

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MATTRISE ES SCIENCES (ENERGIE)

PAR

KOSSI N'SOUKPOE CHRISTOPHE

B.Sp. Sc. SANTE (BIOLOGIE)

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES D'EXTRAITS PURIFIÉS
DE RHODOPSINE À L'ÉTAT DE MONOCOUCHE

JUIN 1975

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

THESE
DE LA MAITRISE ES SCIENCES (ENERGIE)

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES D'EXTRAITS PURIFIÉS
DE RHODOPSINE A L'ÉTAT DE MONOCOUCHE

Résumé

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche visant l'élucidation du mécanisme du processus visuel, du point de vue moléculaire.

Nous avons extrait la rhodopsine des segments externes de bâtonnets de rétines bovines, et l'avons purifiée, soit avec de l'Ammonyx LO, soit avec du Triton X-100. L'Ammonyx LO s'est avéré meilleur agent purificateur de la rhodopsine que le Triton X-100. En retour, ce dernier s'apprête mieux au travail de monocouche que le premier, parce qu'il s'élimine aisément, particulièrement par adsorption sur du Bio-Beads SM-2.

Pour le travail de monocouche, nous avons utilisé le système de Langmuir que nous avons standardisé avec des solutions d'acides arachidique et stéarique. Nous avons pris la courbe de pression de surface de la rhodopsine sur des systèmes de Langmuir de sensibilités différentes, laquelle nous a permis de déterminer l'aire moléculaire du pigment visuel, soit 2400 \AA^2 , et son poids moléculaire, soit 32400 ± 1600 . Nous avons aussi étudié l'effet de la lumière blanche

sur la monocouche de rhodopsine. La lumière provoque une expansion de la monocouche de rhodopsine. Ce phénomène, se produisant dans le système vivant, pourrait être à la base de la génération du courant électrique dans la membrane discale des photorécepteurs visuels, nécessaire à l'excitation du nerf optique.

Avant-propos

Si, comme le dit le proverbe, "la culture, c'est ce qui reste lorsqu'on a tout oublié", la connaissance serait-elle l'art d'oublier un peu pour savoir plus? Peut-être même, fermerions-nous les yeux pour mieux voir!

Mais, avant d'ouvrir les yeux sur cette polémique qui s'annonce déjà chaude, j'aimerais rendre hommage à un ami, à quelqu'un qui n'a pas les yeux fermés, quelqu'un chez qui le tact et la simplicité n'ont rien à envier au leadership scientifique, en bref, quelqu'un que j'admire beaucoup: mon directeur de thèse, Dr Roger M. Leblanc. Merci Roger.

Je désire remercier aussi Dr Julian Gruda, Dr Mario Fragata et Dr Surat Hotchandani pour leurs judicieux conseils, ainsi que M. Gaétan Munger, Mme Réjeanne Asselin et les techniciens du département de Chimie-Biologie, des ateliers de mécanique et d'électronique pour leur assistance technique.

Enfin, un merci tout spécial à mon amie Lorraine, pour sa patience et les encouragements dont elle m'a appuyé.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	i
TABLE DES MATIERES.....	ii
I- INTRODUCTION.....	1
A- GENERALITES.....	1
B- THEORIE DE L'EXCITATION VISUELLE.....	10
C- BUT DU TRAVAIL.....	25
II- MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES.....	30
A- MATERIEL.....	30
B- METHODES EXPERIMENTALES.....	38
1- Isolation des segments externes de bâtonnet.....	38
2- Purification de la rhodopsine.....	41
a) Purification à l'Ammonyx LO.....	41
b) Purification au Triton X-100.....	42
α) Sur colonne de célite et de phosphate de Calcium tribasique.....	42
β) Sur colonne de cellulose ectéola.....	43
3- Elimination du détergent.....	44
a) Au sulfate d'ammonium.....	44
b) Au Bio-Beads SM-2.....	45

α) Lavage du Bio-Beads SM-2.....	45
β) Technique de l'élimination du détergent.....	46
i) Méthode d'inversion.....	46
ii) Méthode de chromatographie sur colonne.....	47
c) Par dialyse.....	47
4- Techniques de monocouches.....	48
a) Etalonnage.....	48
b) Principe et technique de monocouche.....	50
c) Courbe de pression de surface.....	53
α) Standardisation du système.....	53
β) Courbe de pression de surface de la rhodopsine....	54
d) Effet de la lumière sur la monocouche de rhodopsine.....	55
e) Détermination de poids moléculaire en monocouche.....	55
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	58
A- EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA RHODOPSINE.....	59
1- Critères de pureté de la rhodopsine.....	59
a) Spectre d'absorption U.-V.-Visible.....	59
b) Absorptivité molaire.....	59
c) Poids moléculaire.....	60
d) Rapports spectraux.....	61

2- Rhodopsine purifiée à l'Ammonyx LO.....	61
3- Rhodopsine purifiée au Triton X-100.....	64
B- MONOCOUCHE.....	67
1- Sensibilité des systèmes de Langmuir.....	67
2- Courbes de pression de surface des acides arachidique et stéarique.....	71
a) Courbe de pression de surface de l'acide arachidique.....	71
b) Courbe de pression de surface de l'acide stéarique.....	74
3- Courbe de pression de surface de la rhodopsine.....	79
4- Effet de l'irradiation sur la monocouche de rhodopsine.....	82
5- Poids moléculaire de la rhodopsine déterminée par la technique des monocouches.....	87
IV- CONCLUSION.....	92
APPENDICE A.....	96
APPENDICE B.....	99
BIBLIOGRAPHIE.....	103

A mes parents,

I- INTRODUCTION

I- INTRODUCTION

A. Généralités

Des cinq organes des sens, l'oeil - ou la vision - est le plus étudié. Cela se comprend d'ailleurs fort bien si l'on pense que la vision représente notre plus importante source d'information: environ 40% de nos connaissances sont d'origine visuelle. Mais, avant d'aller plus loin, il conviendrait peut-être de rappeler quelques notions générales sur l'oeil et la vision.

L'oeil fait partie du cerveau. Du point de vue embryologique, la rétine - comme l'oeil entier - s'est développée à partir de la vésicule optique, qui est une excroissance du cerveau. C'était d'abord constitué de deux feuillets, par suite de l'invagination de la paroi antérieure de la vésicule optique vers l'arrière, par sa moitié postérieure, pour former la coupe optique à deux couches (voir figure 1).

Le feuillet interne s'est différencié pour former la portion nerveuse de la rétine, tandis que la couche externe est devenue l'épithélium pigmentaire.

L'oeil peut être comparé sommairement à un appareil photographique, tel que nous le fait voir la figure 2.

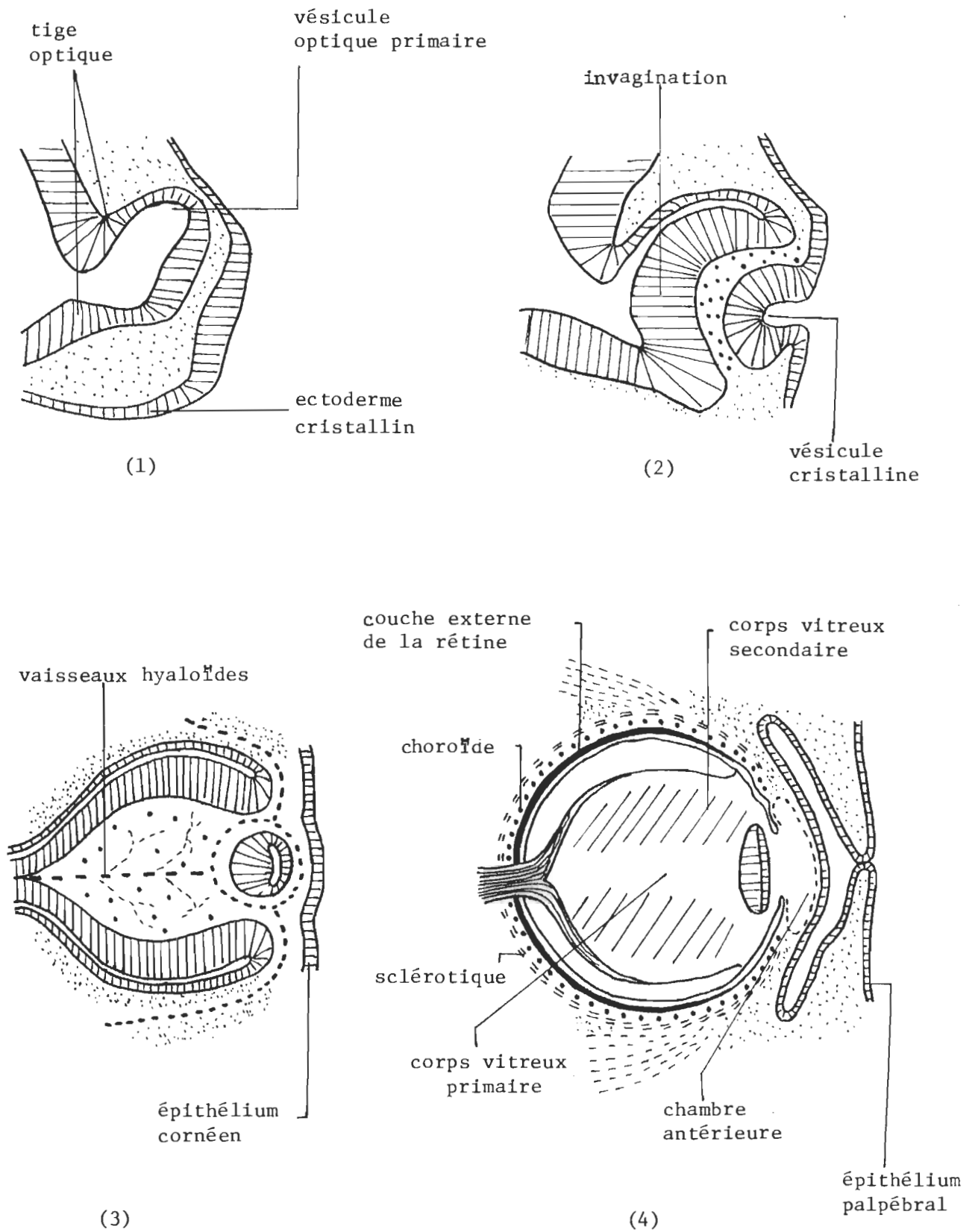


Fig. -1: Diagramme des quatre stages de développement de l'oeil [Ham (1969)]

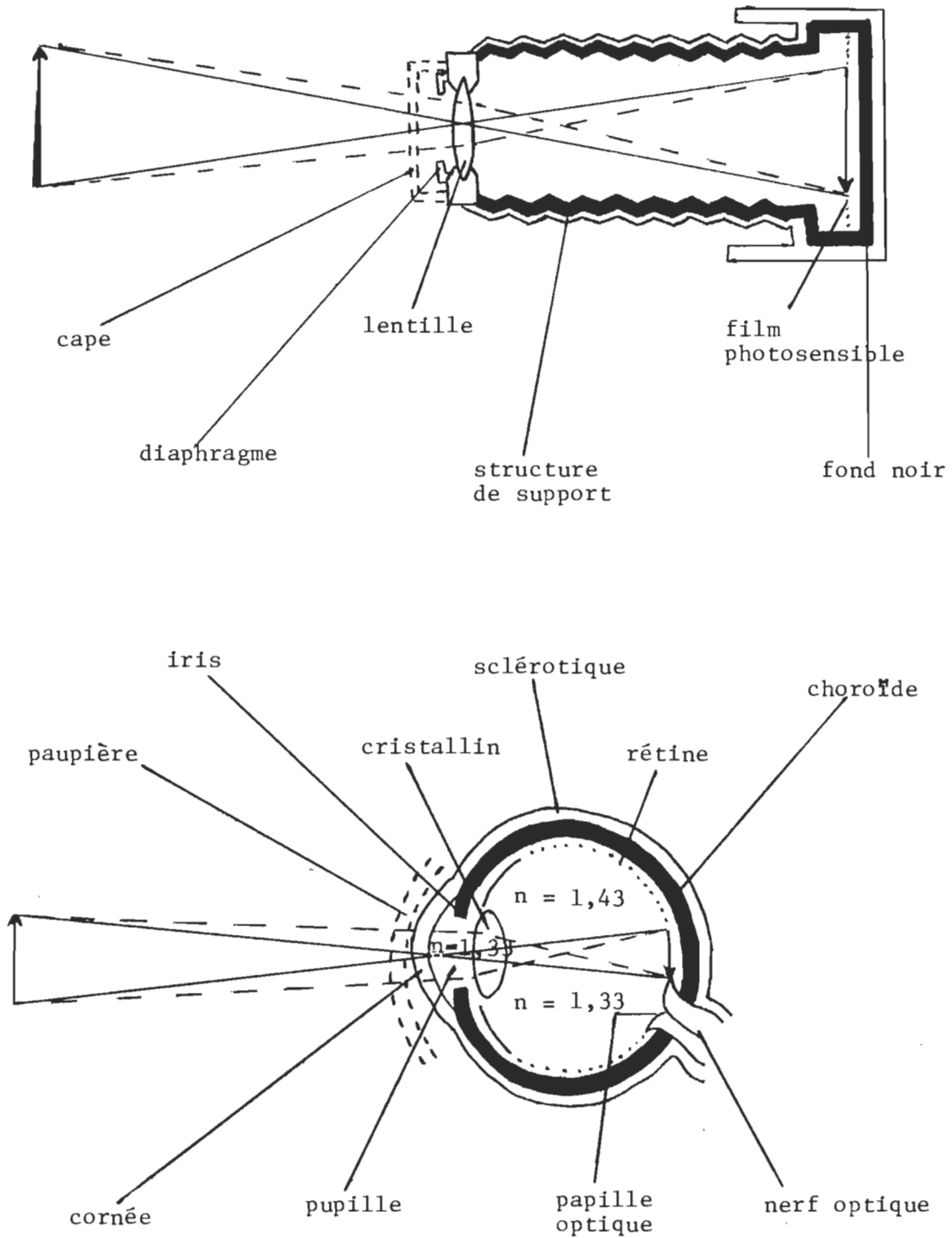


Fig. -2: Diagramme illustrant les similitudes entre un appareil photographique et un oeil [Ham (1969)]

De toute cette structure, la rétine est la partie qui nous intéresse le plus ici: c'est la portion photosensible de l'oeil. Nous allons l'examiner d'un peu plus près.

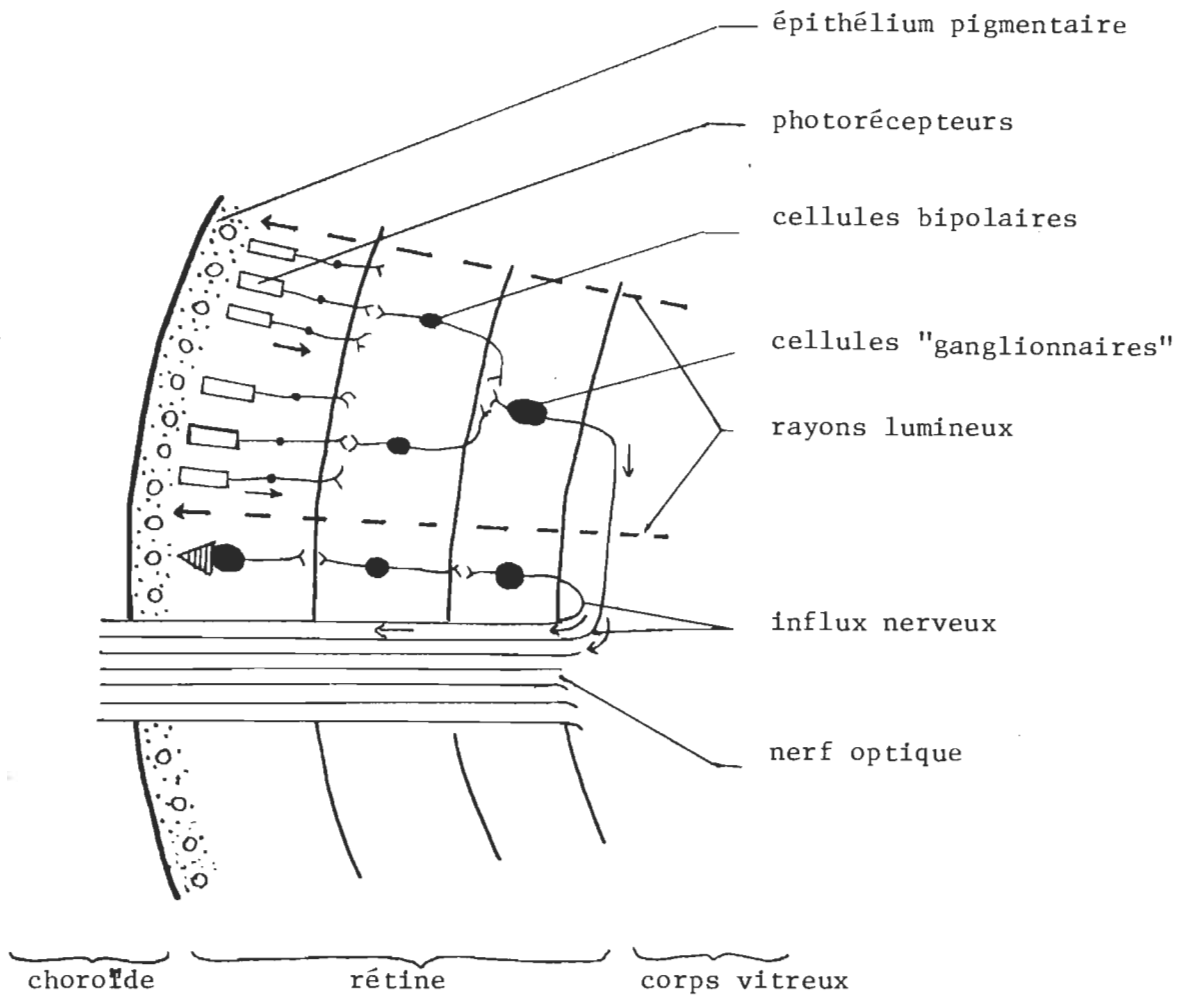


Fig. -3: Diagramme montrant l'arrangement des trois (3) couches de neurones dans la rétine. Observer que la lumière et l'influx nerveux voyagent en directions opposées
[Ham (1969)]

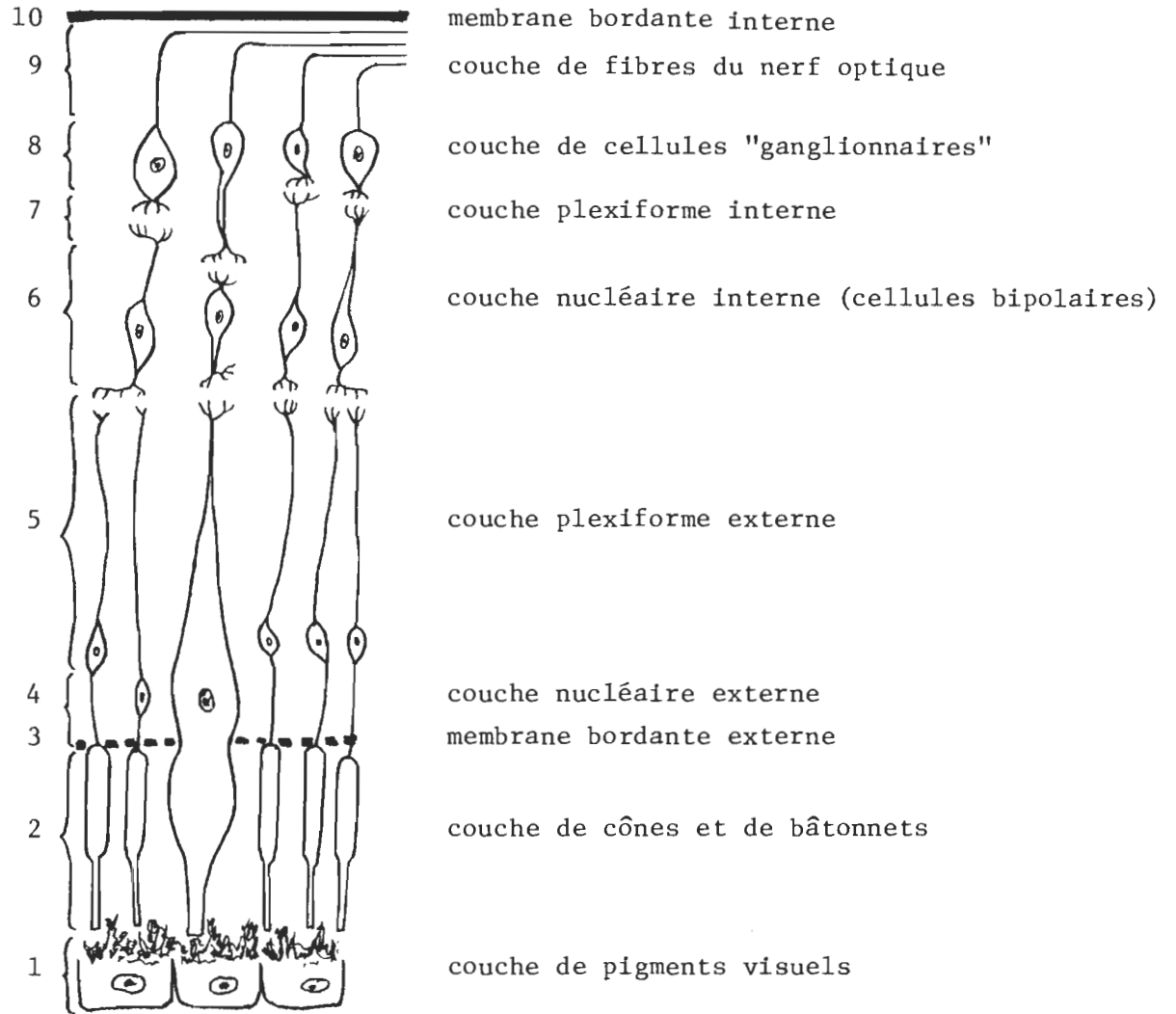


Fig. -4: Diagramme montrant les diverses couches de la rétine

[Ham (1969)]

La rétine se compose de dix couches, qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur de l'oeil:

- la couche de pigments visuels
- la couche de cônes et de bâtonnets
- la membrane bordante externe
- la couche plexiforme externe
- la couche nucléaire interne (cellules bipolaires)
- la couche plexiforme interne
- la couche de cellules "ganglionnaires"
- la couche de fibres nerveuses optiques
- la membrane bordante interne (membrane hyaloïde)
comme nous l'indiquent les figures 3 et 4.

Mais que savons-nous aujourd'hui du mécanisme de la vision?

Le mécanisme de la vision peut se schématiser comme suit:

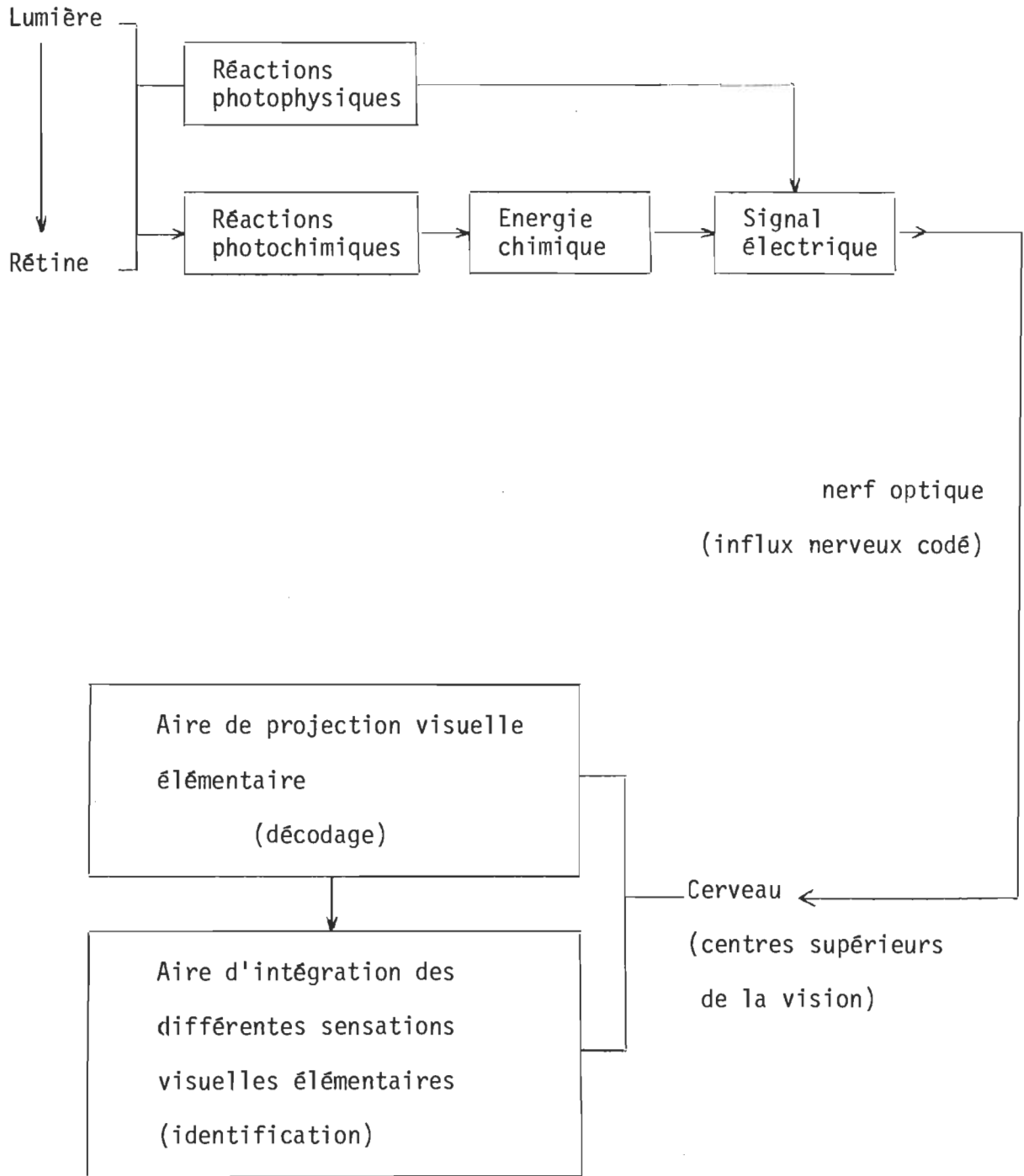


Schéma 1 - Mécanisme de la vision

Ainsi, les photons qu'un objet illuminé réfléchit dans l'oeil, engendrent un certain nombre de réactions physico-chimiques dans les pigments visuels. Puis un courant électrique est généré et conduit par le nerf optique jusqu'aux centres supérieurs du système nerveux où s'effectue l'identification de l'objet. Mais le mécanisme détaillé par lequel l'excitation de nature optique, se convertit en courant électrique, fait encore le sujet de beaucoup de controverse. Les études, toutefois, se multiplient dans ce sens. Quelques théories ont été avancées: je pense principalement à celle de la photoconduction et de la semiconduction soutenue par Barnett Rosenberg, et celle de la photoisomérisation, par George Wald.

