

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE DU  
DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR  
SONYA GRENIER

STRUCTURE ET FONCTION DE LA SOUS-UNITÉ ALPHA DE LA  
PROTÉINE G DES SEGMENTS EXTERNES DES BÂTONNETS RÉTINIENS:  
INTERACTION AVEC DES MEMBRANES MODÈLES ET TENTATIVES DE  
CRISTALLISATION EN DEUX DIMENSIONS

JUIN 1998

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

à mon frère,  
à sa créativité.

## REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit de plusieurs années de recherche. Au cours de ce cheminement, plusieurs personnes ont contribué de façon significative à cette réalisation. Je prends ici quelques lignes pour souligner leur apport.

Mes remerciements s'adressent d'abord à mon directeur de thèse, le Dr Christian Salesse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de travailler sur la structure et la fonction de la G $\alpha$ . Ma passion pour ce sujet n'a fait qu'augmenter au cours de la réalisation de ce doctorat. Je le remercie aussi de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé la liberté de prendre de nouvelles initiatives, ainsi que pour son support.

Je remercie aussi François Boucher dont les implications et les conseils m'ont été très bénéfiques. À titre de collaborateurs, j'aimerais également remercier le Dr Akio Yamazaki, le Dr Luc Lebeau et le Dr Patrick Schlutz pour m'avoir permis de tirer profit de leur expérience qui fut des plus formatrices.

Ma reconnaissance est également destinée à mes compagnons de laboratoire qui ont aussi été omniprésents dans cette aventure. Judith, Patrick, Michèle, Philippe, Nathalie, Mario, Stéphanie, Hugo, Céline et Philippe pour les échanges scientifiques stimulants et les très agréables moments "culturels" passés en leur compagnie. Je voudrais particulièrement souligner la gentillesse de Stéphane Vincent qui a donné à ce stage France-Québec un aspect scientifique et social des plus stimulants et enrichissants.

Merci également au Fonds d'intervention spéciale de l'UQTR pour la confiance qu'ils m'ont témoignée par leur soutien financier.

Un merci bien spécial à Ashim Dutta avec qui les conversations scientifiques ont été des plus enrichissantes et formatrices. En plus de partager des connaissances scientifiques de haut niveau avec ce dernier, j'ai eu la chance de développer une très belle amitié avec lui et sa famille.

L'amitié est un cadeau précieux et je tiens à remercier très spécialement Michelle Bernier, pour sa présence de tous les moments. Son aide, sa compréhension et sa parfaite complicité se sont traduites par un partage sans limite tant sur le plan humain que scientifique.

Toute ma gratitude envers Alain, pour les encouragements soutenus et la grande confiance qu'il m'a démontrée. Nos nombreuses discussions scientifiques ainsi que sa rigueur, son intégrité et sa passion pour la science m'ont très souvent inspirée.

Aux membres de ma famille, pour avoir respecté mon choix d'étudier si longtemps et pour m'avoir soutenue chacun à leur manière dans ce choix. Merci aussi à Léa pour ta compréhension et ton aide.

Je tiens à adresser mon merci de la fin, un merci dessert, à Mario, mon compagnon de vie. Merci pour ton support constant, ton écoute, ta très grande compréhension, ta confiance et ton implication scientifique et humaine à tous les niveaux de cette thèse. Ta présence dans ma vie catalyse mon arrivée à bon port.

## RÉSUMÉ

Les cellules communiquent entre elles par l'intermédiaire de molécules telles que les neurotransmetteurs et les hormones et, avec l'extérieur, par des stimuli aussi variés que la lumière et les molécules odorantes. Ces molécules stimulent un récepteur de façon spécifique, puis le signal est ensuite amplifié par un transducteur. Il est maintenant bien connu qu'un grand nombre de protéines G hétérotrimériques assurent la transduction des messages hormonaux et sensoriels. Elles agissent comme des commutateurs moléculaires oscillant entre deux états, actif et inactif, selon qu'elles lient ou hydrolysent le GTP. Il est donc important de mieux comprendre leur mécanisme d'action, car ce dernier a un effet sur toute la cellule.

Dans le processus visuel, la sous-unité alpha de la protéine G ( $G\alpha$ ) joue un rôle clef en régulant une séquence d'événements biochimiques et électrophysiologiques. Elle module la vitesse du processus de transduction visuelle. Deux modèles ont été postulés pour expliquer le mode d'action de la protéine  $G\alpha$  des cellules photoréceptrices. L'un proposant que la  $G\alpha$  voyage par le biais du cytoplasme pour activer son effecteur qui est ici la phosphodiesterase  $GMPc$  dépendante, et l'autre proposant que la  $G\alpha$  voyagerait par diffusion latérale dans la membrane. Au cours de ce projet de recherche, nous avons tenté de déterminer lequel de ces modèles était valable.

Par des mesures d'augmentation de l'aire moléculaire de monocouches de phospholipides en présence de  $G\alpha$ , nous avons montré que les formes

active ( $G\alpha$ -GTP) et inactive ( $G\alpha$ -GDP) de la  $G\alpha$  interagissent avec ces lipides, ce qui nous a permis de suggérer que la  $G\alpha$  interagit avec la membrane visuelle. Cette interaction avec la membrane dépend de la composition lipidique de la membrane et de la concentration en NaCl du milieu. Par spectroscopie de fluorescence, nous avons mesuré l'atténuation de la fluorescence intrinsèque de la  $G\alpha$  par des lipides bromés et démontré que la  $G\alpha$  interagit avec les membranes. La  $G\alpha$  active ( $G\alpha$ -GTP) pénètre la membrane d'au moins 6.5 Å. Ces résultats sont nouveaux et en faveur du mécanisme de diffusion latérale de la  $G\alpha$  dans les membranes pour activer la phosphodiesterase.

Nous avons aussi développé une autre méthode pour mesurer la profondeur de pénétration de protéines dans les membranes. Cette méthode repose sur l'utilisation de lipides doxylés comme atténuateurs de fluorescence intrinsèque des protéines et possède donc l'avantage de ne requérir que 5 % de ces lipides. Il est donc possible de préparer des membranes modèles dont 95 % des lipides sont les lipides que l'on retrouve dans les membranes de la cellule étudiée.

Enfin, nous avons tenté de cristalliser la  $G\alpha$  en deux dimensions afin d'avoir des informations sur sa structure lorsque cette dernière interagit avec des lipides. Les cristaux de  $G\alpha$  et de  $G\alpha\beta\gamma$  obtenus étaient cependant trop peu nombreux pour que nous puissions les utiliser pour déterminer la structure de ces protéines.

## CONTRIBUTION DES COAUTEURS DES ARTICLES DE CETTE THÈSE

Outre l'introduction et la conclusion, trois des quatre chapitres de cette thèse sont présentés sous forme d'articles. Bien que je sois première auteure de chacun d'entre eux, les correcteurs sont en droit de se demander quelle est la part du travail que j'ai effectuée dans ces articles. D'ailleurs, il est de plus en plus fréquent que l'on indique, en pourcentage, la contribution de chacun des auteurs de l'article. Comme ce n'est pas le cas pour les articles présentés dans cette thèse, j'apporterai ici les informations nécessaires. Pour plus de précisions, je décrirai la part du travail que j'ai effectuée plutôt que d'y attribuer un pourcentage. Vous pourrez alors vous-mêmes juger de ma contribution à ces articles.

### Chapitre 2

J'ai planifié et exécuté toutes les expériences réalisées pour cet article à l'exception d'une seule. En effet, l'expérience menant aux résultats de la figure 2.3 fut réalisée en majeure partie par Patrick Lagüe qui était alors étudiant d'été au laboratoire du Dr Salesse. Par contre, personne d'autre que moi, dans toutes les expériences de cette thèse, n'a manipulé la protéine Gt qui, dans le cas de la figure 2.3, a été injectée dans la sous-phase. J'avais, au préalable, extrait et purifié ladite protéine Gt $\alpha$ . J'ai ensuite traité et interprété les résultats, puis je les ai présentés sous forme finale pour publication. C'est cependant mon directeur de thèse qui a ensuite écrit cet article.



### Chapitre 3

J'ai planifié et exécuté les expériences pour cet article. Toutefois, Philippe Desmeules qui était alors étudiant d'été a contribué à la réalisation d'environ 30 % des expériences exécutées. Ashim Dutta a apporté son aide au niveau théorique quant à l'estimation de la profondeur de pénétration de la  $G\alpha$  dans les membranes. Il m'a aidée à faire les simulations qui ont produit la figure 3.3. Enfin, Akio Yamazaki nous a fourni une partie de la protéine G utilisée pour ces expériences. J'ai compilé les résultats et rédigé l'article récemment paru dans la revue *Biochimica et Biophysica Acta*.

### Chapitre 4

Pour cet article, j'ai également planifié et réalisé toutes les expériences nécessaires. J'ai aussi compilé et interprété les résultats puis j'ai rédigé l'article. Une fois de plus, Ashim Dutta a apporté son aide sur le plan théorique quant à l'estimation de la profondeur de pénétration du doxyl dans les membranes au niveau des simulations, ce qui a permis de produire la figure 4.10.

## TABLE DES MATIÈRES

<i>Remerciements</i> .....	i
<i>Résumé</i> .....	iii
<i>Contribution des coauteurs des articles de cette thèse</i> .....	v
<i>Table des matières</i> .....	vii
<i>Liste des schémas</i> .....	xii
<i>Liste des tableaux</i> .....	xiii
<i>Liste des figures</i> .....	xv
<i>Liste des abréviations</i> .....	xvii

### CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1 L'oeil .....	3
1.2 La rétine .....	3
1.3 Les photorécepteurs .....	7
1.4 Mécanisme d'activation du processus visuel .....	9
1.4.1 La rhodopsine .....	11
1.4.2 La protéine G des photorécepteurs visuels .....	13
1.4.2.1 La fonction de la protéine Gt .....	14
1.4.2.2 La structure de la protéine Gt .....	19
1.4.3 La phosphodiesterase GMPc dépendante .....	21
1.4.4 Les canaux ioniques .....	25
1.5 Mécanisme d'inactivation du processus visuel .....	27

1.5.1 Inhibition de la rhodopsine par la rhodopsine kinase et l'arrestine .....	28
1.5.2 Inhibition de la Gt .....	29
1.5.3 Inhibition de la PDE .....	31
1.5.4 Rôle de la phosducine dans l'activité de la Gt et de la PDE .....	31
1.5.5 Synthèse du GMPc par la guanylate cyclase .....	32
1.5.6 Rôles possibles de la recoverine .....	33
1.5.7 Rôle de la calmoduline dans la modulation de l'activité des canaux sodiques .....	33
1.6 Importance des phospholipides des SEB .....	34
1.7 La spectroscopie de fluorescence .....	37
1.7.1 Fluorescence intrinsèque de la Gt $\alpha$ .....	38
1.7.2 Bases théoriques des techniques de fluorescence utilisées .....	40
1.8 Cristallisation bidimensionnelle de la Gt $\alpha$ .....	44
1.9 Problématique de ce travail de recherche .....	49
1.10 Objectifs de recherche .....	51
1.11 Références .....	53

**CHAPITRE 2 - PHOSPHOLIPID, GTP AND SALT DEPENDENT BINDING OF THE ALPHA  
SUBUNIT OF ROD OUTER SEGMENT G-PROTEIN TRANSDUCIN IN  
MONOLAYERS**

2.1 Abstract .....	80
2.2 Introduction .....	81
2.3 Materials and methods .....	83

2.3.1	Materials .....	83
2.3.2	Purification of ROS and ROS G $\alpha$ -GDP subunit .....	83
2.3.3	Protein binding onto phospholipid monolayers .....	84
2.3.4	Fluorescence microscopy of protein-lipid monolayers .....	85
2.4	Results and discussion .....	86
2.5	Acknowledgements .....	91
2.6	References .....	92

**CHAPITRE 3 - DETERMINATION OF THE DEPTH OF PENETRATION OF THE ALPHA SUBUNIT OF RETINAL G PROTEIN IN MEMBRANES: A SPECTROSCOPIC STUDY**

3.1	Abstract .....	102
3.2	Introduction .....	103
3.3	Materials and methods .....	106
3.4	Results and discussion .....	109
3.5	Acknowledgements .....	115
3.6	References .....	116

**CHAPITRE 4 - EVALUATION OF MEMBRANE PENETRATION DEPTH UTILIZING FLUORESCENCE QUENCHING BY DOXYLATED FATTY ACIDS**

4.1	Abstract .....	125
4.2	Introduction .....	126
4.3	Materials and methods .....	128
4.4	Results and discussion .....	130
4.5	Conclusions .....	142
4.6	Acknowledgements .....	143
4.7	References .....	144

**CHAPITRE 5 - MESURE DE L'AFFINITÉ ENTRE DES ANALOGUES DU GDP ET LA Gt $\alpha$  ET TENTATIVES DE CRISTALLISATION BIDIMENSIONNELLE DE LA Gt**

