverine est éjectée de la monocouche. Il est intéressant de noter que cette valeur de 22 mN/m correspond à peu près à la PCI de la recoverine myristoylée en présence de DMPC (21 mNm; figure 23). On peut donc conclure que l'interaction recoverine/DMPC subsiste

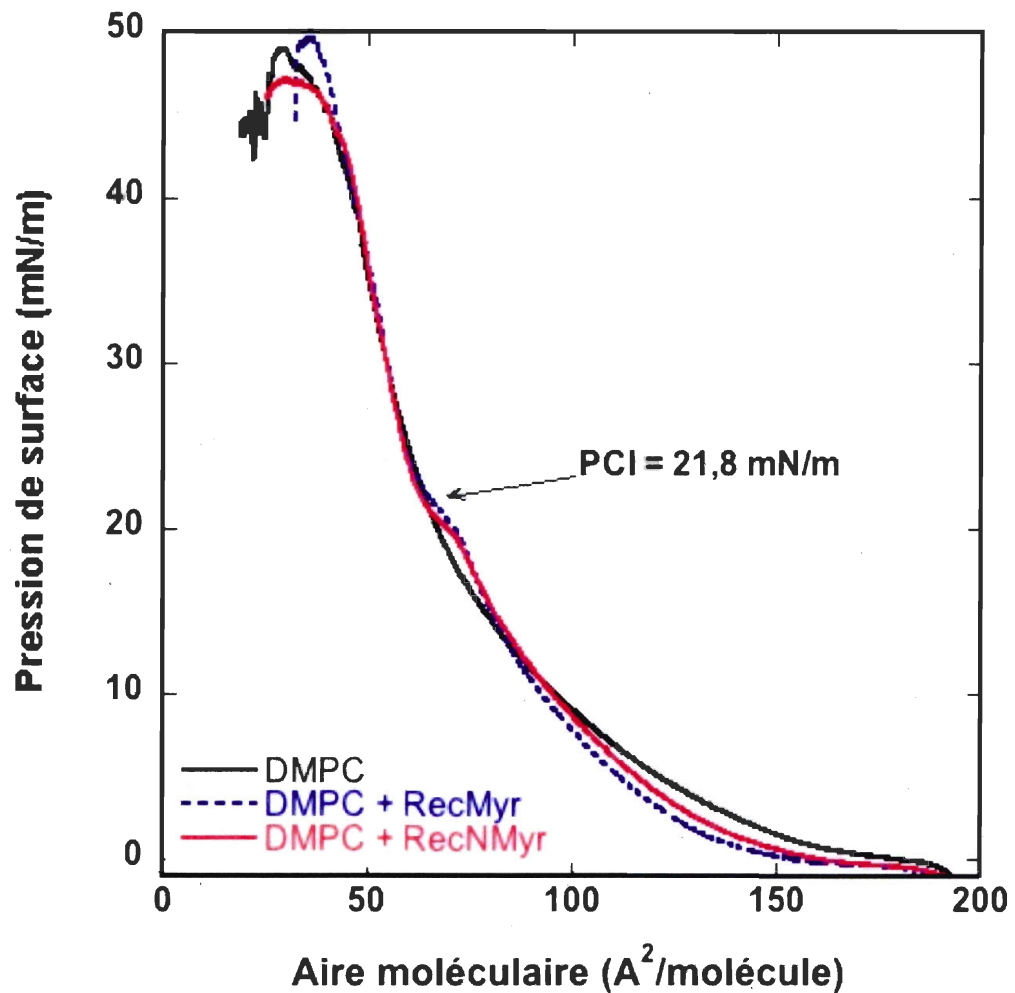


Figure 26 : Isotherme de pression de surface du DMPC (en noir) et isothermes de recompression des systèmes binaires recoverine myristoylée/DMPC (en pointillé) et recoverine non myristoylée (en rose). DMPC : monocouche composée de DMPC pure; DMPC + RecMyr : monocouche composée de recoverine myristoylée adsorbée au DMPC; DMPC + RecNMyr : monocouche composée de recoverine non myristoylée adsorbée au DMPC, PCI : pression critique d'insertion.

jusqu'à $\sim 21-22$ mN/m et, qu'au delà de cette pression de surface, la recoverine est éjectée de la monocouche. De plus, comme le changement de pente des monocouches recoverine myristoylée/DMPC et recoverine non myristoylée/DMPC se produit à la même pression de surface, on peut conclure que la contribution du myristoyl à l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPC est négligeable. Plus encore, comme la valeur de PCI de la recoverine à une monocouche de DMPC (21,8 mN/m) correspond à la fin du changement de pente des isothermes de recompression, on peut conclure que la valeur de PCI (figure 22) semble correspondre à l'éjection de la recoverine de la monocouche.

3.2.2 Le système recoverine/DOPC

Comparativement au DMPC, la DOPC est plus longue de 4 carbones et contient une insaturation. Cela semble suffisant pour modifier de façon significative la liaison de la recoverine myristoylée avec cette monocouche de DOPC. Premièrement, comme montré à la figure 27, l'isotherme de recompression du système recoverine myristoylée/DOPC (en pointillé) est considérablement déplacée vers les grandes aires moléculaires comparativement au DOPC pur (en noir). Cette augmentation d'aire est consécutive à une adsorption considérable de recoverine myristoylée, ce qui n'était pas observé avec la DMPC (voir figure 26). En effet, la figure 27 montre que l'isotherme de recompression de la recoverine myristoylée (en pointillé) dévie drastiquement de celle de la DOPC seule (en noir) jusqu'au changement de pente où se produit l'éjection de la recoverine myristoylée. Le point de jonction de ces deux isothermes se situe à une pression de surface de ~ 32 mN/m alors que la valeur de PCI pour la DOPC déterminée à la figure 23 est de 20,5 mN/m. Cette différence est difficile à expliquer. Deuxièmement, on note très peu de différence entre la courbe de recompression du système recoverine non myristoylée/DOPC (en rose) et la DOPC seule (en noir). De plus, le changement de pente se produit à une pression de surface un peu plus faible que pour le système recoverine myristoylée/DOPC; plus encore, la recoverine non myristoylée est éjectée à une pression de surface de 24,1 mN/m, ce qui est beaucoup plus faible qu'en présence de recoverine myristoylée. Par

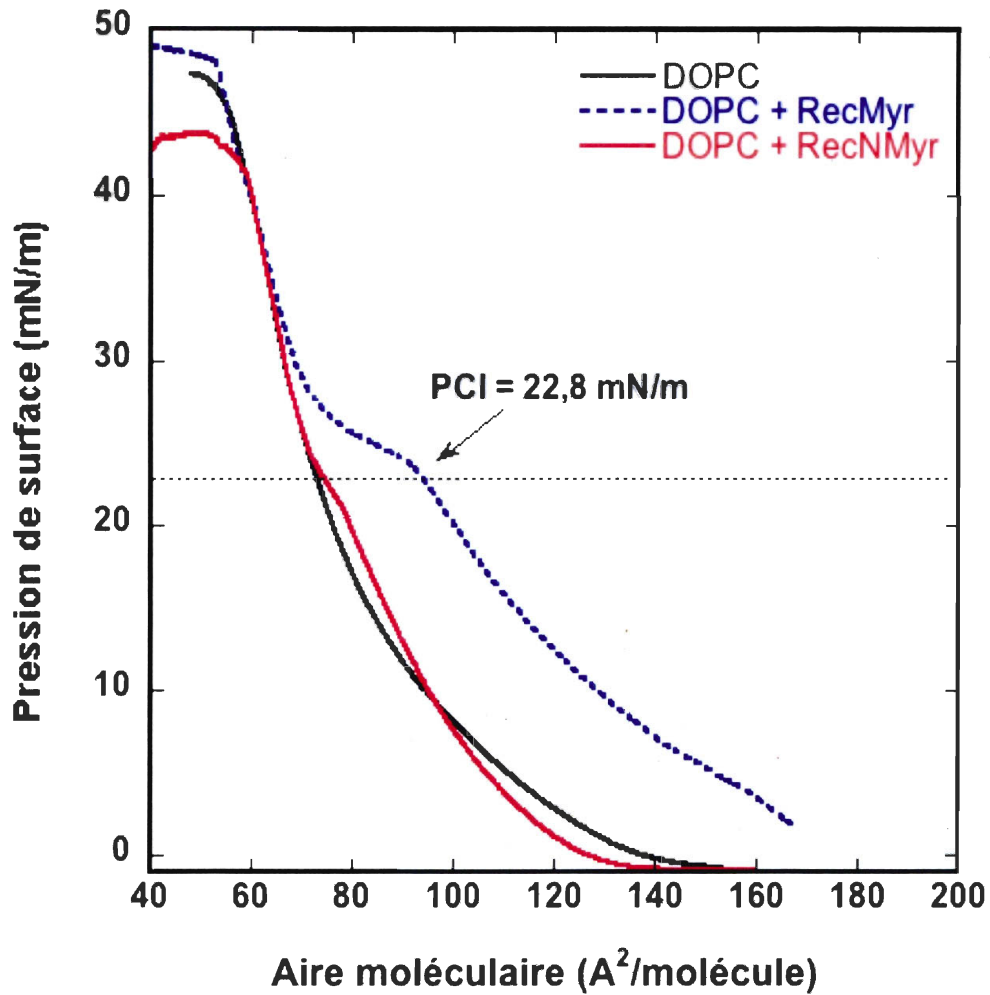


Figure 27 : Isotherme de pression de surface de la DOPC (en noir) et courbes de recompression des systèmes binaires recoverine myristoylée/DOPC (en pointillé) et recoverine non myristoylée (en rose). DOPC : monocouche composée de DOPC pure; DOPC + RecMyr : monocouche composée de recoverine myristoylée adsorbée au DOPC; DOPC + RecNMyr : monocouche composée de recoverine non myristoylée adsorbée au DOPC, PCI : pression critique d'insertion.

ailleurs, on remarque que le *collapse*⁷ de l'isotherme du système DOPC/recoverine non myristoylée (en rose) est inférieur à celui du système binaire recoverine myristoylée/DOPC (en pointillé). Cela suggère que l'adsorption recoverine non myristoylée/DOPC est moins stable. Ces observations suggèrent que la liaison de la recoverine non myristoylée à une monocouche de DOPC est beaucoup moins favorable que pour la recoverine myristoylée. Ainsi, la contribution du myristoyl à l'adsorption de la recoverine au DOPC joue un rôle important. De plus, l'affinité de la recoverine myristoylée pour la DOPC est supérieure à celle pour la DMPC. Est-ce que ce sont les 4 carbones supplémentaires ou l'insaturation de la chaîne grasse insaturée du DOPC qui sont responsables de ces différences par rapport au DMPC? L'insaturation confère une fluidité à la monocouche, ce qui devrait permettre une insertion plus importante de la recoverine, mais il est difficile d'affirmer qu'il s'agit du paramètre jouant le rôle majeur.

3.2.3 Le système recoverine/DDPC

Le DDPC représente un cas extrême par rapport au DMPC. En effet, il possède 6 insaturations et une longue chaîne de 22 carbones, ce qui lui confère une fluidité maximale. La figure 28 montre l'isotherme de pression de surface du DDPC seul (courbe en noir) et les isothermes de recompression des systèmes recoverine myristoylée/DDPC (en pointillé) et recoverine non myristoylée/DDPC (en rose). On remarque d'abord que l'adsorption de la recoverine myristoylée à la monocouche de DDPC est presque aussi importante que dans le cas de la DOPC. De plus, l'intersection de la courbe de recompression de la recoverine myristoylée/DDPC avec celle de la DDPC seule se situe à 30,8 mN/m, ce qui correspond à la PCI de la recoverine myristoylée en présence de ce phospholipide (30,8 mN/m; figure 22). De façon surprenante, le *collapse* de la courbe de recoverine myristoylée/DDPC (en bleu) ne semble pas encore être atteint à 40 mN/m, ce qui suggère que la recoverine influence encore le film de DDPC même si elle semble avoir été éjectée de la monocouche à une pression de surface de 30,8 mN/m. Dans le cas de la recoverine non myristoylée (en rose), le changement de pente est difficile à percevoir. Cependant, au-delà de la PCI (22,8

⁷ Le *collapse* est représenté par la chute de pression de surface en cours de compression. À ce point, l'entassement moléculaire devient compact à un point tel que la monocouche se brise.

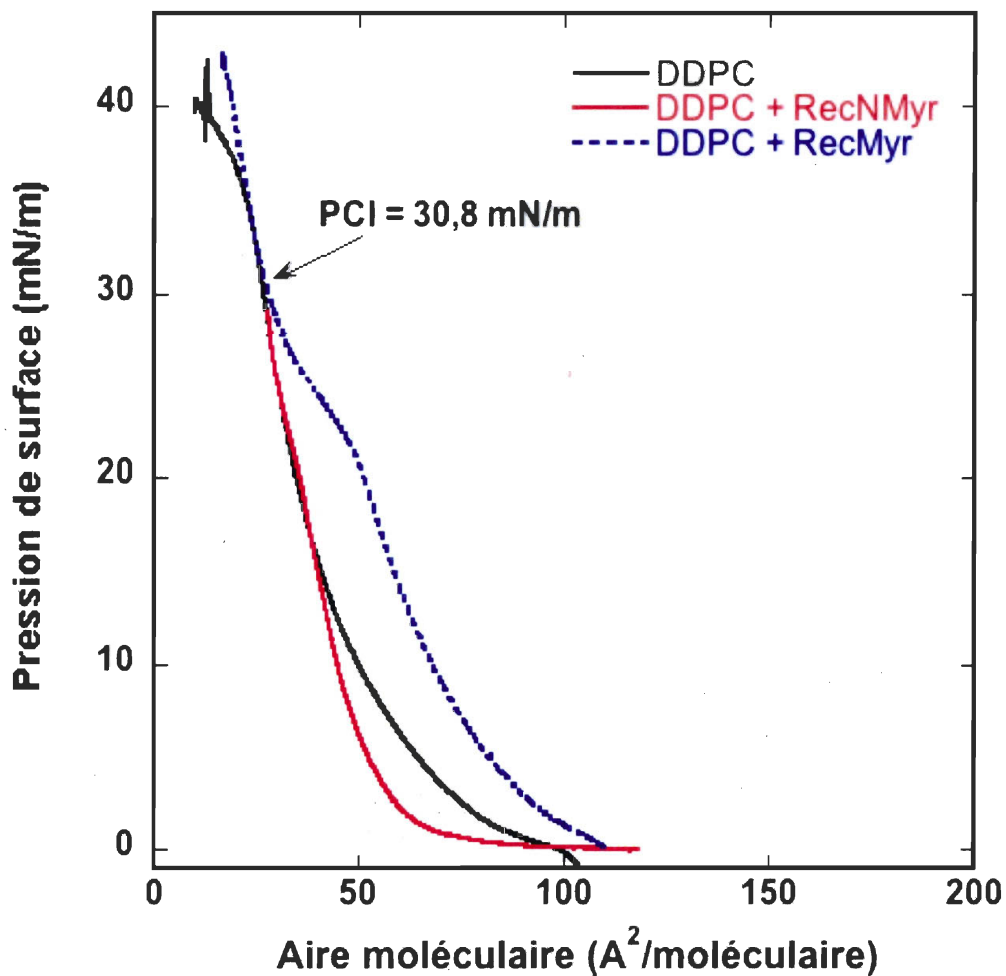


Figure 28 : Isotherme de pression de surface du DDPC pur (en noir) et isothermes de recompression des systèmes binaires recoverine myristoylée/DDPC (en pointillé) et recoverine non myristoylée/ DDPC (en rose). DDPC : monocouche composée de DDPC pur; DDPC + RecMyr : monocouche composée de recoverine myristoylée adsorbée au DDPC; DDPC + RecNMyr : monocouche composée de recoverine non myristoylée adsorbée au DDPC.

mN/m) l'isotherme est identique à celui de la DDPC pure, ce qui suggère que la recoverine non myristoylée a une faible adsorption au film de DDPC et qu'elle est éjectée à une faible pression de surface. De plus, la portion inférieure de l'isotherme de recompression du système recoverine non myristoylée/DDPC est déplacée vers de plus petites aires moléculaires par rapport à l'isotherme du DDPC pur. Cette diminution d'aire moléculaire à faible pression de surface est également vraie pour la recoverine non myristoylée et la DOPC (figure 27), ainsi que pour les deux formes de la recoverine avec la DMPC (figure 26). Cela suggère que des molécules de phospholipides de la monocouche ont été entraînées par la recoverine dans la sous-phase. La barrière énergétique de cohésion, à faible pression de surface est donc suffisamment basse pour permettre à une molécule de la monocouche d'être solubilisée dans la sous-phase (Fontaine et al., 2007; Monradat et Kirat, 2006).