Nous nous proposons, dans cette partie, de dégager les idées maîtresses de ces deux théories; chemin faisant, nous exposerons les points de vue des adeptes de l'une et l'autre théories, et le rôle de l'état triplet. Les résultats de toutes ces études seront confrontés avec la situation in vivo.

B. Théorie de l'excitation visuelle

Depuis longtemps déjà, Wald G. (1950) avait suggéré le mécanisme de l'excitation visuelle:

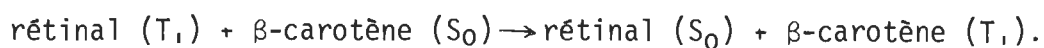


Il a établi que l'excitation visuelle est déclenchée par une photoisomérisation au cours de laquelle, le chromophore de la rhodopsine passe de la conformation de 11-cis-rétinal à celle du rétinal tout-trans (ou rétinène).

Plus tard, Wald G. (1962) localisa l'excitation visuelle au niveau du passage de la lumirhodopsine à la métarhodopsine. Mais, auparavant, Abrahamson E.W. (1960) définissait le processus de l'excitation visuelle comme la dégradation de la métarhodopsine, vu que cette dégradation s'accompagnait d'une variation de conformation de la protéine. En conséquence, le changement du point isoélectrique, donc, de l'environnement de la protéine, produirait le stimulus nécessaire à la dépolarisation de la membrane nerveuse.

Mais, par quel mécanisme procède cette photoisomérisation? Zechmeister L. (1962) énonça que l'isomérisation des carotènes s'effectue par excitation directe ou par photoisomérisation à partir des états singulet (S₁) et triplet (T₁). Malgré la réplique d'Abrahamson E.W. et al. (1967) à l'effet que l'état triplet n'intervient pas dans l'excitation visuelle, on pense généralement

aujourd'hui que c'est plutôt le cas. Ce sont Bensasson R. et al. (1973) qui ont confirmé l'implication de l'état triplet dans le processus visuel, par la méthode de photosensibilisation du triplet du carotène par le triplet du rétinol tout-trans:



Il s'agit d'un intersystem crossing (ISC) dont le rendement (ϕ_{ISC}) égale $0,60 \pm 0,10^*$, en accord avec le rendement quantique de photodécoloration de la rhodopsine calculé par Dartnall (1968), soit, 0,67. Et tout récemment, Rosenfeld T. et al. (1974) ont utilisé la méthode de la photoisomérisation du triplet du rétinol tout-trans par le biphényle et ont trouvé un ϕ_{ISC} de $0,7 \pm 0,1$ en excitant directement au laser à N_2 , et $0,6 \pm 0,1$ pour le 11-cis-rétinal avec la radiolyse pulsée. Mais, le rendement de photoisomérisation - fraction de molécule isomérisée par état triplet de rétinol formé, par transfert d'énergie - n'est que de 0,15 pour le 11-cis-rétinal, et de moins de 0,002 pour le rétinol tout-trans, avec le biacétyl comme sensibilisateur. Rosenfeld et al. ont proposé un mécanisme dans lequel il y aurait compétition entre l'isomérisation à partir des états triplets vibroniques non relaxés et une désactivation thermique.

* Nous avons utilisé, tout le long de ce texte, la notation métrique des nombres décimaux, soit la virgule (,) au lieu du point (.).

Tout cela contredit toutefois les calculs de Kropf et al. (1970) qui ont trouvé un rendement quantique de photodécoloration conforme au ϕ_{ISC} d'Abrahamson E.W. (1962) soit 0,11 pour le rétinol. Avant la parution de l'article de Bensasson (1973), plusieurs chercheurs avaient justement utilisé la grande différence entre le rendement quantique de photodécoloration de Dartnall et le ϕ_{ISC} d'Abrahamson, pour discréditer la théorie de l'excitation visuelle via l'état triplet, par photoisomérisation. De ceux-là, on remarque Rosenberg B. (1966) qui a préconisé un mécanisme plus physique, celui de la photoconduction.

La théorie de la photoconduction est fondée sur la génération de porteurs de charges, par l'excitation optique, comme mécanisme de transduction. Rosenberg B. rejette le principe de migration de charge électronique comme fondement de l'excitation visuelle, attendu qu'elle ne peut se faire sur une distance de plus de 10 \AA , alors que la distance inter-groupement-chromophorique dépasse largement cette valeur: la distance entre une molécule de rhodopsine et sa voisine la plus proche est d'environ 70 \AA [Blasie et Worthington (1969a, 1969b), Worthington C.R. (1971)]. Il s'applique alors à prouver l'existence de la photoconduction dans le β -carotène, qui s'apprête bien à cette étude, vu qu'il absorbe dans le visible (soient 400 nm et 500 nm); l'usage du rétinol s'annonçait difficile, car,

sa bande d'absorption se situe dans l'U.-V. (380 nm). A l'aide d'un dispositif relativement simple (voir l'appendice A, page 95) comportant une cellule renfermant le pigment en sandwich entre deux électrodes, un oscilloscope, une source de courant continu, il a démontré, sous l'effet de la lumière, l'existence d'un photocourant linéairement proportionnel à l'intensité de la lumière incidente. En omettant la source de voltage, et en connectant le dispositif à un électromètre, il pouvait enregistrer un courant photovoltaïque.

La photoconduction s'effectue par génération et déplacement de trous positifs; on convient de dire que le déplacement de porteurs de charges de trous positifs dans la direction de la lumière incidente correspond à une déviation vers le bas (négatif) sur l'oscilloscope, et vice versa. La photoconduction requiert la présence d'une source de voltage et le courant qui en résulte va de l'anode à la cathode.

Quant à l'effet photovoltaïque, il se produit quelle que soit la direction de l'irradiation par rapport aux électrodes: le courant résultant suit toujours le sens de l'irradiation.

Ces deux processus photoélectriques peuvent coexister dans une même cellule, avec des constantes de temps différentes; les deux génèrent des courants qui circulent en sens opposés l'un de l'autre, et la somme des deux est biphasique.

Comme les constantes de temps de montée du courant photovoltaïque sont plus petites que celles du courant de photoconduction, la réponse initiale de la cellule (lorsque la lumière est allumée), se traduit par une déviation négative (courant photovoltaïque). Puis, la photoconduction atteint son maximum et donne un courant net positif. Quand la lumière est éteinte, le courant photovoltaïque décroît plus vite que le courant de photoconduction, de sorte que le résultat est un large pic positif au off. En termes physiologiques, ces deux courants sont dits mutuellement inhibitifs. Ainsi, les pics on et off peuvent être considérés comme correspondant à des potentiels de contre-coup pré-inhibitif et post-inhibitif.

Ici aussi, l'état triplet semble jouer un rôle important, en dépit de la nécessité pour cela, d'une énergie considérable, voisine de l'énergie d'ionisation - S_1 : 3, 2 eV; $S_0 - T_1$: 1, 8 eV; ionisation: 5, 6 eV -. Sharp et Schneider (1964), ont montré que le spectre d'action pour la photoconduction de l'antracène est conforme au spectre d'absorption $S_0 - T_1$, et que la génération de porteurs de charges est linéairement proportionnelle à l'intensité de la lumière incidente. De plus, ils ont trouvé que le rendement quantique pour la production de porteurs de charges est de 40 fois supérieure pour l'excitation triplet que pour le singulet. Ce qui laisse voir que l'annihilation triplet-triplet conduisant à l'état singulet excité, contribue très peu à la production de porteurs de charges; car, si le processus bipho-

tonique était à la base de la production de porteurs de charges, le rendement quantique devait être de beaucoup plus petit pour l'excitation triplet que pour le singulet, et non pas 40 fois plus grand. Cet argument ne nie cependant pas l'existence d'un processus biphotonique; mais, il indique que ce dernier est négligeable.

Donc, l'excitation d'une molécule à l'état triplet est une étape intermédiaire dans le processus de la production de porteurs de charges, peu importe si le peuplement de l'état triplet se fait par excitation directe, ou par excitation à l'état singulet, suivie d'un intersystem crossing.

Voilà des faits qui militent bien en faveur de la théorie de la photoconduction. Néanmoins, si la photoconduction existe, la photoisomérisation n'en fait pas moins. Il faudrait alors croire à une existence peut-être compétitive des deux. C'est d'ailleurs l'avis de Rosenberg (1966). Cela nous conduit à nous demander si les deux induisent l'excitation visuelle; sinon, laquelle en est à la base? Le mécanisme de la photoconduction semble pertinent pour le déclenchement du signal électrique. Quant à la photoisomérisation, on n'en connaît malheureusement pas encore tout le mécanisme. Mais, des études récentes sont très révélatrices dans ce domaine.

Et pour parler d'isomérisation, donc de changement de géométrie d'une structure dans l'espace, il semble d'abord

opportun d'en savoir sur cette structure même; nous parlons de pigments visuels, et à l'occurrence, de la rhodopsine.

Il a été généralement admis que la rhodopsine existe sous forme de base de Schiff par une liaison imine entre le 11-cis-rétinal et le groupement ϵ -aminé de la lysine de l'opsine (protéine) [Akhtar (1968), Hall O. Michael (1971), De Grip W.J. et al.(1973)]. Ainsi, l'hypothèse de liaison de base de Schiff entre le 11-cis-rétinal et un phospholipide [Daemen et al.(1969)] a été délaissée [Hall (1970), Daemen et al.(1971)]. Ainsi, à l'absorption d'un quantum de lumière, la rhodopsine subit une série d'isomérisations avec un changement négligeable de conformation, jusqu'à la lumirhodopsine, qui à son tour, s'isomérisé en métrarhodopsine-I avec une forte énergie d'activation [60 kcal, mole⁻¹] et une entropie d'activation de 160 μ .e. [Hubbard R. et al.(1964)], signe d'une importante modification. Mais, des essais effectués en vue de vérifier cette structure de base de Schiff sur des modèles in vitro n'ont pas été très concluants. La plupart des modèles utilisés présentent des longueurs d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) à 365 nm - 440 nm, alors que la rhodopsine naturelle a un λ_{\max} autour de 500 nm.

C'est alors que Honyo I. (1972) en est venu à la conclusion suivante: "il existe deux types d'interactions dans la rhodopsine: la première serait la liaison imine entre le 11-cis-rétinal et

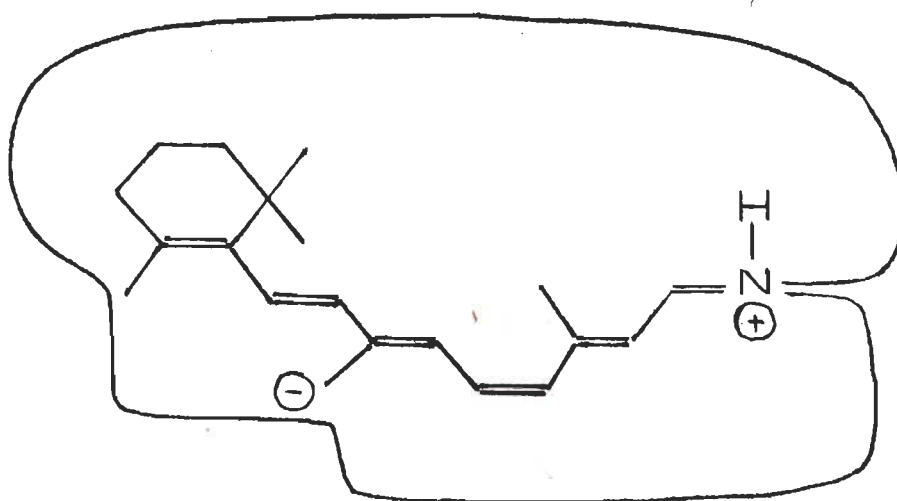
le groupement ϵ -aminé de la lysine de l'opsine; la deuxième serait une somme d'effets, effets de position, d'induction, et de solvant, affectant la première interaction, et qui serait responsable du déplacement du λ_{\max} de 440 nm - en milieu acide - à 500 nm^{*}.

Ainsi, il faudrait peut-être surtout parler de changements conformationnels du chromophore, comme cause première des différences de valeur des λ_{\max} des photoproduits de la rhodopsine [Sundaralingam et al. (1972)], au lieu de changements de conformation de l'opsine [Wald G. (1968)]. En effet, Tatsuo S. et al. (1973) ont remarqué un déplacement du pic de 280 nm sur le spectre d'absorption de la rhodopsine photolysée. C'est peut-être, avant même qu'elle ne fût énoncée clairement, une idée semblable qui eut présidé à la conception des théories MPKH, et de lock and key de Dartnall.

Dans les années cinquante, avait été proposée la théorie MPKH (Morton - Pitt - Kropf - Hubbard). Cette théorie part de l'existence d'une liaison de base de Schiff sous forme de complexe acide N-rétinylidène-opsine [Morton et Pitt (1955)]; à cette liaison, s'ajoute un effet bathochromique provenant de la situation expresse de groupements chargés négativement à proximité de la chaîne polyénique [Kropf et Hubbard (1968),

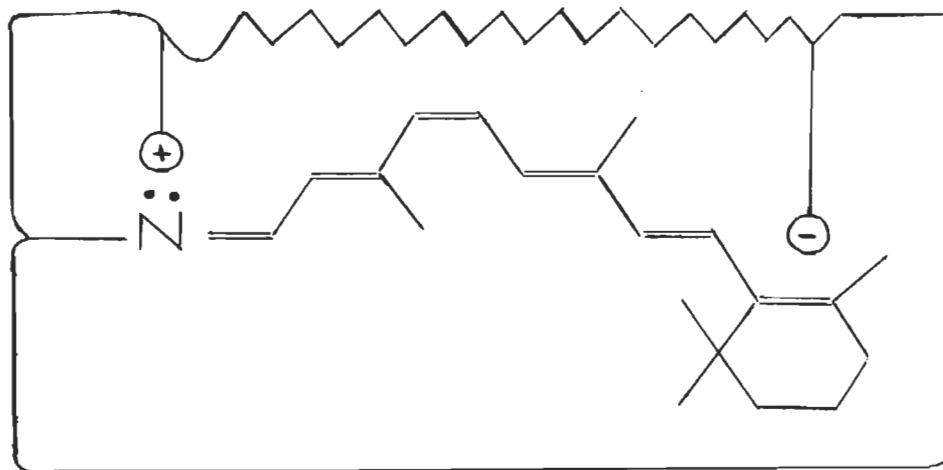
* Note: Nous mettons ici de côté, le fait que le λ_{\max} de la rhodopsine varie avec le type de rhodopsine (provenance) et le solvant, etc...

Platt (1959)]. Alors, l'excitation optique, induit un moment de transition dipolaire le long de la chaîne polyénique, au cours duquel, un électron se déplacerait vers un atome d'azote chargé positivement.



Cette théorie sera appuyée par les études de Waleh A. et al. (1973) sur les orbitales moléculaires de base de Schiff protonée de méthylamine et de rétinol, par la méthode de Parisier - Parr - Pople.

De son côté, Dartnall (1951), énonça une théorie à l'inverse de la précédente: la théorie du "lock and key" (i.e. serrure et clef). Lui aussi accepte l'idée d'une première liaison de base de Schiff, mais une base de Schiff non protonée, entre le chromophore et la protéine. Une seconde liaison s'effectuerait entre le polyène et une lipoprotéine, grâce à une paire de charges qui pourraient induire de massifs dipôles permanents dans la chaîne de polyène fortement polarisable.



Cette théorie paraît raisonnable, surtout en fonction des données qui étaient disponibles à cette époque. Mais alors, aujourd'hui, on est porté à rejeter l'existence d'une liaison entre la chaîne polyénique et une certaine lipoprotéine dans la rhodopsine naturelle. Alors, il faudrait plutôt parler de la deuxième liaison d'interactions telle que suggérée par Honyo I. (1972). Sous cet angle, le transfert de proton représenterait un candidat valable pour la génération de réponse électrique.

Mais, revenons-en à la photoisomérisation. Nous savons que lors de l'isomérisation, l'énergie d'excitation se dissipe dans le milieu sous forme de chaleur, sans bris de liaison.

(Le mécanisme de la photoisomérisation est présentée sur la page suivante).

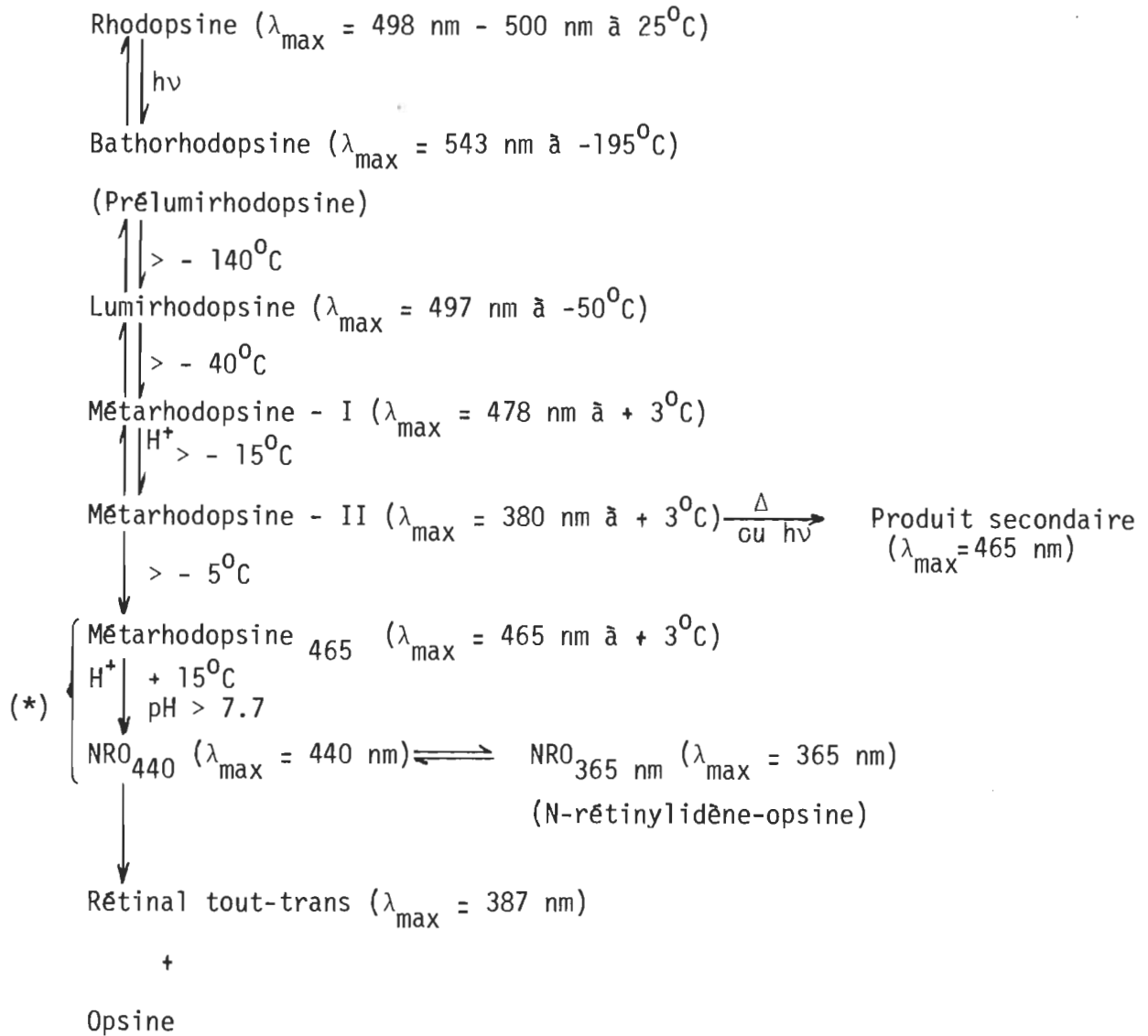


Fig. 5 Mécanisme de la photoisomérisation d'après Mathews et al. (1963)

(*): Ajout selon Lythgoe et Quilliam (1938)

Le tout représente le modèle de Ostroy S.E. et al. (1966)

Ainsi, on voit difficilement, du moins a priori, le rôle de la photoisomérisation dans la génération de courant électrique. Dans la rhodopsine, le chromophore semble encapsulé dans la protéine, dans le champ d'un ou de plusieurs groupements chargés. Comme ceci a été déjà noté, ces champs sont intimement liés à la chaîne polyénique, dans une sorte d'interaction de dipôle avec un ensemble chargé. D'où, la photoisomérisation, en détruisant cette condition d'interaction, et en alignant la chaîne polyénique avec un autre ensemble chargé non impliqué dans le maintien de l'intégrité structurale de la protéine, pourrait provoquer cette réponse électrique. Dans ce sens, plusieurs auteurs ont pensé que ce changement de site d'interaction agirait sur la membrane cellulaire des bâtonnets, modifiant sa perméabilité aux ions: ce qui créera une différence de potentiel, génératrice d'électricité. Les preuves pour ce changement de perméabilité de la membrane aux ions sont nombreuses. Citons seulement les résultats de Daemen F.J.M. et al.(1969), de Duncan G. et al.(1969), de DePont J.J.H.H.M. et al. (1971), de Hagins W.A. (1972), et de Cervetto L. (1973).

Par ailleurs, si la photoisomérisation essaie de prouver son rôle ou sa participation dans l'excitation visuelle, elle devra aussi démontrer sa capacité d'exciter le nerf optique, quantitativement parlant. Nous savons qu'un quantum et un seul quantum de lumière peut exciter une molécule de rhodopsine, en

isomérisant le 11-cis-rétinal en rétinal tout-trans, avec exposition d'au moins deux groupements sulfhydryles et un groupement H^+ . Il paraît clair que ceci est trop peu pour justifier l'excitation visuelle et toute réponse électrique. Il faudrait alors penser à un système d'amplification. Et Wald G. (1956) avait suggéré deux formes d'amplification.

La première forme d'amplification est d'ordre biochimique: le pigment visuel serait un zymogène - ou proenzyme -. C'est d'ailleurs le cas dans le système sanguin comme l'avaient indiqué Macfarlane (1964), Davie et Ratnoff (1964). L'isomérisation, sous l'absorption de la lumière, viendrait exposer le site actif de la rhodopsine en découvrant des groupements SH et H^+ , et le pigment visuel deviendrait actif, je veux dire une enzyme active.

La deuxième forme d'amplification concerne la membrane transversale des segments externes des récepteurs visuels. L'absorption de la lumière par la rhodopsine, pourrait percer un trou unimoléculaire dans cette membrane. Cela créerait un puissant flot d'ions, se résultant en une dépolarisation de la membrane, capable d'exciter la fibre nerveuse optique.

Mais la lumière n'a pas été faite sur ce trou unimoléculaire, pas plus que sur le caractère proenzymatique de la rhodopsine.

Et si la théorie de la photoisomérisation tente de se défendre, celle de la photoconduction n'en fait pas moins. En

effet, Rosenberg (1966) aussi a énormément travaillé sur le système d'amplification de l'excitation optique. Rosenberg a parlé de processus de gain. Si t est le temps de vie du porteur de charge libre, T_r le temps de transit du porteur de charge entre les deux électrodes, l'auteur en est venu à définir le facteur de gain comme le rapport $\frac{t}{T_r}$ (on peut voir le détail des calculs en appendice A, page 96). Le facteur de gain serait de l'ordre de 10^4 . Et pour expliquer la source de voltage nécessaire à la photoconduction, il répond: (1966) et je traduis: "la génération de potentiel dans la rétine, naît d'une source de courant dans les segments externes de bâtonnets; ces courants consistent en des processus de transport de charges électroniques (photoconduction et effets photovoltaïques) créés par l'absorption de la lumière par les pigments visuels".