5.1	Préparation des membranes discales enrichies en Gt $\alpha$ , en R et en PDE .....	162
5.2	Description du test d'affinité entre la Gt et les analogues du GDP .....	164
5.3	Analogues du GDP étudiés par d'autres auteurs .....	165
5.4	Mesure de l'affinité du G-PCC, G-PCP, G-CCP, G-CCC et G-PNP pour la Gt $\alpha$ .....	167
5.5	Analogues du GDP portant un bras espaceur .....	170
	5.5.1 Analogues du GTP et du GDP étudiés par d'autres auteurs .....	172
5.6	Mesure de l'affinité des analogues du GDP portant un bras espaceur pour la Gt $\alpha$ .....	177
5.7	Amélioration possible du test d'affinité relative .....	179
5.8	Utilisation de lipides non spécifiques pour lier et cristalliser la Gt .....	180
5.9	Conditions expérimentales étudiées en vue d'obtenir des cristaux bidimensionnels de Gt à l'aide de lipides non spécifiques .....	183
5.10	Observation de cristaux bidimensionnels de Gt .....	192
5.11	Références .....	198

**CHAPITRE 6 - CONCLUSION**

6.1	Hypothèse proposée pour le mécanisme d'inactivation des SEB .....	205
6.2	Domaines d'interaction de la Gt $\alpha$ avec les membranes: perspectives d'avenir .....	207
6.3	Utilisation de lipides doxylés pour mesurer l'atténuation de fluorescence de la Gt $\alpha$ .....	209
6.4	Cristallisation de la Gt .....	212
6.5	Références .....	215

## LISTE DES SCHÉMAS

1.1	Structure de l'oeil des vertébrés .....	4
1.2	Structure de la rétine .....	5
1.3	Structure du bâtonnet .....	8
1.4	Mécanisme d'activation du processus visuel .....	10
1.5	Structure de la rhodopsine .....	12
1.6	Types d'acides gras servant à acyler la $G\alpha$ .....	16-B
1.7	Modèles postulés pour l'activation de la PDE .....	20
1.8	Structure de la $G\alpha\beta\gamma$ .....	22
1.9	Effet du GMPc sur la perméabilité de la membrane plasmique ....	24
1.10	Modèles postulés pour reformer le complexe $G\alpha\beta\gamma$ .....	30
1.11	Structure de phospholipides .....	36
1.12	Structure de la $G\alpha$ -GTP et de la $G\alpha$ -GDP et position de ses tryptophanes .....	39
1.13	Cristallisation en deux dimensions .....	47
5.1	Analogues du GDP sans bras espaceur .....	160
5.2	Analogues du GDP avec un bras espaceur .....	161
5.3	Structure du GDP et de trois analogues soufrés du GDP .....	166
5.4	Sites potentiels de fonctionnalisation du G-PNP .....	171
5.5	Analogues fonctionnalisés sur le phosphate gamma .....	173
5.6	Analogues fonctionnalisés sur le sucre .....	175
5.7	Analogues fonctionnalisés sur la guanine .....	176
5.8	Lipides non spécifiques utilisés pour cristalliser la $G\alpha$ .....	182
5.9	Technique utilisée pour la cristallisation de protéines en deux dimensions .....	184
6.1	Analogues fluorés G-PXP .....	213

## LISTE DES TABLEAUX

5.1:	Valeurs d'IC50 d'analogues du GDP de la littérature .....	167
5.2:	Géométrie du P-O-P, du P-N-P et du P-C-P .....	170
5.3:	Expérience 1: Effet de mélanges lipidiques, du type de protéine et de la concentration en protéine sur la formation de cristaux .....	185
5.4:	Expériences 2, 3 et 4: Effet du temps d'incubation sur la formation de cristaux .....	186
5.5:	Expériences 5-6: Répétition de l'expérience 1 où l'on a observé la formation de cristaux .....	186
5.6:	Expérience 7: Effet du glutaraldéhyde sur la formation de cristaux .....	187
5.7:	Expériences 8-9: Effet de la concentration en protéine et de la présence de glutaraldéhyde sur la formation de cristaux .....	187
5.8:	Expériences 10-11: Effet de la concentration en NaCl sur la formation de cristaux .....	188
5.9:	Expériences 12-13: Effet du rapport $G\alpha : G\beta\gamma$ et de la concentration en Tris sur la formation de cristaux .....	188
5.10:	Expérience 14: Effet du pH et de la concentration en Tris sur la formation de cristaux .....	189
5.11:	Expériences 15-16: Effet des ions $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Cu^{2+}$ , TMAbu, TMAet sur la formation de cristaux.....	189
5.12:	Expérience 17: Effet du temps d'incubation et de la température sur la formation de cristaux .....	190
5.13:	Expérience 18: Observation de la formation de cristaux de $G\alpha\beta\gamma$ provenant des SEB de grenouille .....	190



5.14:	Expérience 19: Effet de l'incubation de la $G\alpha\beta\gamma$ avec des membranes des SEB sur la formation de cristaux .....	191
5.15:	Expériences 20-21: Effet du type de grille pour prélever la monocouche sur la récolte de cristaux .....	191

## LISTE DES FIGURES

2.1	Models for the activation of phosphodiesterase .....	94
2.2	Binding of $G\alpha$ -GDP onto different phospholipid monolayers.....	95
2.3	Fluorescence micrographs of DPPC monolayers.....	96
2.4	Binding of $G\alpha$ -GDP onto DOPE monolayers .....	97
2.5	Structural model for the binding of $AlF_4^-$ .....	98
2.6	Binding of $G\alpha$ -GDP and $G\alpha$ -GTP onto DOPE monolayers .....	99
3.1	Emission and excitation spectra of $G\alpha$ -GDP + $AlF_x$ and $G\alpha$ -GDP .....	119
3.2	Fluorescence quenching of $G\alpha$ -GDP + $AlF_x$ and $G\alpha$ -GDP .....	120
3.3	Estimation of the distance of separation between the fluorophore and the quencher .....	121
3.4	Anisotropy measurements .....	122
4.1	Molecular structure of D12 and D16 .....	147
4.2	Absorption spectrum of the peptide in methanol and in POPC vesicles .....	148
4.3	Fluorescence spectrum of the peptide in methanol and in POPC vesicles .....	149
4.4	Absorption spectrum of D16 in methanol and in POPC vesicles .....	150
4.5	Excitation spectrum of the peptide in methanol and in POPC vesicles .....	151
4.6	Fluorescence quenching of the tryptophan residue of the peptide in methanol at different concentrations of D16 .....	152
4.7	Electron micrograph of the vesicles recorded after 7 days .....	153
4.8	Stern Volmer plot of $F_0/F$ versus the concentration of acrylamide in buffer .....	154

4.9	Plot of $F_0/F$ versus the concentration of doxylated fatty acids in vesicles .....	155
4.9	Plot of $F_0/F_0-F$ versus the inverse of the concentration of D16 and D12 .....	156
4.10	Plot of $F_0/F$ versus $C_S$ of D16 and D12 in vesicles .....	157
5.1	Affinité des analogues du GDP sans bras espaceur pour la $G\alpha$ .....	168
5.2	Affinité des analogues du GDP avec un bras espaceur pour la $G\alpha$ .....	178
5.3	Structure observée en présence de OOH: DOPS (4:1) et de $G\alpha$ bovine .....	193
5.4	Structure observée de la $G\alpha\beta\gamma$ bovine en présence de OOH : DOTMA (4:1) .....	194
5.5	Structure cristalline tridimensionnelle de la $G\alpha\beta\gamma$ de grenouille en présence de OOH : DOTMA (4:1) .....	195

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA-GTP	P <sup>3</sup> -(4-azidoanilino)-P <sup>1</sup> -5'-GTP
AGPI	acide gras polyinsaturé
BuGDP	N <sup>2</sup> -(p-n-butylphényl)-guanosine-5'-diphosphate
Ca <sup>2+</sup>	ion calcium
dGDP	désoxyguanosine 5'-diphosphate
DOOH	dioléoylalcool
DOTMA	dioléoyl triméthylammonium
DOPC	dioléoyl phosphatidylcholine
DOPE	dioléoyl phosphatidyléthanolamine
DOPS	dioléoyl phosphatidylsérine
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
G-CCC	9-(5'-O-(malonyl)-β-D-ribofuranosyl)-guanine
G-CCP	9-(5'-O-(phosphono-acétyl)-β-D-ribofuranosyl)-guanine
GDP	guanosine-5'-diphosphate
GDP <sup>3</sup> H	guanosine-5'-diphosphate [8,5'- <sup>3</sup> H]
GDP $\alpha$ S	guanosine 5'-O-(1-thiodiphosphate)
GDP $\beta$ S	guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate)
Gi	protéine G associée à l'inhibition de l'adénylate cyclase

GMPc	guanosine-3: 5'-monophosphate cyclique
Go	protéine G associée à la régulation des canaux ioniques
G-PCC	9-(5'-O-((carboxyméthyl)-hydrophosphinyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-guanine
G-PCF <sub>2</sub> P	guanosine 5'-( $\beta$ , $\gamma$ -(difluorométhylène) diphosphate)
G-PCP	9-(5'-O-(méthylène-bisphosphonate)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-guanine
G-PNP	9-(5'-O-(imido-diphosphate)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-guanine
G-PNP3'	9-(5'-O-( $\alpha$ : $\beta$ -imido-diphosphate)-3'-O-propionyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-guanine
G-PPCP	guanosine 5'-(-méthylène) triphosphate
G-PNPN1a	1-N-(2-(2-(2-amino-éthoxy)-éthoxy)-éthyl)-9-(5'-O-( $\alpha$ : $\beta$ -imido-diphosphate)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-guanine
G-PNPN1b	1-((2-éthoxy)-éthyl)-9-(5'-O-( $\alpha$ : $\beta$ -imido-diphosphate)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-guanine
Gs	protéine G associée à la stimulation de l'adénylate cyclase
Gt	protéine G des SEB ou transducine ou T
G $\alpha$	sous-unité alpha de la protéine G des SEB
G $\alpha\beta\gamma$	sous-unités alpha, bêta et gamma de la protéine G des SEB
G $\alpha$ -GDP	G $\alpha$ qui a dans son site actif une molécule de GDP
G $\alpha$ -GTP	G $\alpha$ qui a dans son site actif une molécule de GTP
G $\alpha$ -GTP $\gamma$ S	G $\alpha$ qui a dans son site actif une molécule de GTP $\gamma$ S

Gt $\alpha$ -GDP-AlF $_4^-$	Gt $\alpha$ qui a dans son site actif une molécule de GDP-AlF $_4^-$
Gt $\alpha$ -GDP-Gt $\beta\gamma$	hétérotrimère de Gt ayant dans son site actif un GDP
Gt $\beta\gamma$	sous-unités bêta et gamma de la protéine G des SEB
GTP	guanosine triphosphate
GTP $\gamma$ F	guanosine 5'-O-(3-fluorotriphosphate)
GTP $\gamma$ S	guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
GTP $\gamma^{35}$ S	guanosine-5'-( $\gamma$ -thio)triphosphate [ $^{35}$ S]
InsP $_3$	Inositol 1,4,5-triphosphate
K $^+$	ions potassium
ME-GRP	membranes enrichies en protéine G, en rhodopsine et en phosphodiesterase
Mg $^{2+}$	ion magnésium
MgCl $_2$	chlorure de magnésium
mGTP	2'(3')-O-(N-méthyl)anthraniloyleguanosine 5' triphosphate
mG-PPNP	guanosine 5'-( $\beta$ , $\gamma$ -imido) triphosphate
mG-PPCP	guanosine 5'-( $\beta$ , $\gamma$ -méthylène) triphosphate
MLU	membranes lavées à l'urée
Na $^+$	ion sodium
NaCl	chlorure de sodium
OOH	oléoylalcool

p21 <sup>ras</sup>	produit du gène Ha-ras, petite protéine G
PA	acide phosphatidique
PC	phosphatidylcholine
P-C-P	phosphonates
PDE	phosphodiesterase
PDE $\alpha\beta$	sous-unités alpha et bêta de la phosphodiesterase
PDE $\alpha\beta(\gamma)_2$	sous-unités alpha, bêta et gamma de la phosphodiesterase
PDE $\alpha\beta(\gamma G\alpha)_2$	sous-unités alpha, bêta et gamma de la phosphodiesterase dont les sous-unités gamma sont liées à la G $\alpha$
PDE $\gamma$	sous-unité gamma de la phosphodiesterase
PDE $\gamma$ -G $\alpha$	sous-unité gamma de la phosphodiesterase liée à la G $\alpha$
PE	phosphatidyléthanolamine
PI	phosphatidylinositol
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
P-N-P	imidophosphates
P-O-P	phosphates
PS	phosphatidylsérine
PtdInsP2	phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate
R	rhodopsine

R *	rhodopsine activée
R*-Gt $\alpha$ -GDP	rhodopsine liée à la sous-unité alpha de la protéine G des SEB qui a une molécule de GDP dans son site actif
R*-Gt $\alpha$ -GDP-G $\beta\gamma$	complexe entre la rhodopsine activée et l'hétérotrimère de la protéine G des SEB dont la sous-unité alpha renferme une molécule de GDP dans son site actif
R*-Gt $\alpha$ -vide-G $\beta\gamma$	complexe entre la rhodopsine activée et l'hétérotrimère de la protéine G des SEB dont le site actif de la sous-unité alpha est vide
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS <sup>1</sup>	abréviation anglaise de SEB (rod outer segments)
RPE	épithélium pigmentaire rétinien
SEB	segments externes des bâtonnets
Tris	tris [hydroxyméthyl] aminométhane
VBG-ROS	de l'anglais vortexed buffered gradient of rod outer segments
W	tryptophane

---

<sup>1</sup> Abréviation utilisée au Chapitre 2 seulement.



## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

D'un point de vue biophysique, l'oeil en tant qu'organe présente toutes les qualités d'un instrument optique très performant et d'un tissu neurosensoriel extrêmement sensible (Doly et Meyniel, 1989). C'est au niveau de la rétine, plus spécifiquement par les cellules photoréceptrices de cette dernière, que la lumière est convertie en signal nerveux (Doly et Meyniel, 1989). Cette conversion se fait par l'intermédiaire d'une protéine, la rhodopsine, qui suite à l'absorption d'un photon, devient active et enclenche une cascade de réactions biochimiques. Cette cascade de réactions a la particularité d'amplifier le signal lumineux de 100 000 fois.

Ce travail de recherche porte sur la fonction et la structure de l'une des protéines impliquées dans ce mécanisme, la protéine G, qui est un convertisseur, ou transducteur, impliqué dans l'amplification du signal lumineux. En effet, le mécanisme d'activation visuelle est semblable à celui de nombreux systèmes qui utilisent un transducteur pour amplifier un message hormonal ou sensoriel tel la lumière. Ce mécanisme a été découvert par l'équipe du Dr Martin Rodbell en 1971 qui a montré le rôle crucial d'une protéine G dans la transduction d'un message hormonal (Rodbell et al., 1971). Il

proposa deux concepts majeurs qui lui valurent le prix Nobel de physiologie en 1994 (Rodbell, 1995). Le premier concept stipule que la transduction du signal met en jeu trois composantes, un récepteur qui lie un messager (tel que la lumière dans le cas de la vision) et interagit ensuite avec un transducteur qui peut alors être activé par une molécule de guanosine triphosphate (GTP) et être à son tour en mesure d'activer un effecteur. Le deuxième concept énonce que le transducteur possède une activité GTPase intrinsèque car, lorsqu'il est lié à un analogue non-hydrolysable du GTP, il stimule continuellement l'effecteur en l'absence du récepteur. Plus tard, l'équipe du Dr Alfred Gilman a purifié la protéine G hétérotrimérique couplée au récepteur de l'adrénaline, la Gs (Hepler et Gilman, 1992; Linder et Gilman, 1992; Gilman, 1995). Ceci a valu à M. Gilman de partager le prix Nobel avec M. Rodbell. Depuis, plusieurs protéines G ont été découvertes. On parle maintenant de la superfamille des protéines G. On subdivise cette dernière en trois grandes familles qui possèdent des structures et des rôles différents. D'abord, il y a la famille des facteurs impliqués dans la synthèse de protéines, celle des petites protéines G et celle des protéines G hétérotrimériques.

La protéine G que nous avons étudiée est hétérotrimérique et elle est située dans l'une des cellules photoréceptrices de l'oeil, le bâtonnet. Avant de définir en détail la problématique et les objectifs de ce projet de recherche, nous ferons d'abord un survol des composantes de l'oeil, de la rétine et des photorécepteurs qui nous ont intéressés. Ensuite, nous aborderons les mécanismes d'activation et d'inactivation du processus visuel.

## 1.1 L'oeil

La lumière pénètre dans l'oeil par la cornée, passe au travers de l'humeur aqueuse et de l'ouverture pupillaire de l'iris, pour finalement traverser le cristallin et l'humeur vitrée avant d'atteindre la rétine. Une représentation de la structure de l'oeil est illustrée dans le schéma 1.1. La rétine est un tissu nerveux dont les cellules photoréceptrices sont responsables de l'absorption des photons et de la conversion du signal lumineux en influx nerveux. Pour atteindre les photorécepteurs, la lumière doit d'abord traverser les cellules nerveuses de la rétine (voir schéma 1.2). La lumière résiduelle (celle qui n'est pas absorbée par les photorécepteurs) est absorbée en partie par l'épithélium pigmentaire, qui fait partie de la rétine, et par la choroïde, une couche pigmentée et vascularisée, ce qui empêche la multiplication des images rétinienne causées par les réflexions internes (Ali et Klyne, 1986; Shichi, 1983). L'épithélium pigmentaire est accolé à la membrane de Bruch<sup>1</sup> elle-même adjacente à la choroïde. Enfin, la sclérotique constitue l'enveloppe externe qui assure la résistance mécanique de l'oeil (Ali et Klyne, 1986; Albert et al., 1992).

## 1.2 La rétine

La principale fonction de la rétine est de détecter la lumière pour ensuite produire un signal nerveux qui est le codage de l'information visuelle. La lumière est absorbée par les photorécepteurs qui convertissent le signal

---

<sup>1</sup> La membrane de Bruch est un mélange de fibres de collagène et de fibres élastiques qui lient l'épithélium pigmentaire à la choroïde (Shichi, 1983).

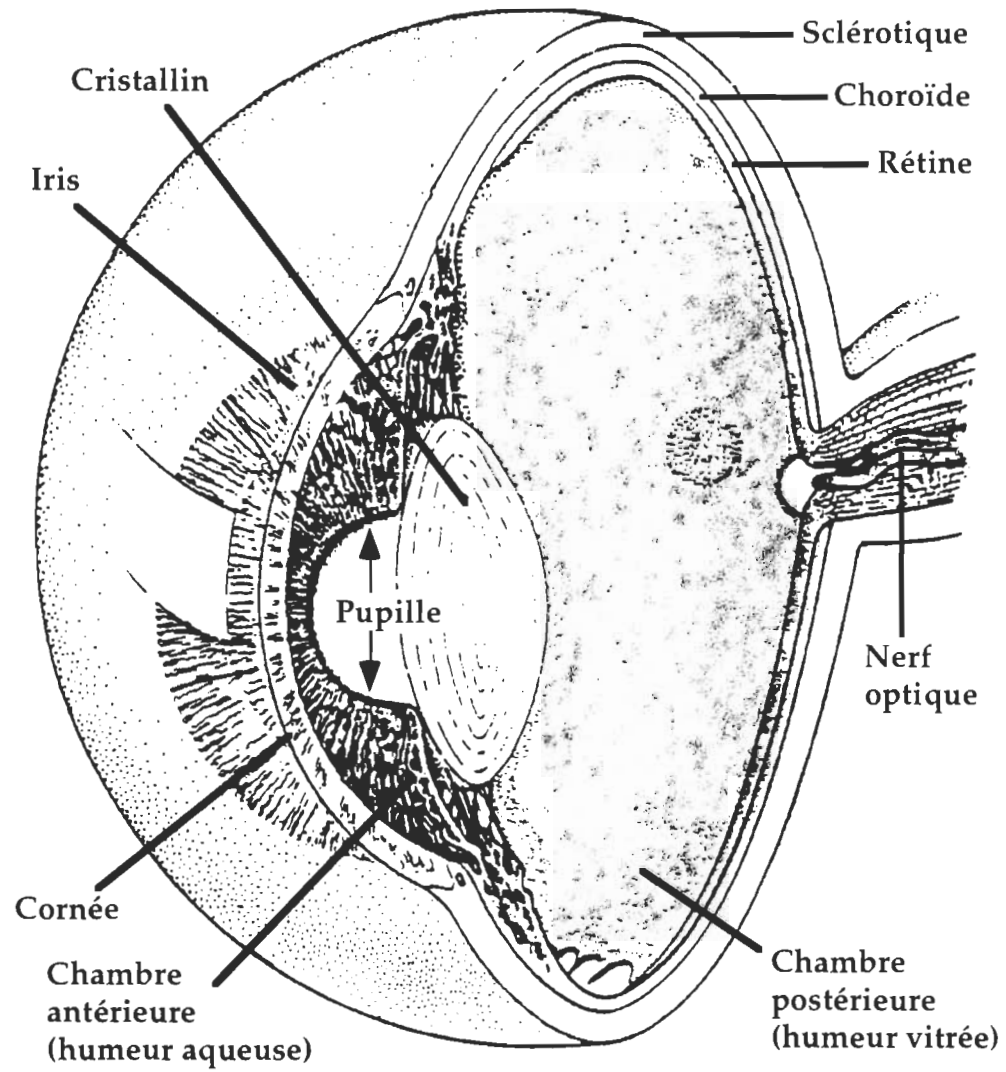


Schéma 1.1: Structure de l'oeil des vertébrés (Spence et Mason, 1983)

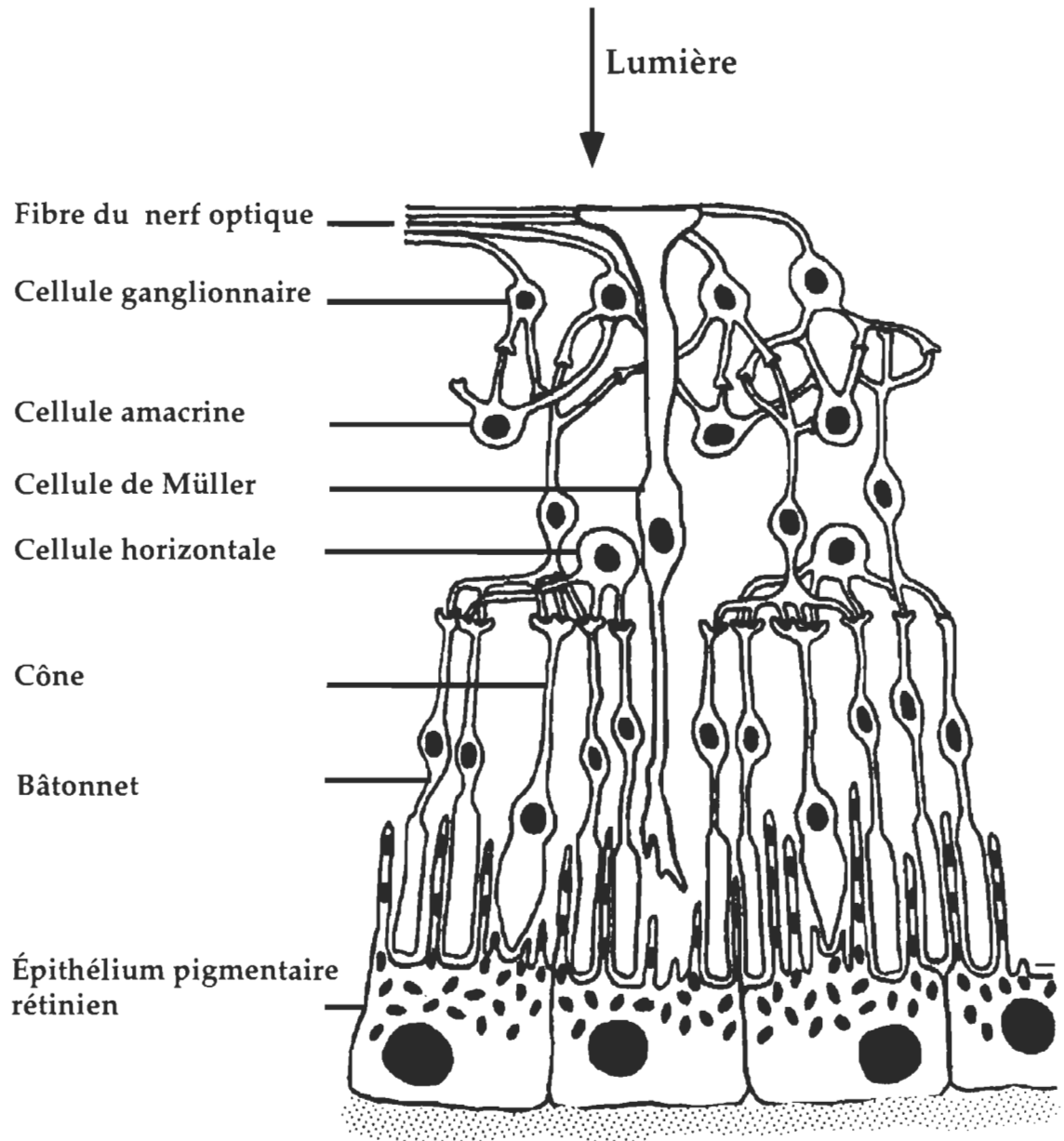


Schéma 1.2: Structure de la rétine (Spence et Mason, 1983)

lumineux en signal électrique par une hyperpolarisation de la membrane plasmique (Wu, 1994; Doly et Meyniel, 1989). Contrairement aux autres récepteurs neuronaux, la stimulation des photorécepteurs par la lumière a pour effet de réduire la perméabilité de la membrane aux ions sodium. À l'obscurité, le potentiel membranaire des bâtonnets est d'environ -30 mV, ce qui est très différent du potentiel de repos typique des neurones qui est de -60 à -90 mV (Darnell et al., 1990). Conséquemment, la dépolarisation des bâtonnets à l'obscurité induit le "courant d'obscurité". C'est ce courant de -30 mV qui explique qu'à l'obscurité les bâtonnets sont constamment dépolarisés et sécrètent des neurotransmetteurs. Les cellules bipolaires avec lesquelles les bâtonnets font synapse sont donc continuellement stimulées à l'obscurité. Une impulsion lumineuse entraîne une baisse du relargage de neurotransmetteurs, le glutamate, par la terminaison synaptique des bâtonnets (Darnell et al., 1990; Tortora et al., 1994). Ce signal est ensuite acheminé vers le nerf optique puis vers le cerveau. De façon schématique, l'on retrouve six types de cellules nerveuses dans la rétine, de la face externe (côté scléral) vers la face interne (côté vitréen), soit les cellules photoréceptrices (les cônes et les bâtonnets), les cellules bipolaires, les cellules horizontales qui font synapse avec les bipolaires et les photorécepteurs, les cellules ganglionnaires et, enfin, les cellules amacrines qui font synapse entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires (voir schéma 1.2). La rétine est également composée de cellules gliales que l'on nomme cellules de Müller et qui ne sont pas considérées comme des cellules nerveuses (Shichi, 1983; Ali et Klyne, 1986). Enfin, l'épithélium pigmentaire (RPE) est constitué d'une monocouche de cellules très pigmentées qui reçoit des nutriments de la choroïde afin de pourvoir aux besoins métaboliques des photorécepteurs (Shichi, 1983). Le RPE fait aussi partie

de la rétine mais il n'est pas impliqué dans la transmission du signal nerveux. L'une des principales fonctions du RPE est la phagocytose et la dégradation des vieux disques des photorécepteurs (Berman, 1991).