3.2.4 Force d'éjection de la recoverine de la monocouche

Il est possible de quantifier la force d'interaction entre la recoverine et les phospholipides par la mesure de la différence d'aire entre l'isotherme de recompression du système recoverine/phospholipide et celle du phospholipide seul (voir figure 29). En effet, l'aire sous la courbe ou la différence d'aire moléculaire séparant ces deux courbes est proportionnelle à l'affinité existant entre la recoverine et le phospholipide composant la monocouche et correspond au travail nécessaire pour éjecter cette protéine de la monocouche.

On a donc mesuré cette différence d'aire pour chacun des systèmes binaires, à la fois pour la recoverine myristoylée et non myristoylée. Ces valeurs ont été portées en graphique à la figure 30 pour la DMPC, la DOPC et la DDPC. On pourrait ainsi quantifier l'affinité de la recoverine pour ces phospholipides et faire une relation avec la longueur des chaînes grasses et le nombre d'insaturations de ces phospholipides. En effet, pour la recoverine non myristoylée, il semble y avoir une légère diminution de l'affinité en fonction de l'augmentation de la longueur de chaîne et du nombre d'insaturations. Pour la recoverine myristoylée, l'affinité augmente pour la DOPC et diminue ensuite un peu pour la DDPC. De plus, dans le cas du DMPC, cette affinité est la même pour la recoverine myristoylée et non myristoylée, ce qui est surprenant puisque la contribution du myristoyl est importante

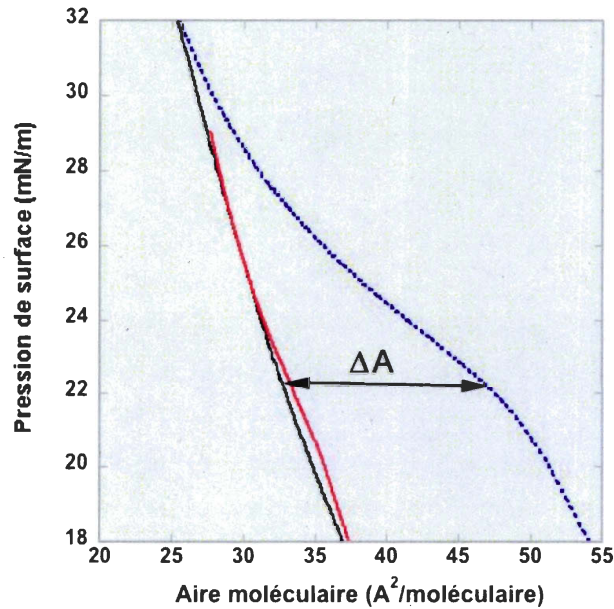


Figure 29 : Agrandissement de la zone où a lieu le changement de pente pour la DDPC. La distance maximale séparant l'isotherme de la recoverine myristoylée/DDPC (en bleu) et celle de la DDPC (en noir) est montrée par un trait horizontal (ΔA).

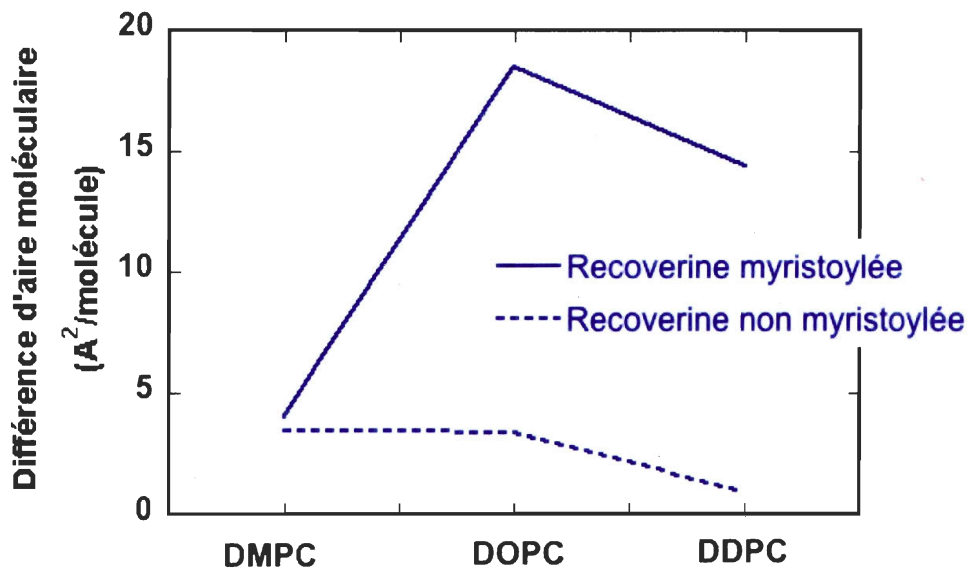


Figure 30 : Graphique de la différence d'aire moléculaire maximale entre l'isotherme de recompression de la recoverine myristoylée/phospholipide (trait plein) et non myristoylée/phospholipide (trait pointillé) et celle des 3 phospholipides purs (DMPC, DOPC et DDPC).

dans les interactions hydrophobes avec les chaînes hydrocarbonées de la DOPC et de la DDPC.

Qu'y a-t-il de connu à propos de l'adsorption de la recoverine non myristoylée à une monocouche de DMPC? La figure 31 montre la cinétique d'adsorption de la recoverine myristoylée et non myristoylée à une pression de surface initiale de 5 mN/m en présence de calcium (Desmeules, 2005). On peut voir que la myristoylation joue un rôle majeur puisque la cinétique d'adsorption de la recoverine myristoylée est largement supérieure à celle de la recoverine non myristoylée (figure 31). On sait que le calcium provoque un changement conformationnel à la fois de la recoverine myristoylée et non myristoylée (Ames et al., 1996; Flaherty et al., 1993). Outre l'exposition du myristoyl, il se produit une rotation du domaine N-terminal et l'exposition au solvant des acides aminés hydrophobes F23, W36, Y53, F56, F57 et Y86 (Ames et al., 1996).

Bref, il est fort probable que ces acides aminés soient aussi impliqués dans l'adsorption de la recoverine à la monocouche. Ces informations permettent d'analyser plus en détail les données présentées à la figure 30 et d'attribuer ces différentes contributions possibles à la liaison de la recoverine en monocouche, tel qu'illustré sur à la figure 32. Ainsi, l'adsorption de la recoverine myristoylée en monocouche pourrait être modulée par le myristoyl et les acides aminés hydrophobes en périphérie, alors que pour la recoverine non myristoylée, son interaction serait uniquement modulée par ces mêmes acides aminés. Cela dit, la distance séparant la ligne pleine de la ligne pointillée (voir figure 32) pourrait être proportionnelle à la contribution du myristoyl à cette interaction alors que la distance séparant la courbe pointillée de l'origine pourrait représenter la contribution des acides aminés en périphérie. À partir de ces observations, pour le système binaire recoverine/DMPC, on peut assumer que le myristoyl est faiblement impliqué dans cette interaction et que seuls les acides aminés périphériques jouent un rôle important. Pour ce qui est des systèmes impliquant la DOPC et la DDPC, la contribution du myristoyl est similaire pour ces deux types de phospholipides. Cependant, les résidus en périphérie de la recoverine sont peu impliqués dans l'interaction avec la DDPC. Par conséquent, l'interaction recoverine myristoylée/DOPC est la plus importante parmi ces trois phospholipides.

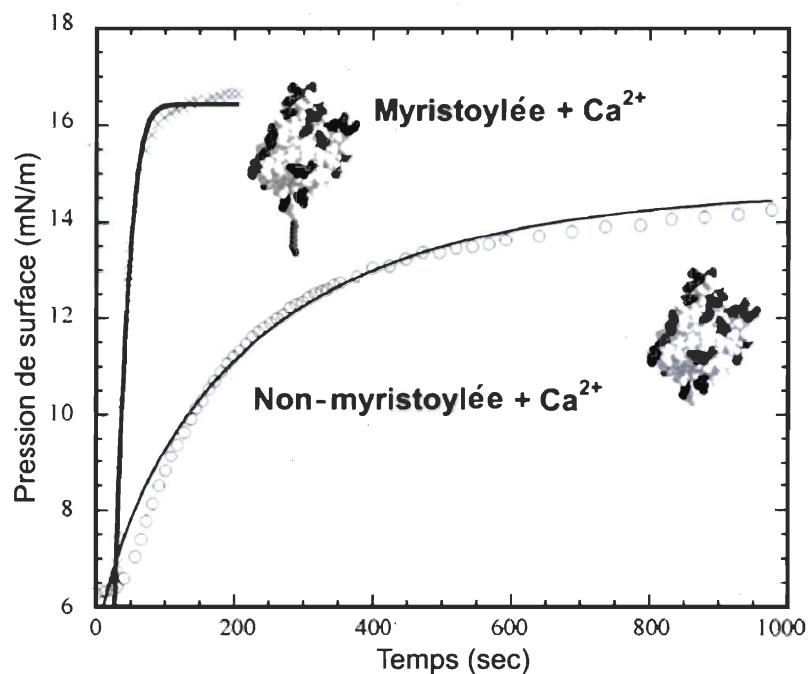


Figure 31 : Cinétique d'adsorption de la recoverine myristoylée et non myristoylée à une monocouche de DMPC à une pression de surface initiale de 5 mN/m (Desmeules et al., 2005).

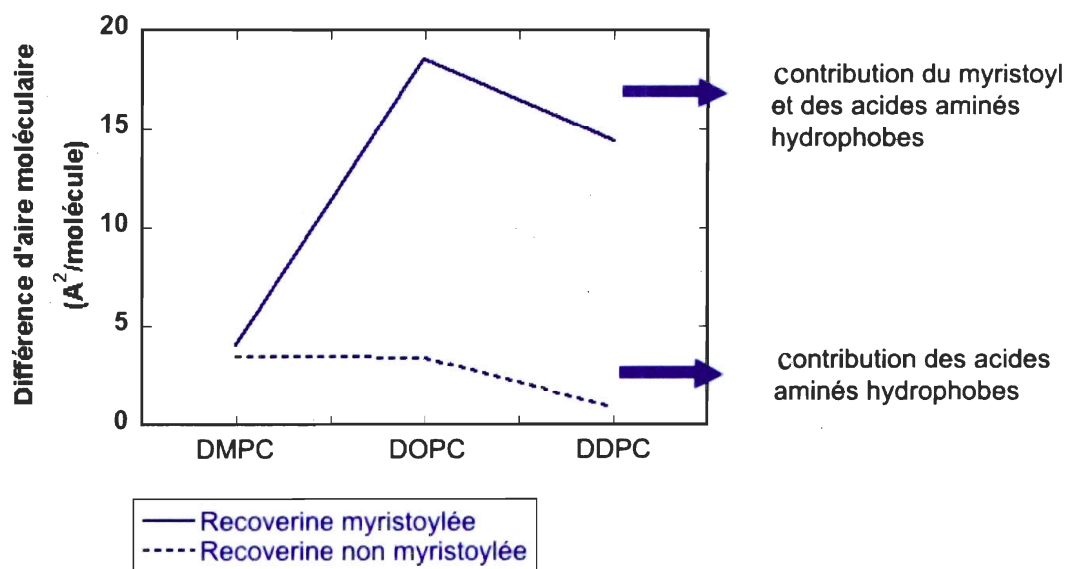


Figure 32 : Graphique de la différence d'aire moléculaire maximale entre l'isotherme de recompression de la recoverine myristoylée (trait plein) et non myristoylée (trait pointillé) de celle des 3 phospholipides (DMPC, DOPC et DDPC).

3.2.5 Discussion

Les mesures d'adsorption à aire moléculaire variable démontrent des différences intéressantes d'un phospholipide à l'autre. Dans le cas du DMPC, la contribution du myristoyl à l'adsorption de la recoverine myristoylée est négligeable. En effet, seuls les acides aminés en périphérie semblent impliqués dans cette interaction, ce qui explique pourquoi l'adsorption de la recoverine myristoylée est équivalente à celle de son homologue non myristoylée (voir figure 32).

L'adsorption de la recoverine myristoylée aux monocouches de DDPC et de DOPC est supérieure à celle de la DMPC. L'insaturation de la DOPC et celle de la DDPC confèrent de la fluidité au film et pourrait être un paramètre important favorisant une insertion plus grande du myristoyl de la recoverine. Cependant, il semble que l'augmentation du nombre d'insaturations de 1 à 6 ne joue pas un rôle important dans l'augmentation de l'affinité entre la recoverine et le film lipidique. Pour ces phospholipides, la liaison de la recoverine non myristoylée est beaucoup moins favorisée que celle de la recoverine myristoylée. Cette observation suggère fortement que la liaison membranaire de la recoverine myristoylée est assurée par son myristoyl. Comme la membrane des SEB est majoritairement composée de phospholipides polyinsaturés et que l'affinité de la recoverine non myristoylée est peu favorable pour ceux-ci, sa liaison serait faible comparativement à celle de la recoverine myristoylée. Cependant, comme il a été démontré que la recoverine inhibe efficacement la phosphorylation de la rhodopsine par la rhodopsine kinase à haute concentration de calcium (Kawamura, 1993; Calvert et al., 1995), nos résultats suggèrent que sa liaison membranaire n'est pas une condition nécessaire à son activité d'inhibition. On peut tout de même se demander en quoi la stabilité de la liaison membranaire de la recoverine est importante ? Peut-être que celle-ci a un impact sur la cinétique de l'inhibition, tout comme pour la cinétique d'interaction membranaire, tel que démontré par Desmeules et al. (2007). Ou encore, elle assurerait la translocation de la recoverine à l'intérieur des SEB vers la terminaison synaptique (Strissel et al., 2005).

Il est intéressant à ce niveau-ci de comparer ces résultats en tenant compte de la composition membranaire des cellules photoréceptrices. La DMPC n'est pas retrouvée dans les photorécepteurs et nos résultats suggèrent que ce phospholipide ne favorise pas

l'interaction membranaire de la recoverine. À l'inverse, les phospholipides hautement insaturés qui composent tout près de 50% des membranes des photorécepteurs (voir tableau 1) permettent une interaction importante avec le myristoyl de la recoverine. Cependant, on pourrait conclure qu'une seule insaturation est suffisante pour optimiser la liaison de la recoverine, ce qui ne permet pas d'expliquer le pourcentage très élevé d'acides gras polyinsaturés des photorécepteurs. Par contre, il est possible que ce comportement soit différent pour les autres phospholipides majeurs des photorécepteurs (PE et PS).