D'autre part, continue Rosenberg:

"le champ électrique, dans l'organe récepteur, viendrait d'un gradient de potentiel entre l'extrémité synaptique et l'extrémité libre du récepteur; la base du récepteur étant négative par rapport à son extrémité libre".

Mais, la théorie de la photoconduction se fera attaquer par le fait que ce mécanisme requiert un trop haut rendement quantique, pour être un candidat valable de l'excitation visuelle. De plus, elle recevra un autre coup dur par la révélation de Bonting S.L. et al. (1967) d'un très faible gain de courant quantique dans des solides photoconducteurs.

Et voilà, en résumé, où en sont les théories de l'excitation visuelle. Et elle demeure posée, la question de savoir laquelle de ces deux principales théories relatées plus haut est responsable de l'excitation visuelle. Nous avons, quant à nous, choisi d'orienter notre travail dans le sens de la photoisomérisation, mais par une approche quelque peu différente de celle de Wald.

C. But du travail

Nous avons peut-être pu remarquer que les études dont nous avons fait mention jusqu'ici ont été effectuées, soit en solution, soit en film solide, où les molécules de pigments visuels ou de composés rétiniques sont disposés pêle-mêle, et orientés dans toutes directions. Or, les résultats de travaux récents suggèrent que les molécules de rhodopsine aient une disposition définie dans les disques de segments externes de bâtonnets (figures 6 et 7).

Blaurock A.E. (1969), par suite d'études de diffraction des R-X par les segments externes de bâtonnets (S.E.B.), est arrivé au résultat que le pigment visuel est disposé en couches monomoléculaires dans la membrane discale, et peut être sur les deux faces de la membrane. Plus tard, Worthington (1971) reprit l'étude de diffraction des R-X par les S.E.B., et appuya l'hypothèse de la structure monomoléculaire de la rhodopsine. Toutefois, ce dernier soupçonnait que la monocouche de rhodopsine serait localisée sur une seule face de la membrane discale. C'est ainsi que Worthington C.R. (1973) en est venu à la conclusion que la monocouche de rhodopsine est localisée seulement sur la face interne de chaque membrane discale. Ajoutons que la rhodopsine pénétrerait un peu dans la couche lipidique bimoléculaire "sus-jacente", sans la traverser, pensent Charbre et al. (1972). Mais, tous tombent d'accord que les molécules de rhodopsine sont dans une disposition de monocouche, où le chromophore est dans le

plan de la membrane, c'est-à-dire, perpendiculaire à l'axe du bâtonnet et donc au trajet du faisceau lumineux.

C'est pourquoi nous avons voulu aborder l'étude du processus visuel, par l'examen des propriétés physico-chimiques d'extraits purifiés de rhodopsine à l'état de monocouche. Nous avons ainsi un modèle simulant la situation in vivo, avec l'avantage de travailler sur un composé isolé et purifié. Le chapitre suivant va traiter du matériel utilisé, et de la procédure expérimentale.

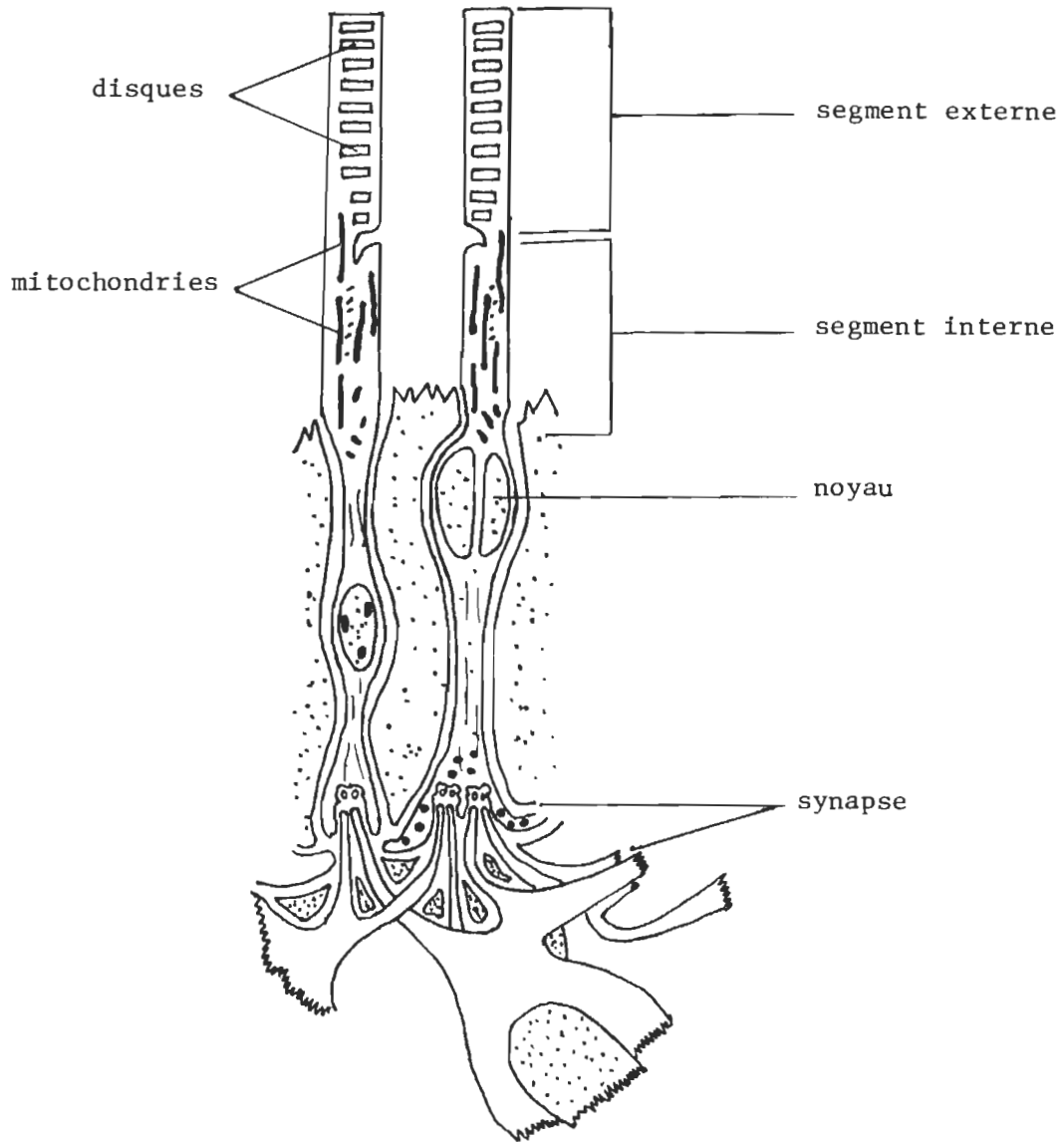


Fig. -6: Structure du bâtonnet de rétine de vertébrés
 [Sjöstrand (1953), Ham (1969)]

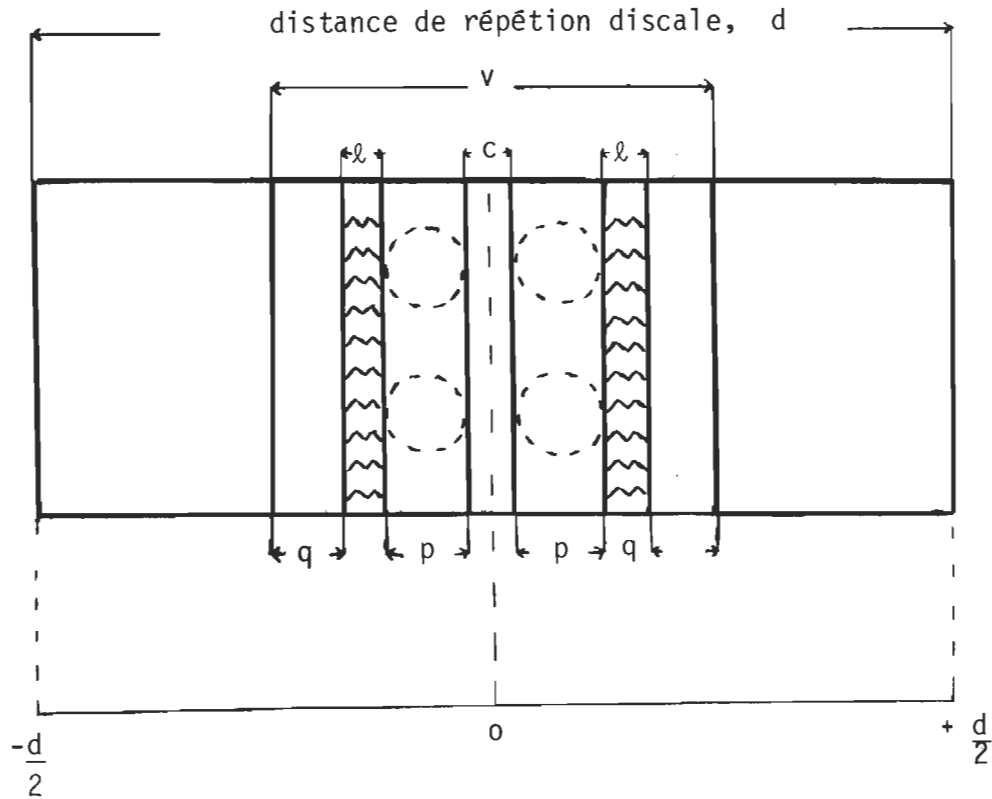


FIG. 7 : ULTRASTRUCTURE DE LA MEMBRANE DISCALE (de grenouille)

D'APRES WORTHINGTON C.R., (1971)

LEGENDE: d: distance de répétition des disques (314 Å)
v: épaisseur de la paire de membrane (154 Å)
q: épaisseur de la couche lipidique (18.5 Å)
l: épaisseur de la couche d'hydrocarbure (16 Å)
p: épaisseur de la couche de rhodopsine
c: espace intradiscal (5 Å)
 $\frac{d-v}{2}$: espace interdiscal (80 Å)

II- MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

II- MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

Nous présentons dans ce chapitre, une description sommaire des expériences effectuées, des appareils spéciaux utilisés tout au cours de nos travaux, ainsi que "l'inventaire" des produits employés.

A. Matériel

Dû à l'extrême sensibilité de l'appareillage de monocouche aux impuretés, et même à la poussière atmosphérique, une attention particulière est accordée au choix du matériel, des produits chimiques, afin d'éliminer toute source de contamination, et donc d'erreur. Ainsi, tous les outils susceptibles d'avoir contact avec le système de monocouche sont traités dans un agent nettoyant approprié. Les solvants organiques et produits sont achetés, très purs, sinon, purifiés, avant leur usage.

Les rétines bovines, dont nous extrayons la rhodopsine, sont achetées congelées et adaptées à la noirceur, de la compagnie Geo. Hormel, Austin, Minnesota, et sont conservées à l'abri de la lumière à -20°C jusqu'à leur usage.

L'eau utilisée pour les solutions et le bain de Langmuir (dont on parlera plus loin) est de l'eau d'abord une fois distillée dans une colonne Barnstead, puis redistillée dans un système de double distillation en verre, en présence de KMnO_4

saturé et de NaOH 1N (5ml/5ml à tous les 2l d'eau à distiller). Et pour le travail de monocouche proprement dit, soit remplir le bain, l'eau tridistillée ainsi obtenue est filtrée à travers une superposition de 3 filtres Millipore de 5 μ m, 0,45 μ m et 0,2 μ m (dans l'ordre de haut en bas). Ces traitements nous donnent une bonne qualité d'eau. Le système de monocouche sera décrit plus loin. Les autres produits chimiques, solvants et matériel sont présentés dans les tableaux 1 et 2 ci-après, avec leurs caractéristiques.

Tableau - 1

Caractéristiques des solvants et produits chimiques

Solvants et produits chimiques	Provenance	Propriétés spéciales	Pureté
Eau distillée			(voir plus loin)
Diéthyléther	BDH Chem., Mtl., Qué.	Analar	> 99 mol. %
n-Hexane	Fisher Sci. Co. Mtl., Qué.	Certified A.C.S.	99 mol. %
NaOH	"		
H ₂ SO ₄	"	Concentré	
HCl	"	Concentré	
KMnO ₄	"		
Sucrose	"	Certified A.C.S.	
Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆	"	"	
Tampon phosphate de potassium	"	2 M	
Triton X-100	Sigma Sci. Co. St-Louis, Mo.		
Cellulose ecteola	"	Anionique	
Trizma-base	"	Reagent grade	
Célite	Johns Manville, U.S.A.	Analyt. filter aid	
Ac. arachidique	Appl. Sci. Lab. Inc.		> 99 mol. %
Ac. stéarique	"		"
Bio. Beads SM-2	Bio. Rad Lab. Richmond, Calif.	Doit être lavé avant usage	
Ammonyx LO	Onyx Chem. Co. Jersey City, N.J.	30%	

Tableau - 2

Caractéristiques des appareils et instruments

Matériel	Provenance	Caractéristiques
Seringue	Fisher Co., Mtl. Qué.	Hamilton micrometer syringe, capacity: 100 μ l
Colonne de chromatographie	O.H. Johns Sci. Mtl Qué.	45 cm de hauteur, 1 cm de diamètre
Colonne de chromatographie	Pharmacia Fine Chem. Uppsala, Swed.	Colonne: K-15 Réservoir: R-15
Homogénéiseur manuel	Pyrex Lab. Glassware Corning, U.S.A.	
Papier filtre entonnoir et support	Millipore, Mississauga, Ont.	Pore de 5 μ m, 0,45 μ m et de 0,2 μ m. Entonnoir: Pyrex
Spectrophotomètre		Perkin-Elmer Double Beam Spectrophoto. Coleman 124
Spectrophotomètre		Unicam SP 1800 UV-Visible Spectrophotometer
Ultracentrifugeuse		International Preparative Ultracentrifuge Model B-50
Lyophilisateur	Virtis Res. Equipment Gardiner, New-York	
Système de Langmuir		(voir plus loin)

Le système de Langmuir représente l'appareil de base en monocouche, et mérite une description détaillée (Schémas 2 et 3 p.36 et 37). Il se compose:

- d'un bain de 33 cm de long, 14,85 cm de large et 5 cm de profondeur. Il est fait de panneaux de verre d'une épaisseur de 0,50 cm, collés ensemble avec de l'araldite. Le verre convient bien à ce système, parce qu'il est inerte chimiquement, peut se nettoyer aisément, et ne contamine pas. Les bordures du bain sont polies et recouvertes de ruban adhésif de teflon, offrant ainsi une surface hydrophobe, pour éviter l'écoulement de l'eau, et donc la fuite des molécules par-dessus les rebords. Les coins du bain sont aussi tapissés de teflon. Le bain principal dont nous venons de parler peut être logé dans un autre bain pour le contrôle de la température.
- d'une barrière en verre de 21,7 cm x 1 cm x 0,6 cm, mobile au-dessus du bain à l'aide d'un système de manivelle - manuelle ou automatique-. La barrière est aussi recouverte de teflon, surtout au niveau des contacts avec le bain. Deux poids marqués de 50 g appliqués chacun à chaque extrémité de la barrière, assurent un contact ferme de celle-ci avec les rebords du bain. La barrière dépasse le bord du bain, de chaque côté, d'environ 3 cm.

- d'un fil de torsion, soit en acier inoxydable, soit en nickel. Le fil de torsion est solidaire d'un miroir, et de deux bras métalliques: un bras horizontal (a) pour supporter des poids marqués lors de l'étalonnage de l'appareil; un deuxième bras, vertical, finit par une fourche qui pénètre dans deux petits trous pratiqués dans un flotteur. Le miroir a pour rôle de réfléchir le faisceau lumineux sortant par la fente d'une boîte logeant une petite lampe de tungstène, sur un écran portant une ligne de repère.
- d'un flotteur en mica de 12,7 x 0,6 x 0,0085 cm, soutenu et collé aux parois du bain par deux feuilles d'or de 4 cm x 0,5 cm x 0,00061 cm, à l'aide de cire. Les feuilles d'or sont soigneusement rattachées au bain et au flotteur pour que ce dernier soit en mesure de flotter librement à la surface du liquide lorsque le bain est rempli. Précisons que les feuilles d'or ont été choisies à cette fin pour leur malléabilité et leur non-réactivité.

Tout le système est protégé de la poussière par un toit de plexiglass et le tout est logé dans une chambre noire (salle de monocouche), pourvue d'un ventilateur avec contrôle de température.

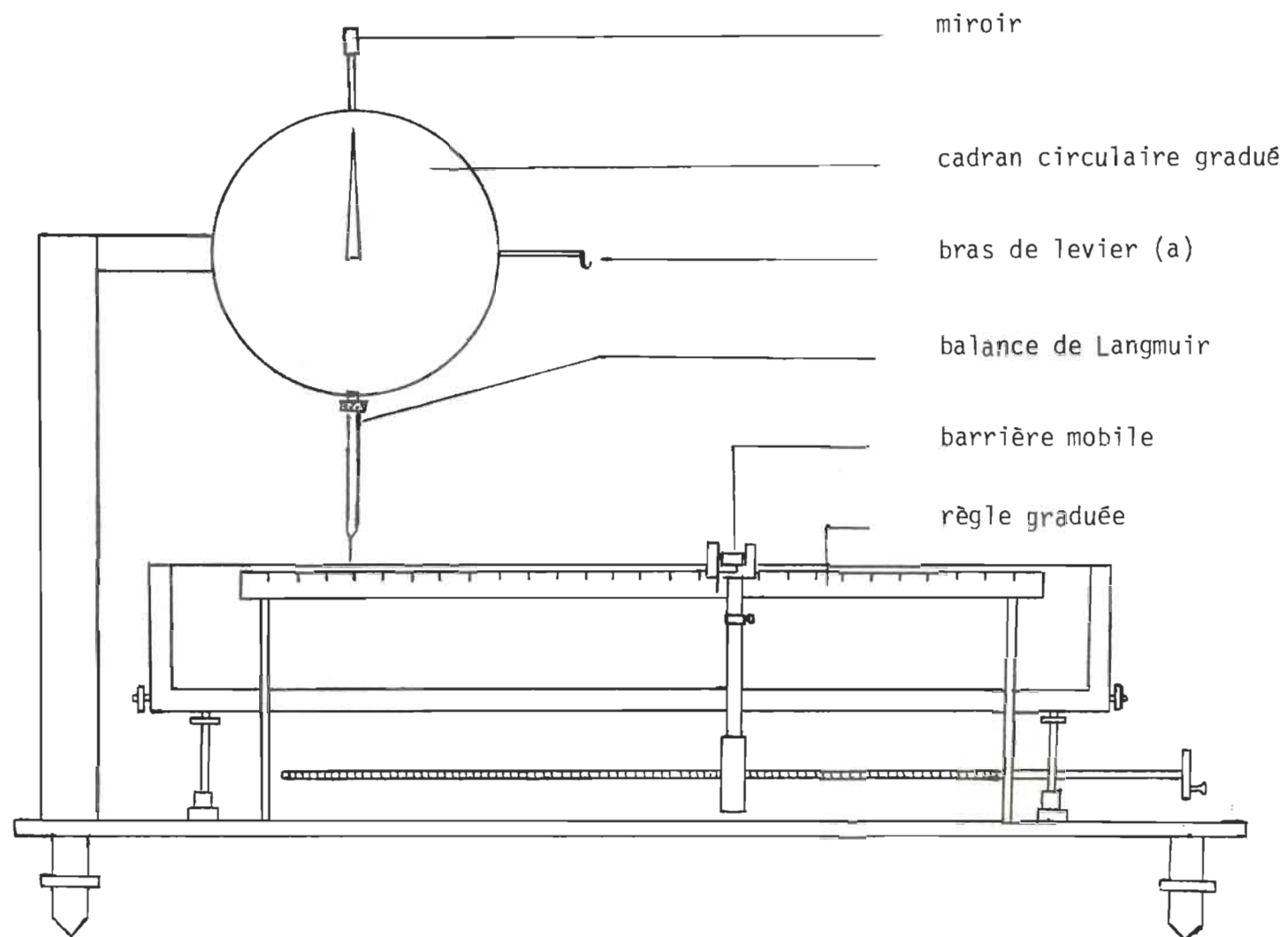


Schéma -2. Système de Langmuir, vue d'ensemble (Profil)

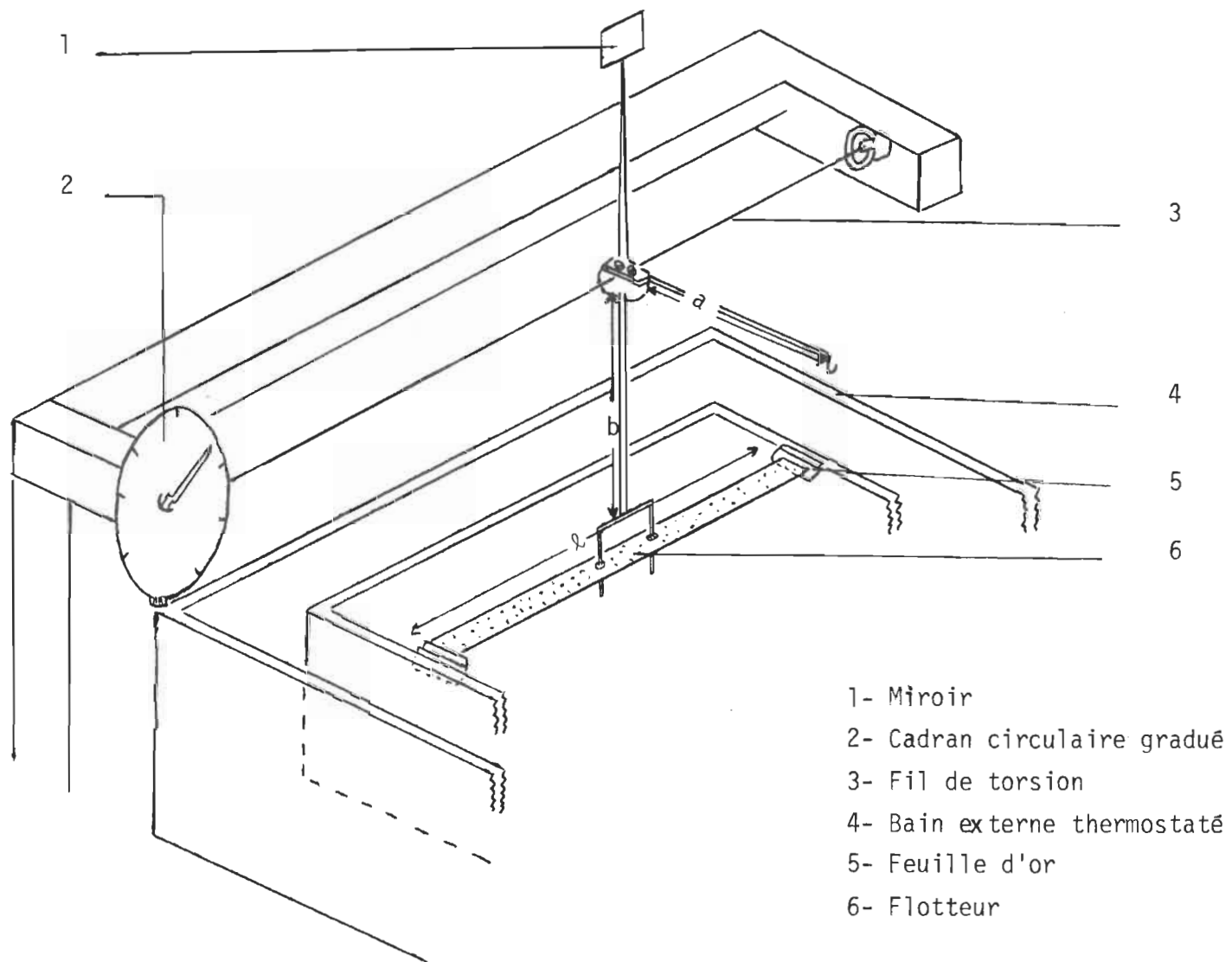


Schéma -3. Système de Langmuir: vue sur le coté du fil de torsion

B. Méthodes expérimentales

Nous parlerons dans cette section, des méthodes utilisées pour l'extraction et la purification de la rhodopsine, ainsi que de l'élimination du détergent ayant servi à la purification; nous décrirons aussi la technique de monocouche.

1- Isolation des segments externes de bâtonnet de la rétine:

Les rétines bovines sont achetées congelées et conservées à la noirceur à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation.

Durant toute l'isolation, le travail se fait à la noirceur, sous la lueur d'une lampe rouge de tungstène de 40 W, et à 4°C .

Un lot de 50 rétines dégelées à 4°C , sont mises en suspension dans environ 20 ml de tampon phosphate de potassium 0,067 M, pH 7,0, et centrifugées pendant 10 mn à 27 000 g dans une ultracentrifugeuse avec un rotor A-237 à $3-4^{\circ}\text{C}$; cette centrifugation sert à éliminer le sang.

Le culot de rétines recueilli est alors remis en suspension dans 50 ml de tampon phosphate, broyé à l'aide d'un homogénéiseur manuel en verre, après quoi, on centrifuge à 27 000 g pendant 20 mn.

Le surnageant est rejeté; le culot est mis en suspension dans 50 ml de sucrose 37% (P/v), et remoulu dans l'homogénéisateur. Puis le volume de suspension est amené à 150 ml avec du sucrose 37%. La suspension ainsi obtenue est bien mélangée et centrifugée pendant 45 mn à la même vitesse que précédemment.