### 1.3 Les photorécepteurs

Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets, contenant des pigments photosensibles qui absorbent la lumière. Les bâtonnets sont responsables de la vision en lumière atténuée, tandis que les cônes sont responsables de la vision des couleurs. Plusieurs critères morphologiques et physiologiques distinguent ces deux types de photorécepteurs, mais nous nous limiterons à la description du bâtonnet car ce sont les mécanismes de la transduction visuelle en vision scotopique qui ont été étudiés plus en détail pour des raisons de coût, de disponibilité, d'homogénéité du matériel à isoler et de facilité à isoler les bâtonnets (Shichi, 1983; Ali et Klyne, 1986; Doly et Meyniel, 1989). De plus, l'objet d'étude de cette thèse, soit la protéine G, a été isolé à partir des bâtonnets. Les bâtonnets sont composés d'un segment interne, aussi appelé partie ellipsoïde, qui renferme la machinerie métabolique, du noyau comportant le matériel génétique, de la terminaison synaptique, et puis d'un segment externe contenant un empilement d'environ 2000 disques (voir schéma 1.3) (Albert et al., 1992; Doly et Meyniel, 1989). Le bâtonnet est un détecteur de photons très sensible car un seul photon peut induire l'excitation de toute la cellule (Doly et Meyniel, 1989). C'est au niveau des disques des segments externes des bâtonnets (SEB) que logent les pigments visuels qui absorbent les photons, ce qui initie le processus d'excitation visuelle. Une

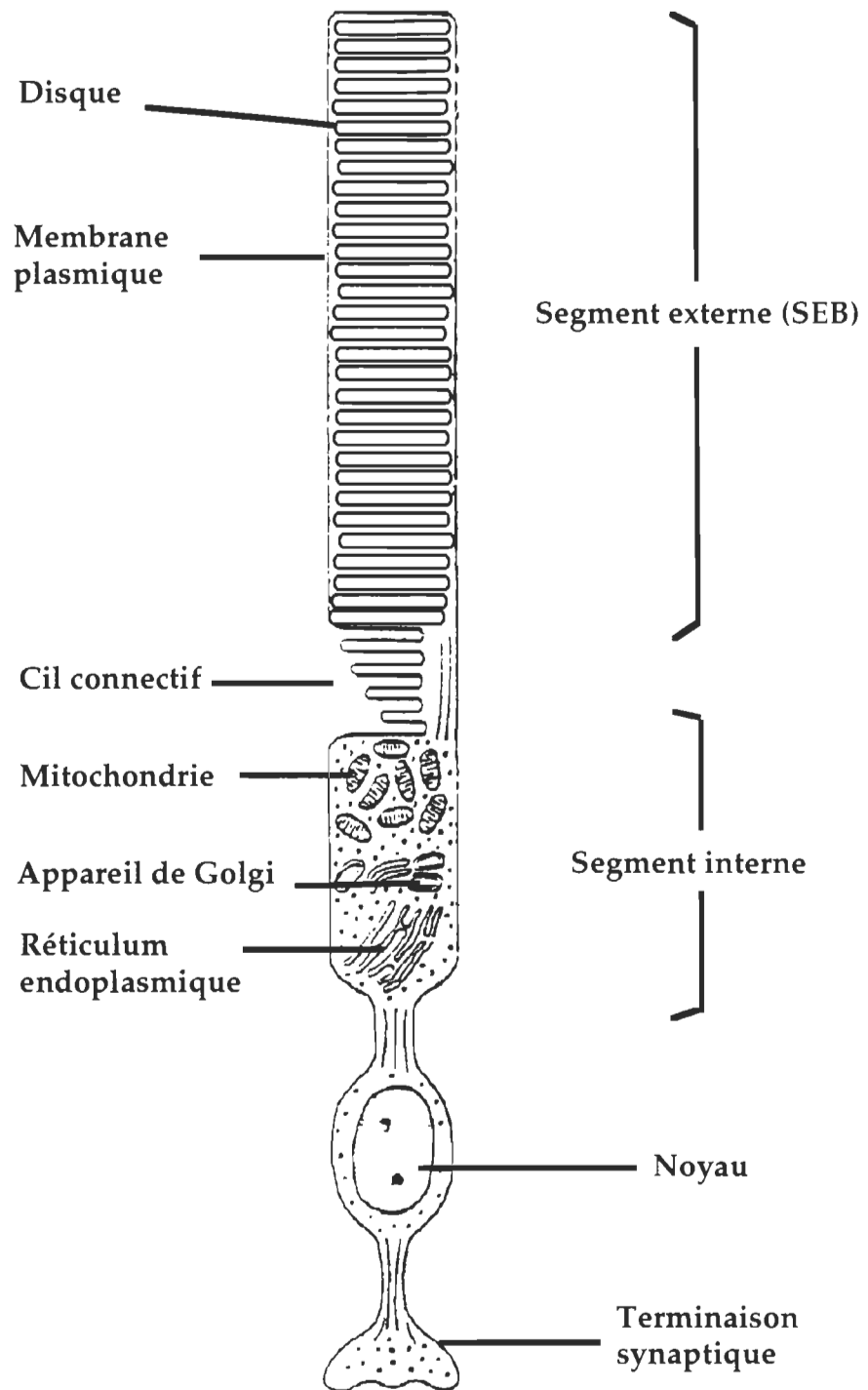


Schéma 1.3: Structure du bâtonnet (Spence et Mason, 1983)



cascade de réactions biochimiques est responsable de l'amplification du signal lumineux et de l'hyperpolarisation de la membrane plasmique des SEB. Il faut préciser que les disques sont totalement isolés de la membrane plasmique<sup>2</sup>. De plus, l'espace interdiscal est très petit, ce qui favorise la transmission rapide de l'information dans la cellule (Ali et Klyne, 1986; Doly et Meyniel, 1989). Nous verrons maintenant de façon détaillée les étapes du mécanisme de la phototransduction soit l'excitation du photorécepteur (section 1.4) ainsi que les mécanismes d'inhibition subséquents (section 1.5) permettant au bâtonnet de retourner à l'état basal.

#### 1.4 Mécanisme d'activation du processus visuel

Au niveau des photorécepteurs, l'excitation visuelle se résume à quelques étapes (voir schéma 1.4). D'abord, un stimulus lumineux active le récepteur protéique des SEB, la rhodopsine (R), qui à son tour active une protéine G hétérotrimérique qui lie le GTP et que l'on appelle Gt ou transducine. Cette dernière activera ensuite un effecteur qui est, dans le cas des photorécepteurs, une phosphodiesterase spécifique au GMPc. Précisons d'abord qu'à l'obscurité, la rhodopsine est inactive. La Gt forme un hétérotrimère (Gt $\alpha$ -GDP-Gt $\beta\gamma$ ) et renferme dans son site actif une molécule de guanosine diphosphate (GDP). La phosphodiesterase est maintenue dans son état inactif par une interaction adéquate avec ses sous-unités gamma (PDE $\gamma$ ). La concentration en GMPc à l'intérieur des segments externes des

---

<sup>2</sup> Par contre, occasionnellement, les disques inférieurs peuvent être ouverts et en continuité avec la membrane plasmique lors de leur formation (Ali et Klyne, 1986).

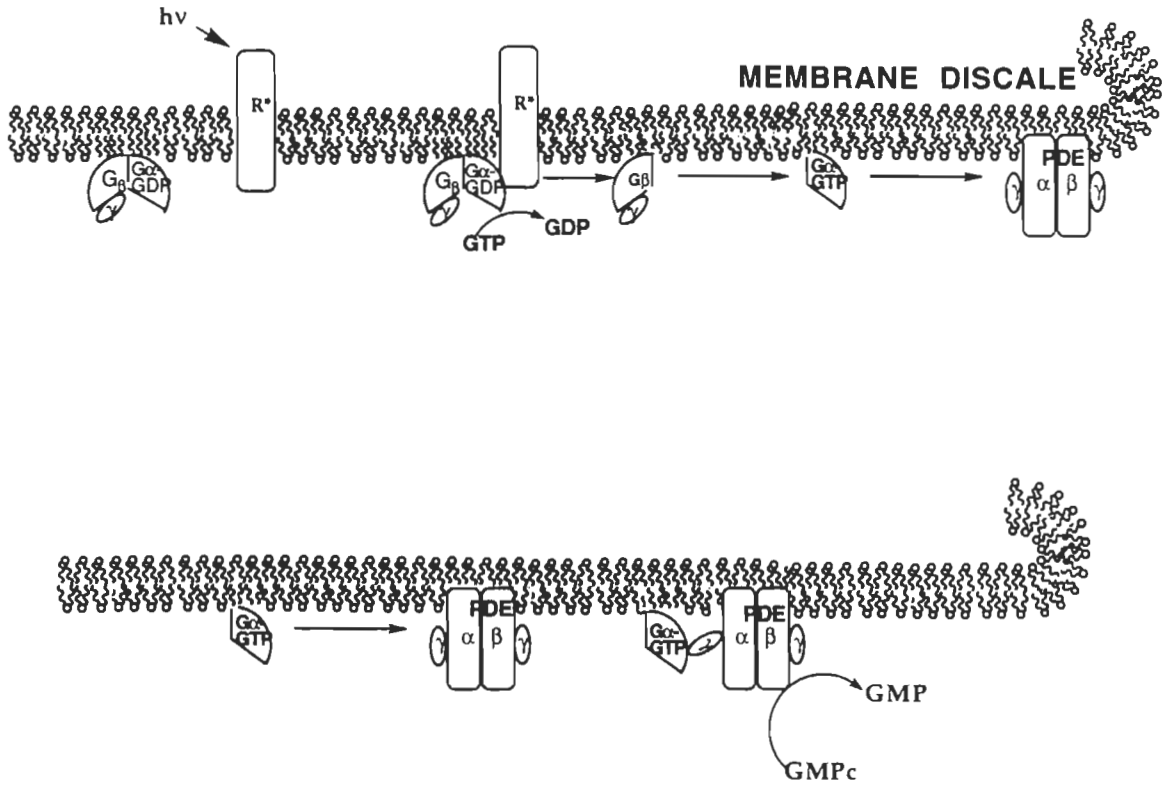


Schéma 1.4: Mécanisme d'activation du processus visuel

bâtonnets est suffisante pour maintenir les canaux sodium ouverts (Pfister et al., 1993).

#### 1.4.1 La rhodopsine

La première étape du mécanisme d'excitation visuelle est l'absorption d'un photon par le pigment visuel, la rhodopsine, qui fait partie de la grande famille des récepteurs à sept hélices alpha couplés aux protéines G. Elle est composée de l'opsine, une glycoprotéine transmembranaire de 41 kDa et d'un chromophore, le 11-cis-rétinal, dont le maximum d'absorption se situe à 498 nm (Shichi, 1983; Doly et Meyniel, 1989; Yarfitz et Hurley, 1994; Hurley 1995). Avant l'activation, donc à l'obscurité, le chromophore de la rhodopsine qui absorbe la lumière est sous la forme 11-cis-rétinal et confère à la rhodopsine une forme inactive. Le rétinal est localisé au milieu de la dernière hélice donc au centre de la membrane (Chabre et Deterre, 1989). Il est lié à la lysine 296 par une base de Schiff protonée. La glutamine 113 sert de contre-ion et peut influencer les propriétés spectrales de la rhodopsine (Yarfitz et Hurley, 1994). Deux groupements palmitoyl situés sur la partie carboxy terminale de la protéine permettent à cette extrémité de la protéine de s'ancrer à la membrane créant ainsi une quatrième boucle du côté cytoplasmique des disques des SEB (voir schéma 1.5) (Hargrave, 1995; Hurley, 1995). Cette dernière boucle nommée i4 ainsi que les boucles i3 et i2 sont impliquées dans l'interaction de la Gt avec R activée (R\*) (König et al., 1989; Kahler et al., 1990). Précisons que les peptides synthétiques de ces trois boucles sont des compétiteurs efficaces de R\* pour lier la sous-unité alpha de la protéine Gt (Gt $\alpha$ ) (König et al., 1989).