3.3 Étude structurale de la recoverine en monocouche par spectroscopie PM-IRRAS

L'étude structurale de la recoverine myristoylée en monocouche par spectroscopie infrarouge a été effectuée en utilisant deux approches distinctes qui sont présentées dans les deux prochaines sous-sections. La première approche appelée «*mesures en compression*», consiste à suivre le comportement de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche en comprimant successivement cette monocouche jusqu'à différentes valeurs de pression de surface (c.f. section 2.3). Par cette méthode, on observe progressivement l'interaction de la recoverine jusqu'à des pressions de surfaces élevées et on peut assister ou non à l'éjection de cette protéine de la monocouche à une certaine valeur de pression de surface qui intègre ici le concept de pression critique d'exclusion (PCE). Quatre phospholipides différents ont été choisis pour faire cette mesure: la DMPC, la DMPS, la DDPC et la DDPS. Ce choix rend possible l'étude de l'effet de têtes polaires dont la charge nette est différente (PC : 0 et PS : -1) et de comparer l'effet des chaînes hydrocarbonées longues et insaturées (DD) avec des chaînes courtes et saturées (DM). On souhaite comprendre davantage de quelle façon les valeurs de PCI varient (voir figures 22 et 23) lorsqu'on varie ces paramètres propres à chaque phospholipide. En effet, on peut se demander pourquoi la DMPC montre une PCI inférieure à celle de la DDPC tandis que des valeurs très similaires sont obtenues pour la DMPS et la DDPS (voir figure 22). De plus, on sera en mesure de déterminer si la recoverine myristoylée sera plus facilement éjectée d'une monocouche formée de phospholipides avec des chaînes grasses courtes et saturées (DM) que longues et insaturées (DD).

La deuxième approche appelée «*mesures à aire moléculaire fixe*» permet d'observer l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche à aire moléculaire constante et

à des valeurs de pressions de surface initiales de 5, 10 et 20 mN/m (c.f. section 2.2.2). Contrairement à l'autre approche, celle-ci est spécifique à l'entassement moléculaire de départ et permet de déterminer comment la recoverine peut s'insérer dans une monocouche en fonction de cet entassement. Les phospholipides étudiés selon cette approche sont la DMPC et la DMPS. Des mesures avec la DMPE n'ont pas été faites parce qu'elle montre une longue transition de phase entre 5 et 12 mN/m (Mingotaud et al. 1993) et que la comparaison ne serait pas valable car la DMPS et la DMPC présentent un seul état physique en monocouche à 24 °C.

3.3.1 Mesures en compression

3.3.1.1 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPC

La compression du système recoverine myristoylée/DMPC mène à une réduction d'aire moléculaire de 84 à 75, 59 et 51 cm² pour des pressions de surface de 19, 20, 21 et 22,5 mN/m, respectivement (figure 33). Cependant, il semble que la compression a peu d'impact sur l'augmentation de la pression de surface. En effet, on se serait attendu à une élévation plus importante de pression de surface, ce qui permet de soupçonner la présence d'une fuite au niveau de la barrière mobile du bain de monocouche en PEEK. Ce doute nous a amené à répéter une mesure de compression de la DMPC seule dans un bain de monocouche de la compagnie Kibron. Lors de l'arrêt de la diminution de l'aire moléculaire, la pression de surface diminue à un rythme de 0,15 mNm⁻¹min⁻¹ (voir figure 34). Ce taux est trois fois plus faible que celui observé avec le bain de PEEK (figure 33), ce qui confirme notre hypothèse d'une anomalie au niveau de la barrière du bain de monocouche en PEEK laissant échapper le lipide. Cet ennui technique sera donc considéré dans l'interprétation des résultats.

Des spectres PM-IRRAS ont été mesurés à chacune de ces étapes de compression (figure 35) correspondant aux plateaux de la figure 33. La courbe pleine en noir correspond au spectre à 19 mN/m. On peut voir aussi les spectres correspondant aux trois compressions successives. Au départ, avant la compression, il apparaît une bande amide I à 1661 cm⁻¹ avec un épaulement à 1676 cm⁻¹ et une large bande amide II centrée à 1536 cm⁻¹ (voir

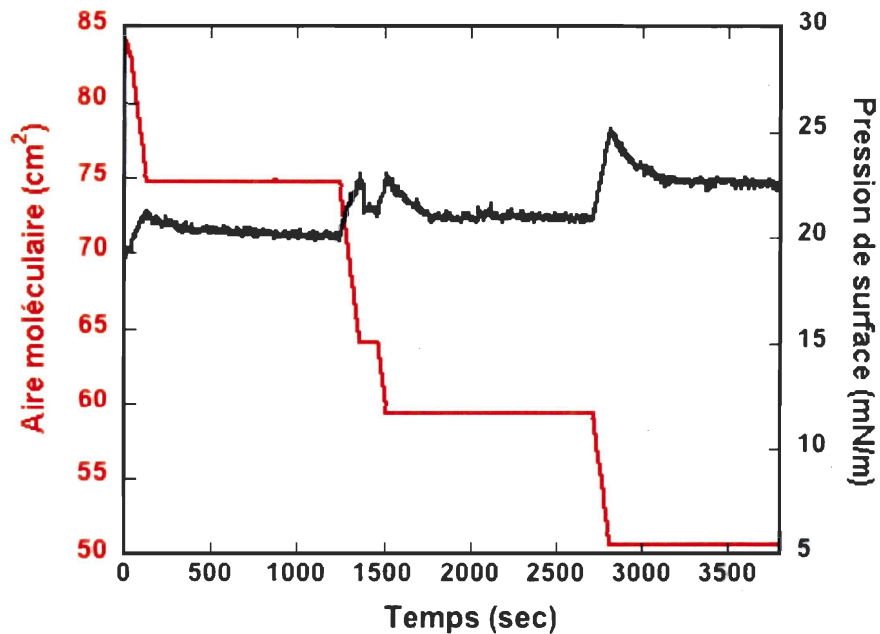


Figure 33 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DMPC/recoverine myristoylée avec un bain de monocouche en PEEK. La courbe en noir représente la pression de surface en fonction du temps et la courbe en rouge présente l'aire moléculaire en fonction du temps.

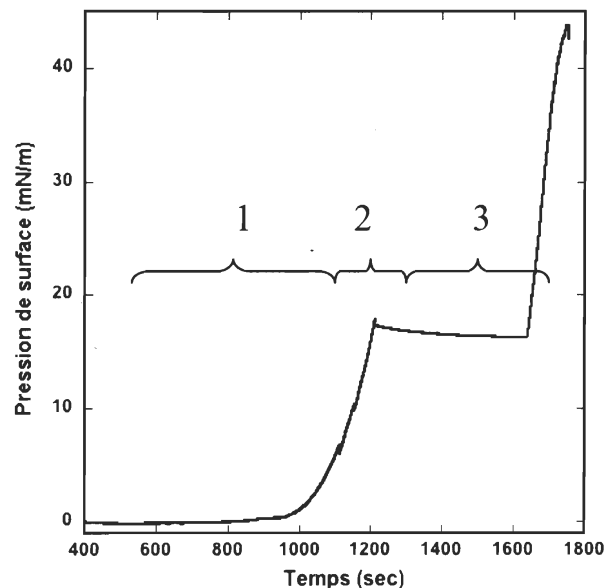


Figure 34 : Compression, arrêt et poursuite de la compression d'une monocouche de DMPC avec un bain de monocouche de la compagnie Kibron. Les sections 1 et 2 représentent la compression après l'étalement du lipide. La section 2 montre le début de l'isotherme de pression de surface du DMPC. À 17 mN/m, on arrête la compression et on enregistre la pression de surface en fonction du temps (section 3) qui diminue très lentement par rapport à la variation observée en figure 33.

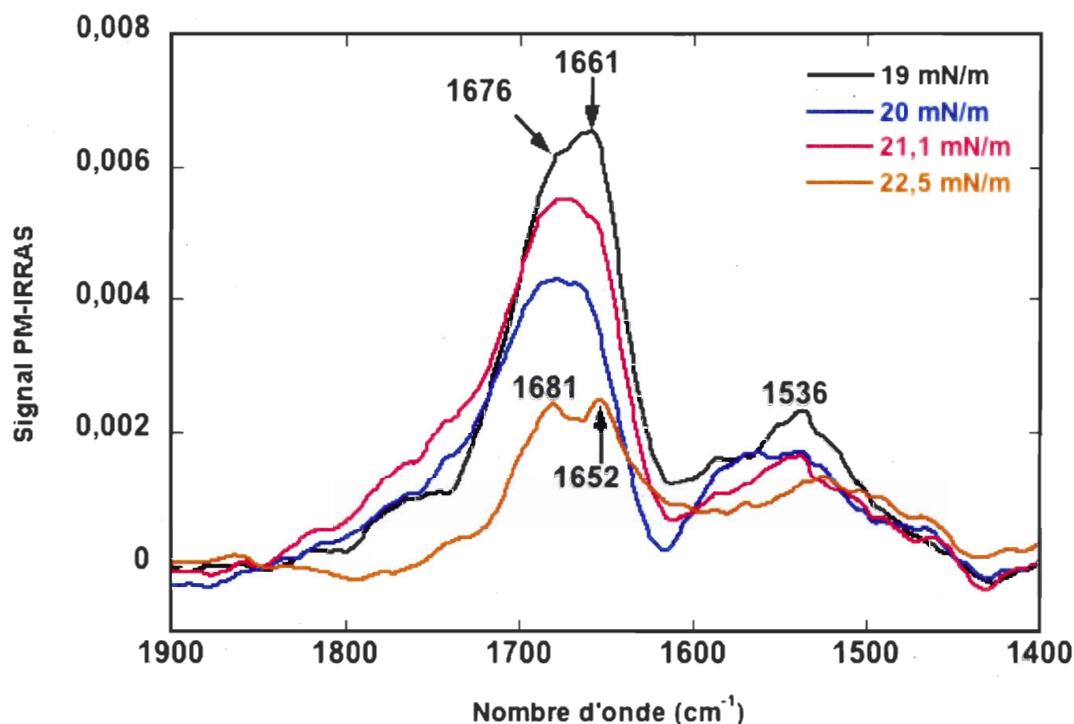


Figure 35 : Spectres PM-IRRAS du système binaire DMPC/recoverine myristoylée.

Les différentes valeurs d'aire moléculaire et de pressions de surface correspondent aux plateaux de la monocouche à différentes aires moléculaires, soit 84 cm^2 (19 mN/m, avant le début de la compression), 75 cm^2 (20 mN/m), 59 cm^2 (21,1 mN/m) et 51 cm^2 (22,5 mN/m), respectivement.

courbe en noir, figure 35). Pour une conformation en hélices- α , les bandes amide I et II devraient être centrées respectivement vers $1645\text{-}1670 \text{ cm}^{-1}$ et 1552 cm^{-1} (Barth et Zscherp, 2002) (voir tableau 3).

Les spectres associés aux mesures en compression montrent que la forme de la bande amide I se déplace légèrement vers les nombres d'onde plus élevés. À la dernière étape de la compression (22,5 mN/m), on distingue deux bandes, l'une à 1681 et l'autre à 1652 cm^{-1} . La protéine est partiellement dénaturée puisqu'il reste seulement une certaine portion de la protéine en hélices- α . L'intensité des bandes amides I et II diminue au cours de la compression. On attribue cette diminution à une exclusion graduelle de la protéine de la monocouche. La compression jusqu'à $22,5 \text{ mNm}^{-1}$ n'exclut pas totalement la recoverine myristoylée puisqu'on observe encore les bandes amides I et II. Il aurait été intéressant de connaître la PCE; c'est-à-dire la valeur de pression de surface où les bandes amides I et II

Tableau 3 : Position des bandes amide I et II selon la structure secondaire de la protéine¹.

Structure secondaire	Position de la bande Amide I	Position de la bande Amide II
Hélices- α	1645-1670 ² cm^{-1}	1550 cm^{-1}
Feuillets β anti-parallèle	1615-1645 cm^{-1} 1690-1700 cm^{-1} (composante mineure)	1510-1530 cm^{-1}
Feuillets β parallèle	1615-1645 cm^{-1}	1530-1550 cm^{-1}
Hélices- β	1638-1644 cm^{-1}	---
Autres structures (boucles)	1630-1700 cm^{-1}	---

¹ Barth et Zscherp, 2002

² Dépend de la longueur des hélices- α .

disparaissent complètement. Comme la PCI de la recoverine myristoylée avec la DMPC se situe à 21,8 mN/m, il semble donc que cette valeur soit inférieure à la PCE.

Il a été démontré à la section 2.4.2 qu'il est possible de corrélérer l'orientation moléculaire des hélices- α de la recoverine myristoylée en fonction de l'intensité relative des bandes amides I et II. L'analyse orientationnelle de la recoverine myristoylée adsorbée au DMPC n'a pu être effectuée car la recoverine change de conformation au cours de la compression. En effet, la conformation de la recoverine selon le spectre de la figure 35 est très différente de celle en figure 19 et celle de la recoverine myristoylée au cours de son adsorption à une pression de surface initiale de 5 mN/m (Desmeules et al., 2007) où une structure essentiellement en hélices- α est observée (position de la bande amide I à 1655 cm^{-1}). Cela suggère qu'un changement conformationnel important a eu lieu par rapport aux données de Desmeules et al. (2007) et au cours de la compression (figure 35), ce qui empêche de conclure quoique ce soit à propos de l'orientation de la recoverine.

3.3.1.2 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPS

Le même type de mesures de compression a été effectuée avec la DMPS. Il est d'intérêt de comprendre de quelle façon le changement de tête polaire pourrait affecter l'isotherme de compression, l'intensité des bandes amide du spectre PM-IRRAS et l'orientation de la recoverine.

L'isotherme de compression du système DMPS/recoverine myristoylée est présenté à la figure 36. On a comprimé les barrières du bain de monocouche en cinq étapes correspondant chacune à un plateau. Un spectre infrarouge a été enregistré à chacun de ces cinq plateaux. Contrairement à la mesure faite avec la DMPC (figure 33), on arrive à augmenter davantage la pression de surface en cours de compression, i.e. de 17,4 mN/m à 26,3 mN/m avec un taux moyen de diminution de la pression de surface, suite à l'arrêt de compression, de $0,14 \text{ mNm}^{-1}\text{min}^{-1}$. Si des fuites sont présentes dans cette expérience, elles sont donc beaucoup moins importantes que dans le cas du DMPC.

Les figures 37 et 38 montrent les différents spectres PM-IRRAS obtenus à chacune des étapes de compression. La courbe en bleu de la figure 37 correspond au spectre PM-IRRAS avant la compression et les spectres des compressions successives sont de couleur différente. La position des bandes amides I et II ($1655\text{-}1659$ et 1539 cm^{-1} , respectivement) suggère que la structure de la recoverine est composée majoritairement d'hélices- α (tableau 3). L'intensité des bandes amide I et II diminue au cours de la compression, allant même jusqu'à disparaître presque complètement. En effet, on peut distinguer une bande amide I dans le spectre mesuré à 22 mN/m (figure 37) alors qu'on voit uniquement les bandes C=O ester (1742 cm^{-1}) et les déformations CH_2 et CH_3 (1467 cm^{-1}) des chaînes hydrocarbonées de la DMPS dans les spectres à 23,5 et 26,3 mN/m (figure 38). Ces données suggèrent que la recoverine myristoylée est exclue de la monocouche à une pression de surface qui se situe autour de 22 mN/m. Cette valeur est très près de la PCI du système recoverine myristoylée/DMPS (21 mN/m). Cela suggère que la compression influence significativement les interactions entre la recoverine myristoylée et la DMPS. De plus, la forme de la bande amide I reste centrée à $1655\text{-}1659 \text{ cm}^{-1}$, ce qui suggère que sa structure secondaire native est maintenue, ce qui n'est pas le cas pour les spectres mesurés en présence de DMPC (figure 35). Une bande négative est présente à 1735 cm^{-1} seulement pour le spectre avant la compression. Cette position est caractéristique de la bande C=O ester des phospholipides et pourrait résulter d'une orientation différente de ce groupement fonctionnel en absence et en présence de recoverine.