Alors, les segments externes de bâtonnet (S.E.B.) de meilleure qualité flottent au-dessus du sucrose. Ces S.E.B. sont récupérés soigneusement à l'aide d'une pipette Pasteur et seront traités séparément de ceux qui sont contenus dans le surnageant. Le culot peut être jeté, ou remoulu et recentrifugé comme tout à l'heure.

Les S.E.B. de meilleure qualité sont dilués avec un volume égal de tampon, ainsi que le surnageant. Les deux types de suspension sont alors centrifugés pendant 10 mn à 27 000 g. Les culots des deux dilutions centrifugées sont récoltés, toujours séparément. Si parfois, à cette étape, quelques S.E.B. flottent au-dessus ou à l'intérieur du surnageant, on les récupère aussi et ils sont traités avec les S.E.B. de moins bonne qualité, ou séparément de préférence.

Les culots sont de nouveau mis en suspension dans du sucrose 37% et centrifugés pendant 1h à 39 100 g.

Les S.E.B. sont recueillis encore à la surface et dans le surnageant; ils sont dilués 1:1 avec du tampon phosphate, centrifugés pendant 10 mn à 39 100 g, et lavés deux fois avec du tampon par centrifugation pendant 10 mn à cette même vitesse.

Après ce lavage, les S.E.B. sont remis en suspension dans du sucrose 37% en raison de 15 ml de la solution de sucrose pour les meilleurs S.E.B., et de 75 ml pour les autres.

Ces suspensions sont réparties dans les tubes à centrifuger jusqu'aux deux tiers (2/3), et, doucement, on fait couler du tampon phosphate par-dessus le sucrose, sans mélanger les deux couches liquides. Les tubes sont centrifugés pendant 1h à 57 600 g. Les S.E.B. flottent cette fois-ci à l'interface du sucrose et du tampon. Avec l'aide d'une pipette Pasteur propre, ils sont soutirés délicatement, mis en suspension dans du tampon phosphate, centrifugés à 57 600 g pendant 10 mn, et récupérés en culot.

La procédure du paragraphe précédent est répétée une ou deux fois.

Après la méthode de flottement finale, les S.E.B. sont lavés environ cinq fois avec de l'eau distillée en centrifugeant 10 mn à la même vitesse que précédemment.

Les segments externes de bâtonnet ainsi isolés sont conservés à -20°C , à la noirceur, jusqu'au moment de leur utilisation, ou de l'extraction de la rhodopsine.

2- Purification de la rhodopsine:

Les segments externes de bâtonnet isolés ci-avant, sont solubilisés dans du détergent pour digérer la membrane discale et libérer le pigment visuel, lequel va être séparé des lipides et autres protéines membranaires.

a) Purification à l'Ammonyx L0.

L'Ammonyx L0 (lauryl oxime diamine) est un détergent non ionique dont Ebrey Thomas G. (1971) s'est servi pour purifier la rhodopsine par chromatographie sur colonne.

La colonne a été apprêtée selon la méthode de Shichi H. et al. (1969) de la façon suivante: à 5 g de phosphate de calcium tribasique, nous ajoutons 7 g de célite et 50 ml d'une solution d'Ammonyx L0 1,5% dans du tampon phosphate de potassium 0,0067 M, pH: 7. Le mélange est bien homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 mn. La préparation est alors introduite dans une colonne de 1 cm de diamètre et entassée sous la pression atmosphérique pour donner une couche unie d'environ 10 cm d'épaisseur. La colonne est ensuite lavée avec de l'Ammonyx L0.

Pendant ce temps, les S.E.B. sont incubés dans 2 ml d'Ammonyx LO 1,5% (dans du tampon phosphate 0,0067 M) pendant 4 à 8h à 4°C. La solution de rhodopsine est déposée au-dessus de la colonne en raison d'1 ml par colonne (toujours à 4°C et à la noirceur).

L'élution se fait avec une solution d'Ammonyx LO 1,5% dans du tampon phosphate de K 0,067 M, pH 7, ou bien avec l'Ammonyx LO 1,5% dans du tampon phosphate de K 0,0067 M, NaCl 0,1 M.

L'éluat se collecte par fractions de 2 ml avec un débit de 0,5 ml par heure.

b) Purification au Triton X-100:

Le Triton X-100 (octyl phénoxy polyéthoxy éthanol) est aussi un détergent non ionique. Nous nous en sommes servi pour purifier la rhodopsine d'abord par chromatographie sur une colonne de célite plus phosphate tribasique de Ca, puis, par chromatographie sur une colonne de cellulose ectéola anionique.

α) Sur colonne de célite et de phosphate tribasique de Ca:

Les segments externes de bâtonnet sont solubilisés dans 2 ml d'une solution de Triton X-100 1% ou 2% dans du tampon phosphate de K 0,0067 M, pH: 7. Après incubation à 4°C pendant une nuit entière, la solution est centrifugée à

57 600 g pendant 1h. Le surnageant clair de rhodopsine est récupéré, laissant un culot blanchâtre de lipide au fond du tube.

La solution est alors déposée au-dessus d'une colonne de 1 cm de diamètre et de 10 cm de hauteur, faite d'un mélange homogénéisé de 5 g de phosphate de Ca tribasique, 7 g de célite et 50 ml de Triton X-100 1% ou 2% (selon le cas) dans du tampon phosphate de K $0,0067$ M.

L'élution s'est faite avec une solution de Triton X-100 1% dans du tampon phosphate de K 10^{-2} M, NaCl 10^{-1} M, à un débit d'une goutte aux deux minutes.

β) Sur colonne de cellulose ectéola:

La colonne a été faite de cellulose ectéola anionique (10g) agitée dans du Triton X-100 de concentration égale à celle de la solution éluante. Nous avons utilisé une colonne K-15 avec réservoir R-15 de marque Pharmacia, selon la méthode d'Osborne H.B. et al. (1974). Après sédimentation, la colonne est entassée à l'aide d'une poire en caoutchouc.

Les S.E.B. solubilisés avec agitation dans du Triton X-100 sont, comme dans le cas précédent, centrifugés à 57 600 g, pendant 1h, sauf dans un cas où ils l'ont été à 150 000 g pendant 1h en solution de Triton X-100 20% (dans du tampon tris-HCl 2×10^{-3} M).

L'élu­tion s'est faite soit avec du Triton X-100 2%, NaCl 10^{-2} M; soit avec du Triton X-100 3%, NaCl 10^{-2} M, avec un débit d'une goutte par minute. Nous donnons plus de détails au tableau 3 page 66.

3- Elimination du détergent:

La plupart des solutions de protéines ou de lipides forment des systèmes micellaires, à savoir, des agrégats constitués par l'agglutination de molécules de détergent autour d'une molécule de protéine ou de lipide. Il en est ainsi de la rhodopsine. Ces formations micellaires s'apprêtent mal à la réalisation de couche monomoléculaire de rhodopsine, d'un côté; et de l'autre, la présence de détergent entraînera la dissolution de la rhodopsine dans la sous-phase; et par-dessus tout, le détergent lui-même possède une activité de surface. En raison de tous ces facteurs d'erreur, il est impératif d'éliminer le détergent, et obtenir une substance exempte de toute impureté. Nous avons alors eu recours aux méthodes qui suivent.

a) Elimination du détergent au sulfate d'ammonium:

Nous avons utilisé cette méthode de précipitation du détergent pour nous débarrasser de l'Ammonyx L0.

Il s'agit de saturer la solution de rhodopsine, en

milieu de détergent, à 30% au sulfate d'ammonium et de la centrifuger à 10 000 g pendant 20 mn. La rhodopsine est censée flotter à la surface du surnageant sous forme d'une couche rouge; elle est retirée et mise en suspension dans du tampon phosphate de $K 10^{-1}$ M. La procédure est répétée deux fois et la rhodopsine récupérée est centrifugée à 12 000 g pendant 15 mn, et récoltée dans le culot. Après cinq lavages à l'eau distillée, la teneur en détergent peut être considérée comme négligeable, selon Poincelot Raymond P. et al. (1970).

b) Elimination du détergent au Bio-Beads SM-2.

Le Bio-Beads SM-2 (copolymère poreux et neutre de styrène-divinylbenzène) avait été utilisé par Holloway P.W. (1973) pour éliminer le Triton X-100 par adsorption, d'une solution d'albumine. Nous avons appliqué cette méthode à l'Ammonyx L0 et au Triton X-100 pour la rhodopsine. Mais le Bio-Beads SM-2 doit être bien lavé avant son usage.

α) Lavage du Bio-Beads SM-2:

Le Bio-Beads SM-2 est agité à l'aide d'un agitateur magnétique dans du méthanol en raison de 30 gr du copolymère pour 200 ml de méthanol pendant 15 mn pour le débarrasser des contaminants gras. Le copolymère est ensuite lavé

avec 500 ml de méthanol, puis rincé immédiatement (sans le laisser s'assécher) avec 3 l d'eau distillée soit par-dessus un filtre, soit dans une colonne de chromatographie. Le Bio-Beads ainsi lavé est conservé sous une couche d'eau distillée jusqu'au moment de l'emploi.

β) Technique de l'élimination du détergent:

Il existe la méthode d'inversion et celle de chromatographie sur colonne.

i) Méthode d'inversion:

A 0,6 g de Bio-Beads SM-2 dans un tube en verre, sont ajoutés 2 ml de la solution de rhodopsine dans du détergent en milieu tamponné, à 4°C. Le mélange est alors agité par inversion sur un disque rotatoire automatique pendant au moins 2 h.

A la fin du traitement, le surnageant est délicatement retiré, et parfois, il est centrifugé à 45 000 g pendant 10 mn pour le débarrasser de quelques fines particules de copolymère dans la solution. Cette méthode a été utilisée pour l'Ammonyx L0 1,5% (dans du tampon phosphate de K 0,067 M, pH: 7) et pour le Triton X-100 1% ou 2% (soit dans du tampon phosphate de K 10^{-2} M, pH: 7, soit, dans du tampon tris-HCl 2×10^{-3} M, NaCl 10^{-2} M, pH: 7).

ii) Méthode de chromatographie sur colonne:

Des colonnes de 1 cm x 8 cm, contenant 5 g de Bio-Beads SM-2, sont équilibrées avec du tampon phosphate de $K 10^{-2}$ M, pH: 7 à 4°C. Nous déposons 1 ml de la solution de rhodopsine dans du détergent au-dessus de chaque colonne. L'élution se fait avec du tampon phosphate de $K 10^{-2}$ M, à une vitesse de $0,3 \text{ ml} \cdot \text{mn}^{-1}$. Les éluats sont collectés par fractions de 1 ml et analysés au spectrophotomètre pour évaluer leur teneur en rhodopsine et en Triton X-100 (le Triton X-100 absorbe beaucoup dans l'U.-V., et présente un λ_{max} à 275 nm). Cette méthode n'a pas été appliquée à l'Ammonyx L0.

c) Elimination du détergent par dialyse:

La dialyse a été effectuée sur une solution de rhodopsine dans du Triton X-100 3% dans du tampon tris-HCl 2×10^{-3} M, NaCl 10^{-2} M, pendant 4h avec agitation, contre 1l d'eau distillée renfermant un peu d'albumine d'oeuf, (pour capter le Triton X-100). La dialyse est répétée une fois, dans les mêmes conditions.

Voilà les méthodes d'extraction et de purification de la rhodopsine (incluant l'élimination du détergent). Alors, peut commencer le travail de monocouche.

4- Techniques de monocouche:

Nous avons déjà parlé de l'appareil de monocouche, soit, le système de Langmuir présenté sur les schémas 2 et 3, p.36 et 37.

Avant son usage, nous procédons à son étalonnage pour déterminer sa sensibilité.

a) Etalonnage:

L'étalonnage s'effectue avec des poids marqués et en voici la procédure.

Le bain est rempli d'eau distillée, et toute la surface est bien nettoyée, surtout la portion de surface entre la barrière et le flotteur, et celle derrière le flotteur, au moyen d'une pipette Pasteur munie d'un système de vide. Ce nettoyage est exécuté jusqu'à ce que la compression de la poussière restante éventuelle n'entraîne une variation de "pression de surface" supérieure à $0,5 \text{ dyne. cm}^{-1}$.

Alors le fil de torsion étant en sa position de repos, l'indicateur des degrés de rotation (torsion du fil) est tourné à zéro, et la tache lumineuse ajustée à la ligne zéro sur l'écran. Puis, nous accrochons des poids marqués de plus en plus lourds au bras horizontal solidaire au fil de torsion; chaque poids marqué fait écarter la tache lumineuse du zéro, et nous l'y ramenons en appliquant une

force de torsion au fil, torsion qui est mesurée en degrés de rotation sur un cadran circulaire. Après un nombre suffisant de mesures, nous traçons le graphique des poids (P) en fonction de l'angle de rotation (θ). Nous obtenons une droite (graphe - 1) dont la pente ($\frac{P}{\theta}$) sert à calculer la sensibilité (S) du système selon la relation:

$$S = \left(\frac{P}{\theta}\right) \times \frac{g \times a}{d \times b}$$

dans laquelle

a = bras horizontal (voir schémas 2 et 3, p. 36 et 37)

b = bras vertical

d = longueur effective du flotteur

= longueur réelle du flotteur + $\frac{1}{2}$ (largeur du bain - longueur du flotteur)

g = 980 dyne. g⁻¹ = facteur de conversion.

La sensibilité (S) s'exprime en dynes. cm⁻¹. deg⁻¹. La sensibilité étant déterminée, le système de Langmuir est prêt à servir. Ainsi, nous allons élaborer un peu sur le principe et la technique de monocouche (à l'interface air-eau).

b) Principe et technique de monocouche:

Le bain étant scrupuleusement lavé, nettoyé au diéthyl-éther et bien rincé, nous le remplissons d'eau pure, ou bien selon le cas, d'une solution donnée à base de l'eau tridistillée. Comme toujours, la surface est aussi bien nettoyée. Alors, la substance à étudier, en solution dans un solvant approprié, est étalée délicatement sur la surface comprise entre la barrière et le flotteur. On en met une quantité suffisante tout en veillant à ce que la tache lumineuse revienne à zéro après que l'échantillon s'est bien répandu à la surface du bain. Alors, nous compressons les molécules à l'aide de la barrière de façon régulière et continue. Ce faisant, deux phénomènes se produisent:

Les molécules qui, au départ, avaient une disposition et une orientation quelconques à l'interface air-liquide (Schéma 4, no. 1, p. 51) se mettent graduellement à se redresser et à s'orienter selon leur caractère polaire, pour finir par former une couche monomoléculaire plus ou moins compacte, suivant qu'elle soit en phase solide ou en phase liquide (Schéma 4, no. 2, p. 51).

Pendant ce temps, la surface recouverte par l'échantillon, connaît une diminution progressive de sa tension superficielle par rapport à la surface libre derrière le flotteur. Cette diminution de tension superficielle se traduit par une force qui s'applique sur le flotteur et fait

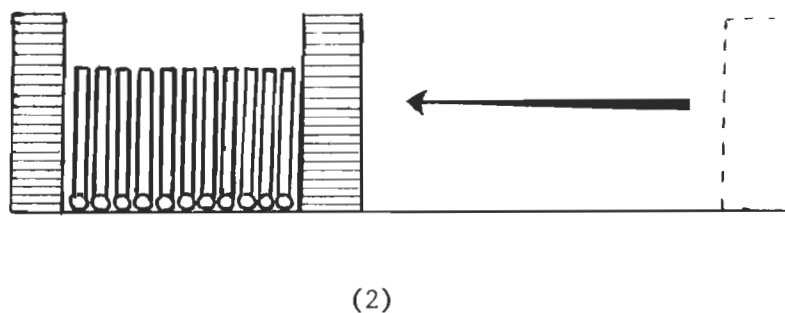
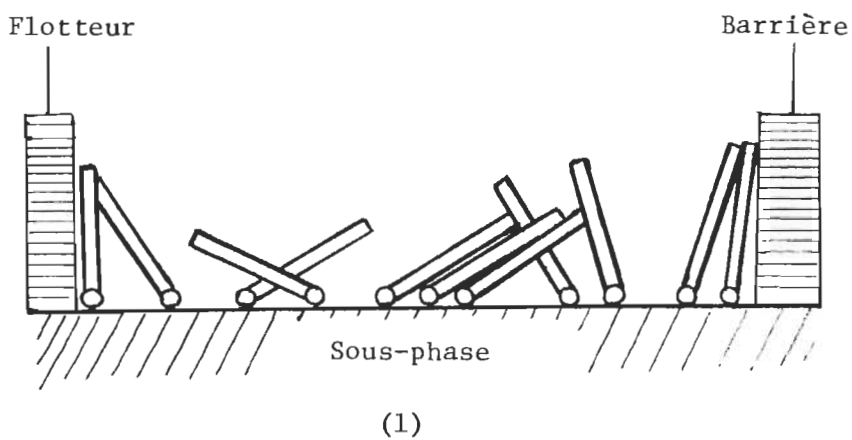


Schéma -4: Diagramme montrant l'orientation de molécules d'un acide gras en monocouche: avant (1) et après (2) compression

dévier la tache lumineuse de sa position de repère sur l'écran. Nous mesurons cette force tout au long de la compression au moyen de l'angle (θ) de la torsion qu'il faut exercer sur le fil de torsion pour ramener le système aux conditions de départ. Nous faisons peut-être une répétition en précisant que cette force est une fonction croissante de la concentration de molécules à la surface du bain.

Ainsi, nous sommes en mesure de porter en graphique cette force (F) en fonction de l'aire moléculaire (\bar{A}): c'est la courbe de pression de surface, laquelle caractérise chaque substance. Mais, vu que la tension superficielle et l'aire moléculaire sont fonctions de la température, il s'avère alors important de travailler à température constante.

Pour certaines substances, la courbe de pression de surface présente un collapse à une pression caractéristique où les particules, trop serrées entre elles, commencent à se chevaucher les unes sur les autres: comme conséquence, il y a réduction de la concentration de molécules à la surface du bain, et donc, diminution proportionnelle de la pression de surface. Naturellement, nous arrêtons la compression avant l'atteinte du collapse, une fois celui-ci connu, si nous voulons conserver la monocouche intacte.

Comme nous le voyons, la courbe de pression de surface

représente une mesure importante en monocouche. C'est pourquoi, nous allons lui consacrer une sous-section, en parlant un peu de certaines précautions dont on doit entourer cette technique.

c) Courbe de pression de surface:

Avant de déterminer la courbe de pression de surface de la rhodopsine, nous avons voulu nous assurer que l'appareil et la technique sont à point, et que l'eau est de bonne qualité. Nous avons ainsi procédé à une standardisation du système, en prenant la courbe de pression de surface de substances déjà bien connues dans ce domaine.

α) Standardisation du système:

Nous avons utilisé l'acide arachidique (sur une solution de CdCl_2 10^{-3} M, ou sur du HCl 10^{-2} M) et de l'acide stéarique (sur une solution de H_2SO_4 10^{-4} M); ces solutions sont faites avec de l'eau tridistillée, et parfois filtrée au millipore. Les acides gras ont été mis en solution dans du diéthyléther. Nous étalons habituellement 0,1 ml de la solution d'acide gras (10^{-4} - 10^{-3} M). L'étalement s'effectue à l'aide d'une seringue micrométrique en laissant tomber la solution goutte à goutte à environ 5 mm au-dessus du bain. Nous attendons le retour de la tache lumineuse au zéro après chaque goutte, pour nous assurer d'une bonne répartition monomoléculaire de

l'échantillon. La standardisation réussie, nous pouvons finalement passer à la rhodopsine.

β) Courbe de pression de surface de la rhodopsine (à la noirceur avec la lumière rouge)

La formation de monocouche de protéine sur une sous-phase aqueuse pose un problème particulier. D'abord, il faut éviter d'utiliser un solvant organique fort pour ne pas la dénaturer. Si bien, qu'en général, l'usage de solution aqueuse est de pratique courante. Mais alors, surgit la question de savoir comment éliminer les pertes de protéine par dissolution dans la sous-phase. La méthode d'étalement à la seringue s'avère inefficace. Trurnit (1960) a démontré que par la méthode de la seringue, il y a une perte allant de 43 à 60% (à l'occurrence, l'albumine) selon que l'on attend 90 mn ou 5 mn après l'étalement, avant de compresser.

Il a alors mis au point une technique d'étalement, la technique de Trurnit: il s'agit de faire couler l'échantillon le long d'une tige de verre cylindrique (plantée au centre du bain) à partir de son sommet hémisphérique. Cette méthode peut réduire jusqu'à zéro les pertes de protéine. Nous avons employé une tige de verre de 2 mm de diamètre et de 7 cm de long dont 2 cm au-dessus du niveau de la sous-phase. L'échantillon est débité à $0,2 \text{ ml mn}^{-1}$. Précisons ici que nos échantillons de rhodopsine sont des solutions à base d'environ 0,05% de Triton X-100 dans du

tampon tris - HCl 2×10^{-3} M, NaCl 10^{-2} M; la sous-phase est de l'eau tridistillée et filtrée au millipore, ou bien du tampon tris-HCl 2×10^{-3} M.

d) Effet de la lumière sur la monocouche de rhodopsine

Pour étudier le comportement photochimique de la rhodopsine, nous avons réalisé des monocouches du pigment visuel (compressées à $20 \text{ dynes. cm}^{-1}$) que nous avons irradiées avec la lumière blanche d'une lampe de microscope, pendant 5 mn, à une distance de 30 cm de la surface du bain.

Pour tester l'influence du peu de Triton X-100 qui reste dans nos échantillons de rhodopsine, nous avons effectué une série de mesures du poids moléculaire de la rhodopsine sur les échantillons ayant servi à prendre les courbes de pression de surface, à l'aide d'un système automatique à faible pression de surface (Appendice B, p. 99).

e) Détermination de poids moléculaire en monocouche

Aux basses pressions de surface (de 0 à 1 dyne. cm^{-1}), les monocouches sont en phase gazeuse (en deux dimensions) et la courbe de pression de surface suit la loi de Bull H. (1958).

$$FA = n RT + n sF$$

où:

F est la pression de surface

A est la surface totale occupée par la substance ($m^2 \cdot mg^{-1}$)

n est le nombre de moles de protéine étalées

R est la constante des gaz

T est la température absolue ($^{\circ}K$)

s est l'aire molaire de la protéine

Nous portons alors en graphique FA en fonction de F, pour obtenir une droite qui, extrapolée à $F = 0$, nous donne sur l'axe des ordonnées, la valeur limite de FA que nous reportons dans la relation de Bull, dans laquelle nsF s'annule pour $F = 0$.

Ainsi:

$$FA = n RT$$

or
$$n = \frac{P}{M}$$

où:

P = poids de substance étalée

M = poids moléculaire de la substance

d'où:

$$M = \frac{PRT}{FA}$$

Nous avons ainsi déterminé à prime abord, le poids moléculaire de l'albumine bovine, puis celui de la rhodopsine bovine. Les résultats sont présentés plus loin.

Et voilà pour les techniques de monocouche, et les méthodes d'extraction et de purification de la rhodopsine. Allons voir maintenant du côté des résultats.

III- RESULTATS ET DISCUSSION

III- RESULTATS ET DISCUSSION

A. Extraction et purification de la rhodopsine

Avant de rendre compte de nos résultats relatifs à l'extraction et la purification de la rhodopsine, nous croyons utile de donner les critères de pureté de la rhodopsine.

1- Critères de pureté de la rhodopsine:

La rhodopsine se caractérise par son spectre d'absorption U.V.-Visible, son absorptivité molaire et son poids moléculaire. Mais les critères de pureté le plus couramment utilisés sont les rapports spectraux.

a) Spectre d'absorption U.V.-Visible de la rhodopsine bovine:

Le spectre d'absorption U.V.-Visible de la rhodopsine présente trois pics:

- un pic à 278 nm, correspondant à l'absorption du tryptophane ou de la tyrosine de l'opsine.
- un pic à 350 nm correspondant à l'absorption du 11-cis-rétinal.
- un pic à 498 nm qui est dû à l'absorption de la rhodopsine, base de Schiff, opsine - 11-cis-rétinal.

b) Absorptivité molaire (ϵ): exprimée en $\ell \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

L'absorptivité molaire est un critère de pureté important de la rhodopsine. Elle est de:

74,000 à 278 nm selon Shichi H. et al. (1969).
11,200 à 350 nm selon Shichi H. et al. (1969).
40,600 - 43,000 à 498 nm selon Wald G. et al. (1953),
Futterman et Saslaw (1961), Shichi H. et al. (1969), Bridges C.D.B.
(1970, 1971), Daemen et al. (1970).

c) Poids moléculaire :

Jusqu'ici le poids moléculaire de la rhodopsine bovine a varié de 26 400 à 40 000 suivant la méthode utilisée.

Hubbard R. (1954), par suite d'études de centrifugation et de teneur en rhodopsine de micelles de digitonine, avait obtenu un poids moléculaire maximal de 40 000. Shields et al. (1967) sont arrivés à une valeur de $28\,600 \pm 2\,200$ pour le poids moléculaire de la rhodopsine bovine purifiée sur du Sephadex G-25. Heller (1968) obtint une valeur de 27 000 - 30 000 par purification sur du Sephadex et par filtration sur de l'agarose. Par électrophorèse sur gel, Cavanagh et Wald (1969) ont eu un poids moléculaire de 35 000, toujours pour la rhodopsine bovine. Daemen F.J.M. et al. (1972) en purifiant la rhodopsine soit par filtration sur gel, soit par électrophorèse sur gel d'acrilamide, soit encore par délipidation enzymatique, ont obtenu un poids moléculaire autour de 40 000. Et plus récemment, Lewis M.S. et al. (1974) ont mesuré le poids moléculaire de la rhodopsine bovine purifiée dans du Triton X-100, par ultracentrifugation et ont trouvé

une valeur de 35 000.

d) Rapports spectraux :

Les rapports spectraux concernés sont $A_{278 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$, $A_{350 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$. Mais le plus couramment utilisé est le rapport spectral d'absorption à 278 nm et 498 nm ($A_{278 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$). Et plus ce rapport est petit, et plus la rhodopsine est pure.