Côté cytosolique

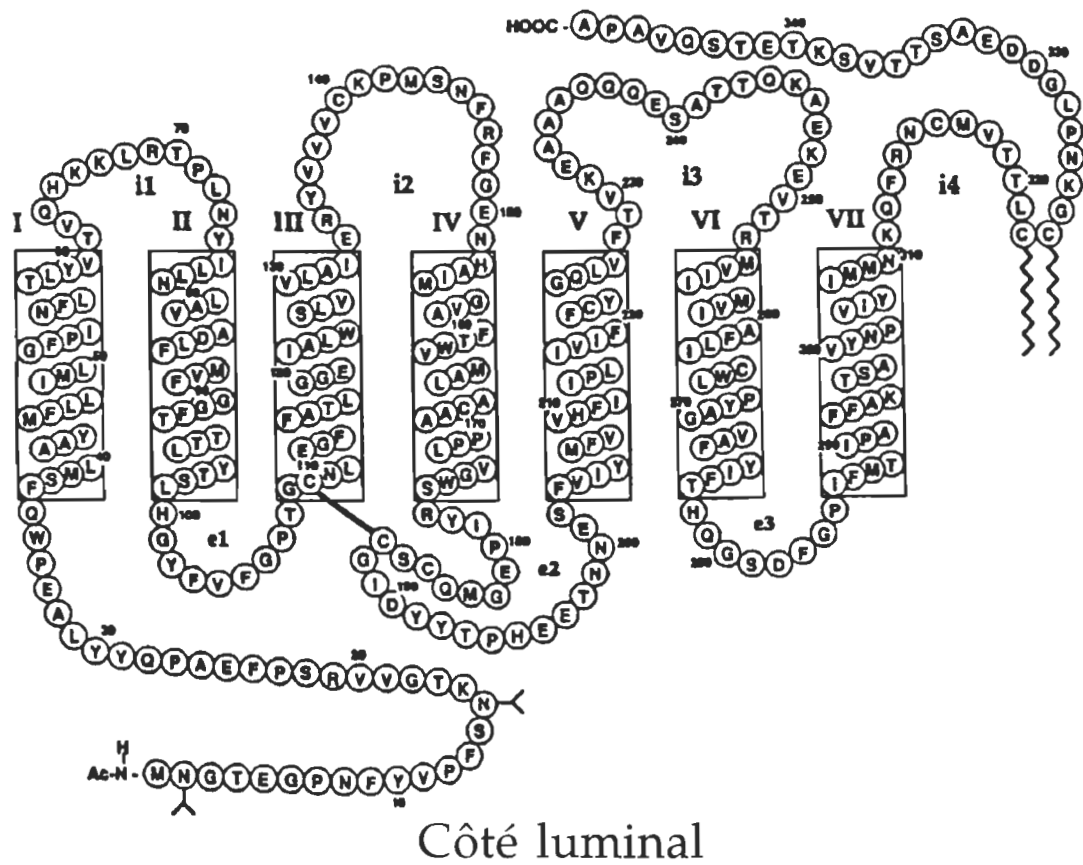


Schéma 1.5: Structure de la rhodopsine (Hargrave, 1995)

Approximativement 50 % des acides aminés de la rhodopsine sont enfouis dans la membrane alors que 25 % se situent du côté intradiscal et que l'autre 25 % baignent dans le milieu cytosolique du SEB (Liebman et al., 1987). Bien que la rhodopsine constitue 90 % de la totalité des protéines présentes dans les SEB (Palczewski, 1994), elle n'occupe que 20 % de la surface de la membrane discale, ce qui lui permet d'effectuer des mouvements latéraux rapides (Liebman et al., 1987). L'isomérisation du 11-cis-rétinal en tout-trans par la lumière s'accompagne d'un enchaînement de changements conformationnels de la rhodopsine. C'est au cours de l'une de ces transformations, soit de métarhodopsine I ( $\lambda_{\text{max}} = 478 \text{ nm}$ ) à métarhodopsine II ( $\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$ ), que débute la cascade de réactions biochimiques qui mèneront à l'hyperpolarisation de la cellule (Doly et Meyniel, 1989; Brown, 1994). Sous sa forme métarhodopsine II, le récepteur est sous une conformation lui permettant d'interagir et d'activer de façon catalytique près de 500 Gt par l'échange du GDP pour le GTP. C'est la première étape d'amplification de l'excitation visuelle (Chabre, 1985; Doly et Meyniel, 1989; Pfister et al., 1993).

#### **1.4.2 La protéine G des photorécepteurs visuels**

La protéine G rétinienne des bâtonnets, aussi appelée transducine (Gt), est composée de trois sous-unités:  $\alpha$  (38-39 kDa),  $\beta$  (35-37 kDa) et  $\gamma$  (6-8 kDa) (Fung, 1983; Deterre et al., 1984; Yamazaki et al., 1987b). Les sous-unités  $\beta\gamma$  (Gt $\beta\gamma$ ) peuvent être dissociées seulement dans des conditions dénaturantes (Schmidt et al., 1992).

### 1.4.2.1 La fonction de la protéine Gt

La protéine G hétérotrimérique des photorécepteurs appartient à la superfamille des protéines G liant et hydrolysant le GTP. Elle agit comme un commutateur moléculaire oscillant entre deux états, actif et inactif, qui sont contrôlés par la liaison et l'hydrolyse du GTP. La sous-unité  $\alpha$  ( $Gt\alpha$ ) porte le site de liaison et d'hydrolyse du GTP ainsi que les domaines d'interaction avec le récepteur, l'effecteur et les sous-unités  $Gt\beta\gamma$  (pour une revue, voir Homburger, 1991). C'est la sous-unité  $Gt\alpha$  qui est responsable de la liaison de la Gt avec la métarhodopsine II ( $R^*$ ). Il semble que les sous-unités  $Gt\beta\gamma$  qui se lient à la boucle i4 de la rhodopsine ne soient pas essentiels à l'activation (Kahler et al., 1990). Cependant, *in vitro*, les sous-unités  $Gt\beta\gamma$  augmentent de 10 fois la vitesse d'activation de la  $Gt\alpha$  (Phillips et al., 1992a et 1992b). Le complexe  $R^*-Gt\alpha-GDP-Gt\beta\gamma$  est donc plus efficace que le complexe  $R^*-Gt\alpha-GDP$  en ce qui a trait à l'échange du GDP pour un GTP au sein du site actif de la  $Gt\alpha$  (Vuong et Chabre, 1991; Bruckert et al., 1992). Comme nous l'avons mentionné à la section précédente, trois des quatre boucles cytoplasmiques de la rhodopsine interagissent avec la  $Gt\alpha$ . Toutefois, il semble que les boucles i2 et i3 soient essentielles pour cette interaction (Franke et al., 1989; Kahler et al., 1990; Willardson et al., 1993). Une fois liée à la rhodopsine activée, la  $Gt\alpha$  subit un changement conformationnel qui a pour conséquence d'ouvrir son site actif situé sur la sous-unité  $\alpha$  et dans lequel était enfouie une molécule de GDP. Elle a alors la forme  $R^*-Gt\alpha$ -vide- $Gt\beta\gamma$  et est fortement liée à la rhodopsine (Chabre et Deterre, 1989; Kahler et al., 1990). L'entrée du GTP dans le site actif induit un changement conformationnel qui confère à la  $Gt\alpha$  sa forme active. Elle perd alors son affinité pour la métarhodopsine II ainsi que pour les sous-unités  $Gt\beta\gamma$

(Chabre et Deterre, 1989; Hargrave et al., 1992). La rhodopsine sera donc disponible pour activer d'autres Gt (Kaupp et Koch, 1986; Chabre et al., 1993; Pugh et Lamb, 1992b). Dès lors, la  $G\alpha$ -GTP est apte à activer un effecteur. Chacune des sous-unités alpha de la protéine G ( $G\alpha$ -GTP) se trouve alors dans une conformation qui lui permettra de se lier avec une sous-unité  $\gamma$  de la PDE ( $PDE\gamma$ ). La fonction des sous-unités  $\beta\gamma$  de la Gt en ce qui a trait au mécanisme d'excitation visuelle se résume donc essentiellement à la régulation de l'activation de la  $G\alpha$  en ayant une interaction directe avec le récepteur ou en facilitant l'interaction de la  $G\alpha$  avec les membranes (Sternweis, 1994). Le groupement farnesyl (15 carbones) lié à la sous-unité gamma est indispensable à la liaison de  $G\beta\gamma$  avec la  $G\alpha$  (Fukada et al., 1990). Il a aussi été démontré que la  $G\beta\gamma$  stimule, par un mécanisme encore inconnu, l'hydrolyse et la synthèse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $PtdInsP_2$ ) dans les SEB (Grigorjev et al., 1996). Cependant, le rôle de l'hydrolyse du  $PtdInsP_2$  en inositol 1,4,5-triphosphate ( $InsP_3$ ) et en 1,2-di-octanoyl-sn-glycerol (DG), qui sont des seconds messagers de ce système, n'est pas encore connu (Grigorjev et al., 1996).

La  $G\alpha$  possède une fonction catalytique d'hydrolyse du GTP en plus d'activer une phosphodiesterase spécifique au  $GMPc$  (Fung et al., 1981; Yamazaki et al., 1983; Pfister et al., 1993). Il y aurait trois types de  $G\alpha$  dans les SEB présentant des différences de solubilité (Hurley, 1992). Le premier type est très soluble et il est éliminé lors des centrifugations visant à extraire la protéine G lorsque les segments externes de bâtonnets sont brisés en cours de purification (Lerea et al., 1986). Le deuxième type de  $G\alpha$  serait majoritaire (> 90 %) et associé aux membranes discales des SEB, mais peut être élué à faible force ionique en présence de GTP (Kühn, 1981; Gray-Keller et al., 1990). C'est ce

deuxième type de Gt $\alpha$  que nous avons utilisé pour réaliser les travaux de cette thèse. Le troisième type est fermement associé à la membrane discale et ne peut être élué qu'en présence de détergent (Wensel et Stryer, 1988; Gray-Keller et al., 1990). Aucune différence structurelle ou fonctionnelle entre ces différentes formes de la Gt $\alpha$  n'a été démontrée (Hurley, 1992).

L'interaction de cette protéine avec les membranes demeure donc ambiguë (Chabre, 1987; Bruckert et al., 1988; Schleicher et Hofmann, 1987; Spiegel et al., 1991; Uhl et al., 1990; Yamazaki, 1992). Bien que Kokame et al. (1992) et Neubert et al. (1992) aient démontré que la Gt $\alpha$  est acylée par quatre types d'acides gras différents (14:0, 14:1, 14:2 et 12:0) (voir schéma 1.6), il n'a pas encore été démontré que cette modification post-transcriptionnelle est responsable de l'attachement de la protéine aux membranes. Spécifions que trois des quatre acides gras (14:1, 14:2, et 12:0) ont été trouvés par Kokame et al. (1992) chez la Gt $\alpha$  éluée à faible force ionique en présence de GTP.

Il est très bien connu que sous sa forme active, la Gt $\alpha$  acquiert une affinité pour la PDE $\gamma$  (pour une revue, voir Pfister et al., 1993). On ne sait toutefois pas si la Gt $\alpha$ -GTP, une fois activée par la rhodopsine, se déplace à la surface de la membrane, en diffusant latéralement (voir schéma 1.7) (Liebman et al., 1987; Uhl et Ryba, 1990; Uhl et al., 1990; Lamb et Pugh, 1992a) ou par le biais du cytoplasme par un mécanisme par saut (voir schéma 1.7) (Chabre, 1985; Bruckert et al., 1988; Chabre et Deterre, 1989), pour aller activer la PDE. De plus, on ne sait pas si la Gt $\alpha$ -GDP se réassocie aux sous-unités Gt $\beta\gamma$  en voyageant par le biais du cytoplasme ou en diffusant à la surface de la membrane.



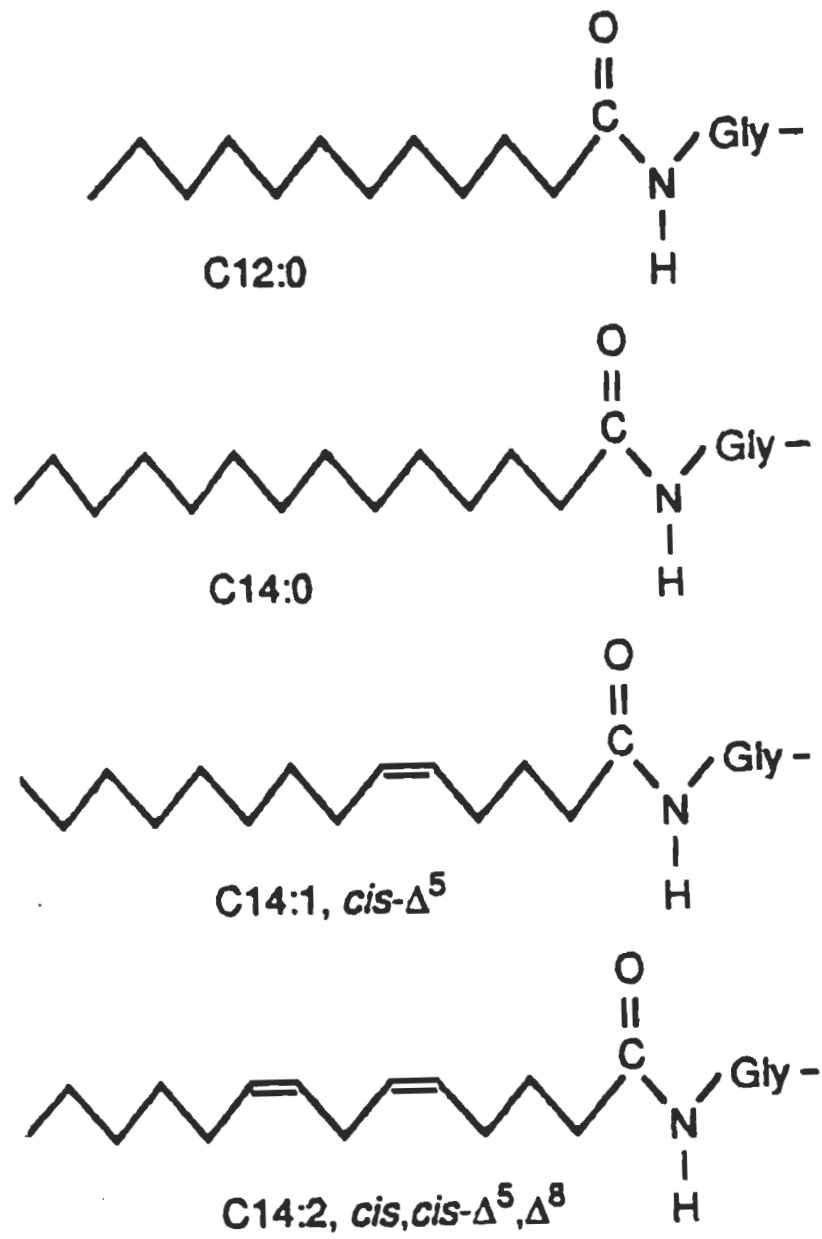


Schéma 1.6: Types d'acides gras servant à acyler la Gt $\alpha$  (Casey, 1992)