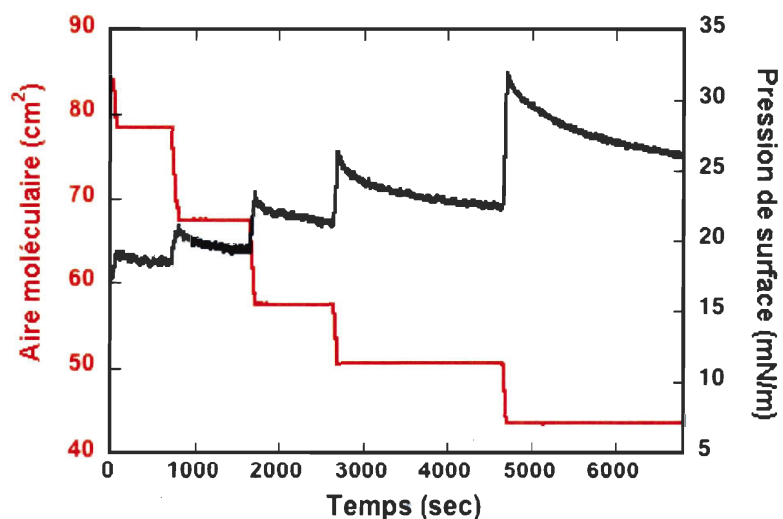


Figure 36 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DMPS/recoverine myristoylée. La courbe en noir représente la pression de surface en fonction du temps, tandis que celle en rouge présente l'aire moléculaire en fonction du temps.

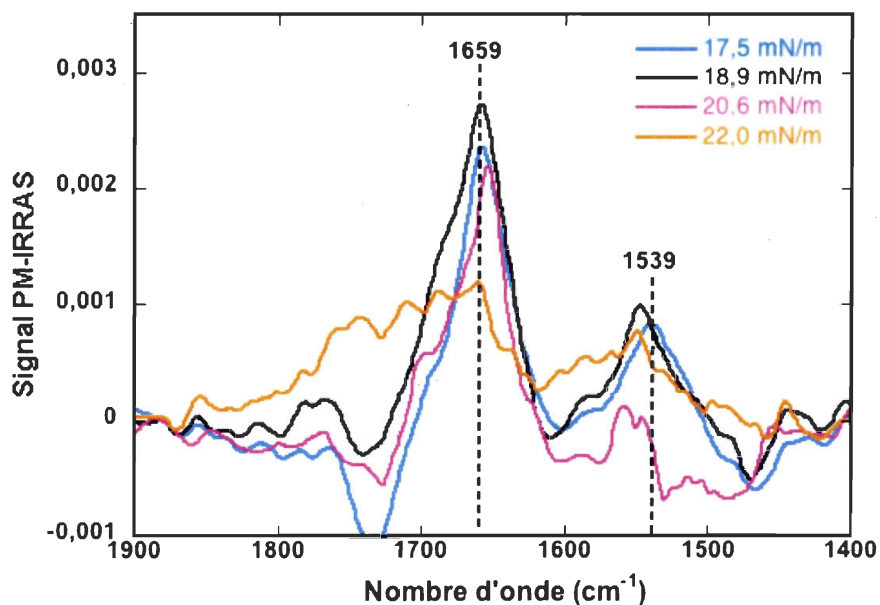


Figure 37 : Spectres PM-IRRAS du système binaire DMPS/recoverine myristoylée. Les différentes pressions de surface correspondent aux plateaux de la figure 36. La courbe en bleu correspond au moment de l'adsorption maximale de la recoverine myristoylée à la monocouche à une aire moléculaire maximale, soit 84 cm^2 ($17,5 \text{ mN/m}$, avant le début de la compression). Les courbes en noir, en rose et en orange correspondent à une compression du film jusqu'à des aires moléculaires de $78,6 \text{ cm}^2$ ($18,9 \text{ mN/m}$), $75,5 \text{ cm}^2$ ($20,6 \text{ mN/m}$) et $57,6 \text{ cm}^2$ ($22,0 \text{ mN/m}$).

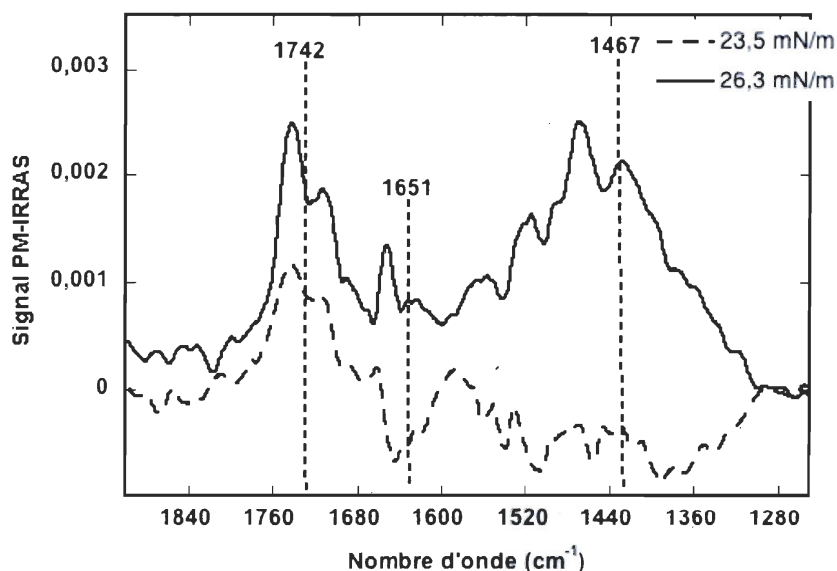


Figure 38 : Spectres PM-IRRAS du système binaire DMPS/recoverine myristoylée.

Les différentes pressions de surface correspondent aux plateaux de la figure 36. La courbe en pointillé et celle en trait plein correspondent à une compression du film jusqu'à des aires moléculaires de 50.8 cm^2 (23,5 mN/m) et 43.5 cm^2 (26,3 mN/m), respectivement.

L'orientation des hélices- α de la recoverine myristoylée en présence de DMPS tel que déterminé par le rapport de l'intensité relative des bandes amides I et II, sur la base des spectres simulés en figure 19, est montré en figure 39. Les hélices- α de la recoverine sont d'abord orientées à $10\text{-}15^\circ$ par rapport à la normale à $17,5$ à $18,9 \text{ mN/m}$ puis la compression de la monocouche jusqu'à $20,6 \text{ mN/m}$ provoque un redressement complet des hélices- α de la protéine (0°).

3.3.1.3 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DDPG

L'étalement d'un phospholipide composé de deux chaînes grasses de didocosahexaénoyl à la surface du tampon Hépès dans le bain de monocouche en PEEK mène à la formation d'une monocouche plutôt instable. En effet, la pression de surface chute drastiquement jusqu'à ce que le signal atteigne une valeur près de 0 mN/m . La raison exacte de ce comportement est jusqu'à maintenant inconnue et des mesures de caractérisation supplémentaires seraient nécessaires afin de comprendre l'organisation d'une telle monocouche. Plusieurs hypothèses ont été soulevées, notamment l'oxydation du phospholipide au contact de l'air et une fuite importante de la barrière mobile.

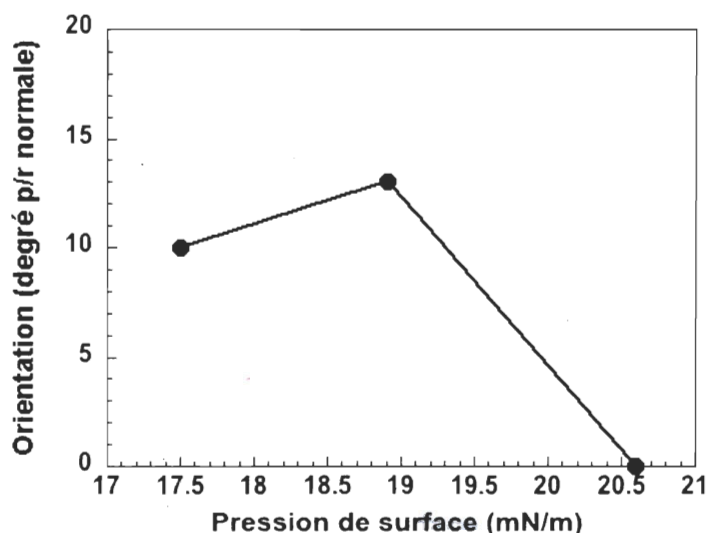


Figure 39 : Orientation de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DMPS à différentes pressions de surface. Les points expérimentaux correspondent au rapport des bandes amide I et II des spectres de la figure 37.

Quoiqu'il en soit, il nous a été possible de mesurer l'adsorption de la recoverine myristoylée à cette monocouche à pression de surface constante en utilisant le contrôle de l'aire moléculaire. La pression de surface a été fixée à 10,2 mN/m et l'aire moléculaire, contrôlée par la position des barrières, diminue de façon à maintenir la pression de surface constante (voir figure 40). La protéine est injectée sous la monocouche ~15 minutes après l'étalement de la DDPC, ce qui correspond au délai normal permettant à la monocouche de se stabiliser et au solvant de s'évaporer. On observe, après un court laps de temps, l'adsorption de la protéine qui se traduit par un ralentissement de la diminution d'aire moléculaire (~3800 à 4700 sec), puis par une augmentation de l'aire (> 4700 sec), tel que montré sur la figure 40. Ce n'est que lorsque le signal devient stable que l'étape de compression a été mise en marche, tel que présenté à la figure 41, de façon similaire aux étapes décrites pour la DMPC (section 3.3.1.1) et la DMPS (3.3.1.2).

Le système recoverine myristoylée/DDPC a subi 3 compressions successives au cours desquelles le signal de pression de surface augmente de 17,3 à 21,0 mN/m. Les spectres infrarouge sont enregistrés à chacun des paliers de compression, soit à 59,3 cm² (17,3 mN/m), 51,7 cm² (18,5 mN/m), 41,0 cm² (20,3 mN/m) et 32,1 cm² (21,0 mN/m).

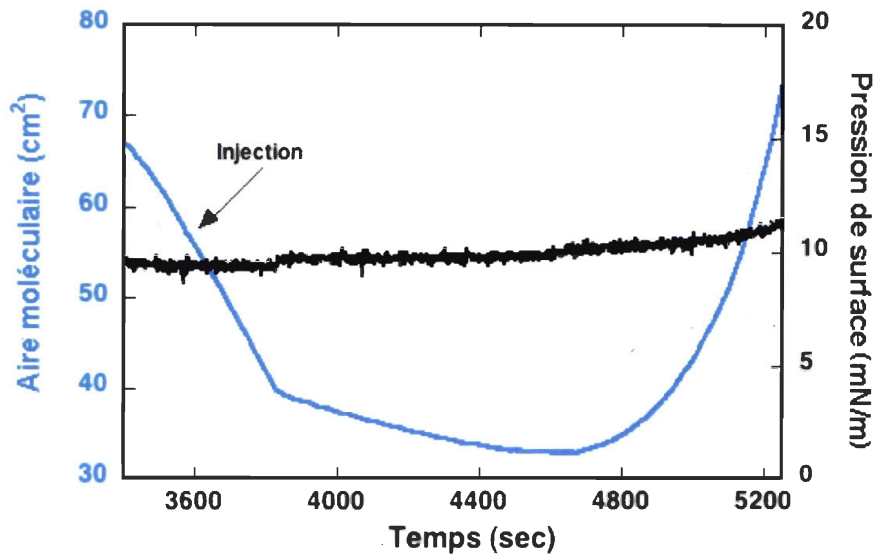


Figure 40 : Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DDPG.
 L'aire moléculaire (en bleu) diminue pour maintenir la pression de surface (en noir) constante. La flèche indique le moment où on injecte la protéine sous la monocouche.

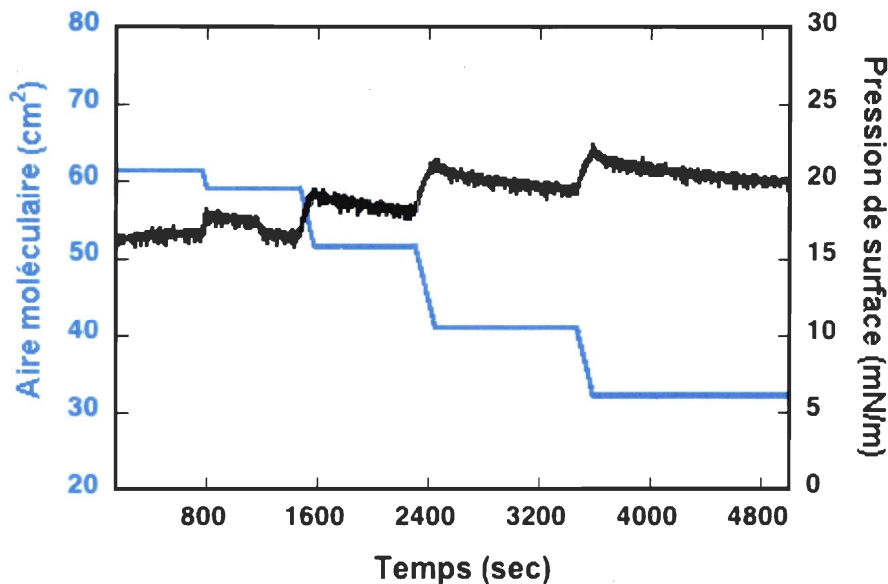


Figure 41 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DDPG/recoverine myristoylée.

La courbe en noir représente la pression de surface en fonction du temps et celle en bleu l'aire moléculaire en fonction du temps. Il est important de noter que la pression de surface de départ ne correspond pas à la pression de surface finale de la figure 40. L'aire moléculaire a été réduite manuellement de façon à obtenir des valeurs de pression de surface initiales similaires à celles utilisées pour la DMPC (figure 33) et la DMPS (figure 36) tout en ayant le maximum de surface pour faciliter la compression subséquente.

Les spectres PM-IRRAS de la figure 42 correspondent à ceux enregistrés à chaque palier de compression montré en figure 41. L'intensité des bandes amide I et II ne varie pas de façon cohérente avec la pression de surface. En effet, l'intensité de la bande amide I (1664 cm^{-1}) augmente légèrement de 17,4 à 18,5 mN/m, puis diminue à 20,3 mN/m et augmente légèrement de nouveau ensuite à 21 mN/m. L'épaule de la bande amide I à 1688 cm^{-1} correspond à une conformation particulière qu'adopte la protéine. Cette conformation dont on n'arrive pas à attribuer spécifiquement à un mode vibrationnel est cependant très différente de la structure observée en présence de DMPS (figure 37) mais assez similaire à celle en présence de DMPC (figure 35). Par ailleurs, la compression n'a pas permis d'atteindre la pression de surface d'exclusion de la protéine; la longueur du bain ne permettait pas de comprimer davantage les barrières pour atteindre des niveaux de pression de surface plus élevés. De plus, comme la PCI est de 30,8 mN/m, il est impossible d'établir une corrélation dans ce cas-ci avec la PCE. L'orientation des hélices- α ne peut être déterminée car il y a peu ou pas d'hélices- α présentes à la surface (voir figure 42).