Ces points étant clarifiés, voyons ce que nous avons obtenu comme pureté pour nos extraits de pigment visuel en fonction du détergent et de la méthode employés.

2- Rhodopsine purifiée à l'Ammonyx L0:

D'abord, remarquons que, avec la méthode d'isolation par flottement sur sucrose des segments externes de bâtonnet, nous avons déjà un rapport spectral $A_{278 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$ de $3,0 \pm 0,2$, dans l'Ammonyx L0.

Et, comme nous l'indique le tableau 3, p.66, le rapport spectral $A_{278 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$ de la rhodopsine purifiée à l'Ammonyx L0 selon la méthode d'Ebrey T.G. (1971), va de 1,6 à 1,8 pour la rhodopsine de meilleure qualité (i.e. dans les premières fractions d'éluat). La plupart des méthodes de purification de la rhodopsine utilisées de nos jours donnent un rapport spectral*

* Le rapport spectral dont il sera question tout le long du texte sera celui de $A_{278 \text{ nm}} / A_{498 \text{ nm}}$. Autrement, il sera précisé.

de 1,6 à 2. [Bowness J.M. (1959), Heller J. (1968), Shichi H. et al. (1969), Shichi H. (1970), Ebrey T.G. (1971), Zorn M. et al. (1971, 1973) De Grip W.J. et al. (1972), Henselman R.A. et al. (1974), Osborne B.H. et al. (1974)]. Le plus petit rapport spectral jusqu'ici, a été obtenu par Heller J. (1968), soit, 1,52 à 1,68, en utilisant du CTAB (un détergent cathionique: bromure de céthyltriméthyl ammonium) avec une colonne de gel de Sephadex G-200.

Donc l'Ammonyx L0 donne une bonne purification de la rhodopsine, sur une colonne de célite plus du phosphate tri-basique de calcium. Mais, il est très difficile à éliminer. La méthode de précipitation au sulfate d'ammonium n'a pas été efficace, car elle exigeait une trop grande quantité de rhodopsine pour la visualisation de celle-ci au-dessus du surnageant. La méthode d'adsorption sur du Bio-Beads SM-2 n'a pas réussi non plus. Le Bio-Beads SM-2 adsorbe bel et bien l'Ammonyx L0, mais ce dernier semble garder la rhodopsine prisonnière avec lui. Nous avons été réduits à abandonner l'Ammonyx L0. Nous aurions pu utiliser le CTAB, vu qu'il purifie bien la rhodopsine, mais Heller J. (1968) aussi avait rencontré de sérieux problèmes à élimination de ce détergent. Nous nous sommes alors tournés vers le Triton X-100.

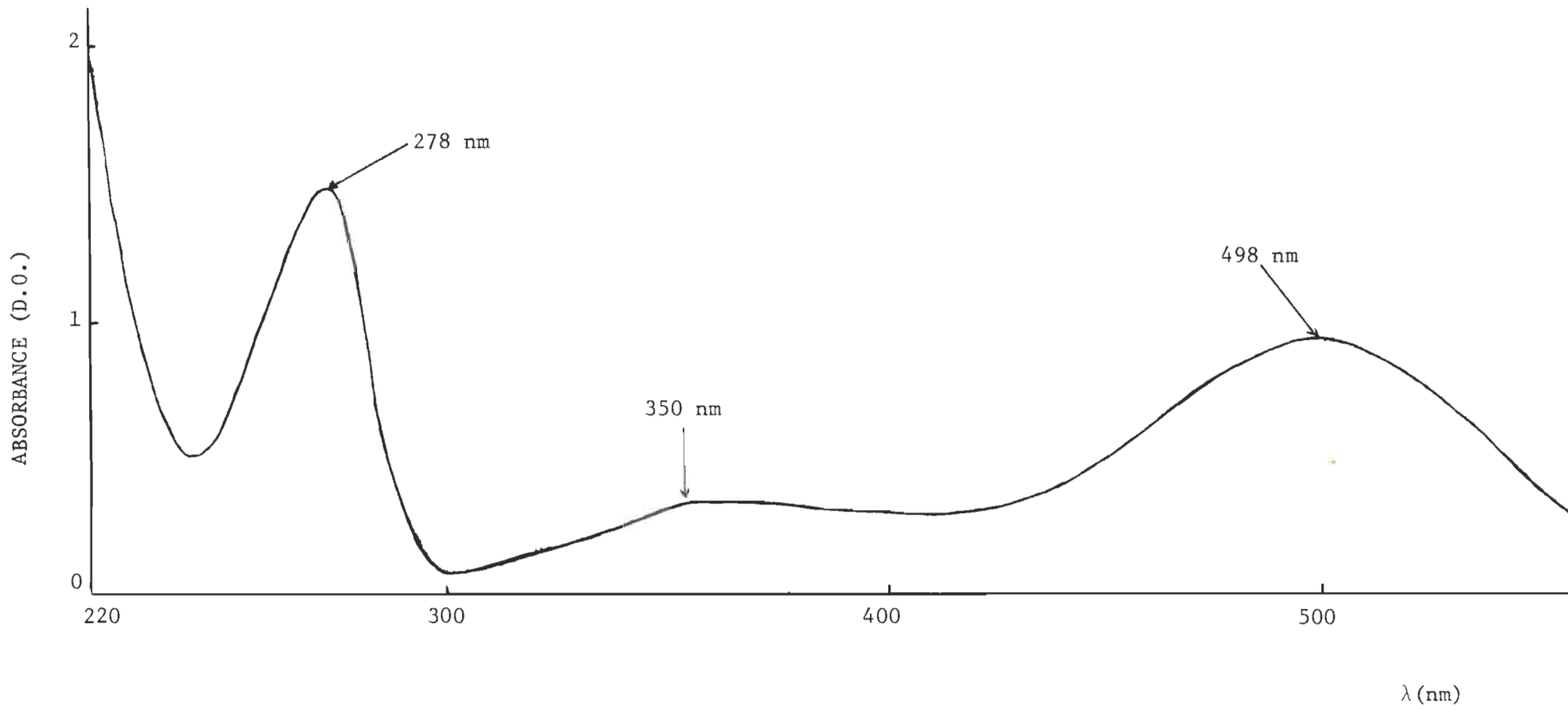


Fig. 8 : Spectre d'adsorption de la rhodopsine bovine dans de l'Ammonyx L0

3- Rhodopsine purifiée au Triton X-100:

Comme l'indique le tableau 3, p.66, le Triton X-100 permet une assez bonne purification de la rhodopsine, spécialement sur une colonne de cellulose ectéola. Le rapport spectral est de $2,0 \pm 0,1$.

De plus, le Triton X-100 présente l'avantage de s'éliminer aisément, évidemment pas beaucoup avec la méthode de dialyse à cause de la présence de micelles de rhodopsine, mais bien avec le Bio-Beads SM-2. C'est la solution de Triton X-100 2% en raison de 2 ml pour chacune des deux qualités de S.E.B. qui donne les meilleurs résultats. Si la solution est plus diluée, la digestion de la membrane des S.E.B. n'est que partielle d'un côté; de l'autre côté, une solution plus concentrée à l'élution, pose des problèmes lors de l'élimination du détergent. Nous avons observé une perte importante de la rhodopsine en solution de Triton X-100 3% lors du traitement au Bio-Beads. Mais, de 2%, le teneur de Triton X-100 se réduit jusqu'à 0,05% (déterminée par spectrophotométrie d'absorption U.V.-Visible à λ_{\max} de 275 nm). Précisons ici que c'est la technique d'inversion qui s'est avérée la plus efficace par rapport à celle de chromatographie. Cette dernière technique comporte des pertes de la rhodopsine, et surtout un effet de dilution important de la solution.

Par ailleurs, dans certains cas où l'élimination du Triton X-100 a été poussée très loin, la rhodopsine flotte dans les solutions traitées au Bio-Beads SM-2. Alors, nous récupérons la rhodopsine en culot en centrifugeant les "solutions" ou mieux les suspensions, pendant 10 mn à 45 000 g. Le culot de rhodopsine ainsi obtenu est lavé à l'eau distillée et lyophilisé. Mais nous avons eu des problèmes pour solubiliser la rhodopsine traitée ainsi, dans l'éthanol 8 à 12%, ou dans du n-hexane. Même dans du diéther, la solubilisation n'est que partielle pour des concentrations de l'ordre de 10^{-6} M.

Ainsi, nous avons utilisé les solutions de rhodopsine dans du Triton X-100 d'environ 0,05% pour le travail de monocouche.

Détergent	Solution de solubilisation des S.E.B.	Colonne	Solution d'élu-tion	Pureté (rapport spectral)
Ammonyx LO	Ammonyx LO 1,5% dans du tamp. phosph. de K 0,0067 M	Célite + phosph. tribasique de Ca	Ammonyx LO 1,5%, tamp. phosph. de K 0,067 M	1,61 - 1,8
Triton X-100	Triton X-100 1%, tamp. phosph. de K 0,0067 M	Célite + phosph. tribasique de Ca	Triton X-100 1%, tamp. phosph. de K 10^{-2} M, NaCl 10^{-1} M	2,3 - 2,5
	Triton X-100 2%, tamp. phosph. de K 0,0067 M	Célite + phosph. tribasique de Ca	Triton X-100 2%, tamp. phosph. de K 10^{-2} M, NaCl 10^{-1} M	2,3 - 2,5
	Triton X-100 3%, tamp. tris-HCl 2×10^{-3} M	Cellulose Ectéola	Triton X-100 2%, tamp. tris-HCl 2×10^{-3} M, NaCl 10^{-2} M	1,9 - 2,1
	Triton X-100 20%, tamp. tris-HCl 2×10^{-3} M	Cellulose Ectéola	Triton X-100 3%, tamp. tris-HCl 2×10^{-3} M, NaCl 10^{-2} M	Elimination difficile du détergent
	Triton X-100 2%, tamp. tris-HCl 2×10^{-3} M	Cellulose Ectéola	Triton X-100 2%, tamp. tris-HCl 2×10^{-3} M, NaCl 10^{-2} M	1,9 - 2,1

Purification de la rhodopsine

Tableau - 3

B. Monocouche

Cette partie est probablement la plus importante de notre travail. Comme nous l'avons déjà fait remarquer, le travail de monocouche en est, non seulement un très délicat, mais aussi et surtout très long, tout en étant passionnant. Et sans attendre plus longtemps, nous donnons les résultats obtenus.

1- Sensibilité des systèmes de Langmuir:

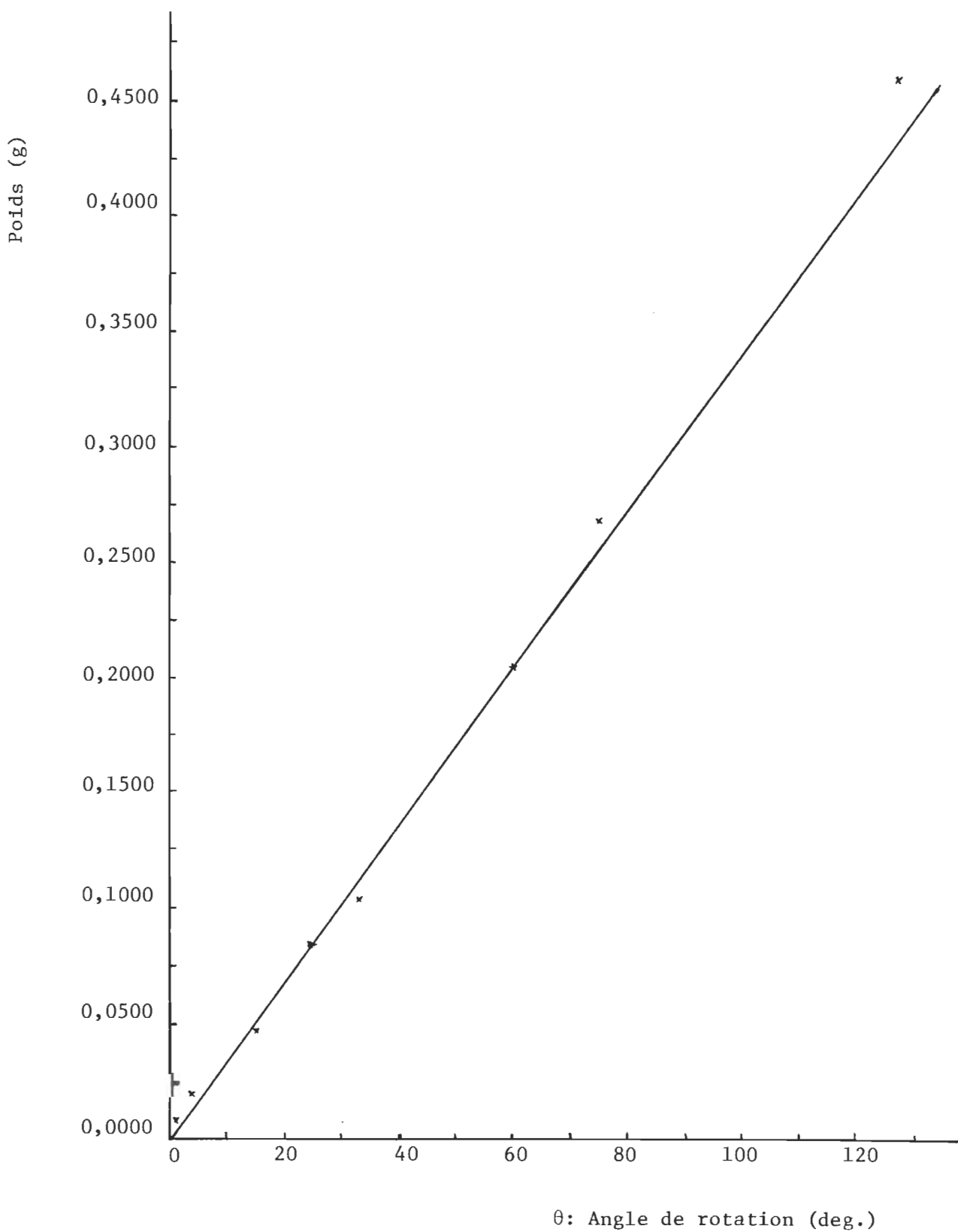
La sensibilité des systèmes de Langmuir est obtenue par étalonnage à l'aide de poids marqués comme décrit dans le chapitre précédent. Le graphe 1, p.68, est un exemple de courbe d'étalonnage. Dans ce cas précis, la pente $\left(\frac{P}{\theta}\right)$ de la courbe d'étalonnage est de $3,539 \times 10^{-3} \text{g. deg}^{-1}$. Ainsi, la sensibilité S est de:

$$S = \left(\frac{P}{\theta}\right) \times \frac{g \times a}{b \times d}$$

$$S = 3,539 \times 10^{-3} \text{g. deg}^{-1} \times \frac{980 \text{ dyne. deg}^{-1} \times 6,5 \text{ cm}}{7,3 \text{ cm} \times 13,70 \text{ cm}}$$

$$S = 0,22_5 \text{ dyne. cm}^{-1} \text{ deg}^{-1}$$

Le tableau 4, p.69, nous montre les valeurs de la sensibilité en fonction du diamètre et de la nature du fil de torsion, pour les mêmes caractéristiques du flotteur et les mêmes dimensions des bras de levier et de feuilles d'or.



Graphe 1: Courbe d'étalonnage du système de Langmuir

Tableau - 4

Valeurs de la sensibilité du système de Langmuir en fonction du diamètre et de la nature du fil de torsion pour les mêmes caractéristiques* du flotteur, des bras de levier, et des feuilles d'or.

Fil de torsion		Sensibilité (dyne. cm ⁻¹ deg ⁻¹)	Domaine de mesure de pression de surface (dyne. cm ⁻¹)
Nature	Diamètre (cm)		
Nickel	0,025	0,28 ₀	0-34 ± 0,14 ₀
Nickel	0,023	0,24 ₄	0-30 ± 0,12 ₂
Acier inoxydable	0,023	0,22 ₅	0-27 ± 0,11 ₂
Acier inoxydable	0,020	0,17 ₈	0-21 ± 0,08 ₉

* Flotteur: 12,7 x 0,6 x 0,0085 cm
 Bras de levier: a = 6,5 cm
 b = 7,3 cm
 Feuilles d'or: 4 x 0,5 x 0,00061 cm
 Longueur effective (d) du flotteur = 13,70 cm

La plupart de nos expériences ont été effectuées sur un système de sensibilité $0,22_5$ dyne. cm^{-1} . deg^{-1} , sauf la détermination du poids moléculaire de la rhodopsine qui l'a été sur un système de sensibilité $0,14_3$ dyne. cm^{-1} V^{-1} permettant de prendre des lectures de pression de surface de 0,001 à 0,222 dyne. cm^{-1} (Appendice B, p.99). Sur le tableau 4, p.69, nous voyons aussi les domaines de mesure de la pression de surface. Les limites supérieures sont évaluées expérimentalement et représentent les forces pour lesquelles le fil de torsion garde intacte sa flexibilité. Si on dépasse ces valeurs, le fil ne revient pas ou revient difficilement à sa position initiale lorsque la pression est ôtée. Ces limites doivent être strictement observées pour un bon étalonnage ou une bonne courbe de pression de surface.

2- Courbes de pression de surface des acides arachidique et stéarique:

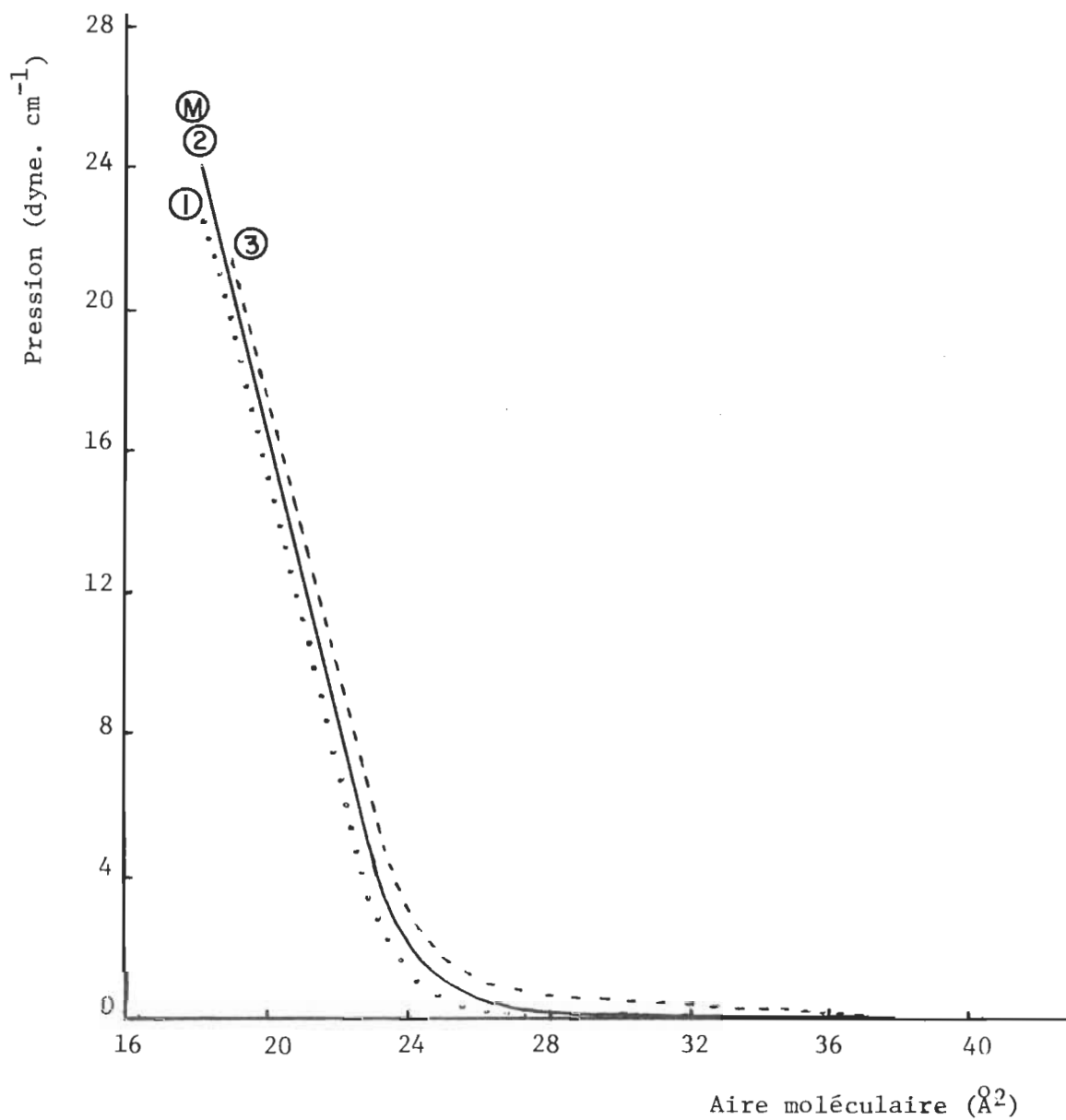
a) Courbe de pression de surface de l'acide arachidique.

La courbe de pression de surface de l'acide arachidique (graphe 2, p.72, courbe (M)) est la moyenne de trois déterminations:

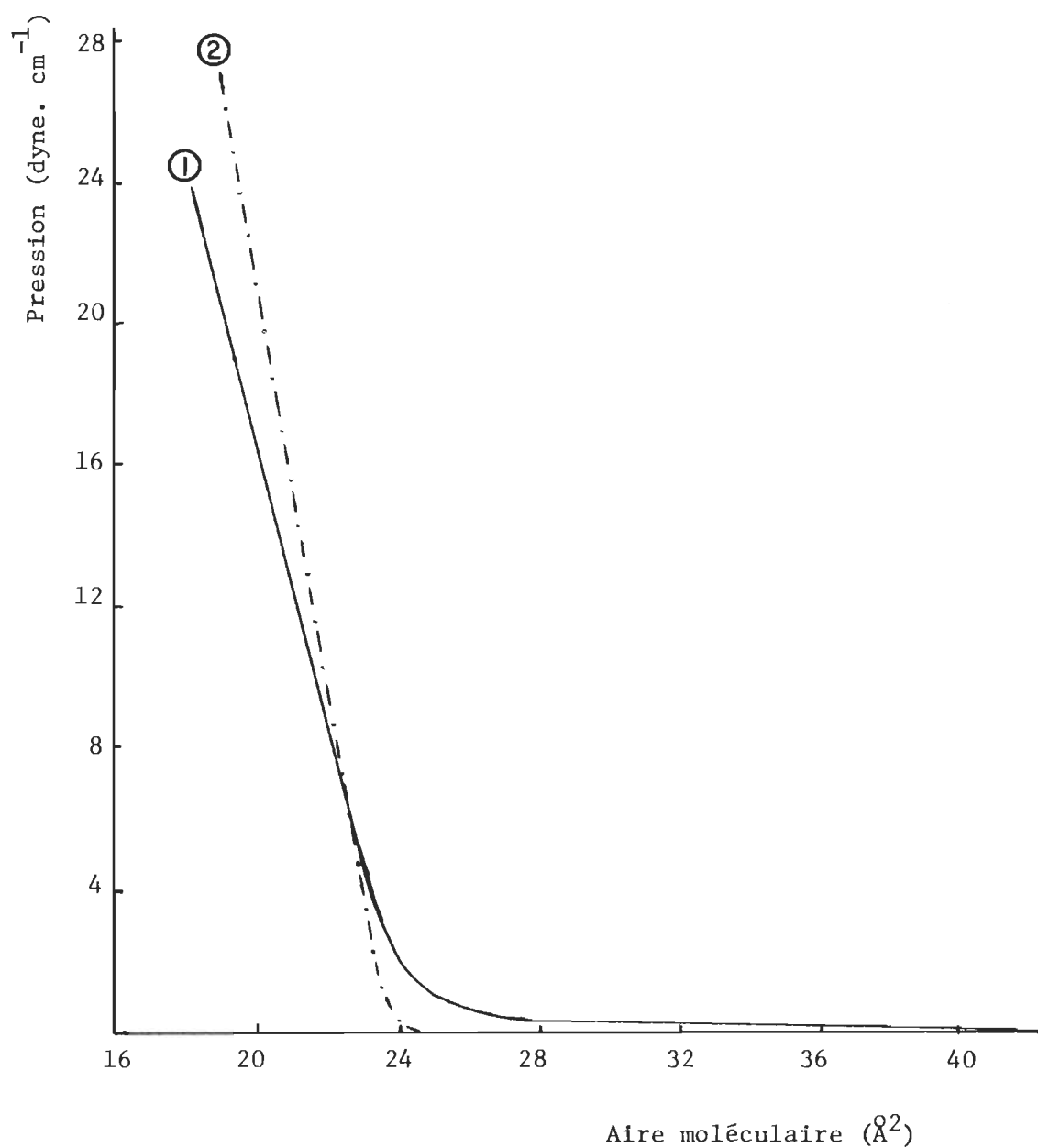
- 0,05 ml de solution d'acide arachidique
 $1,279 \times 10^{-3}$ M dans du diéthyléther, $T = 296,5^{\circ}\text{K}$
- 0,07 ml de la même solution, $T = 296,5^{\circ}\text{K}$
- 0,1 ml de solution d'acide arachidique $8,441 \times 10^{-4}$ M
 dans du diéthyléther, $T = 296^{\circ}\text{C}$

Ces expériences ont été effectuées sur une sous-phase de chlorure de cadmium 10^{-3} M dans de l'eau tridistillée et filtrée au Millipore. La compression s'est faite manuellement, à une vitesse de $0,75 \text{ cm. mn}^{-1}$, et de façon continue.