Les deux modèles de référence pour l'action de la Gt $\alpha$  sont donc celui de la diffusion latérale et celui de la diffusion par saut. Les avantages et les contraintes associés à chacun de ces modèles sont décrits ci-dessous. Les bases théoriques en faveur de la diffusion par saut sont les suivantes. D'abord l'empilement des disques (voir schéma 1.3) permet une proximité entre les membranes d'environ 150 Å selon Pfister et al. (1993). Cette proximité favoriserait un déplacement de la Gt $\alpha$  en deux dimensions (2D) sans que cette dernière ait à interagir avec la membrane (Pfister et al., 1993). De plus, selon Chabre (1987), une protéine ne peut pas, du point de vue thermodynamique, être partiellement enfouie dans la membrane. Les bases théoriques en faveur de la diffusion latérale sont les suivantes. La probabilité d'entrer en collision avec une molécule adéquatement orientée afin de permettre une liaison est plus grande en deux dimensions qu'en trois dimensions si le milieu dans lequel voyage les protéines en deux dimensions est suffisamment fluide (Liebman et Sitaramayya, 1984; Liebman et al., 1987). Bien que la diffusion des protéines dans le cytoplasme est, de façon générale, plus rapide que la diffusion des protéines à la surface des membranes, il faut mentionner les données suivantes. À la température de la pièce, le coefficient de diffusion latérale de la rhodopsine est de  $0.7 \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$  et celui de la Gt $\alpha$  est de  $1.5 \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$  (Lamb et Pugh, 1992b). En considérant que la concentration de surface de la Gt $\alpha$  est de  $2500 \mu\text{m}^{-2}$ , cela nous donne selon les équations utilisées par Lamb et Pugh (1992b) une activation possible de 7000 Gt $\alpha$  par seconde par rhodopsine. Si on fait le même type de calcul en tenant compte des coefficients de diffusion latérale et des concentrations de surface de la PDE ( $0.8 \mu\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$  et  $330 \mu\text{m}^{-2}$ , respectivement) ainsi que ceux de la Gt $\alpha$ , on arrive à la conclusion qu'en voyageant par diffusion latérale, seulement une très faible proportion de la Gt $\alpha$

n'atteint pas la PDE en 200 msec (durée de l'excitation visuelle). Selon leurs calculs, Lamb et Pugh (1992b) stipulent que seules les interactions de la  $G\alpha$  avec les membranes sont entièrement satisfaisantes du point de vue cinétique pour une activation de la PDE dans des temps qui correspondent à ce qui est observé expérimentalement (Lamb et Pugh, 1992a et 1992b). Leurs calculs sont toutefois fastidieux et ne se résument pas en quelques lignes.

Voici maintenant les évidences expérimentales qui supportent le modèle de diffusion par saut. La  $G\alpha$  est extraite en ajoutant du GTP à des SEB très dilués dans un tampon isotonique (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 6 mM  $MgCl_2$  et 1 mM DTT). Dans ces conditions, la  $G\alpha$ -GTP quitte la membrane discale pour se retrouver dans le surnageant, ce qui suggère que cette protéine est soluble *in vivo* (Kühn, 1981; Fung et al., 1981; Gilman, 1987; Bruckert et al., 1988; Chabre, 1987). De plus, il a été observé, par diffusion de la lumière, que la  $G\alpha$ -GTP était larguée dans l'espace interdiscal après illumination des SEB en présence de GTP (Bruckert et al., 1988), ce qui impliquerait que la  $G\alpha$  voyagerait par le biais du cytoplasme. Les évidences expérimentales qui supportent le modèle de diffusion latérale sont les observations de Uhl et al. (1990) qui ont mesuré, eux aussi par diffusion de la lumière, que dans les SEB intacts rendus perméables aux nucléotides, la  $G\alpha$ -GTP ne quitte jamais la membrane discale (Uhl et al., 1990). Ces observations sont contradictoires si l'on fait abstraction du fait que Uhl et al. (1990) ont travaillé avec des SEB plus intacts.

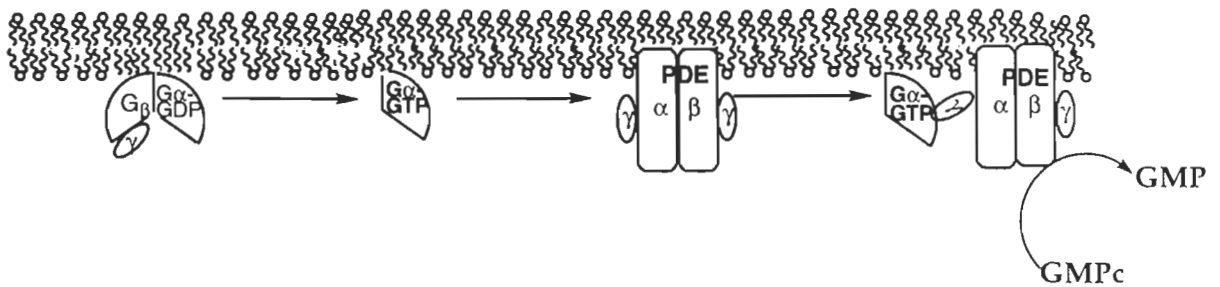
Nous avons tenté, par des méthodes différentes de celles utilisées par les auteurs mentionnés ci-haut, de déterminer l'interaction qu'entretiennent la  $G\alpha$ -GTP et la  $G\alpha$ -GDP avec des membranes modèles. Les résultats de ces

expériences font l'objet des chapitres 2 et 3 et ils indiquent que la  $G\alpha$ -GTP et la  $G\alpha$ -GDP interagissent avec des membranes modèles (chapitre 2) (Grenier et al., 1994) et que la  $G\alpha$ -GTP pénètre la membrane lipidique jusqu'à une profondeur d'au moins 6.5 Å (chapitre 3) (Grenier et al., 1998). Ces résultats sont donc des arguments favorisant l'hypothèse de la diffusion latérale (voir schéma 1.7). Comme la structure et la fonction d'une protéine sont souvent reliées nous avons voulu également étudier l'aspect structurel de la  $G\alpha$ . Voilà pourquoi nous décrivons maintenant cet aspect de la  $G\alpha$ .

#### 1.4.2.2 La structure de la protéine Gt

C'est en décembre 1993 que l'équipe de Paul Sigler et de Heidi Hamm a publié les premières structures cristallographiques de la sous-unité  $G\alpha$  associée à une molécule de  $GTP\gamma S$  (Noel et al., 1993). En 1994, Lambright et al. et Sondek et al. de la même équipe publiaient, respectivement, la structure de la  $G\alpha$  associée à une molécule de GDP puis à du  $GDP-AlF_4^-$  qui simule la forme  $G\alpha$ -GTP. Finalement, en 1996, Lambright et al. et Sondek et al. publiaient, respectivement, la structure d'un hétérotrimère de protéine G ainsi que celle de la  $Gt\beta\gamma$ . Il faut cependant préciser qu'il manque les 25 premiers acides aminés à la structure de la  $G\alpha$ , lesquels sont responsables de la perte d'affinité pour les sous-unités  $Gt\beta\gamma$ . Ces acides aminés ont dû être éliminés par protéolyse pour obtenir des cristaux de  $G\alpha$ . D'autre part, la structure de la forme hétérotrimérique de la Gt a été obtenue à partir d'une chimère de la  $G\alpha$  et d'une protéine G inhibitrice ( $G_i$ ) présente dans le cerveau (Lambright et al., 1996). Toutefois, ces résultats de cristallographie couplés aux données

### DIFFUSION LATÉRALE



### DIFFUSION PAR SAUT

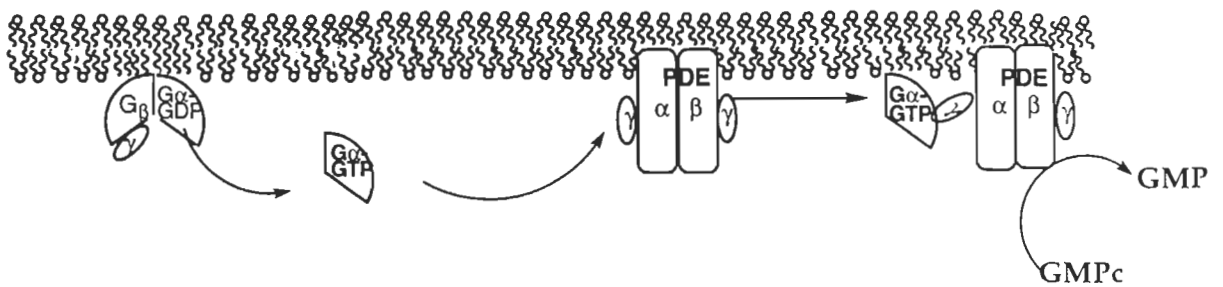


Schéma 1.7: Modèles postulés pour l'activation de la PDE

biochimiques et de mutagénèse dirigée sur la  $Gt\alpha$  ont permis de spéculer sur les zones d'interaction de la Gt avec le récepteur, l'effecteur et les membranes (Onrust et al., 1997; Lichtarge et al., 1996). Le schéma 1.8 présente la structure de l'hétérotrimère. Selon ces auteurs, ce sont les acides aminés du domaine de type Ras de la  $Gt\alpha$  qui feraient face à la membrane. Ceux du domaine hélicoïdal feraient face au cytoplasme.

### 1.4.3 La phosphodiesterase spécifique au $GMPc$

La phosphodiesterase (PDE) est aussi une protéine périphérique et se compose d'une sous-unité  $\alpha$ , d'une sous-unité  $\beta$  et de 2 sous-unités  $\gamma$ . Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ont des poids moléculaires respectifs de 88 kDa et 84 kDa et forment l'hétérodimère responsable d'hydrolyser de façon catalytique le  $GMPc$ . Les deux sous-unités  $\gamma$  ( $PDE\gamma$ ), de 11 kDa chacune, sont responsables de l'inhibition de l'activité hydrolytique du  $GMPc$  par la  $PDE\alpha\beta$  (Baehr et al., 1979; Hurley, 1982; Yamazaki et al., 1983; Wensel et Stryer, 1986).

Certains auteurs affirment que le complexe  $PDE\alpha\beta-(\gamma-Gt\alpha)_2$  est indissociable (Gray-Keller et al., 1990; Catty et al., 1992) alors que d'autres suggèrent qu'il l'est (Yamazaki et al., 1989; Wensel et Stryer, 1990). En ce qui a trait à son interaction avec la membrane, certaines équipes ont présenté des résultats suggérant une interaction soit de  $PDE\gamma-Gt\alpha$  ou de  $PDE\alpha\beta-(\gamma-Gt\alpha)_2$  avec la membrane en milieu isotonique (Navon et Fung, 1987; Wensel et Stryer, 1990). D'autre part, les résultats de Yamazaki et al. (1989) indiquent que la  $PDE\gamma-Gt\alpha$  se retrouve dans le surnageant après un lavage en milieu isotonique.