3.3.1.4 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DDPS

Contrairement au DDPC, les mesures d'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DDPS ont été réalisées à aire moléculaire fixe. Malgré l'instabilité du lipide et la chute décroissante du signal de pression de surface, la protéine a été injectée et on observe une augmentation du signal jusqu'à l'adsorption maximale (voir figure 43). Les flèches sur la figure indiquent le moment où un spectre PM-IRRAS a été enregistré. Une intensité similaire de la bande amide I est obtenue indépendamment de la pression de surface. De plus, le maximum de la bande amide I varie entre 1652 et 1660 cm^{-1} , ce qui suggère que la structure de la recoverine se trouve majoritairement en hélices- α (figure 44). L'orientation des hélices- α au cours de l'adsorption à la monocouche de DDPS varie considérablement (courbe en noir, figure 47). Elle varie de 50° à 86° par rapport à la normale pour une variation de pression de surface de 5 à 15 mN/m.

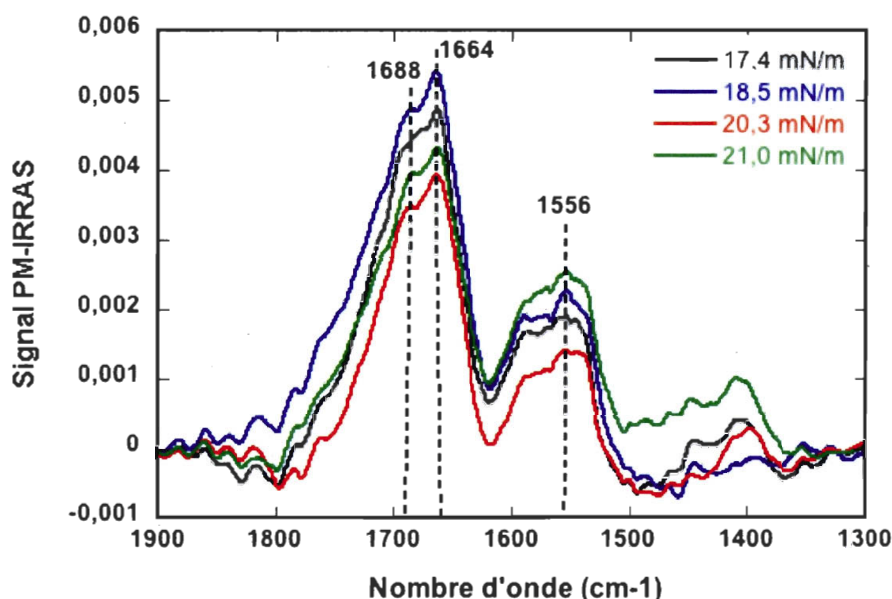


Figure 42 : Spectres PM-IRRAS du système DDPC/recoverine myristoylée.

Les différentes pressions de surfaces correspondent aux plateaux de la figure 41. La courbe en noir correspond au moment de l'adsorption maximale (avant le début de la compression) et à une aire moléculaire maximale, soit $59,3 \text{ cm}^2$ ($17,4 \text{ mN/m}$). Les courbes en bleu, rouge et vert correspondent à des aires moléculaires de $51,7 \text{ cm}^2$ ($18,5 \text{ mN/m}$), $41,0 \text{ cm}^2$ ($20,3 \text{ mN/m}$) et $32,1 \text{ cm}^2$ ($21,0 \text{ mN/m}$), respectivement.

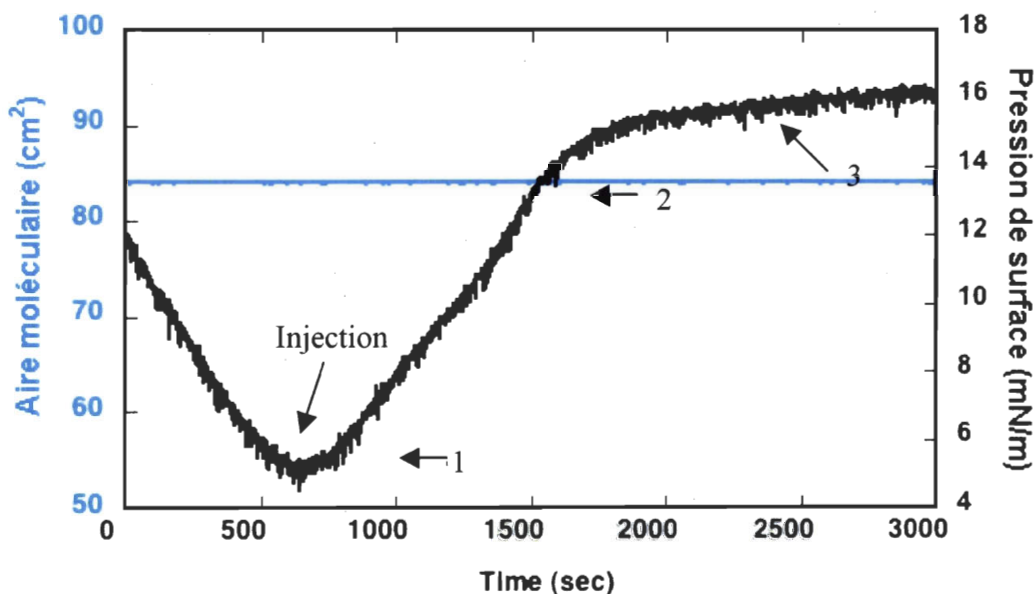


Figure 43 : Adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DDPS.

L'aire moléculaire (en bleu) est stable et la pression de surface (en noir) varie en fonction du temps. L'injection de la protéine sous la monocouche de DDPS est indiquée par une flèche et les autres flèches indiquent le moment où un spectre PM-IRRAS est enregistré.

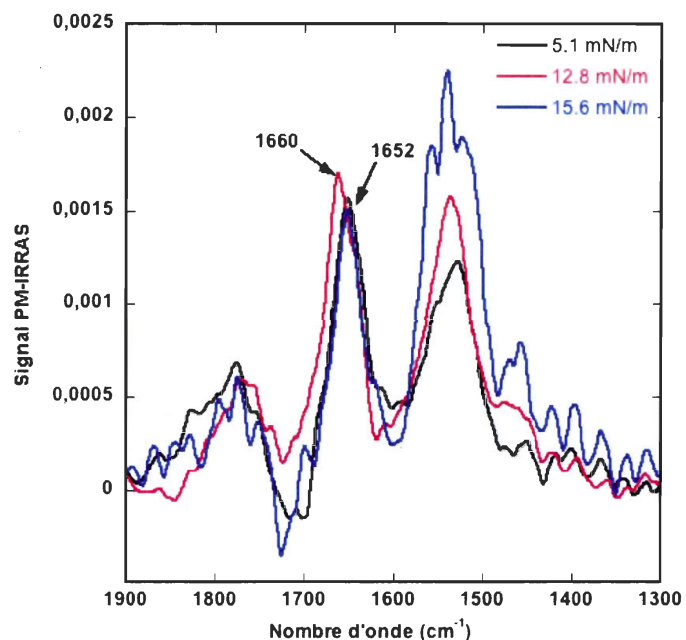


Figure 44 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée au cours de son adsorption à une monocouche de DDPS. Les courbes 1 (en noir), 2 (en rose), 3 (en bleu) réfèrent aux flèches montrées en figure 43, soit suite à l'injection de la recoverine à des pressions de surface de 5,1, 12,8 et 15,6 mN/m, respectivement.

Une fois l'atteinte du maximum d'adsorption de la recoverine, on passe en mode compression, tel que présenté par l'isotherme de la figure 45. On note que la compression du film mène à une augmentation rapide de la pression de surface suivie d'une chute un peu moins rapide jusqu'à la valeur de pression de surface de départ de ~ 14 mN/m, ce qui suggère une fuite lors de la compression. Le taux de diminution de la pression de surface en figure 45 est de $0,12 \text{ mNm}^{-1}\text{min}^{-1}$. L'observation de bandes amides I et II à cette pression de surface (figure 46) suggère que la PCE de la recoverine pour la DDPS est supérieure à $16,1$ mN/m, ce qui est cohérent avec les mesures de PCI (figure 22).

L'intensité de la bande amide I est maximale à 14 mN/m et diminue ensuite à $14,5$ mN/m puis augmente de nouveau à $15,5$ mN/m (figure 46). Cependant, le rapport amide I/amide II de ces spectres varie très peu et correspond à une orientation de $\sim 30^\circ$ par rapport à la normale. La bande amide I des spectres à 14 et $15,5$ mN/m est localisée à 1657 cm^{-1} ; cette bande subit un léger déplacement jusqu'à 1664 cm^{-1} à $14,5$ mN/m (figure 47). La position de cette bande suggère que la structure de la recoverine est organisée en majorité en hélices- α .

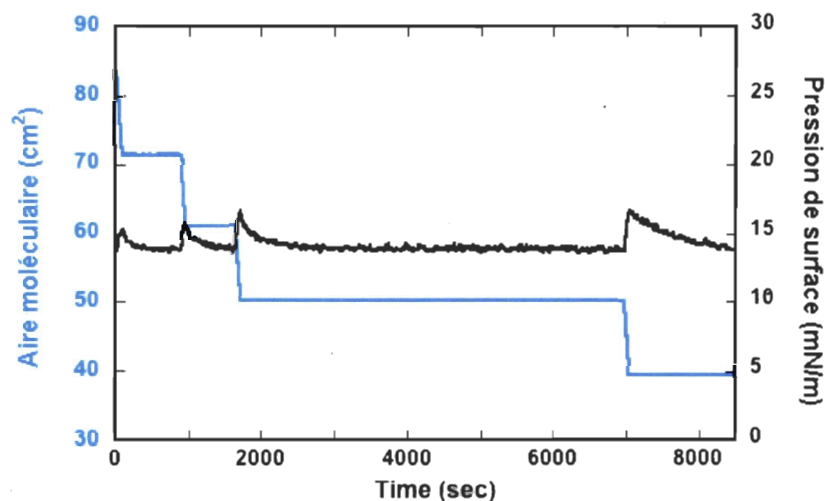


Figure 45 : Isotherme de pression de surface et d'aire moléculaire en fonction du temps pour le système DDPS/recoverine myristoylée. La courbe en noir représente la pression de surface en fonction du temps et celle en bleu l'aire moléculaire en fonction du temps. Il est à noter que la pression de surface initiale est différente de la pression de surface finale de la figure 45. Cela est dû à l'ajustement de la hauteur du bain pour maximiser le signal PM-IRRAS, compte tenu de l'évaporation de l'eau.

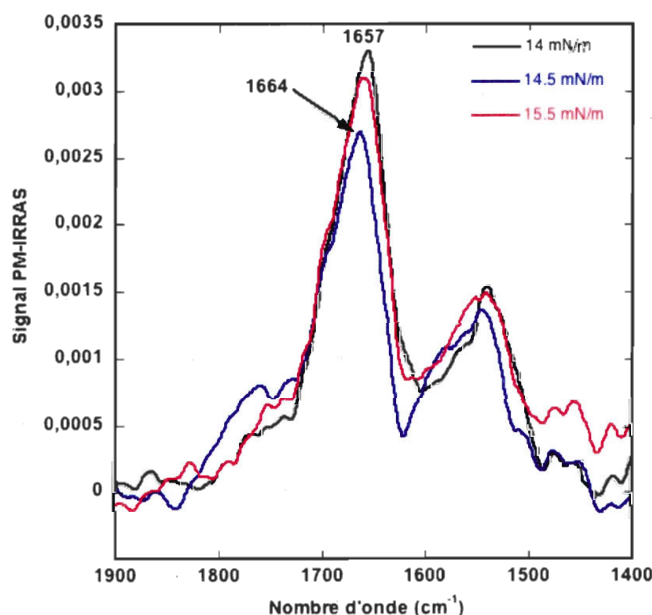


Figure 46 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DDPS en cours de compression. Les valeurs de pression de surface correspondent aux plateaux de la figure 47. La courbe en noir correspond à l'adsorption maximale à une aire moléculaire maximale, soit $71,9 \text{ cm}^2$ (avant le début de la compression). Les courbes en bleu, en rose et en orange correspondent à des aires moléculaires de $61,3 \text{ cm}^2$ ($14,0 \text{ mN/m}$), $50,6 \text{ cm}^2$ ($14,5 \text{ mN/m}$) et $39,7 \text{ cm}^2$ ($16,1 \text{ mN/m}$), respectivement.

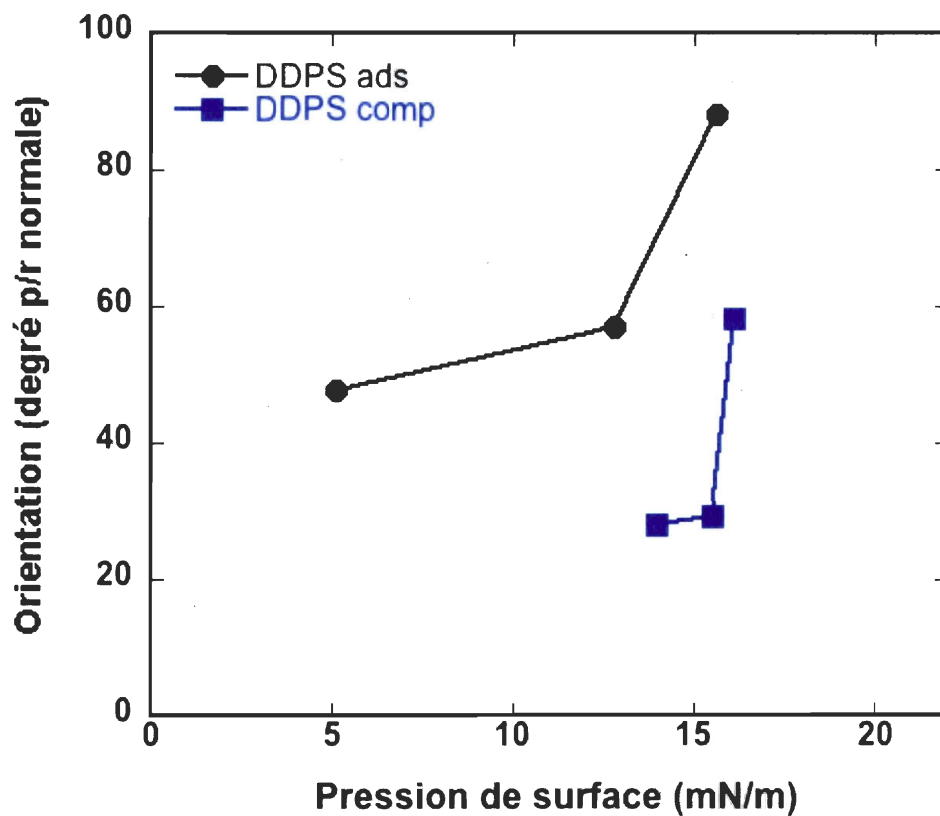


Figure 47 : Orientation de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DDPS à différentes aires moléculaires. L'orientation moléculaire en cours d'adsorption et en compression est calculée à partir du rapport des bandes amide I et II issue des spectres PM-IRRAS des figures 44 (en noir) et 46 (en bleu), respectivement.