Cette courbe moyenne suit très bien la courbe de référence [Nuting et Harkins (1939)], sur le graphe 3, p.73. Elle comporte trois portions: une portion linéaire dans les basses pressions correspondant à la phase gazeuse de la monocouche; une portion linéaire aux fortes



Graphe 2: Courbe de pression de surface de l'acide arachidique/
diéthyléther sur une sous-phase de CdCl_2
 (1) Détermination faite à $T = 296,5^\circ\text{K}$
 (2) Détermination faite à $T = 296,5^\circ\text{K}$
 C'est aussi la courbe moyenne (M)
 (3) Détermination faite à $T = 296^\circ\text{K}$



Graphe 3: Courbes de pression de surface de l'acide arachidique

- (1) Notre courbe moyenne (Sur CdCl₂, T = 296 - 296,5°K)
- (2) Courbe obtenue par Nutting et Harkins (1939)
(pH:2, T = 298°K)

pressions qui correspond à la phase solide; et entre les deux, la portion représentant la phase liquide, et tout ceci en deux dimensions.

Par ailleurs, l'extrapolation de la portion des fortes pressions sur l'axe des abscisses donne l'aire moléculaire moyenne de l'acide arachidique, soit, 24 \AA^2 .

b) Courbe de pression de surface de l'acide stéarique.

Nous présentons sur le graphe 4, p.76, la courbe moyenne de trois courbes de pression de surface de l'acide stéarique. L'une a été déterminée à 297°K , par étalement de 0,1 ml de solution d'acide stéarique $1,792 \times 10^{-3} \text{ M}$ dans du diéthyléther, sur une sous-phase de $\text{HCl } 10^{-2} \text{ M}$, par compression manuelle continue de $0,33 \text{ cm. mn}^{-1}$; la deuxième a été déterminée avec 0,07 ml de solution d'acide stéarique $1,792 \times 10^{-3} \text{ M}$ /diéthyléther sur une sous-phase de $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 10^{-4} \text{ M}$, à 297°K , toujours par compression manuelle et continue de $0,33 \text{ cm. mn}^{-1}$ et la troisième, avec 0,1 ml d'une solution de l'acide $1,75 \times 10^{-3} \text{ M}$ dans du n-hexane sur du $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 10^{-4} \text{ M}$, à $T = 297,5^{\circ}\text{K}$ dans les mêmes conditions de compression que précédemment.

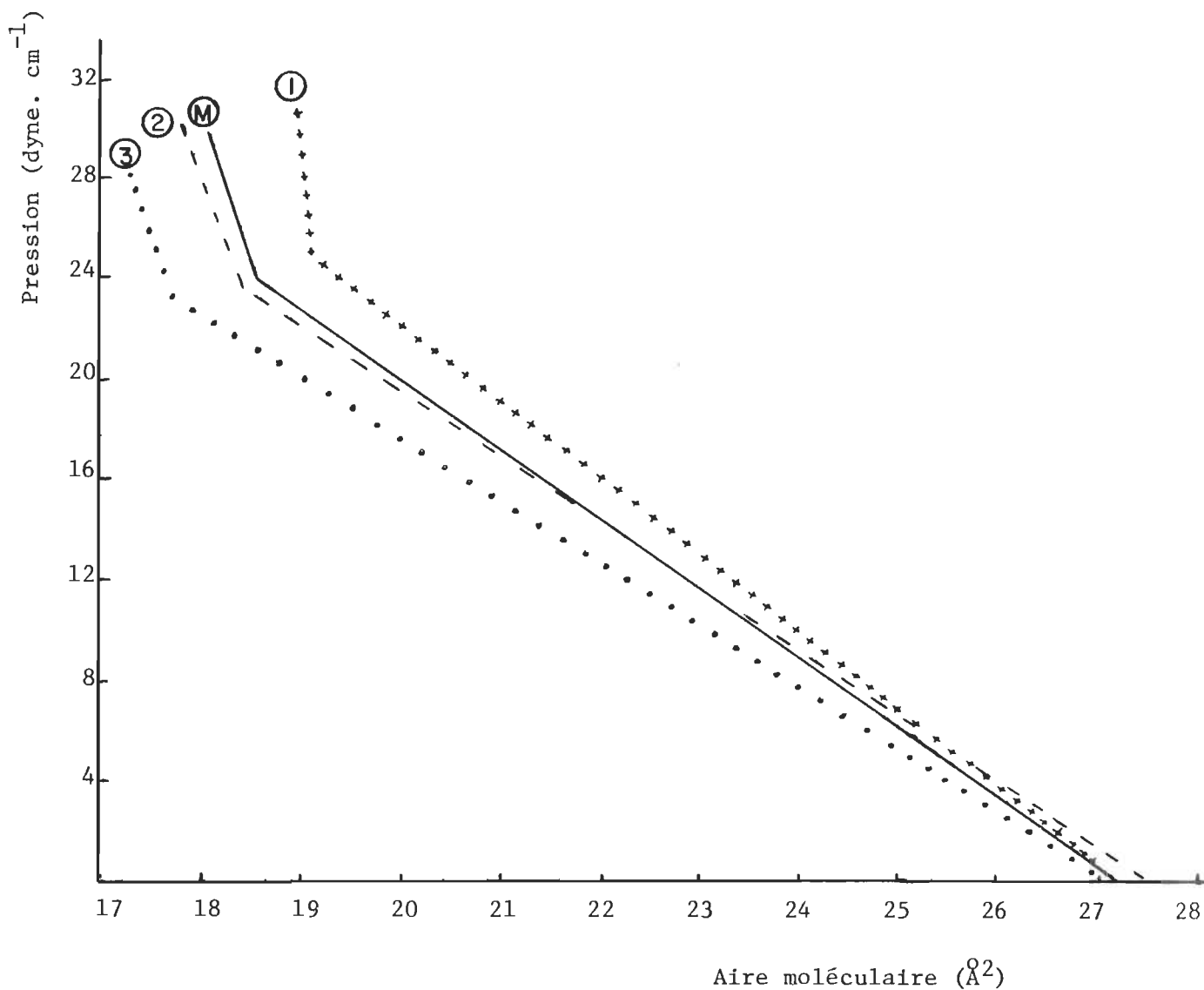
Cette courbe présente aussi trois portions correspondant aux phases gazeuse, liquide et solide, avec les deux bris caractéristiques marquant les changements de

phase de la monocouche d'acide stéarique. Mais, nous devons ajouter que la phase liquide de la monocouche d'acide stéarique est un état instable. De ce fait, les portions de la courbe représentant la phase liquide, se coïncident rarement d'un laboratoire à l'autre, et même d'une expérience à l'autre. Nous remarquerons cette variation sur le graphe 5, p.77, où sont reproduites des courbes de pression de surface de l'acide stéarique, tirées de plusieurs articles publiés. Notre courbe se rapproche plus de celle de Cadenhead et Csonka (1970), déterminée à 297°K sur du $\text{HCl } 10^{-2} \text{ M}$ (graphe 6, p.78).

C'est pourquoi le deuxième bris de la courbe correspondant à la transition de la phase liquide à la phase solide caractérise le mieux la courbe de pression de surface de cet acide gras. Mais en même temps, la réussite de la détermination de cette courbe témoigne d'une bonne qualité d'eau.

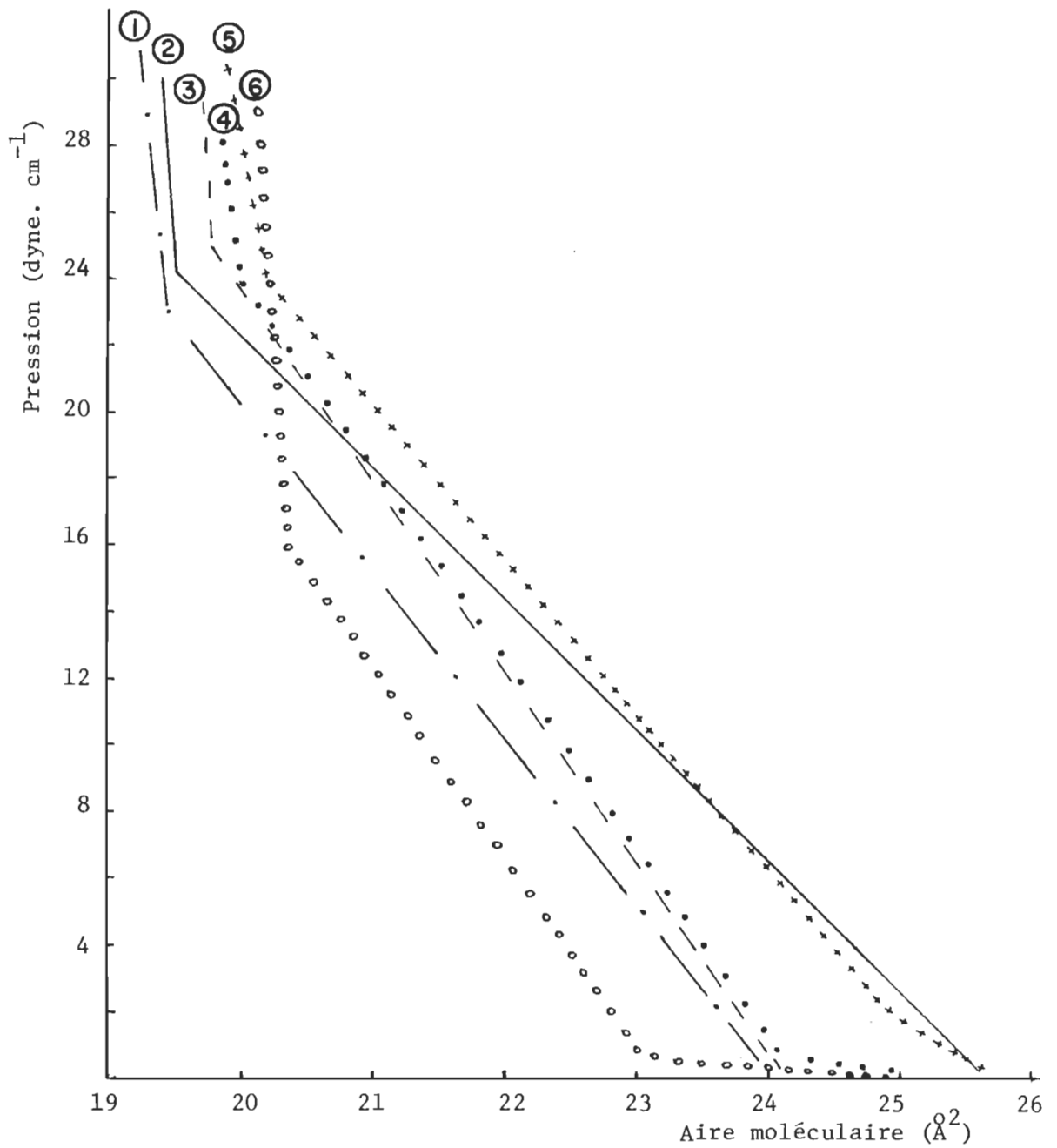
Ici aussi, l'extrapolation de la portion de courbe des fortes pressions (phase solide) sur l'axe des abscisses donne l'aire moléculaire moyenne de l'acide stéarique, soit $20,5 \text{ \AA}^2$.

Tous ces résultats sur les acides stéarique et arachidique sont conformes à ceux publiés dans le livre de Gaines (1966). Ainsi, la standardisation de notre système de monocouche est opérée. Et qu'en est-il de la rhodopsine?



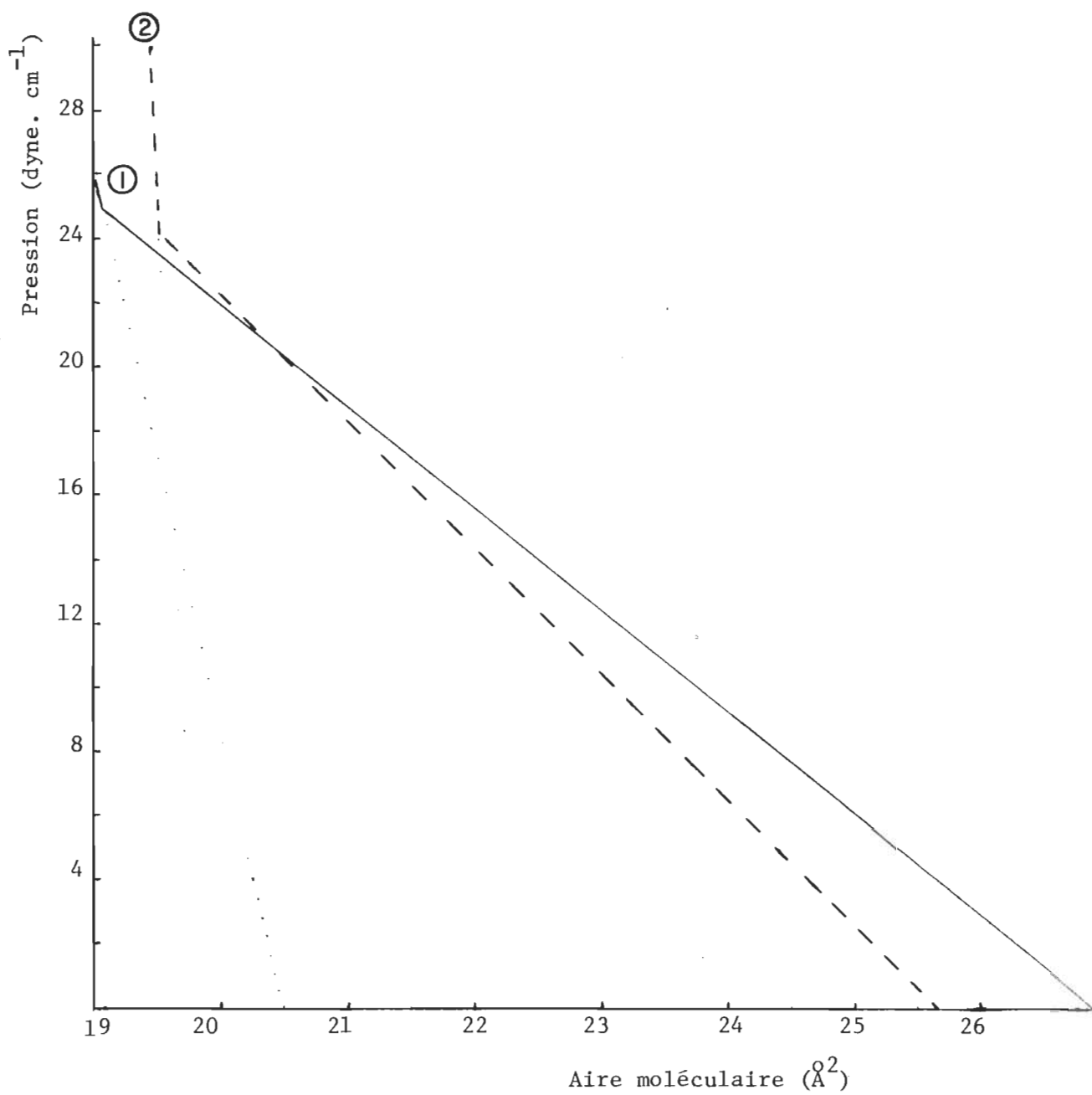
Graph 4: Curves of surface pressure of stearic acid

- ① Determination with a solution of stearic acid / diethyl ether, on H_2SO_4 10^{-4}M , $T: 297^\circ\text{K}$.
- ② Determination with a solution of stearic acid / diethyl ether, on HCl 10^{-2}M , $T: 297^\circ\text{K}$.
- ③ Determination with a solution of stearic acid / n-hexane, on H_2SO_4 10^{-4}M , $T: 297,5 \text{ K}$.
- (M) Average curve of the three obtained in (1), (2) and (3).



Graph 5: Courbes de pression de surface de l'acide stéarique

- ① Courbe obtenue par Willis (1971), (pH: 6,8, T: 293^oK).
- ② Courbe obtenue par Cadenhead et Csonka (1970), (HCl 10⁻²M, T: 297^oK)
- ③ Courbe tirée de Gaines (1966) p. 220, T: 298^oK
- ④ Courbe obtenue par Patit et Matthews (1973), (pH: 2,0, T: 297^oK)
- ⑤ Courbe obtenue par Leblanc, R.M. et Orger B. (1970), (D₂HCl 10⁻²M, T: 291^oK)
- ⑥ Courbe obtenue par Casilla-Cooper, D., Eley (1973), (sur, H₂O, T: 293^oK).



Graphe 6: Courbe de pression de surface de l'acide stéarique

- ① Notre courbe moyenne
- ② Courbe obtenue par Cadenhead et Csonka (1970)

3- Courbe de pression de surface de la rhodopsine:

La rhodopsine utilisée ici est celle purifiée par la méthode modifiée d'Osborne (1974) et traitée au Bio-Beads SM-2 pour éliminer le Triton X-100. La concentration de la rhodopsine est calculée à partir de la différence d'absorbance à 498 nm ($\Delta A_{498 \text{ nm}}$) avant et après photodécoloration; cette valeur de $\Delta A_{498 \text{ nm}}$, reportée dans la relation de Lambert-Beer nous donne la concentration:

$$A = \epsilon c l \rightarrow C = \frac{A}{\epsilon l}$$

où A représente l'absorbance

ϵ = absorptivité molaire ($\text{l. mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

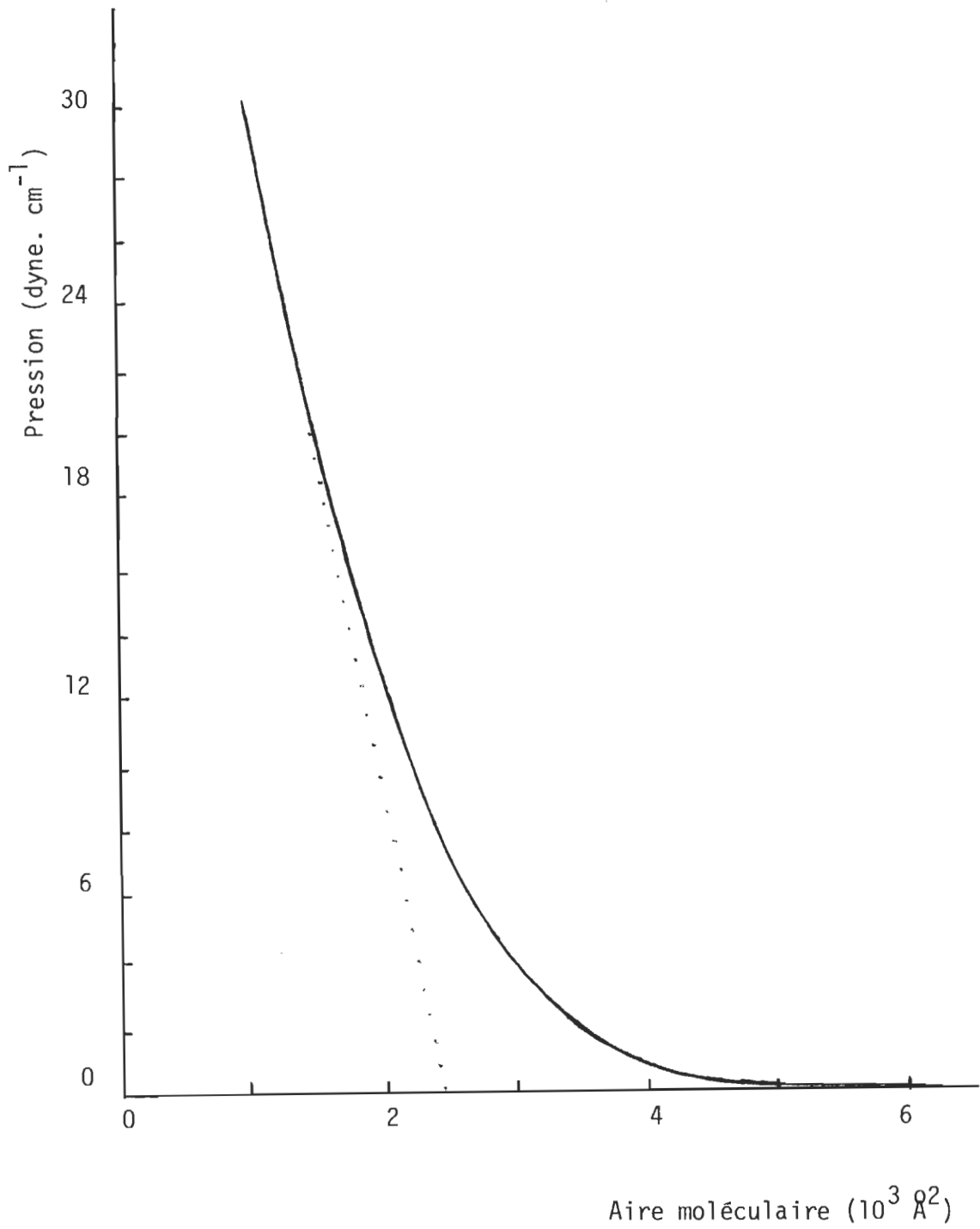
c = concentration (mole l^{-1})

l = trajet optique (cm)

Nous avons pris pour $\epsilon_{498 \text{ nm}}$, la valeur obtenue par Wald G. et al. (1953), soit $40,600 \text{ l. mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La courbe de pression de surface de la rhodopsine* (sur de l'eau tridistillée) est indiquée par le graphe 7, p.80. La contraction de l'échelle de l'axe des abscisses lui donne

* C'est un résultat préliminaire que nous comptons confirmer plus tard sur d'autres échantillons.



Graphe 7: Courbe de pression de surface de la rhodopsine bovine (sur eau distillée, T: 296⁰K)

un isotherme qui rappelle celui de la courbe de pression de surface de l'acide arachidique. Mais en fait, la monocouche de rhodopsine est en phase liquide aux fortes pressions de surface, pendant que celle de l'acide arachidique est en phase solide. L'extrapolation de la portion de courbe en fortes pressions sur l'axe des abscisses nous donne une aire moléculaire de $2\,400 \text{ \AA}^2$. Mais, précisons que cette aire moléculaire doit être traitée avec prudence parce qu'elle est obtenue, non pas d'une monocouche en phase solide, c'est-à-dire dans un état serré, mais d'une monocouche en phase liquide.

Et si l'on considère que la molécule de rhodopsine est sphérique, elle aurait, dans le cadre de nos déterminations, un diamètre de l'ordre de 80 \AA , soit près de deux fois la valeur trouvée par des études de diffraction des R-X [Blaurock et al. (1969), Worthington C.R. (1971, 1973)], soit 40 \AA , ou de $40\text{-}46 \text{ \AA}$ selon Cone R.A. (1972). Mais, si l'aire moléculaire moyenne de la rhodopsine déterminée en monocouche, s'écarte un peu de la valeur obtenue par les méthodes optiques mentionnées ci-avant, elle se rapproche de celle calculée par Wu Cheng-Wen et Stryer L. (1972) à partir d'études de fluorescence - Wu C.-W. et al. ont montré que la molécule de rhodopsine serait une ellipse dont le plus grand axe aurait une dimension de 70 \AA . D'une façon

ou d'une autre, nous ne pouvons pas insister davantage sur la valeur de 80 \AA^0 déterminée en monocouche pour la raison relatée plus haut, à savoir que nous avons une monocouche en phase liquide, donc dans un état largement fluide où chaque molécule occupe un espace plus grand que son propre volume, un peu comme dans le système vivant [Worthington C.R. (1971); Poo M.-M. et al. (1973, 1974), Liebman P.A. et al. (1974)].

Par ailleurs, Azuma K. et al. (1966) avaient trouvé une aire moléculaire aux fortes pressions, de l'ordre de $5\,000 \text{ \AA}^2$ pour la rhodopsine en monocouche sur de l'eau distillée. Ils ont aussi noté une augmentation de cette aire moléculaire avec la force ionique de la sous-phase. Cet écart entre la valeur trouvée par le groupe d'Azuma et celle que nous avons obtenue doit venir de la différence de pureté de la rhodopsine. Nous avons travaillé avec une solution de rhodopsine de rapport spectral $2 \pm 0,1$ contre $5 \pm 1,5$ pour la solution de rhodopsine d'Azuma et al. (1966).