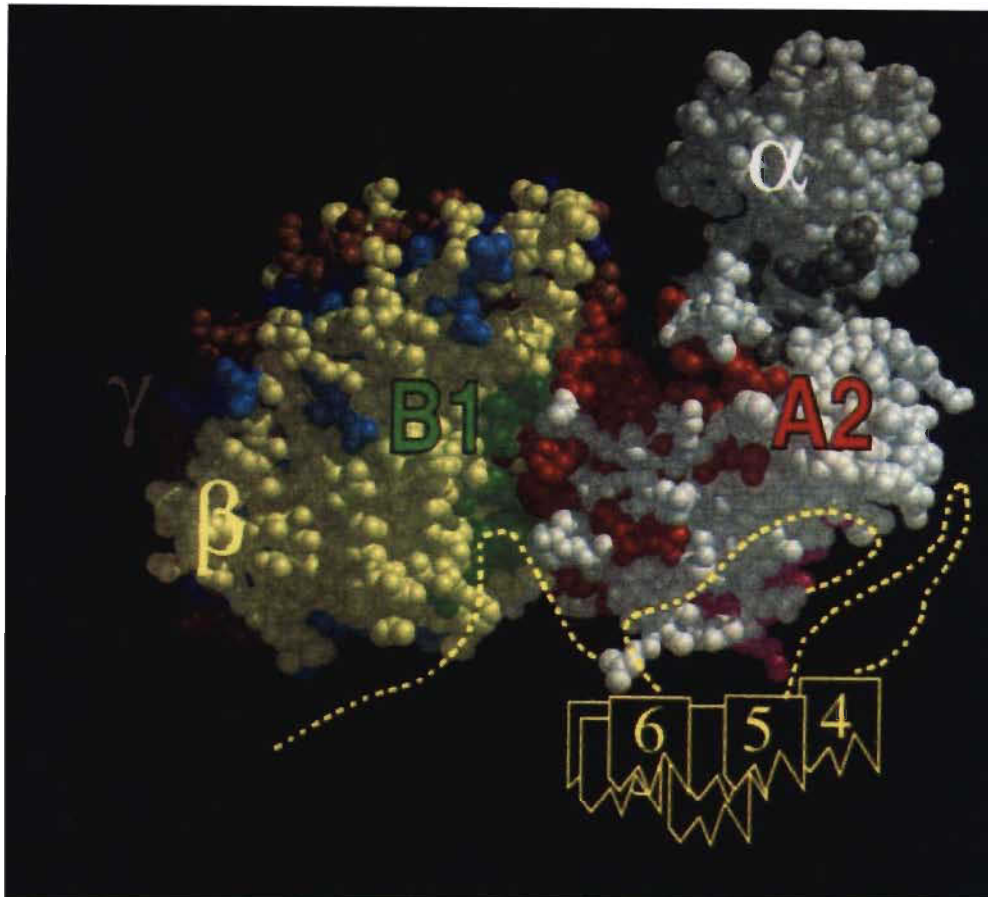


Schéma 1.8: Structure de la  $G\alpha\beta\gamma$ . Cette représentation de la  $G\alpha\beta\gamma$  est tirée de l'article de Lichtarge et al. (1996). Les atomes colorés en blanc et en gris indiquent, respectivement, les domaines de type Ras et hélicoïdal de la  $G\alpha$ . Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont représentées en jaune et en brun, respectivement. Les atomes en rouge près de la lettre A2 pourraient être en contact avec la PDE. Les atomes en vert de la sous-unité  $\beta$  interagiraient avec la sous-unité  $\alpha$ . Les atomes en bleu indiqueraient la zone d'interface entre les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Enfin les atomes en rose indiqueraient la zone d'interaction entre la sous-unité  $\alpha$  et la rhodopsine. Une représentation schématique des hélices 4, 5 et 6 de la rhodopsine est présentée en jaune.

Comme les auteurs qui suggèrent une interaction avec la membrane ont travaillé avec des protéines extraites de rétines bovines et que Yamazaki et al. (1989) ont travaillé avec des protéines provenant des rétines de grenouilles, il est possible que cette différence d'interaction de la PDE soit imputable aux différents stades d'évolution des mécanismes visuels chez la grenouille et le boeuf (Yamazaki, 1992). Par contre, du côté de l'équipe de Chabre, on affirme que la  $PDE\alpha\beta-(\gamma-Gt\alpha)_2$  demeure liée à la membrane en milieu isotonique mais que le complexe se dissocie de la membrane en milieu hypotonique (Otto-Bruc et al., 1993). On constate que, de même que pour la  $Gt\alpha$ , on connaît mal l'interaction de la  $PDE\gamma-Gt\alpha$  avec la membrane et la sous-unité  $PDE\alpha\beta$ .

Il existerait un état intermédiaire d'activation de la PDE selon qu'une seule ou deux sous-unités  $\gamma$  inhiberaient la PDE (Wensel et Stryer, 1990; Otto-Bruc et al. 1993; Bruckert et al., 1994). De plus, il a été suggéré que la phosphorylation de la  $PDE\gamma$  lui conférerait plus d'affinité pour la  $PDE\alpha\beta$  que pour la  $Gt\alpha-GTP$ , ce qui modulerait aussi l'état d'activation de la PDE (Tsuboi et al., 1994) Dès que la  $Gt\alpha-GTP$  se lie aux sous-unités  $PDE\gamma$ , la  $PDE\alpha\beta$  devient active et peut hydrolyser environ 1000 à 2000  $GMPc$  durant son temps de vie d'activation (Chabre et Deterre, 1989). Sachant qu'une rhodopsine peut activer jusqu'à 500  $Gt$ , on aura donc jusqu'à 500 000  $GMPc$  hydrolysés pour chaque rhodopsine activée. C'est la deuxième étape d'amplification de la transduction visuelle (Doly et Meyniel, 1989; Pfister et al., 1993). Cette baisse de la concentration en  $GMPc$  dans le cytoplasme entraîne la fermeture des canaux ioniques (Chabre et Deterre, 1989; Doly et Meyniel, 1989; Rayer et al., 1990; Kaupp et Koch, 1992; Pfister et al., 1993). L'influence du  $GMPc$  sur la perméabilité de la membrane plasmique est illustrée au schéma 1.9.



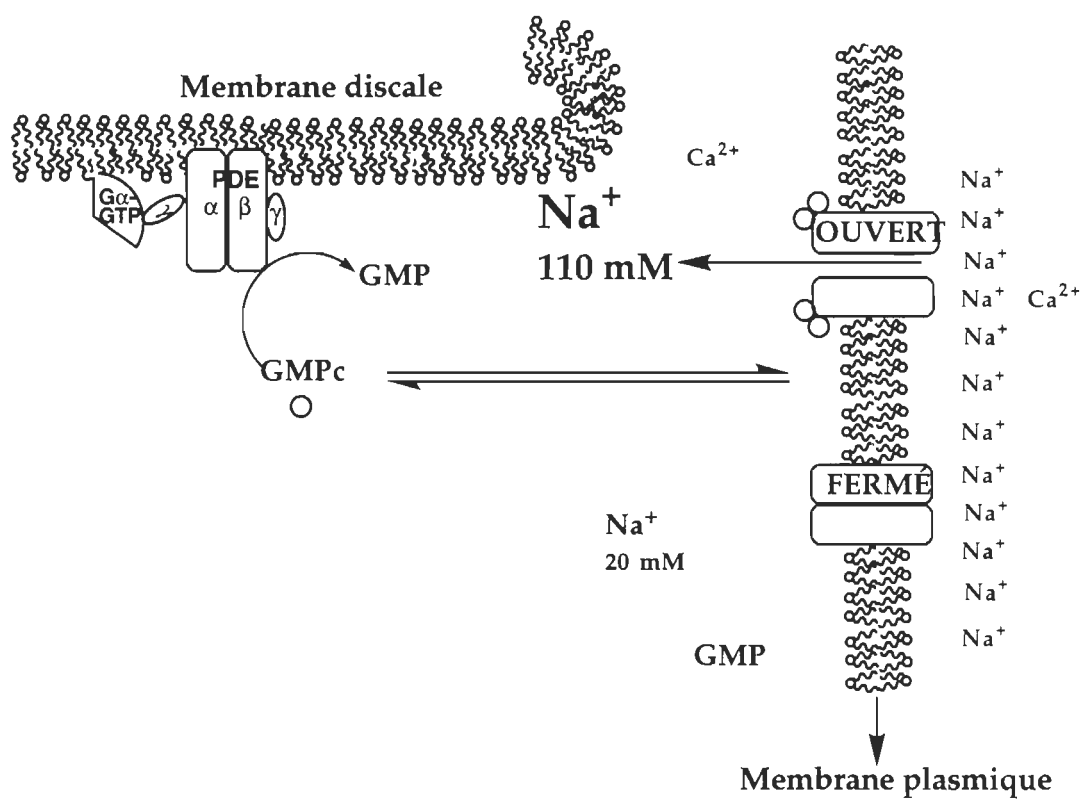


Schéma 1.9: Effet du GMPc sur la perméabilité de la membrane plasmique

#### 1.4.4 Les canaux ioniques

Les canaux ioniques, aussi appelés canaux sodium-calcium, sont des oligomères protéiques transmembranaires de 4 ou 5 sous-unités (Kaupp, 1991) ayant chacun un site de liaison pour le GMPc. Ils sont composés majoritairement de sous-unités  $\alpha$  de 63 kDa, glycosylées à un seul site, puis de sous-unités  $\beta$  de 71 kDa et enfin d'un polypeptide additionnel qui, lié à la sous-unité  $\beta$ , aurait un poids moléculaire de 240 kDa. (Molday et Hsu, 1995). Le rapport stoechiométrique des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  n'est pas encore connu. Par contre, il a été démontré que ces canaux sont localisés dans la membrane plasmique (Cook et al., 1987; Kaupp et al., 1989; Eismann et al., 1993; Molday et Hsu, 1995).

Le GMPc est présent à une concentration de 4-10  $\mu\text{M}$  à l'obscurité (Molday et Hsu, 1995). En réponse à un stimulus lumineux, la PDE hydrolyse le GMPc. Il s'ensuit une baisse importante de la concentration en GMPc dans le cytoplasme (Molday et Hsu, 1995). Cela cause la dissociation du GMPc lié aux canaux ioniques entraînant ainsi la fermeture de ces derniers (Pfister et al., 1993; Stryer, 1991; Kaupp et Koch, 1992).

Considérons maintenant l'effet du GMPc sur la membrane plasmique des SEB dans laquelle l'on retrouve des canaux sodium-calcium ( $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ ). L'ouverture, à l'obscurité d'un canal sodium-calcium permet l'entrée massive de  $\text{Na}^+$  qui dépend, comme décrit précédemment, de la présence du GMPc. La liaison d'au moins 4 GMPc par canal sodium-calcium semble nécessaire pour produire l'activation complète des canaux sodium-calcium et ainsi permettre

leur ouverture. Il existe des états intermédiaires d'ouverture des canaux sodium-calcium qui dépendent du nombre de GMPc qui sont liés à ces derniers (Kaupp et Koch, 1992).

À l'opposé des autres récepteurs neuronaux, la stimulation des bâtonnets par la lumière a pour effet de réduire la perméabilité de la membrane plasmique aux ions sodium (voir schéma 1.9). Lors de leur stimulation, la fermeture des canaux réduit l'entrée du sodium tandis que les pompes sodium-potassium ATPase du segment interne continuent d'évacuer les ions sodium (Rayer et al., 1990). On observe alors une baisse importante de la concentration intracellulaire en ions  $\text{Na}^+$  qui, selon Shichi (1983), serait d'environ 180 mM. Pour arriver à ce résultat, cet auteur considère que la concentration physiologique de  $\text{Na}^+$  dans la rétine est de 200 mM à l'obscurité et de 20 mM à la lumière (Shichi, 1983). Par contre, Kaupp et Koch (1992) ont estimé que la concentration physiologique en sodium dans les segments externes des bâtonnets à l'obscurité est de 110 mM, ce qui entraînerait une baisse de 90 mM en ions  $\text{Na}^+$  plutôt que de 180 mM. Bien que ces résultats soient très différents, on constate, dans les deux cas, que la concentration en sodium change brusquement lors de la fermeture de ces canaux. Il en est de même de la concentration en ions calcium. Les canaux laissent passer vers l'intérieur du bâtonnet non seulement du  $\text{Na}^+$  mais aussi du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  dans une proportion de 70, 15 et 5 %, respectivement (Kaupp et Koch, 1992). Le sodium entre également dans le bâtonnet par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$  dans une proportion de 8 % (Kaupp et Koch, 1992). À l'obscurité, l'on estime la concentration intracellulaire en calcium à 300 nM puisque l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$  qui se trouve aussi dans la membrane plasmique expulse le  $\text{Ca}^{2+}$

hors du bâtonnet. À la fermeture des canaux sodiques, l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  est bloquée et l'échangeur continue d'expulser ce dernier. La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  chute alors sous les 100 nM (Molday et Hsu, 1995).

L'entrée massive, à l'obscurité, d'ions sodium se traduit par une dépolarisation de la membrane plasmique des bâtonnets (Albert et al., 1992) alors que la fermeture des canaux sodiques sous l'effet de la lumière provoque l'hyperpolarisation de la membrane et entraîne une baisse des concentrations en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  qui peuvent aussi avoir une influence sur l'interaction des protéines entre elles ou avec les membranes. Il a été démontré que les variations de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  ont une influence sur les mécanismes d'inactivation de l'excitation visuelle. Elles influencent entre autres le fonctionnement de la calmoduline, la recoverine et la guanylate cyclase (Hurley, 1992; Pfister et al., 1993). Ces protéines participent, comme nous le verrons à la prochaine section, à l'inactivation de l'excitation visuelle en restaurant les conditions ioniques et biochimiques de départ à l'intérieur du bâtonnet (Hurley, 1995).

### 1.5 Mécanisme d'inactivation du processus visuel

Bien que le mécanisme d'excitation se déroule approximativement en 200 msec, de l'activation de la rhodopsine à l'hyperpolarisation de la membrane, la réponse globale, incluant le mécanisme d'inactivation, est de 500 à 600 msec (Shichi, 1983; Chabre et Deterre, 1989; Chabre et al., 1993). Cela laisse de 300 à 400 msec pour restaurer les conditions initiales d'obscurité du

bâtonnet. Il a été démontré que plusieurs processus de régulation négative doivent avoir lieu en même temps pour mettre fin à l'excitation visuelle (Chabre et Deterre, 1989 et 1990; Pugh et Lamb, 1990; Rayer et al., 1990; Stryer, 1991; Kaupp et Koch, 1992; Hurley, 1992 et 1995). Ainsi, il est important d'inactiver la rhodopsine, la Gt, la PDE et de synthétiser du GMPC. Les rôles que jouent différentes protéines dans ce processus seront maintenant présentés en détail.