3.3.2 Mesures à aire moléculaire fixe

3.3.2.1 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPC

La figure 48 montre les spectres PM-IRRAS au cours de l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPC à différentes pressions de surface initiales de 5, 10 et 20 mN/m. Premièrement, le résultat à une pression initiale de 5 mN/m est très cohérent avec ceux de Desmeules et al. (2007). De plus, l'intensité de la bande amide I et le rapport amide I/amide II varient seulement un peu en fonction du temps pour des pressions de surface initiales de 5 et 20 mN/m (figures 48A et 48C). Cependant, le rapport amide I/amide II change énormément en fonction du temps à une pression de surface initiale de 10 mN/m (figure 48B). En effet, ce rapport diminue de 2.1 à 1.03 après 1800 et 2400 sec. d'adsorption de la recoverine, respectivement. Ce résultat suggère que l'orientation de l'axe principal de la recoverine myristoylée change de 10 à 75° (Desmeules et al., 2007). Il est difficile de comprendre pourquoi l'orientation de la recoverine change seulement à cette pression de surface initiale. Il aurait été intéressant de faire des mesures à des temps d'adsorption plus courts et plus longs pour confirmer ce résultat. Cependant, à une pression de surface initiale de 20 mN/m, la recoverine semble avoir maintenu l'orientation de ~75° observée après 2400 min d'adsorption à 10 mN/m (figure 48C). La figure 48D permet de comparer l'intensité et la position de la bande amide des spectres des figures 48A à 48C au temps d'adsorption le plus long. On peut noter que la bande amide I est centrée à peu près à la même position pour des pressions de surface initiales de 5 et 10 mN/m (~1654 cm⁻¹, ce qui correspond à une structure majoritairement en hélices- α). Cependant, cette bande devient plus large à une pression de surface initiale de 20 mN/m, ce qui suggère que la structure de la recoverine devient plus désordonnée à cette pression de surface initiale. On pourrait expliquer ce résultat par la difficulté plus importante de la recoverine à pénétrer

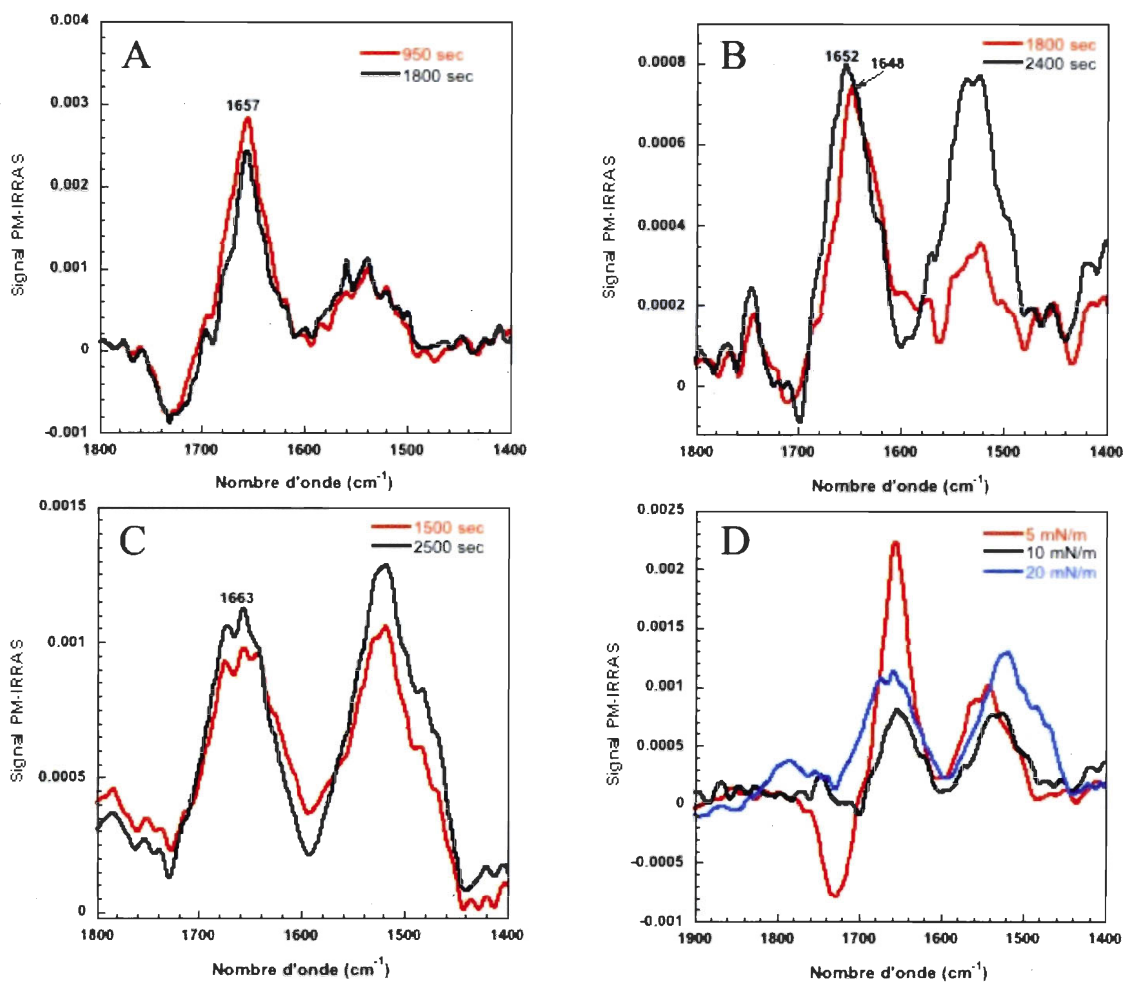


Figure 48 : Spectres PM-IRRAS au cours de l'adsorption de la recoverine myristoylée à une monocouche de DMPC à aire moléculaire fixe à différentes pressions de surface initiales. A. 5 mN/m, B. 10 mN/m, C. 20 mN/m, D. Comparaison 5-10-20 mN/m. Comparaison des spectres à des pressions de surface initiales de 5, 10 et 20 mN/m.

dans la monocouche de DMPC à cette pression de surface plus élevée et de stabiliser sa conformation. La réduction de l'intensité de la bande amide I entre 5 et 10 mN/m suggère une adsorption moins importante de la recoverine suite à l'augmentation de pression de surface ou encore un changement d'orientation de la protéine. Cependant, l'intensité de la bande amide I augmente légèrement entre 10 et 20 mN/m, ce qui suggère une adsorption légèrement supérieure de la recoverine à 10 par rapport à 20 mN/m. Il est aussi important de remarquer la bande négative à $\sim 1721 \text{ cm}^{-1}$ qui suggère une forte perturbation des groupements C=O ester de la DMPC au cours de l'adsorption de la recoverine à une pression de surface initiale de 5 mN/m mais pas à 10 et 20 mN/m.

Il est par ailleurs intéressant de comparer les spectres obtenus à aire moléculaire fixe (figure 48C) et en compression (figure 35) à la même pression de surface. La figure 49 montre les spectres à 20 mN/m obtenus après compression du film DMPC-recoverine myristoylée et après adsorption de la recoverine myristoylée à une pression de surface initiale de 20 mN/m. Premièrement, on observe un rapport amide I/amide II très différent entre les deux spectres. De plus, la bande amide I du spectre en compression est déplacée vers le plus grands nombres d'onde, ce qui suggère que la recoverine est plus désordonnée (contient moins d'hélices- α) dans ces conditions expérimentales. Cette conformation différente de la recoverine en compression et en adsorption ne permet pas de comparer son orientation dans ces deux conditions car le signal PM-IRRAS varie avec le type et le pourcentage de structure. Cependant, il est évident que la compression du film de DMPC-recoverine myristoylée produit une conformation différente de celle observée lorsque la recoverine s'adsorbe à une monocouche de DMPC à la même pression de surface. Il est possible que ce soit dû à un niveau de pénétration différent de la recoverine dans la monocouche qui serait alors plus sensible à l'effet de la pression de surface.

3.3.2.2 Mesures des spectres PM-IRRAS de la recoverine en présence de DMPS

La figure 50 montre les spectres PM-IRRAS au cours de l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPS à différentes pressions de surface initiales de 5, 10 et 20 mN/m. La bande amide I des spectres à une pression de surface initiale de 5 mN/m est centrée à 1658 cm^{-1} , ce qui correspond à une structure majoritairement en hélices- α (figure 50A). L'intensité de cette bande amide I et le rapport amide I/amide II sont presque

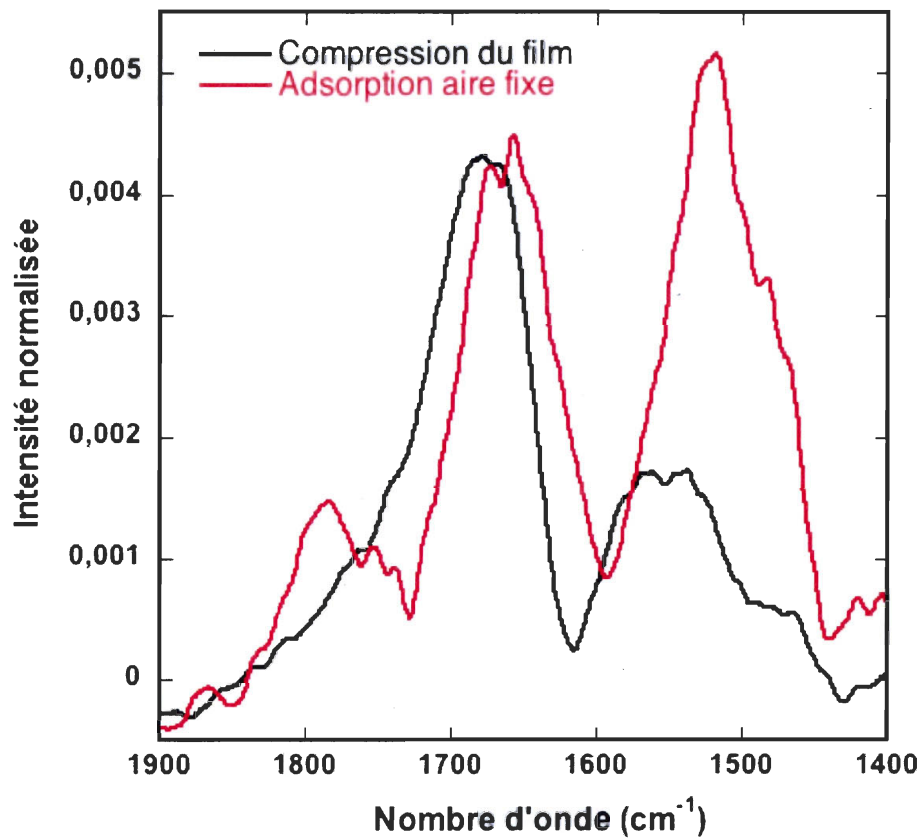


Figure 49 : Spectre PM-IRRAS de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DMPC à une pression de surface de 20 mN/m. La courbe en noir représente la mesure en compression et celle en rose à aire moléculaire fixe.

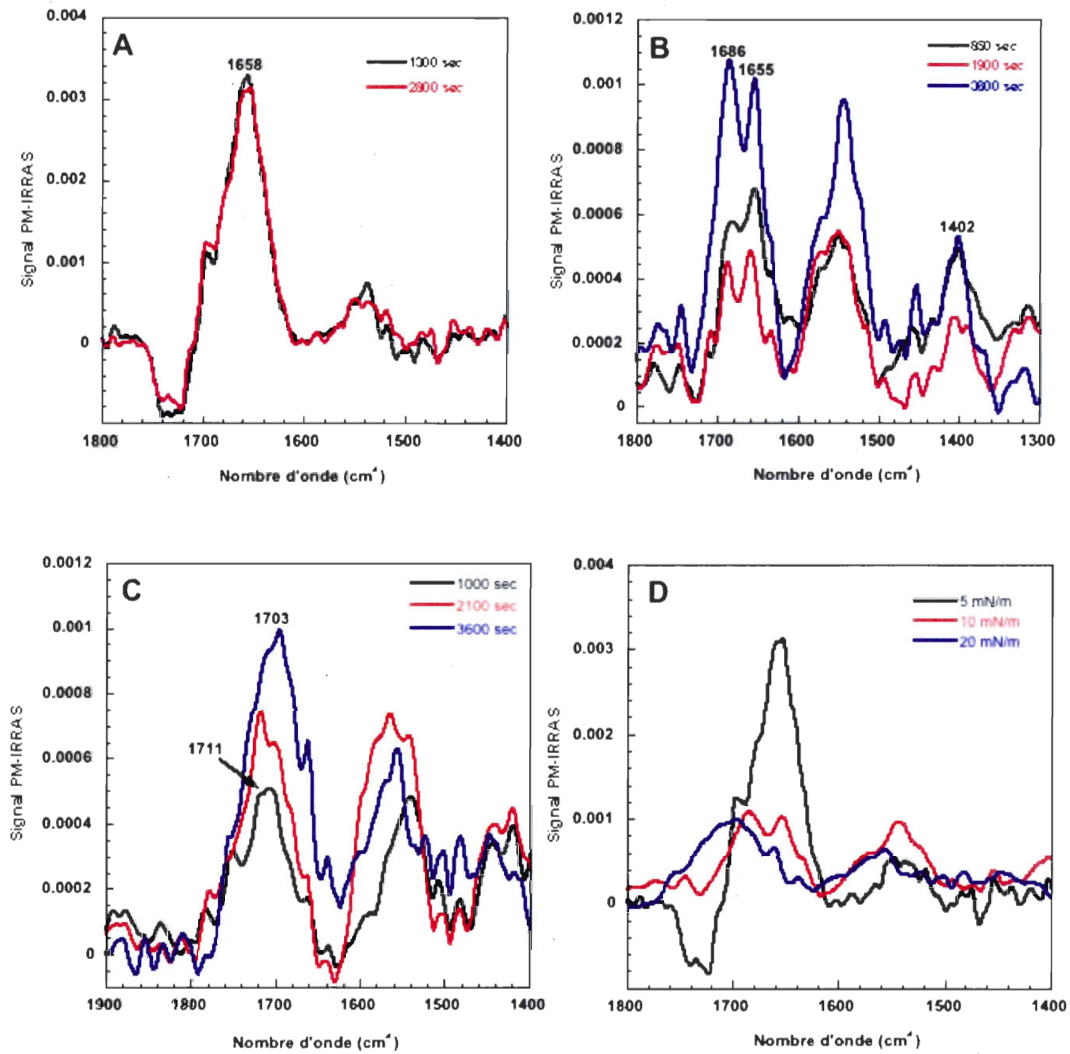


Figure 50 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée au cours de son adsorption à une monocouche de DMPS à aire moléculaire fixe et à différentes pressions de surface initiales. A. 5 mN/m, B. 10 mN/m, C. 20mN/m, D. Comparaison des spectres à une pression de surface de 5, 10 et 20 mN/m.

identiques après 1300 ou 2800 sec. d'adsorption de la recoverine. Tout comme la DMPC à 5 mN/m, on remarque la présence d'une bande négative à $\sim 1734 \text{ cm}^{-1}$ qui démontre une forte perturbation des groupements C=O ester de la DMPS au cours de l'adsorption de la recoverine (figure 50A). Les spectres PM-IRRAS à une pression de surface initiale de 10 mN/m (figure 50B) sont très différents de ceux montrés en figure 50A. En effet, deux composantes sont clairement visibles dans la bande amide I, quelque soit le temps d'adsorption, à 1655 et à 1686 cm^{-1} . La bande à 1655 cm^{-1} correspondant à la protéine structurée en hélices- α alors que l'autre bande intense à 1686 cm^{-1} , qui ne peut représenter un mode amide I, pourrait être attribuée au COOH en conséquence à une protonation du carboxylate de la sérine de la DMPS (Corrigan et Weaver, 1988; Floate et al., 2003). Par ailleurs, on note l'apparition d'une bande vers 1402 cm^{-1} pouvant correspondre à la déformation C-OH (Floate et al., 2003). Il est cependant étrange que cet effet ne soit pas aussi observé à une pression initiale de 5 mN/m. Étant donné l'intensité de la bande à 1686 cm^{-1} , il est impossible d'utiliser le rapport amide I/amide II pour déterminer l'orientation de la recoverine car celle-ci contribue aussi au signal de la bande à 1655 cm^{-1} . Par la suite, l'adsorption de la recoverine à une monocouche de DMPS à 20 mN/m (figure 50C) montre des spectres PM-IRRAS très différents de ceux à 5 et 10 mN/m. En effet, dans la région amide I, on observe une composante centrée à $\sim 1703\text{-}1712 \text{ cm}^{-1}$ ainsi qu'un épaulement à $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$. L'intensité de cette bande amide I a beaucoup diminué, ce qui suggère que la recoverine arrive difficilement à s'absorber à cette pression de surface. La figure 48D permet de comparer les spectres PM-IRRAS de la recoverine au temps d'adsorption le plus long à une monocouche de DMPS à 5, 10 et 20 mN/m. Comme pour la DMPC, on note que l'intensité de la bande amide I chute de façon importante entre 5 et 10 mN/m et est déphasée à 20 mN/m, ce qui suggère que la quantité de recoverine adsorbée est négligeable à 20 mN/m. De plus, il est possible que la bande amide I à 5 mN/m comporte une composante dans la région du COOH car cette bande n'est pas symétrique et un épaulement semble présent dans cette région. L'élargissement de la bande des COOH à 20 mN/m suggère que la tête polaire sérine de la DMPS est fortement perturbée et que la recoverine a une influence plus forte dans cette région de la DMPS à cette pression de surface.