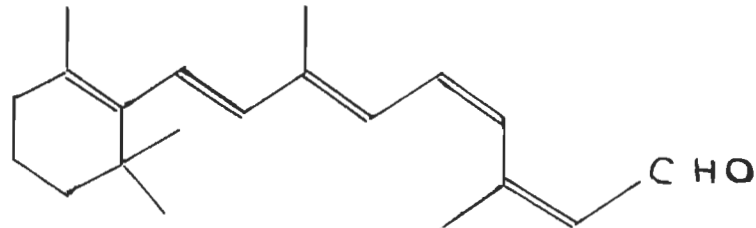
4- Effet de l'irradiation sur la monocouche de rhodopsine:

Lorsque nous irradiions la monocouche de rhodopsine (compressée à $20 \text{ dynes. cm}^{-1}$) avec de la lumière blanche, il se produit une augmentation de la pression de surface

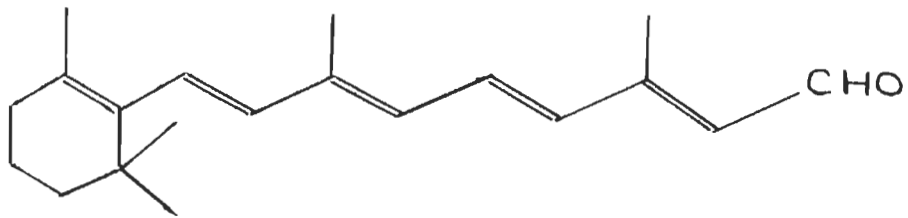
de l'ordre de 1 dyne. cm^{-1} - la barrière étant maintenue immobile -. Cette augmentation de pression de surface, correspondant à une chute de la tension superficielle de la sous-phase peut être due aux facteurs suivants:

Soit une réorganisation des molécules dans la monocouche irradiée comme conséquence de l'isomérisation du 11-cis-rétinal^{*}, en rétinol tout-trans, réorganisation qui exigerait un volume plus grand; soit un réchauffement de la monocouche par l'irradiation; soit encore une augmentation de la concentration de particules à la surface du bain. Mais le premier facteur est peu probable, vu que le passage du rétinol, des isomères cis à l'isomère trans, s'effectue plutôt avec perte de volume, ou mieux d'aire moléculaire, à cause de l'empêchement stérique des isomères cis [Yasuaki et al. (1967); Brody S.S. (1973)]; dans le laboratoire du Dr Leblanc R.M., nous sommes arrivés à des conclusions semblables [Hotchandani S. et al. (1975a, 1975b)]. Nous pouvons remarquer cet empêchement stérique sur la figure 9, p.84.

* Rhodopsine (11-cis-rétinal - opsine) $\xrightarrow{h\nu}$ isomères $\frac{\text{H}_2\text{O}}{\text{H}^+}$ opsine + rétinol tout-trans.



(1) 11-cis-rétinal



(2) rétinal tout-trans

Fig. - 9. Structure chimique du 11-cis-rétinal (1) et du rétinal tout-trans (2) telle que proposée par Wolken J.J. (1963)

Donc, cette chute de la tension superficielle n'est pas le fait de l'isomérisation.

L'effet de la chaleur aussi est à écarter, car, l'irradiation s'est toujours faite à l'aide d'une petite lampe de microscope, à une distance respectable, et en plus, dans une salle thermostatée. D'ailleurs, l'illumination subséquente de la monocouche déjà irradiée, ne produit aucun effet.

Finalement, c'est la dernière possibilité qui retient notre attention: le rétinol tout-trans libéré de l'opsine, par suite de l'hydrolyse de la rhodopsine photolysée, pénétrerait dans la monocouche, pour en produire une expansion. Mais, comme la surface offerte à la monocouche est maintenue constante, c'est plutôt une augmentation de la pression de surface qui est observée, comme conséquence de l'augmentation de la concentration de particules à la surface du bain.

Ainsi, la lumière blanche agit sur la monocouche de rhodopsine en la soumettant à une expansion^{*}, comme résultat de la libération et de la pénétration du rétinol tout-trans dans la monocouche.

* Hyono A. et al. (1962), ainsi que Bonting S.L. et al. (1967) avaient aussi observé cette augmentation de pression de surface en illuminant la monocouche de rhodopsine, tandis que dans le cas d'Azuma K. et al. (1966), il ne s'était rien passé.

Dans le système biologique, ce changement de site d'attachement du rétinol, sa pénétration dans la couche bilipidique "sus-jacente" pourrait, sinon creuser des pores, du moins, élargir ceux qui existeraient déjà, et ainsi, augmenter la perméabilité de la membrane discale aux ions tels que Na^+ et K^+ : ce qui aurait pour résultat de créer une différence de potentiel, génératrice d'influx nerveux. Dans la même veine, Verma S.P. et al. (1974) ont montré que le rétinol tout-trans augmente le degré d'ordre des films de lipides, à faible concentration. Mais, comme ces pores seraient de l'ordre de 100 \AA^0 [Cone R.A. (1973)], l'absorption d'un photon induirait le creusement de 100 canaux de Na^+ ou plus [Cone R.A. (1973)], ceci dans le cas des photorécepteurs du *Limulus*. Par ailleurs, cette liaison nouvelle du rétinol tout-trans aux phospholipides, soit à leurs groupements aminés, rendrait la membrane plus négative et ainsi permettre un plus grand flux de cations [Bonting S.L. et al. (1967)]. D'autre part, des électrophysiologistes parlent de déplacement de charge à l'intérieur des monocouches de pigment visuel: je fais allusion au Early Receptor potential (ERP). La conditio sine qua non de cette réponse naissant dans les premières étapes de la dégradation de la rhodopsine et de ses dérivés, serait le haut degré d'orientation des microgénérateurs de courant que sont les pigments visuels [Giulio L. (1973)].

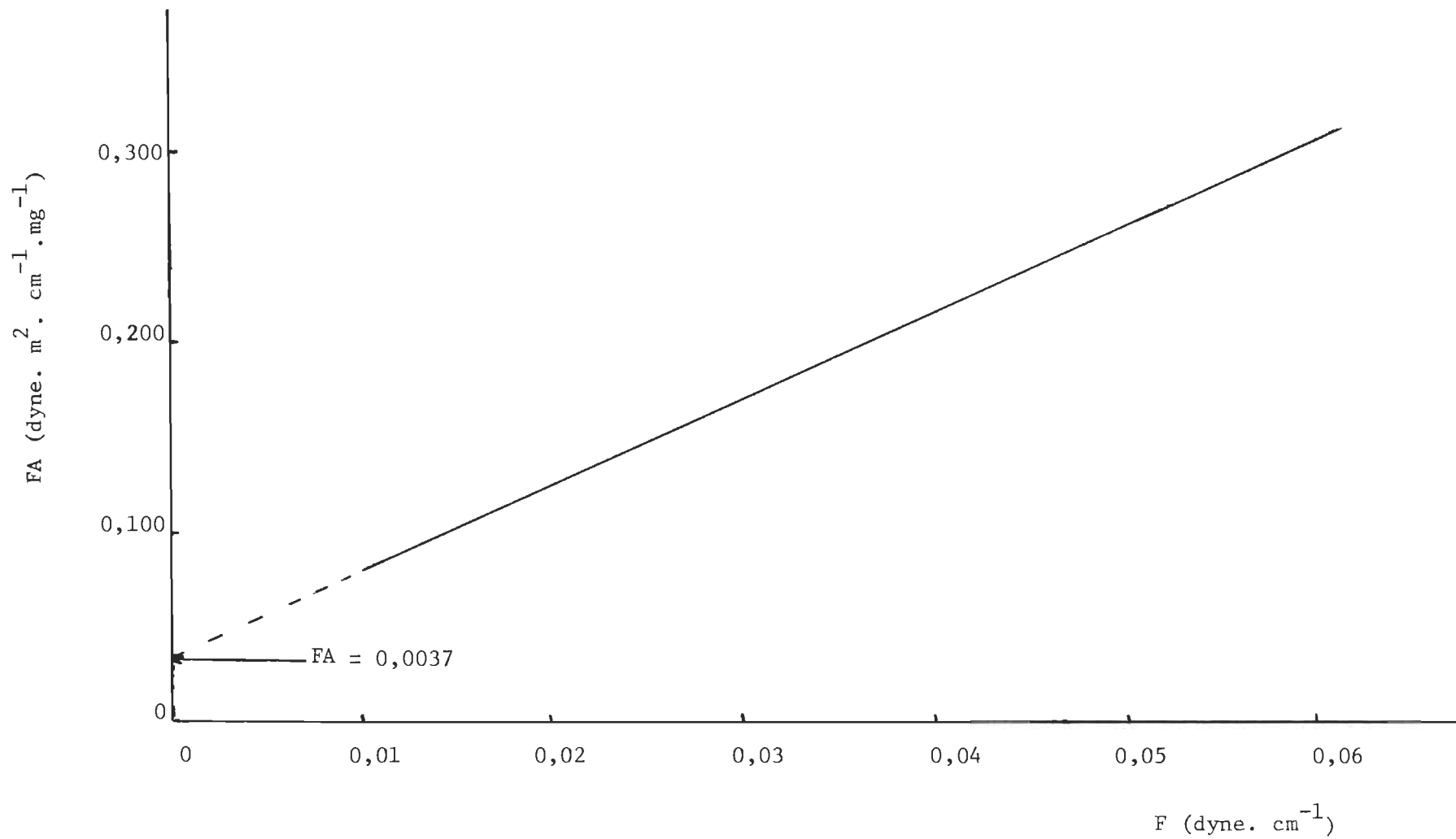
Mais, toutes ces interprétations demeurent hypothétiques. Il reste encore beaucoup de travail à effectuer pour explorer ces diverses possibilités. C'est ainsi qu'il serait par exemple intéressant d'étudier l'effet de la lumière sur des membranes artificielles préparées à partir de couches de rhodopsine et de lipides normalement présents dans la membrane des photorécepteurs. Ceci fera probablement partie du programme de notre prochain travail de recherche.

5- Poids moléculaire de la rhodopsine déterminé à l'aide de la technique des monocouches:

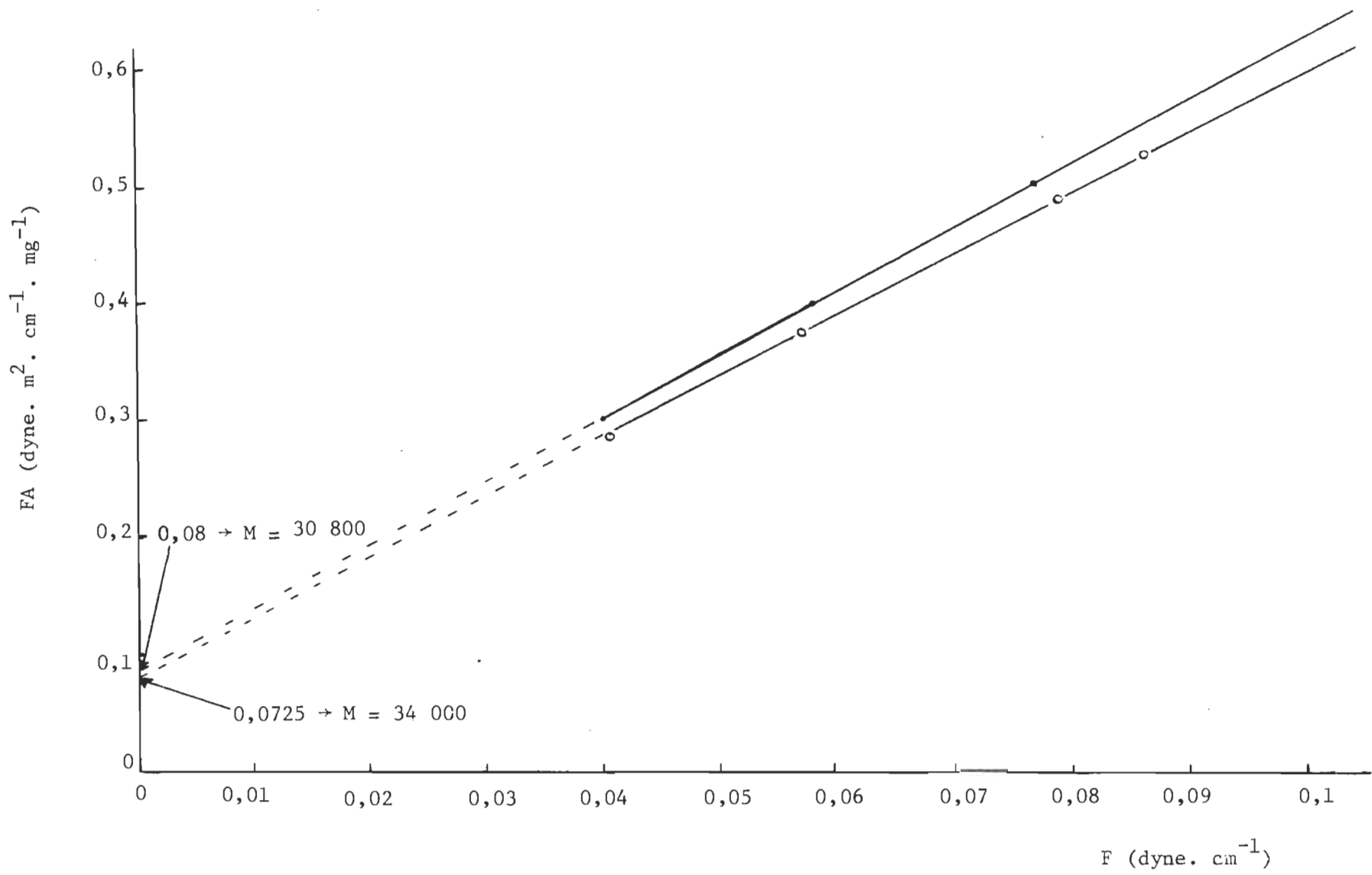
Pour nous assurer que notre système de monocouche à faible pression de surface était à point pour la détermination du poids moléculaire de la rhodopsine, nous l'avons standardisé avec de l'albumine bovine. Le poids moléculaire de l'albumine bovine ainsi déterminé sur une sous-phase de tampon tris-HCl pH 7.2 est de 66 480 (selon la formule modifiée de Bull $M = \frac{PRT}{FA}$), donc, avec une erreur de 0,7% par rapport à la valeur de M obtenue à partir de la composition en acides aminés de cette protéine.

La méthode appliquée à la rhodopsine, nous donne un poids moléculaire de $32\,400 \pm 1\,600$ comme résultats préliminaires. Nous croyons que cette fluctuation de la valeur du poids moléculaire de la rhodopsine, contrairement au cas de l'albumine bovine, serait due à une solubilisation éventuelle du

pigment visuel dans la sous-phase, à cause de la présence de Triton X-100 (si infime soit sa teneur), laquelle solubilisation, pourrait varier d'une expérience à l'autre. Néanmoins, cette erreur expérimentale (4,9%) est comparable à celle d'autres méthodes utilisées pour la détermination du poids moléculaire de la rhodopsine, tel que nous pouvons le remarquer à la section 1.c de ce chapitre. En plus, notre valeur se situe quand même dans la moyenne des autres obtenues autrement (26 400 - 40 000). Nous voyons ci-après les courbes de FA en fonction de F pour la détermination du poids moléculaire de l'albumine bovine (graphe 8) et de la rhodopsine bovine (graphe 9).



Grphe 8: Courbe FA vs F, pour la détermination du poids moléculaire de l'albumine bovine.



Graph 9: Curves FA vs F, for the determination of bovine rhodopsin molecular weight.

IV- CONCLUSION

IV- CONCLUSION

De notre travail, se dégagent quelques éléments intéressants: la confirmation de l'effet d'expansion de la lumière sur la monocouche de rhodopsine, la possibilité de tester la pureté de nombre de substances, par leur comportement en monocouche et la détermination de leur poids moléculaire. L'appareil de monocouche, en plus d'offrir des possibilités de simulation des systèmes membranaires, peut s'apprêter à l'étude de l'énergie d'interaction de protéines (avec le système à faible pression de surface): et cela représente une perspective fort intéressante.

Mais, un point demeure primordial, la pureté des produits utilisés, ainsi que la propreté de tout le matériel. C'est ainsi que se manifeste encore, et de plus bel, le problème de la purification de nos produits, et à l'occurrence, la rhodopsine. Nous avons vu que l'Ammonyx LO avait l'avantage d'une bonne purification de la rhodopsine, mais demeure jusqu'ici, difficile à éliminer. Par contre, le Triton X-100 s'élimine bien, pas entièrement bien sûr, mais il ne semble pas encore satisfaire pleinement aux exigences du travail de monocouche.

Alors, il ne s'agit pas seulement de trouver un agent bon purificateur; mais encore faut-il pouvoir l'éliminer, et sans affecter l'intégrité structurale et physiologique du pigment visuel.

Et, à ce propos, nous avons encore, et plus que jamais, besoin de données précises sur la membrane discale elle-même, sa constitution du point de vue moléculaire, atomique, ionique etc..., et sur le comportement normal, la dynamique des divers constituants les uns par rapport aux autres, dans leur milieu naturel. Nous ne nous cacherons pas que c'est là un travail de longue haleine et très hardu. Mais, peut-être, la promotion d'équipes de recherche multidisciplinaires serait une solution!

Appendice A

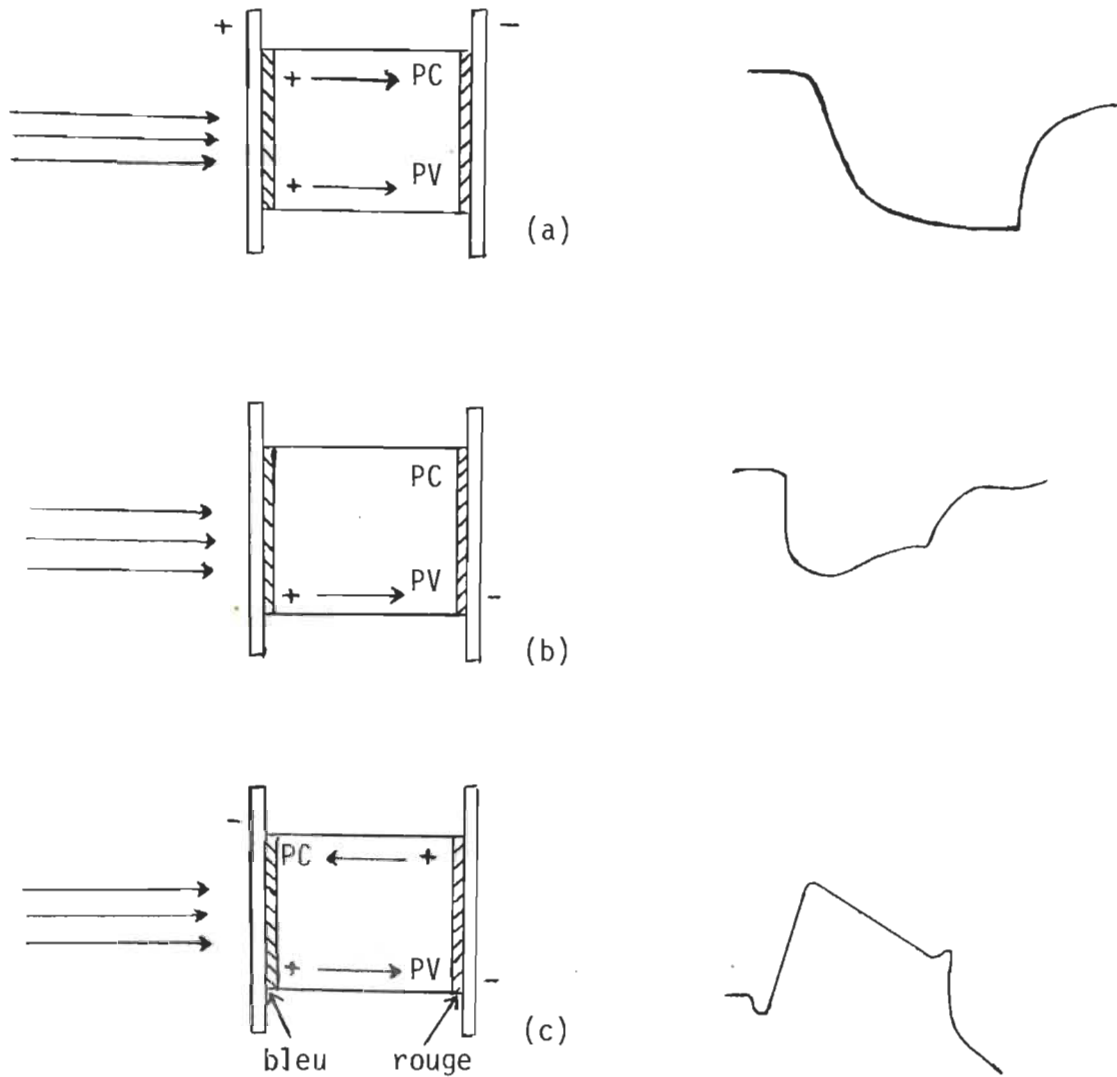


Fig. 10. Diagramme illustrant les deux processus photiques: photoconduction et effets photovoltaïques. Les deux peuvent se superposer pour donner une courbe de courant monophasique où les deux courants s'ajoutent en phase (a); ou une courbe de courant diphasique avec les deux courants en opposition de phase (c) [Rosenberg (1962)]

Appendice A

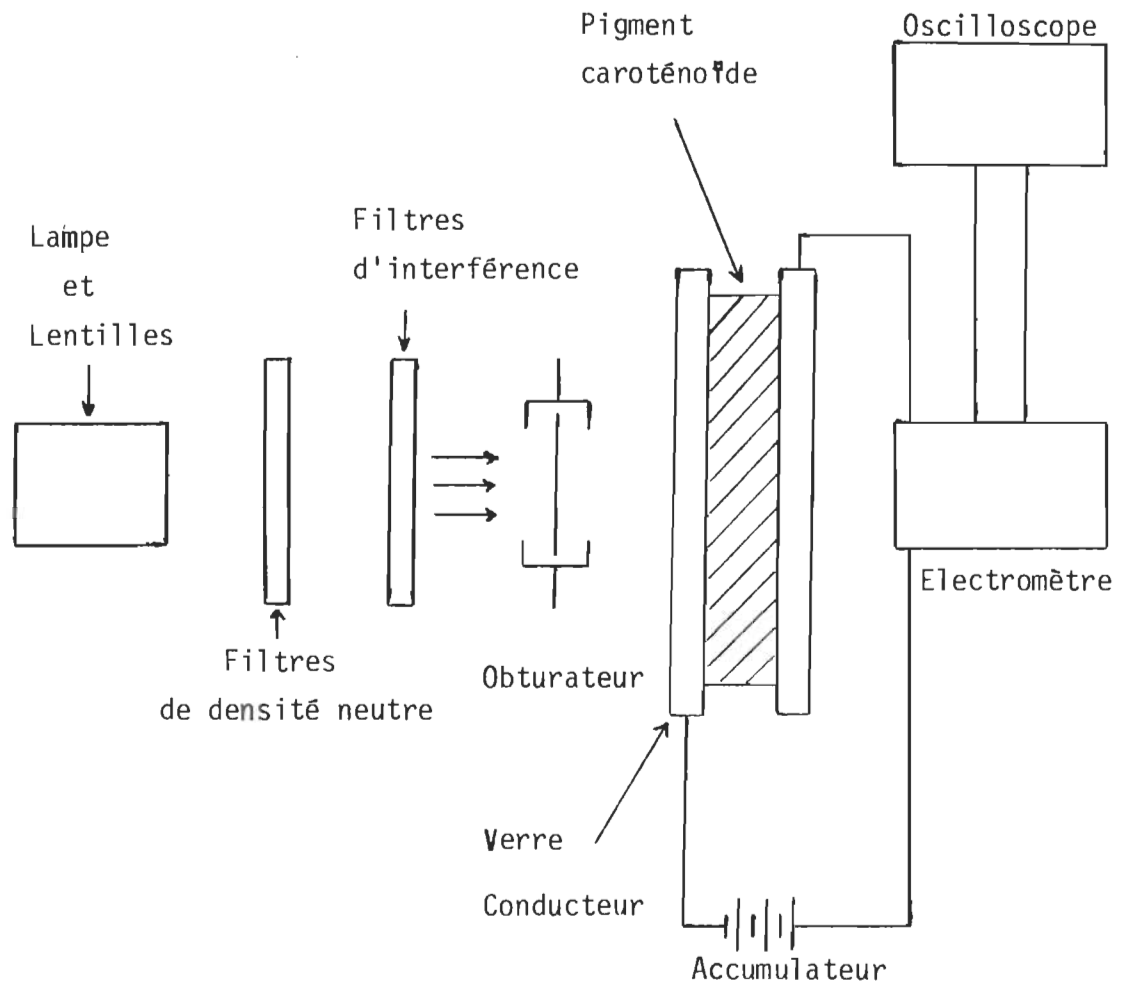


Schéma - 5 . Appareil de mesure de photoconduction

APPENDICE A

Calcul du facteur de gain: [Rosenberg (1966)]

Une substance photoconductrice est introduite entre deux électrodes séparées par une distance L , et de section unitaire.

Si le matériel est irradié par une lumière qui génère un montant F de porteurs de charges libres par seconde, alors, le nombre de charges serait:

$$n = Ft \quad (1)$$

t = temps de vie du porteur de charge libre

Le photocourant I sera donné par l'expression:

$$I = \frac{ne}{Tr} \quad (2)$$

Tr = temps de transit du porteur de charges

entre les deux électrodes.

$$Tr = \frac{L}{v} \quad (3)$$

v = vitesse du porteur de charges

$$v = \mu f \quad (4)$$

μ = mobilité du porteur de charges

f = force du champ

$$f = \frac{V}{L} \quad (5)$$

V = différence de potentiel

Ainsi,

$$Tr = \frac{L^2}{\mu V} \quad (6)$$

En combinant les relations (2) et (6), on obtient:

$$I = \frac{eFt}{Tr} \quad (7)$$

Si chaque photon absorbé fait traverser le champ à un électron, alors:

$$I = eF \quad (8)$$

En comparant les relations (7) et (8), on s'aperçoit que le nombre d'électrons traversant le circuit est plus grand que celui des photons absorbés, d'un facteur égal à $\frac{t}{Tr}$ qui est le facteur de gain.