Les figures 51A et 51B comparent les spectres PM-IRRAS obtenus au cours de l'adsorption et de la compression de la recoverine myristoylée en présence d'une

monocouche de DMPS. La figure 51A permet de comparer les spectres de la recoverine au cours de son adsorption à une monocouche de DMPS à aire fixe (figure 48C) et de la compression du film DMPS/recoverine (figure 37) à 20 mN/m. Premièrement, l'intensité de la bande amide I est beaucoup plus grande en compression qu'en adsorption à aire fixe. Cependant, la forme de ces deux spectres est aussi très différente. Il est possible que la décompression de la monocouche de DMPS qui précède la recompression ait permis l'adsorption d'un maximum de molécules de recoverine qui seront exclues de la monocouche à une pression de surface plus élevée que 20 mN/m, alors que la recoverine tente "désespérément" de pénétrer une monocouche à aire fixe à 20 mN/m. De plus, il est possible que la bande COOH soit aussi présente mais beaucoup moins intense en compression car la bande amide I n'est pas symétrique et un épaulement est visible dans cette région (figure 51A). La Figure 51B permet de constater qu'il existe une bonne correspondance entre la position attribuée au COOH à 1685 cm^{-1} à aire fixe et l'épaulement à 1690 cm^{-1} dans la bande amide I en compression. Il y a aussi une bonne correspondance entre la position de la bande amide I du spectre en compression et celui à aire fixe. De plus, comme observé en figure 51A, l'intensité de la bande amide I en compression est beaucoup plus importante que celle à aire moléculaire fixe.

3.3.3 Discussion

L'analyse des mesures en compression permet de suggérer que la nature de la tête polaire des phospholipides influence la conformation de la recoverine myristoylée à la surface. En effet, en présence de DMPC et de DDPC les spectres de la recoverine correspondent à une structure désordonnée comparativement au DMPS et au DDPS qui présentent une structure majoritairement constituée d'hélices- α . Pour l'instant, il est impossible d'expliquer les résultats obtenus quant à la structure secondaire de la recoverine myristoylée en présence de phosphatidylcholine. D'une part, la recoverine montre une affinité élevée pour ce phospholipide. Cependant, elle adopte une structure relativement désordonnée en présence de ce phospholipide à des pressions de surface supérieures à 5

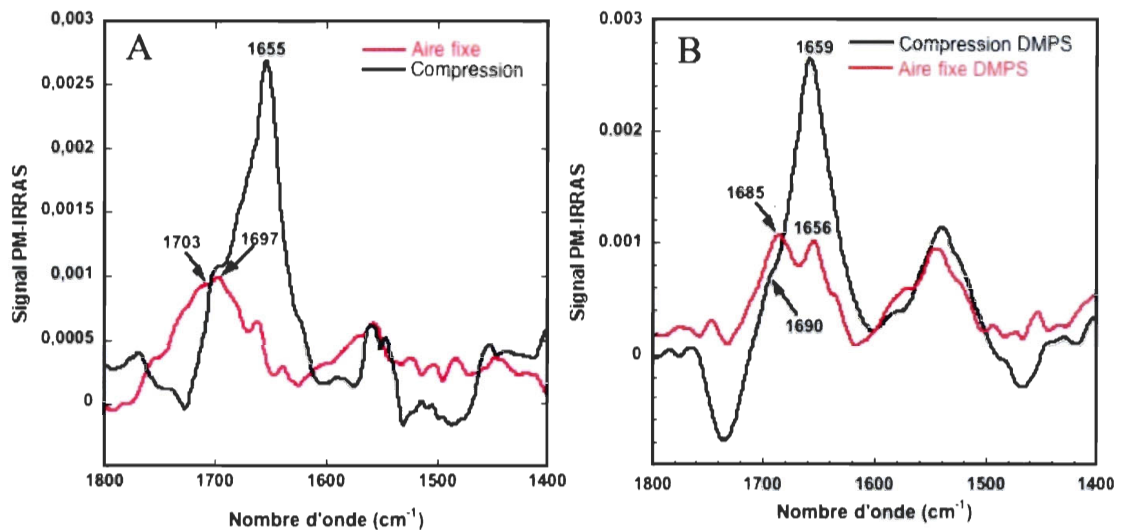


Figure 51 : Spectres PM-IRRAS de la recoverine myristoylée adsorbée à une monocouche de DMPS à une pression de surface de 20 mN/m. La courbe en noir représente la mesure en compression et celle en rose, à aire moléculaire fixe. A. 20mN/m. B. Compression (17,5 mN/m) et aire moléculaire fixe 10 mN/m.

mN/m. Pourquoi la recoverine adopterait-elle une structure différente en présence de PC par rapport à la PS? Il est possible que la charge négative de la PS stabilise la structure de la recoverine. Des mesures avec la PE pourraient permettre de clarifier, du moins en partie, cette question.

Pour ce qui est de la phosphatidylsérine, la compression influence significativement ses interactions avec la recoverine myristoylée sans toutefois altérer sa structure hélicoïdale. Il est plutôt étonnant que la structure des hélices- α ne soit pas affectée par la compression dans le cas de la PS. Peut-être que la recoverine préfère être éjectée plutôt qu'être déformée ou adopter une conformation différente en présence de ce phospholipide. Dans le cas de la DMPS en compression, les hélices- α de la recoverine sont orientées à environ 10 degrés par rapport à l'axe principal et se redressent complètement avant d'être éjectées (figure 47). C'est différent dans le cas de la DDPS; en effet, les résultats suggèrent que la compression du film provoque l'inclinaison des hélices- α à la surface de manière à ce qu'elles se couchent avant d'être éjectées. Ce comportement différent pourrait être spécifique aux chaînes grasses polyinsaturées. La recoverine semble avoir une mobilité

plus grande en présence d'une monocouche de didocosahexaénoyl comparativement à un film de phospholipides avec des chaînes courtes et saturées, tel le dimyristoyl. La fluidité de la chaîne grasse polyinsaturée pourrait donc permettre une insertion supérieure du myristoyl de la recoverine. Cela expliquerait pourquoi la recoverine myristoylée montre une PCI plus petite avec le DM ou le DP que la DD. Comme l'indique la figure 23, cela est vrai pour la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine. Le cas de la phosphatidylsérine est différent, puisque sa charge négative ne semble pas avantager son interaction avec la recoverine, comme montré à la section 1 de ce chapitre, mais elle pourrait être importante pour stabiliser sa structure.

Le niveau de pénétration de la recoverine myristoylée dans la monocouche est différent pour les mesures à aire fixe. Que ce soit pour la DMPC (figure 48) ou la DMPS (figure 50), le rapport amide I/amide II ainsi que la forme et l'intensité des bandes des spectres à aire fixe sont assez différents des spectres en compression. De manière générale, on trouve des quantités moins importantes de protéines et les hélices- α de la recoverine sont plus inclinées à aire fixe qu'en compression (figure 47).

Dans le cas de la DMPC, on note une structure de la recoverine majoritairement composée d'hélices- α , ce qui a permis d'estimer son orientation pour les spectres à aire fixe alors que c'était impossible en compression. En effet, l'orientation des hélices- α est de 10-15 degrés à 5 mN/m, varie de 30 à 75 degrés en cours d'adsorption à 10 mN/m et est stable à 80 degrés à 20 mN/m. L'inclinaison de la recoverine augmente avec l'entassement moléculaire à la surface, ce qui devrait rendre la pénétration de la recoverine dans la monocouche plus difficile. Cette observation est aussi vraie dans le cas de la DMPS où la recoverine présente une augmentation de son inclinaison d'une part en fonction du temps, mais aussi en fonction de la pression de surface initiale. On n'observe donc pas d'effet de la tête polaire des phospholipides sur l'orientation des hélices- α de la recoverine. Les spectres à 10 mN/m (figure 50B) montrent une bande à 1686 cm^{-1} , une bande amide I à 1655 cm^{-1} et une autre bande à 1402 cm^{-1} . Ces données suggèrent que la conformation de la recoverine est majoritairement en hélices- α et que le carboxylate de la sérine est protoné.

Il pourrait y avoir une interaction spécifique entre la recoverine myristoylée et la phosphatidylsérine particulièrement au niveau de son carboxylate. La nature exacte de cette interaction est inconnue. Il pourrait s'agir d'une liaison par pont-hydrogène avec un

groupement en périphérie de la recoverine. Comme l'affinité de la recoverine pour la PS n'est pas favorisée comparativement à la PC ou la PE (figure 23), il est possible que cette interaction électrostatique empêche l'interaction optimale du myristoyl et/ou des acides aminés de la recoverine avec la membrane. Une telle organisation pourrait expliquer pourquoi les hélices- α de la recoverine adsorbée à une monocouche de phosphatidylsérine ne sont pas déformées au cours de la compression. Ainsi, puisque le myristoyl ne serait peu ou pas impliqué dans la liaison membranaire de la recoverine, son insertion serait faible et la compression n'agirait pas sur la structure des hélices de la recoverine en monocouche.

CHAPITRE 4: CONCLUSIONS

Les différentes mesures effectuées avec la recoverine permettent d'une part de caractériser son interaction avec certains phospholipides présents dans les membranes discales des SEB et de comprendre, du moins en partie, en quoi la composition particulière de cette membrane favorise ou non l'action inhibitrice de la recoverine myristoylée par son ancrage à la membrane.

Tout d'abord, l'interaction de la recoverine n'est pas favorisée pour la phosphatidylsérine, peu importe la chaîne hydrocarbonée. Cette interaction particulière marquée par la protonation du carboxylate rend peut-être les principaux groupements de la recoverine peu accessibles. La phosphatidylsérine comporte 12,3 % de la composition membranaire, ce qui est très faible par rapport à la phosphatidylcholine ou phosphatidyléthanolamine. On pourrait conclure que le rôle de ce phospholipide est autre que de favoriser l'interaction de la recoverine myristoylée avec la membrane.

Ensuite, les chaînes hydrocarbonées hautement insaturées favorisent l'interaction entre la recoverine myristoylée et la phosphatidylcholine ainsi que la phosphatidyléthanolamine. Les charges neutres de ces têtes polaires semblent favoriser la liaison et l'insertion du myristoyl qui seraient favorisées par la fluidité des chaînes grasses insaturées. Comme la composition lipidique des SEB inclut 48,9% de chaînes grasses de type didocosahénoyl, on comprend l'importance probable de ces acides gras qui semblent rendre l'insertion de la recoverine myristoylée optimale.

Plusieurs mesures ont été réalisées avec la DMPC pour, entre autres, sa stabilité en monocouche. Ce phospholipide ne représente pas une bonne option pour favoriser la liaison membranaire de la recoverine, ce qui pourrait expliquer pourquoi les membranes discales n'en contiennent pas. D'autre part, la présence du myristoyl de la recoverine semble être une condition presque essentielle à sa liaison aux membranes des photorécepteurs. Comme l'activité inhibitrice de la recoverine non myristoylée n'est pas différente de celle de la recoverine myristoylée, malgré sa faible affinité avec les membranes (Calvert et al., 1995), la question de l'importance de la stabilité de cette interaction peut être soulevée. Cette stabilité de liaison membranaire pourrait permettre la translocation de la recoverine à l'intérieur du SEB vers la terminaison synaptique (Strissel et al., 2005).

En considérant la valeur estimée de la pression latérale des membranes (30 mN/m; Marsh, 1996), la recoverine myristoylée pourrait lier seulement les régions des SEB riches en DDPE et DDPC, ce qui est cohérent avec le contenu élevé en docosahexaénoyl (48,9%; tableau 1)) ainsi qu'en PE et PC (69,1%; tableau 1).

CHAPITRE 5: PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Les résultats des expérimentations décrites dans ce mémoire appuient certaines études, confirment certaines hypothèses, et dans certains cas, permettent de poser d'autres questions. Tout d'abord, les mesures en PM-IRRAS apportent de précieuses informations sur la structure secondaire de la recoverine en monocouche. D'autres phospholipides seraient intéressants à étudier, en particulier la DDPE parce qu'elle montre la plus grande affinité avec la recoverine et qu'elle présente un comportement différent des autres phospholipides (voir figure 24). Il serait aussi souhaitable d'effectuer ces mesures avec un mélange de phospholipides extraits directement de la membrane des SEB. Ce genre de mesure nous renseignerait davantage sur l'orientation réelle de la recoverine myristoylée dans les membranes.

La microscopie de fluorescence est une autre technique qui serait utile afin d'obtenir de l'information sur la morphologie et l'organisation macroscopique du film recoverine-phospholipide. En effet, on pourrait connaître l'homogénéité et la distribution de la recoverine dans la monocouche. Ce type de mesure effectuée avec les phospholipides des SEB nous renseignerait sur la présence ou non de "raft" et s'il existe des interactions spécifiques avec la recoverine myristoylée.

Il a été postulé que certains résidus basiques en périphérie de la recoverine, tels que l'arginine ou la lysine, pourraient être impliqués dans sa liaison membranaire. Cette hypothèse pourrait être confirmée en surexprimant un mutant de la recoverine présentant des délétions spécifiques de ces acides aminés. Il serait ainsi possible d'évaluer l'importance de ces groupements spécifiques dans l'interaction membranaire de la recoverine.

L'hétéroacylation de la recoverine est une autre particularité soulevant des interrogations. Il suffirait d'acyler la recoverine avec les acides gras C14 :1, C14 :2 et C12 :0, présents en des proportions plus variables dans les SEB (DeMar, 1999) et de répéter les mesures de détermination du PCI avec différents phospholipides. On serait ainsi en mesure de comprendre davantage comment l'hétéroacylation pourrait moduler l'interaction entre la recoverine et la membrane des SEB.

De plus, comme il a été soulevé dans le chapitre 2, il serait intéressant de comprendre en quoi la stabilité et la force de l'interaction entre la recoverine myristoylée et la membrane influencent son action dans les SEB. Le phénomène de translocation représente un phénomène intéressant à étudier, puisque peu de données sont répertoriées à ce propos. Des mesures d'interactions entre la recoverine myristoylée et différents mélanges de phospholipides correspondant à chacune des parties de bâtonnet, soit le SEB et le SIB jusqu'à la terminaison synaptique pourraient permettre d'améliorer notre compréhension de ce phénomène.

Bref, c'est la somme de chacune de ces petites informations qui permettra de comprendre davantage le rôle de ce type de protéine dans la rétine.

CHAPITRE 6: BIBLIOGRAPHIE

- Adamson, A.W. *Physical Chemistry of Surfaces* (3rd Ed.) New York, 1976.
- Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E. Polymorphism of phospholipid monolayers. *Physics Abstracts* 1978, 39, 301.
- Ali, M. A., Klyne, M.A. *La vision chez les vertébrés* Ville Mont-Royal, Quebec, 1986.
- Alland, L.; Peseckis, S.M.; Atherton, R.E.; Berthiaume, L.; Resh, M. D. Dual myristylation and palmitoylation of Src family member p59fyn affects subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 16701.
- Ames, J.B.; Ishima, R.; Tanaka, T.; Gordon, J.I.; Stryer, L.; Ikura, M. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* 1997, 389, 198.
- Ames, J.B.; Tanaka, T.; Stryer, L.; Ikura, M. Portrait of a myristoyl switch protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, 6, 432.
- Anderson, R.E.; Maude, M.B.; McClellan, M.; Matthes, M.T.; Yasumura, D.; LaVail, M. M. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334ter rhodopsin mutations. *Mol. Vis.* 2002, 8, 351.
- Arshavsky, V.Y.; Lamb, T.D.; Pugh, E.N. Jr. G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol.* 2002, 64, 153.
- Barth, A.; Zscherp, C. What vibrations tell us about proteins, *Q. Rev. of Biophys.* 2002, 35, 369.
- Berreman, D.W. Optics in stratified and anisotropic media: 4x4 matrix formulation. *J. Opt. Soc. Am.* 1972, 62, 502.
- Blaudez, D. *Spectroscopie différentielle infrarouge par modulation de polarisation de films monomoléculaires déposés sur substrats solides et à l'interface air/eau.* Ph.D. Thesis, Université Bordeaux I, 1993(a).
- Blaudez, D., Buffeteau, T., Cornut, J.C., Desbat, B., Escafre, N., Pézolet, M., Turlet, J.M. Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface. *Appl. Spectro.* 1993(b), 869-874.
- Boucher, J.; Trudel, E.; Methot, M.; Desmeules, P.; Salesse, C. Organization, structure and activity of proteins in monolayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2007, 58, 73.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.

Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure; Garland Publishing: New York, 1991.

Buffeteau, T.; Desbat, B. Thin-film optical constants determined from infrared reflectance and transmittance measurements. *Appl. Spectros.* 1989, 43, 1027.

Burns, M.E.; Baylor, D.A. Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001, 24, 779.

Cadenhead, D.A.; Abrahamsson, S.; Pascher, I. Structure of Biological Membranes : New York, 1977.

Calvert, P.D.; Klenchin, V.A.; Bownds, M.D. Rhodopsin kinase inhibition by recoverin. Function of recoverin myristoylation. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 24127.

Castano, S. Étude physico-chimique de peptides amphipathiques en interaction avec des membranes biologiques modèles. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I, 1998,

Chabre, M. Actualité moléculaire de la phototransduction des bâtonnets rétiens. *Médecine/sciences* 1998, 14, 1315.

Chirgadze, Y.N.; Fedorov, O.V.; Trushina, N. P. Estimation of amino acid residue side-chain adsorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers* 1975, 14, 679.

Chirgadze, Y. N.; Fedorov, O.V.; Tushina, N. P. *Biopolymers* 1975, 14, 679.

Corrigan, D.S., Weaver, M.J., Adsorption and oxidation of benzoic acid, benzoate and cyanate at gold and platinum electrodes as probed by potential-difference infrared spectroscopy. *Langmuir*, 1988, 599.

Dartnall, H.J.; Bowmaker, J.K.; Mollon, J.D. Human visual pigments: microspectrophotometric results from the eyes of seven persons. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1983, 220, 115.

DeMar, J.C. Jr.; Rundle, D.R.; Wensel, T.G.; Anderson, R. E. Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins. *Prog. Lipid Res.* 1999, 38, 49.

Desmeules, P. Étude des paramètres responsables de la liaison de la recoverine myristoylée et non myristoylée aux membranes et de sa myristoylation chez E.Coli, Université du Québec à Trois-Rivières, 2005, 264 pages.

Desmeules, P.; Penney, S. E.; Desbat, B.; Salesses, C. Determination of the contribution of the myristoyl group and hydrophobic amino acids of recoverin on its dynamics of binding to lipid monolayers. *Biophys. J.* 2007, 93, 2069.

Desmeules, P.; Penney, S. E.; Salesse, C. Single-step purification of myristoylated and nonmyristoylated recoverin and substrate dependence of myristoylation level. *Anal. Biochem.* 2006, 349, 25.

Deterre, P.; Bigay, J.; Robert, M.; Pfister, C.; Kuhn, H.; Chabre, M. Activation of retinal rod cyclic GMP-phosphodiesterase by transducin: characterization of the complex formed by phosphodiesterase inhibitor and transducin alpha-subunit. *Proteins* 1986, 1, 188.

Dizhoor, A.M.; Chen, C.K.; Olshevskaya, E.; Sinelnikova, V.V.; Phillipov, P.; Hurley, J.B. Role of the acylated amino terminus of recoverin in Ca(2+)-dependent membrane interaction. *Science* 1993, 259, 829.

Dizhoor, A.M.; Ray, S.; Kumar, S.; Niemi, G.; Spencer, M.; Brolley, D.; Walsh, K.A.; Phillipov, P.P.; Hurley, J.B.; Stryer, L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 1991, 251, 915.

Dousseau, F.; Pézolet, M. Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry* 1990, 29, 8771.

Edsall, J.T.; Martin, R.B.; Hollingworth, B.R. Ionization of individual groups in dibasic acids, with application to the amino and hydroxyl groups of tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1958, 44, 505.

Edward, D.P.; Lam, T.T.; Shahinfar, S.; Li, J.; Tso, M.O. Amelioration of light-induced retinal degeneration by a calcium overload blocker. Flunarizine. *Arch. Ophthalmol.* 1991, 109, 554.

Flaherty, K.M.; Zozulya, S.; Stryer, L.; McKay, D. B. Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision. *Cell* 1993, 75, 709.

Floate, S., Hosseini, M., Arshadi, M.R., Ritson, D., Young, K.L., Nichols, R.J. An in-situ infrared spectroscopy study of the adsorption of citrate on Au(III) electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 2003, 67.

Foley, D.H. An improved applicator system for cellulose acetate electrophoresis. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1990, 6, 141.

Frasson, M.; Sahel, J.A.; Fabre, M.; Simonutti, M.; Dreyfus, H.; Picaud, S. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nature Med.* 1999, 5, 1183.

Fu, Y.; Yau, K.W. Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch.* 2007, 454, 805.

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

Gaines, G. L. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*; Wiley-Interscience: New York, 1966.

Golden, W. G. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, New York, 1985; Vol. 4.

Hamm, H. E.; Gilchrist, A. Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996, 8, 189.

He, R.; Komasa, N.; Ekholm, D.; Murata, T.; Taira, M.; Hockman, S.; Degerman, E.; Manganiello, V. C. Expression and characterization of deletion recombinants of two cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE-3). *Cell Biochem. Biophys.* 1998, 29, 89.

Higgins, K.M.; Oprian, D. D.; Schertler, G.F.X. Recoverin binds exclusively to an amphipathic peptide at the N-terminus of rhodopsin kinase, Inhibiting rhodopsin phosphorylation without affecting catalytic activity of the kinase. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 19426.

Hisatomi, O.; Tokunaga, F. Molecular evolution of proteins involved in vertebrate phototransduction. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2002, 133, 509.

Hui, S.W.; Cowden, M.; Papahadjopoulos, D.; Parsons, D. F. Electro diffraction study of hydrated phospholipid single bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 382, 265.

Ingelman-Sundberg, M.; Glaumann, H. Reconstitution of the liver microsomal hydroxylase system into liposomes. *FEBS Lett.* 1977, 78, 72.

Jacob, M. Identification et caractérisation de nouveaux types de phospholipases A2 dans deux fractions subrétiniennes autres que les segments externes de bâtonnets., Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 1998, 397 pages.

Johnson, W.C.; Palczewski, K.; Gorcyca, W.A.; Riazance-Lawrence, J.H.; Witkowska, D.; Polans, A.S. Calcium binding to recoverin: implications for secondary structure and membrane association. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1342, 154.

Kaupp, U.B.; Koch, K. W. Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* 1992, 54, 153.

Kaupp, U.B.; Seifert, R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* 2002, 82, 769.

Kawamura, S. Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature* 1993, 362, 855.

Koch, K.W. Identification and characterization of calmodulin binding sites in cGMP-gated channel using surface plasmon resonance spectroscopy. *Methods Enzymol.* 2000, 315, 785.

- Koutalos, Y.; Yau, K.W. Regulation of sensitivity in vertebrate rod photoreceptors by calcium. *Trends Neurosci.* 1996, 19, 73.
- Kretsinger, R.H.; Nockolds, C.E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 3313.
- Krimm, S.; Bandekar, J. *Adv. Protein Chem.* 1986, 38, 181.
- Krizaj, D.; Copenhagen, D. R. Calcium regulation in photoreceptors. *Front. Biosci.* 2002, 7, d2023.
- Kuhn, H.; Hall, S. W.; Wilden, U. Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* 1984, 176, 473.
- Lamarche, F.; Téchy, F.; Aghion, J.; Leblanc, R. M. Surface pressure, surface potential and ellipsometric study of cytochrome c binding to dioleoylphosphatidylcholine monolayer at the air-water interface. *Colloids and Surfaces* 1988, 30, 209.
- Langmuir, I. Two-Dimensional Gases, Liquids and Solids. *Science* 1936, 84, 379.
- Makino, C. L.; Dodd, R. L.; Chen, J.; Burns, M. E.; Roca, A.; Simon, M. I.; Baylor, D. A. Recoverin regulates light-dependent phosphodiesterase activity in retinal rods. *J. Gen. Physiol.* 2004, 123, 729.
- Marieb, E.N. *Anatomie et physiologie humaines*, 1999.
- Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1286, 183.
- Miljanich, G. P.; Sklar, L. A.; White, D. L.; Dratz, E. A. Disaturated and dipolyunsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane. *Biochim Biophys Acta* 1979, 552, 294.
- Mingotaud, A.-F.; Mingotaud, C.; Patterson, L. K. *Handbook of Monolayers*; Academic Press: San Diego, CA, 1993.
- Mitchell, D.C.; Niu, S.L.; Litman, B. J. Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 42801.
- Miyazawa, T.; Blout, E.R. *J. Am. Chem. Soc.* 1961, 83, 712.
- Moews, P.C.; Kretsinger, R.H. Terbium replacement of calcium in carp muscle calcium-binding parvalbumin: an x-ray crystallographic study. *J. Mol. Biol.* 1975, 91, 229.
- Mouritsen, O.G. Why is docosahexaenoic acid essential for nervous system function. *Curr. Opinion Coll. Int. Sci.* 1998, 3, 78.

Niu, S.L.; Mitchell, D.C.; Lim, S.Y.; Wen, Z.M.; Kim, H.Y.; Salem, N., Jr.; Litman, B.J. Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 31098.

Otto-Bruc, A.E.; Fariss, R.N.; Van Hooser, J.P.; Palczewski, K. Phosphorylation of photolyzed rhodopsin is calcium-insensitive in retina permeabilized by alpha-toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998, 95, 15014.

Palczewski, K. Structure and functions of arrestins. *Protein Sci.* 1994, 3, 1355.

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

Pugh, E.N., Jr.; Duda, T.; Sitaramayya, A.; Sharma, R. K. Photoreceptor guanylate cyclases: a review. *Biosci. Rep.* 1997, 17, 429.

Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; Hall, W.C.; Lamantia, A.-S.; McNamara, J.O.; White, L.E. *Neuroscience*, Fourth edition, 2001.

Ray, S.; Zozulya, S.; Niemi, G.; Flaherty, K.M.; Brolley, D.; Dizhoor, A.M.; McKay, D.B.; Hurley, J.B.; Stryer, L. Cloning, expression, and crystallization of recoverin, a calcium sensor in vision. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci. of the U.S.A.* 1992, 89, 5705.

Resh, M.D. Fatty acylation of proteins; new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1451, 1.

Rodieck, R.W. *The first steps in seeing*, Vanderbilt University, Nashville, USA, 1998.

SanGiovanni, J.P.; Parra-Cabrera, S.; Colditz, G.A.; Berkey, C.S.; Dwyer, J.T. Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants. *Pediatrics* 2000, 105, 1292.

Senin, I.I.; Churumova, V.-A.; Philipov, P.P.; Koch, K.-W. Membrane binding of the neuronal calcium sensor recoverin-modulatory role of the charged carboxy-terminus. *BMC Biochemistry* 2007, 8, 1.

Senin, I.I.; Höppner-Heitmann, D.; Polkovnikova, O.O.; Churumova, V.-A.; N.K., T.; Philipov, P. P.; Koch, K.-W. Recoverine and rhodopsine kinase activity in detergent-resistant membrane rafts from rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 2004, 47, 48647.

Spence, A.P.; Mason, E.B.. *Anatomie et physiologie: une approche intégrée*. Montréal, Éditions du renouveau pédagogique, 1983.

Strissel, K.J.; Lishko, P.V.; Trieu, L.H.; Kennedy, M.J.; Hurley, J.B.; Arshavsky, V.Y. Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 29250.

- Stryer, L. Molecular design of an amplification cascade in vision. *Biopolymers* 1985, 24, 29.
- Studier, F.W.; Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 1986, 189, 113.
- Tanaka, T.; Ames, J.B.; Harvey, T.S.; Stryer, L.; Ikura, M. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature* 1995, 376, 444.
- Tomita, T. Response of single vertebrate cones. *Neurosci. Res. Program. Bull.* 1970, 8, 477.
- Unger, T. F. Show me the money: prokaryotic expression vectors and purification systems. *The Scientist* 1997, 11, 20.
- Valentine, K.G.; Mesleh, M.F.; Opella, S.J.; Ikura, M.; Ames, J.B. Structure, topology, and dynamics of myristoylated recoverin bound to phospholipid bilayers. *Biochemistry* 2003, 42, 6333.
- Wilhelmy, L. Ueber die Abhängigkeit der capillarität-constanten des alkohols von substanz in gestalt des benutzen festen körper. *Ann. Phys.* 1863, 119, 177.
- Winkler, G. Increasing the Sensitivity of UV Detection in Protein and Peptide Separations When Using TFA-Acetonitrile Gradients. *LC/GC* 1987, 5, 1044.
- Yokoyama, S. Amino acid replacements and wavelength absorption of visual pigments in vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 1995, 12, 53.
- Zozulya, S.; Stryer, L. Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 11569