Appliquons ces résultats à l'organisme animal.

Rosenberg considère que:

- la longueur d'un segment est de 20 nm
- le voltage, soit le potentiel de la membrane est 100 mV
- la mobilité des porteurs de charges = $1 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (c'est la valeur trouvée pour l'antracène).
- le temps de vie des porteurs de charges = 10^{-1} s (par supposition, mais conformément à ce à quoi on s'attend généralement, soit un intervalle de 10^{-3} à 10 s)

Dans ces conditions, le facteur de gain est de 10^4 , tel que relaté plus haut.

APPENDICE B

Système à faible pression de surface

Ce système fonctionne sur le même principe que le système de Langmuir décrit précédemment. Il en diffère cependant par son "unité de mesure" de la pression de surface, sur lequel nous allons élaborer ici.

Le flotteur, comme dans l'autre cas, est rattaché aux parois du bain par deux feuilles d'or. Mais, il est aussi solidaire d'un bras métallique terminé en fourchette de trois dents (schéma 6, p. 101) dont la centrale communique avec un détecteur.

Le détecteur est logé dans un boîtier. Il comprend une source de lumière de 12 volts, fonctionnant avec une alimentation stabilisée de 10 volts. Deux fibres optiques collées ensemble et dans le même axe, conduisent à des phototransistors Darlington (à gain élevé). La tige centrale est rattachée au fil de torsion et conduit au flotteur. Elle est placée entre la lampe et les fibres optiques. Celles-ci sont sensibles seulement à la lumière pouvant les atteindre. Ainsi, lorsque la tige, de diamètre égal à celui d'une fibre optique, est placée au centre des deux fibres, les phototransistors reçoivent la même quantité de quanta de lumière et nous obtenons le zéro. Le moindre déplacement de la tige entraîne une augmentation de l'intensité lumineuse sur le phototransistor correspondant à la fibre dégagée, et une diminution proportionnelle dans l'autre. Un courant

électrique est généré, proportionnel au nombre de photons qu'elles ont reçus, et amplifié par un système d'amplification (schéma 7, p. 102). Notons que nous pouvons amplifier 10 ou 100 fois, le signal des phototransistors.

Et comme toujours, avant l'usage, nous procédons à l'étalonnage du système, et cela, au niveau des phototransistors.

Nous obtenons une sensibilité de $0,143 \text{ dyne. cm}^{-1} \text{ volt}^{-1}$, ce qui nous permet de prendre des mesures de pression de surface de 0,001 à $0,222 \text{ dyne. cm}^{-1}$ avec une précision de $0,0005 \text{ dyne. cm}^{-1}$, et ceci avec un fil de torsion (38 BSG) de 0,015 cm de diamètre.

APPENDICE B

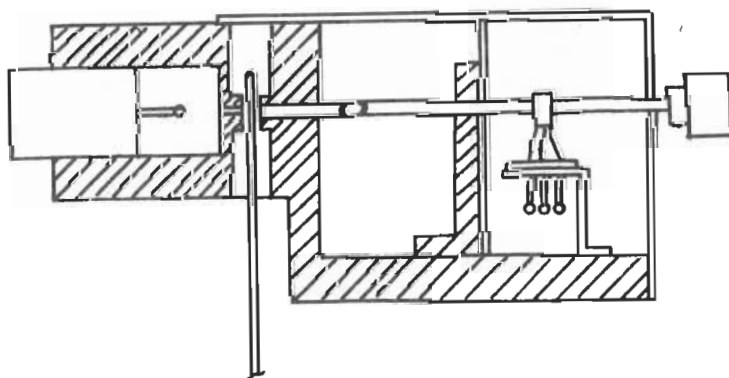
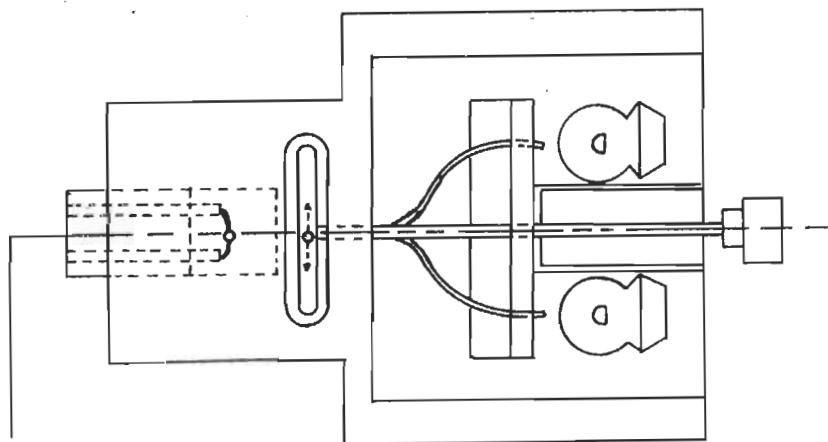


Schéma 6. Plan du montage mécanique du système à faible pression de surface

APPENDICE B

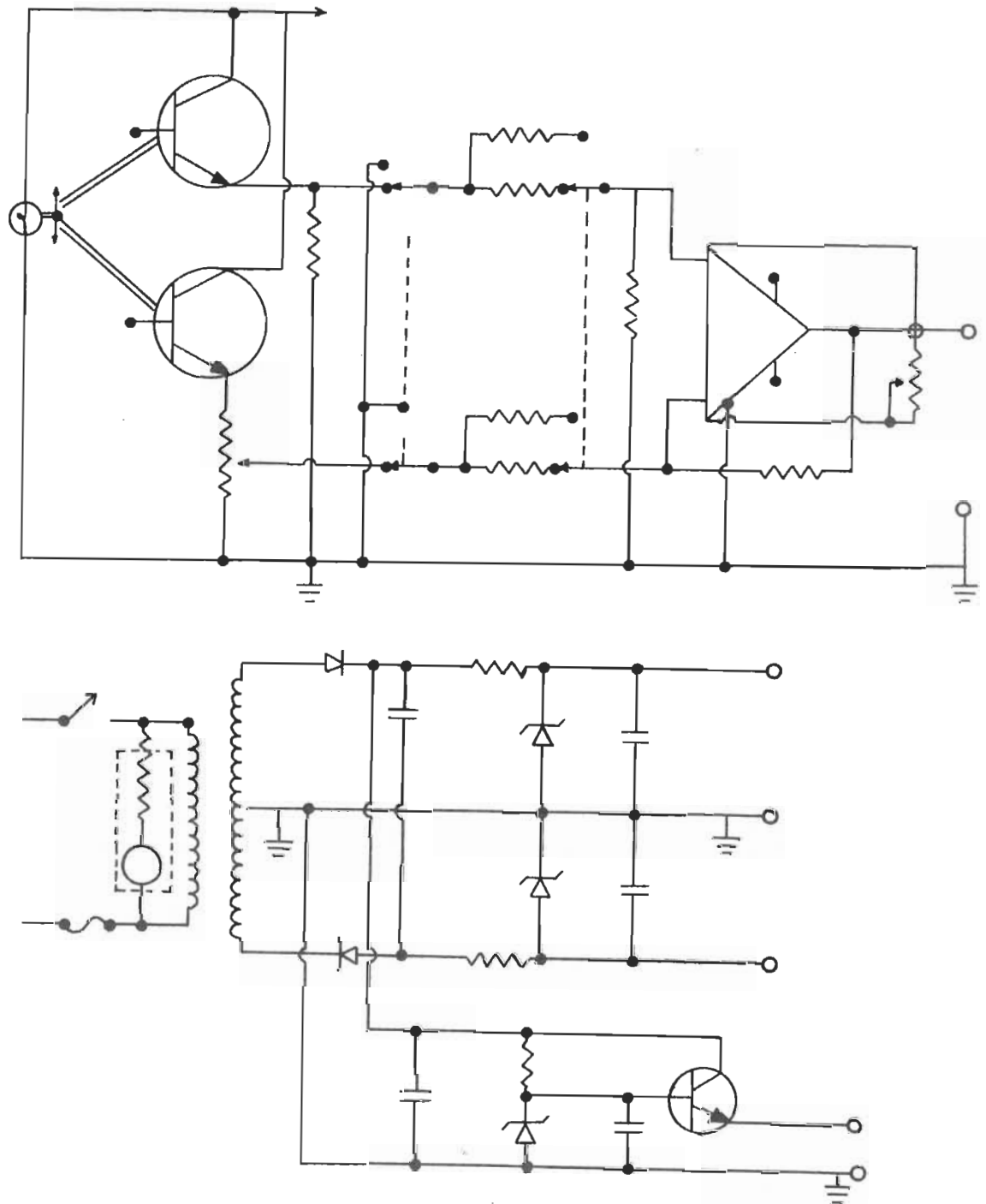


Schéma 7. Plan du circuit électrique du système à faible pression de surface

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAHAMSON, E.W., MARQUISE, J., ROUBIE, J. et GAVUZZI, P. (1960).
Flash protolysis of visual pigments. *Z. Electrochem.* 64, 177-80.
- ABRAHAMSON, E.W. et DAWSON, W. (1962). Population and decay of the
lowest state in polyenes with conjugated heteroatom: retinene.
J. Phys. Chem. 66, 2542-47.
- ABRAHAMSON, E.W. (1966). Protein configuration changes in the photo-
lysis of rhodopsin; II. The sequence of intermediate in thermal
decay of cattle metarhodopsin in vitro. *Biochim. Biophys.*
Acta 112, 265-77.
- ABRAHAMSON, E.W. et OSTROY, S.E. (1967). The photochemical and
macromolecular aspects of vision. *Progr. Biophys. Molec. Biol.*
17, 179-215.
- AKHTAR, M. BLOSSE, P.T. et DEWHURST, P.B. (1968). Studies on vision.
Nature of the retinal - opsin linkage. *Biochem. J.* 110 (4), 693-702.
- AZUMA, K. et KAGAKI, M. (1966). Rhodopsin film at air-water interface.
Ann. Rep. Biol. Works 14, 73-81.
- BENSASSON, R., LAND, E.J. et TRUSCOTT, T.G. (1973). The triplet state
of retinal: is it involved in vision? *Photochem. Photobiol.*
17, 53-55.
- BLASIE, J.K., WORTHINGTON, C.R. et DEWEY, M.M. (1969 a). Planar liquid-
like arrangement of photopigment molecules in frog retinal receptor
disk membranes. *J. Molec. Biol.* 39, 407-16.

- BLASIE, J.K. et WORTHINGTON, C.R. (1969 b). Molecular localization of frog retinal receptor photopigment by electron microscopy and low-angle X-ray diffraction. *J. Molec. Biol.* 39, 417-39.
- BLAUROCK, A.E. et WILKINS, M.H.F. (1969). X-ray diffraction analysis defines the spacings of membranes in retinal rod outer segments, and begins to suggest how rhodopsin molecules are arranged in the membranes. *Nature* 223, 906-9.
- BONTING, S.L. et BANGHAM, A.D. (1967). On the biochemical mechanism of the visual process. *Exp. Eye Res.* 6, 400-13.
- BONTING, S.L. et DAEMEN, F.J.M. (1969). Internal protonation in retinylidene phosphatidylethanolamine and the red shift in rhodopsin. *Nature* 222 (5196), 879-81.
- BOWNESS, J.M. (1959). Purification of rhodopsin using columns containing calcium triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 31, 305-10.
- BRIDGES, C.D.B. (1970). Molar absorbance coefficient of rhodopsin. *Nature (London)* 227, 1258-9.
- BRIDGES, C.D.B. (1971). The molar absorbance coefficient of rhodopsin. *Vision Res.* 11, 841-8.
- BRODY, S.S. (1973). Reactions of retinals in a model membrane system. *Z. Naturforsch.* 28 c, (Heft $\frac{3}{4}$), 157-64.
- BULL, H.B. (1958). Determination of molecular weights of proteins in spread monolayers. *J. Biol. Chem.* 185, 27-38.
- CADENHEAD, D.A. et CSONKA, J.E. (1970). The influence of ethanol on both condensed and expanded monomolecular films at the air-water interface. *J. Coll. and Interf. Sci.* 33 (1), 188-91.

- CASILLA, R., COOPER, W.D. et ELEY, D.D. (1973). Temperature effect on stearic acid monolayers on water. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* 69, 257-62.
- CAVANAGH, H.E. et WALD, G. (1969). Purification and partial characterization of bovine visual pigment protein. *Fedn.Proc., Fedn.Am. Socs. Exp. Biol.* 28, 344.
- CERVETTO, L. (1973). Influence of sodium, potassium and chloride ions on intracellular responses to turtle photoreceptor. *Nature* 241 (5389), 401-3.
- CHABRE, M., CAVAGGIONI, A., OSBORNE, H.B. et GULIK-KRZYWIKI, T. (1972). A rhodopsin - lipid - water lamellar system: its characterization by X-ray diffraction and electron microscopy. *FEBS Lett.* 26 (1), 197-202.
- CONE, R.A. (1972). Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. *Nature (New Biol.)* 236, 39-43.
- CONE, R.A. (1973). The internal transmitter model for visual excitation: some quantitative implications. *Biochem. Physiol. Visual Pigments*. p. 275-82. Edit. Langer, H., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- DAEMEN, F.J.M. et BONTING, S.L. (1969). Biochemical aspects of the visual process. IV. Aldehydes and cation permeability of artificial phospholipid micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 183, 90-7.
- DAEMEN, F.J.M., BORGGREVEN, J.M.P.M. et BONTING, S.L. (1970). Molar absorbance of cattle rhodopsin. *Nature (London)* 227 (5264), 1259-60.
- DAEMEN, F.J.M., JANSEN, P.A.A. et BONTING, S.L. (1971). Biochemical aspects of the visual process. XIV. The binding site of retinaldehyde in rhodopsin studied with model aldimines. *Arch. Biochem. Biophys.* 145 (1), 300-9.

- DAEMEN, F.J.M., DE GRIP, W.J. et JANSEN, P.A.A. (1972). Biochemical aspects of the visual process. XX. Molecular weight of rhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* 271 (2), 419-28.
- DARTNALL, H.J.A. (1957). The visual pigments. Methuen & Co., Ltd London; John Wiley & Son Inc., New York.
- DARTNALL, H.J.A. (1968). The photosensitivities of visual pigments in the presence of hydroxylamine. *Vision Res.* 8, 339-58.
- DAVIE, E.W. et RATNOFF, O.D. (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science (New York)* 145, 1310-11.
- DE GRIP, W.J., DAEMEN, F.J.M. et BONTING, S.L. (1972). Biochemical aspects of the visual process. XVIII. Enrichment of rhodopsin in rod outer segment membrane preparations. *Vision Res.* 12 (10), 1697-1707.
- DE GRIP, W.J., BONTING, S.L. et DAEMEN, F.J.M. (1973). The binding site of retinaldehyde in cattle rhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* 303, 189-93.
- DE PONT, J.J.H.H.M., DUNCAN, G. et BONTING, S.L. (1971). Biochemical aspects of the visual process. XI. Light stimulated ion movements in the retina of the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Pfluger's Arch.* 322, 278-86.
- DUNCAN, G., DAEMEN, F.J.M. et BONTING, S.L. (1969). Light stimulated ion movements in frog rod outer segments. *Fedn. Proc., Fedn. Am. Socs Exp. Biol.* 28, 331.
- EBREY, T.G. (1971). The use of Ammonyx L0 in the purification of rhodopsin and rod outer segments. *Vision Res:* 11, 1007-9.
- FUTTERMAN, S. et SASLAW, L.D. (1961). The estimation of vitamin A aldehyde with thiobarbituric acid. *J. Biol. Chem.* 236, 1652-7.

- GAINES, G.L. Jr. (1966). Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. Interscience Publishers, New-York.
- GIULIO, L. (1973). Early receptor potentials. Atti Della "Fondazione Giorgio Ronchi". Anno XXVIII (1), 1-13.
- HAGINS, W.A. (1972). The visual process: excitatory mechanisms in the primary receptor cells. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1, 131-57.
- HALL, O.M. (1970). Linkage of retinal to opsin and absence of phospholipids in purified frog visual pigment 500. Nature 225 (5233), 637-8.
- HALL, O.M. (1971). Linkage of retinal to opsin. Nature (New Biol.) 229 (8), 249-50.
- HAM, W.A. (1969). Afferent nerve endings and organs of special sense: the eye. Histology, 973-1001. Edit. Lippincott, J.B. Co., U.S.A.
- HELLER, J. (1968). Structure of visual pigment. 1 : purification, molecular weight and composition of bovine visual pigment 500. Biochemistry 7, 2906-13.
- HENSELMAN, R.A. et CUSANOVICH, M.A. (1974). The characterization of sodium cholate solubilized rhodopsin. Biochemistry 13 (25), 5199-5203.
- HOLLOWAY, P.W. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. Anal. Biochem. 53, 304-8.
- HONYO, I. (1972). Primary processes in vision. Aspect cell. Physiol. 191-207.
- HOTCHANDANI, S., LEBLANC, R.M. et BOUCHER, F. (1975 a). Monolayer studies of retinyl polyene. I. Spectroscopic properties. Vision Res. 15, 605-11.
- HOTCHANDANI, S., KOSSI, C.N. et LEBLANC, R.M. (1975 b). Monolayer studies of visual pigments. Vision In Fishes, New Approaches To Research,

- NATO Adv. Stud. Inst. Ser., Ser. A, p. 27-32. Edit. Ali, M.A., Plenum Press, New York and London.
- HUBBARD, R. (1953-54). The molecular weight of rhodopsin and nature of the rhodopsin-digitonin complex. *J. Gen. Physiol.* 37, 381.
- HUBBARD, R., BOWND, D. et YOSHIZAWA, T. (1965). The chemistry of visual photoreceptors. *Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 30, 301-15.
- HYONO, A., KURIYAMA, S. TSUJI, K. et HOSOYA, Y. (1962). Monolayer film of rhodopsin at the air/water interface. *Nature* 193 (4 816), 679-80.
- KROPF, A. et HUBBARD, R. (1958). The mechanism of bleaching rhodopsin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 74, 266-80.
- KROPF, A. et HUBBARD, R. (1970). The photoisomerization of retinal. *Photochem. Photobiol.* 12, 249-50.
- LEBLANC, R.M. et ORGER, B. (1970). An evaluation of monolayer techniques in this laboratory, using a Langmuir type surface pressure balance. Res. Rep. (Unpublished).
- LEWIS, M.S., KRIEG, L.C. et KIRK, W.D. (1974). Molecular weight and detergent binding of bovine rhodopsin. *Exp. Eye Res.* 18, 29-40.
- LIEBMAN, P.A. et ENTINE, G. (1974). Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membrane. *Science* 185, 457-9.
- LYTHGOE, J.N. et QUILLIAM, J.P. (1938). The relation of transient orange to visual purple and indicator yellow. *J. Physiol.* 94, 339.
- MACFARLANE, R.G. (1964). Hematology and enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature (London)* 202, 498-9.

- MATHEWS, R.G., HUBBARD, R., BROWN, P.K. et WALD, G. (1963). Tautomeric forms of metarhodopsin. *J. Gen. Physiol.* 47, 215-40.
- MORTON, R.A. et PITT, G.A.J. (1955). Studies on rhodopsin: 9: pH and the hydrolysis of indicator yellow. *Biochem. J.* 59, 128-34.
- NUTTING, G.C. et HARKINS, W.D. (1939). Pressure area relations of fatty acid and alcohol monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 1180-7.
- OSBORNE, H.B., SARDET, C. et HELENIUS, A. (1974). Bovine rhodopsin: characterization of the complex formed with Triton X-100. *Eur. J. Biochem.* 44, 383-90.
- PATIT, G.S. et MATHEWS, R.H. (1973). Effect of ionization and cation selectivity on the expansion of stearic acid monolayer. *J. Lipid Res.* 13, 574-9.
- PLATT, J.R. et HUBBARD, R. (1959). Carotene - donor - acceptor complexes in photosynthesis. *Science* 129, 372-4.
- POINCELOT, R.P. et ABRAHAMSON, E.W. (1970). Phospholipid composition and extractability of bovine rod outer segments and rhodopsin micelles. *Biochemistry* 9 (8), 1820-5.
- POO, M.M. et CONE, R.A. (1973). Lateral diffusion of rhodopsin in Necturus rods. *Exp. Eye Res.* 17, 503-10.
- POO, M.M. et CONE, R.A. (1974). Lateral diffusion in the photoreceptor membrane. *Nature* 247, 438-41.
- ROSENBERG, B. (1962). Electronic charge transport in carotenoid pigments and a primitive theory of the electroretinogram. *Photochem. Photobiol.* 1, 117-29.

- ROSENGERG, B. (1966). A physical approach to the visual receptor process. Advances in Radiation Biol., Vol. II, p. 193-241
New York Acad. Press.
- ROSENFELD, T., ALCHALEL, A. et OTTOLENGHI, M. (1974). On the role of the triplet state in the photoisomerization of retinal isomers. J. Phys. Chem. 78, 336-41.
- SHARP, J.H. et SCHNEIDER, W.G. (1964). Photoconduction in anthracene induced by triplet excitons. J. Chem. Phys. 41, 3657.
- SHICHI, H., LEWIS, S.M., IRREVERE, F. et STONE, A.L. (1969). Biochemistry of visual pigments. Purification and properties of bovine rhodopsin. J. Biol. Chem. 244 (3), 529-36.
- SHICHI, H. (1970). Spectrum and purity of bovine rhodopsin. Biochemistry 9, 1973-77.
- SHIELDS, J.E., DINOVO, E.C., HENRIKSEN, R.A., KIMBEL Jr., R.L. et MILLAR, P.G. (1967). The purification and amino acid composition of bovine rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta 147, 238-51.
- SJÖSTRAND, F.S. (1953). The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. J. Cell. Comp. Physiol. 42, 15.
- SUNDARALINGAM, M. et BEDDEL, C. (1972). Structures of the visual chromophores and related pigments: a conformational basis of visual excitation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69 (6), 1569-73.
- TATSUO, S., MICHIO, S., KATSU, A., MASAMI, A., YOSHIRO, S. et YUJI, K. (1973). Studies on cephalopod rhodopsin. Conformational changes in chromophore and protein during the photoregeneration process. Biochim. Biophys. Acta 333, 149-60.

- TRURNIT, H.J. (1960). A theory and method for the spreading of protein monolayers. *J. Colloid Sci.* 15, 1-13.
- VERMA, S.P., SCHNEIDER, H. et SMITH, I.C.P. (1974). Effects of visual pigments on the organization of phospholipid multilayer model membranes. A spin probe study. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 48-55.
- WALD, G, DURELL, J. et St.GEORGE, R.C.C. (1950). The light reaction in the bleaching of rhodopsin. *Science* 111, 179.
- WALD, G. et BROWN, P.K. (1953-54). The molar extinction of rhodopsin. *J. Gen. Physiol.* 37, 189-200.
- WALD, G. (1956). The biochemistry of visual pigments. Enzymes: Units of Biol. Struct. Funct. p. 355, Edit. Gaebler, O.H., New York Acad., N.Y.
- WALD, G., BROWN, P.K. et GIBBONS, I.R. (1962). Visual excitation: a chemo-anatomical study. *Symp. of the Soc.: Exp. Biol. XVI (Biological receptor mechanisms)* 32-57.
- WALD, G. (1968). The molecular basis of visual excitation. *Les Prix Nobel en 1967. Nobel Foundation, Stockholm 260. Science (Washington)* 162, 230-9.
- WALEH, A. et INGRAHAM, L.L. (1973). Molecular orbital study of the protein-controlled bathochromic shift in a model of rhodopsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 156 (1), 261-6.
- WILLIS, R.F. (1971). Surface pressure and surface potential measurements of polydimethylsiloxane substituted undecanoic acids on aqueous surfaces. *J. Coll. Interf. Sci.* 35, 1-15.

- WOLKEN, J.J. (1963). Structure and molecular organization of retinal photoreceptors. *J. Opt. Soc. Am.* 53, 1-19.
- WORTHINGTON, C.R. (1971). Physiology of photoreceptors. Structure of photoreceptor membranes. *Fedn. Proc., Fedn. Am. Socs. Exp. Biol.* 30 (1), 57-63.
- WORTHINGTON, C.R. (1973). X-ray analysis of retinal photoreceptor structure. *Exp. Eye Res.* 17, 487-501.
- WU, C.-W. et STRYER, L. (1972). Proximity relationships in rhodopsin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 69, 1104-8.
- YASUAKI, M. et TOSHIZO, I. (1967). Monolayer films of retinal and the effects of light on them. *Nature* 215, 765-6.
- ZECHMEISTER, L. (1962). Cis-Trans Isomeric Caratenoids, Vitamin A and Arylpolyenes Springer-Verlag, Vienna.
- ZORN, M. et FUTTERMAN, S. (1971). Properties of rhodopsin dependent on associated phospholipid. *J. Biol. Chem.* 246 (4), 381-6.
- ZORN, M. et FUTTERMAN, S. (1973). Extraction, regeneration after bleaching, and ion-exchange chromatography of rhodopsin in Tween 80. *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 91-99.