### **1.5.1 Inhibition de la rhodopsine par la rhodopsine kinase et l'arrestine**

La première étape de l'amplification du processus visuel est l'absorption d'un photon par la rhodopsine qui, à elle seule, peut activer près de 500 Gt en 250-300 msec. De plus R\* peut demeurer active pendant près de 10 secondes et serait ainsi susceptible d'activer des milliers de Gt (Chabre et Deterre, 1989). On peut donc s'attendre à ce que ce soit un site d'inhibition privilégié de la transduction visuelle. Au moins deux protéines, soit la rhodopsine kinase (68 kDa) et l'arrestine (48 kDa), lient la R\* et ont comme fonction d'inhiber son activité (Kühn, 1978; Liebman et Pugh, 1980; Kühn et al., 1984; Wilden et al., 1986a et 1986b; Palczewski et al., 1988; Gurevich et Benovic, 1993; Ohguro et al., 1993; Papac et al., 1993; Pullvermüller et al., 1993). Dans un premier temps, la rhodopsine kinase phosphoryle la R\* qui développe alors une affinité pour l'arrestine (Wilden et al., 1986a; Palczewski et al., 1992). La R\* possède 9 sites potentiels de phosphorylation carboxy terminal qui sont accessibles à la rhodopsine kinase (Wilden et al., 1986a; Papac et al., 1993). Une fois phosphorylée, la R\* a une grande affinité pour l'arrestine qui a la propriété de

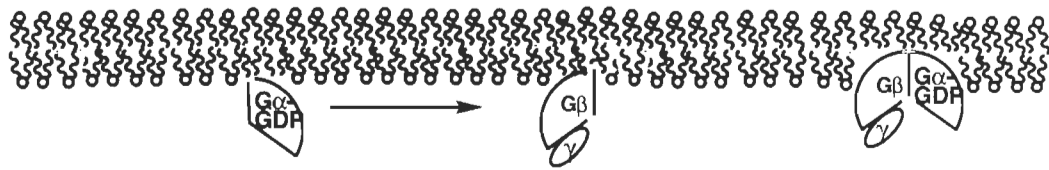
bloquer l'accès à la Gt (Hurley, 1992). Dès lors, la Gt ne peut plus être activée par la rhodopsine. C'est la première étape d'inhibition de l'excitation visuelle<sup>3</sup>. Toutefois, les cinétiques de phosphorylation de la rhodopsine et de liaison subséquente à l'arrestine sont trop lentes pour expliquer à elles seules la régulation négative qui dure de 300 à 400 msec (Chabre et al., 1987; Chabre et Deterre, 1989 et 1990).

### 1.5.2 Inhibition de la Gt

La Gt $\alpha$  est inactive lorsqu'elle a hydrolysé le GTP qui se trouve dans son site actif (Kühn, 1981; Arshavsky et al., 1989; Bourne et al., 1991; Angleson et Wensel, 1993; Antonny et al., 1993). La vitesse d'hydrolyse du GTP par la Gt $\alpha$ -GTP est de 20 secondes *in vitro* (Chabre et al., 1993). Bien que l'activité GTPase serait stimulée par la liaison de la Gt $\alpha$  à la PDE $\gamma$  les vitesses d'hydrolyse mesurées seraient de l'ordre de la seconde (Arshavsky et al., 1989; Yamazaki et al., 1993; Angleson et Wensel, 1994). Ces vitesses d'hydrolyse sont trop lentes pour expliquer l'inactivation du processus visuel qui a lieu en 300 à 400 msec. Suite à un nouveau changement conformationnel, donc de retour à la forme Gt $\alpha$ -GDP, elle perd son affinité pour la PDE $\gamma$  et retrouve son affinité pour la Gt $\beta\gamma$  (Chabre et al., 1987). Cette partie du mécanisme d'inactivation est illustrée au schéma 1.10. Comme nous l'avons déjà mentionné à la section 1.4.2.1, on ne sait pas si la Gt $\alpha$ -GDP se réassocie à sa sous-unité Gt $\beta\gamma$  en voyageant par le biais du cytoplasme ou de la membrane (schéma 1.10).

<sup>3</sup> De plus, la photoisomérisation conduit à la dissociation du chromophore de l'opsine et un processus métabolique est par la suite nécessaire pour régénérer la rhodopsine chez les vertébrés (Rayer et al., 1990). Au cours de ce processus de régénération, le rétinol est acheminé à l'épithélium pigmentaire où il est isomérisé puis réacheminé au bâtonnet (Gregor et al., 1994).

### DIFFUSION LATÉRALE



### DIFFUSION PAR SAUT

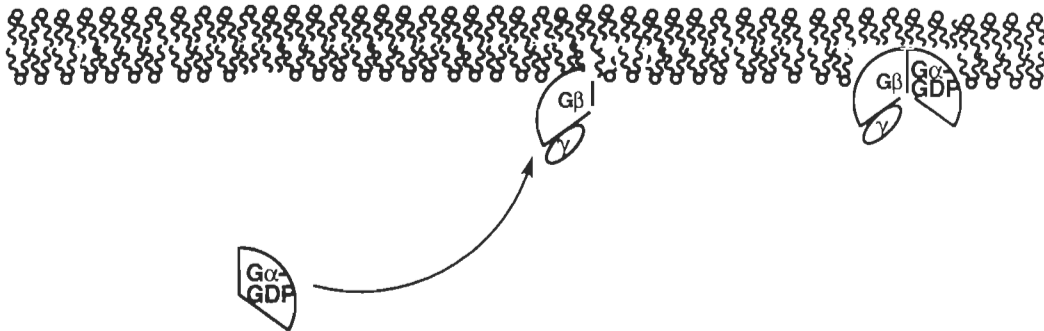


Schéma 1.10: Modèles postulés pour reformer le complexe G $\alpha\beta\gamma$

### 1.5.3 Inhibition de la PDE

Lorsque la  $Gt\alpha$  perd son affinité pour la  $PDE\gamma$ , cette dernière se réassocie à la  $PDE\alpha\beta$  et elle se positionne de manière à inhiber l'activité hydrolytique de la  $PDE\alpha\beta$  selon que l'on considère que le complexe  $PDE\alpha\beta-(\gamma-Gt\alpha)_2$  est dissociable (Yamazaki et al., 1989; Wensel et Stryer, 1990) ou indissociable (Gray-Keller et al., 1990; Catty et al., 1992). Dans les deux cas, la  $PDE\alpha\beta$  serait alors de nouveau inactivée par ses sous-unités  $\gamma$ . Si le complexe est dissociable, alors la sous-unité  $\gamma$  de la PDE doit voyager par le biais de la membrane ou du cytoplasme pour lier la  $PDE\alpha\beta$ , ce qui pourrait avoir une influence sur la vitesse d'inactivation de la  $PDE\alpha\beta$ . De plus, il a été démontré que la  $PDE\alpha\beta$  possède des sites non catalytiques de liaison du  $GMPc$  qui soutiendraient l'activation de cette dernière (Arshavsky et al., 1992). Par conséquent, en l'absence de  $GMPc$  dans ces sites, l'inactivation de la  $PDE\alpha\beta$  serait plus rapide (Cote et al., 1994). Enfin, la phosphorylation de la  $PDE\gamma$  modifierait la vitesse d'inactivation de la  $PDE\alpha\beta$  (Tsuboi et al., 1994). Cette inactivation de la PDE est la deuxième étape de régulation négative.

### 1.5.4 Rôle de la phosducine dans l'activité de la Gt et de la PDE

La phosducine est une protéine soluble de 33 kDa qui, sous l'effet de la lumière, se déphosphoryle (Lee et al., 1984). Une fois déphosphorylée, elle interagit avec la  $Gt\beta\gamma$  et est donc en compétition avec la  $Gt\alpha$  (Lee et al., 1987 et 1992). Les concentrations en  $Gt\alpha$  et en phosducine étant semblables dans les SEB, il est possible que la phosducine agisse comme régulateur de l'activation



de la  $G\alpha$  (Hurley, 1992). La phosducine monopolise les  $G\beta\gamma$  qui ne peuvent alors se lier à la  $G\alpha$ . Comme nous l'avons mentionné à la section 1.4.2.1, la  $G\beta\gamma$  augmente de 10 fois la vitesse d'activation de la  $G\alpha$  par la rhodopsine. Donc, la phosducine, en raison de son interaction avec la  $G\beta\gamma$ , diminuerait de 10 fois la vitesse d'activation de la  $G\alpha$  et, par conséquent, modulerait l'activation de la PDE (Hurley, 1992).

### 1.5.5 Synthèse du GMPc par la guanylate cyclase

Il existe deux formes de guanylate cyclase, l'une est soluble en présence de détergent et est activée par l'oxyde nitrique (Horio et Murad, 1991) et l'autre est régulée par la concentration de calcium et est liée au cytosquelette (Fleischman et Denisevich, 1979; Hakki et Sitaramayya, 1990). Cette protéine de 112 kDa a été extraite en présence de détergent non ionique et est présente dans les SEB à une concentration à peu près équivalente à celle de la PDE (Hurley, 1992). Elle est  $Ca^{2+}$ -dépendante puisque, en présence d'une faible concentration de calcium dans les SEB, elle synthétisera du GMPc afin de rétablir la concentration de ce métabolite à son taux initial de 2-4  $\mu M$  (Vuong et al., 1984; Stryer, 1986; Koch et Stryer, 1988; Koch et al., 1990; Koch, 1992a). Le GMPc permettra la réouverture des canaux sodiques.

### 1.5.6 Rôles possibles de la recoverine

Cette protéine périphérique aussi appelée p26 ou S-moduline de 26 kDa serait liée à la membrane discale à concentration élevée de  $\text{Ca}^{2+}$  et jouerait un rôle dans la régulation de l'activité visuelle (Kawamura et Murakami, 1991). Cependant, à l'exception du fait que, selon tous les auteurs mentionnés ci-dessous, elle aurait une activité  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante, le rôle de la recoverine n'est pas bien défini. Selon Kawamura (1992), elle permettrait, selon un mécanisme mal connu, de soutenir l'activation de la PDE. Par contre, selon Gray-Keller et al. (1993), la recoverine, à faible concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , serait relarguée dans le cytosol et causerait une baisse d'activité de la PDE. D'autre part, Koch (1992b) avance qu'elle aurait des sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  et que, suite à l'excitation du SEB par la lumière, elle relarguerait ses ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Lambrecht et Koch (1991) avancent que la recoverine activerait la guanylate cyclase lorsqu'elle serait phosphorylée en absence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  qu'elle lie habituellement. Par contre, Sanada et al. (1996) disent qu'elle modulerait la phosphorylation de la rhodopsine plutôt que d'activer la guanylate cyclase. Le rôle de la recoverine n'est donc pas encore bien défini.

### 1.5.7 Rôle de la calmoduline dans la modulation de l'activité des canaux sodiques

Cette protéine de 20 kDa se retrouve dans les SEB dans une proportion de 1 calmoduline pour 800 rhodopsines (Kohnken et al., 1981; Nagao et al., 1987). Elle module l'affinité des canaux ioniques pour le GMPc de façon calcium

dépendante. En effet, celle-ci se dissocie des canaux lorsque les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  et de GMPc deviennent faibles. Sa dissociation entraîne une affinité plus grande des canaux pour le GMPc et permet donc l'ouverture de ces derniers même à faible concentration de GMPc (Molday et Hsu, 1995). Cela contribue donc au rétablissement des concentrations de calcium et de sodium à l'intérieur des SEB.

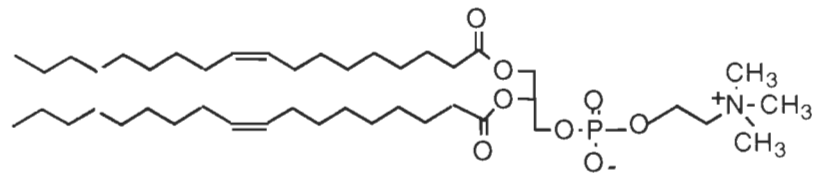
Bien que l'on ait caractérisé plusieurs protéines et déterminé leur fonction au sein des mécanismes d'activation et d'inactivation du processus visuel dans les SEB, il reste à élucider plusieurs étapes de ces mécanismes. Les interactions protéines-lipides peuvent également jouer un rôle dans les mécanismes d'inactivation et d'activation. C'est pour cette raison que les phospholipides des photorécepteurs visuels seront maintenant décrits en détail.

## 1.6 Importance des phospholipides des SEB

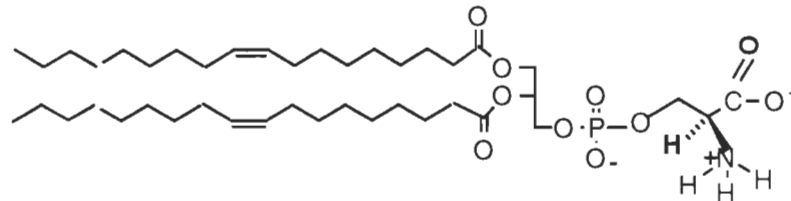
Bien que les interactions des protéines entre elles soient essentielles au bon fonctionnement du processus de phototransduction, il n'en demeure pas moins que leur interaction avec la membrane est tout aussi essentielle. Une protéine qui voyage dans le cytoplasme, donc en trois dimensions, aura une certaine probabilité de se lier à une autre protéine associée aux membranes pour laquelle elle aura une affinité. Pour ce faire, elle doit, premièrement, entrer en collision avec cette dernière et, deuxièmement, avoir un site de liaison orienté de façon adéquate pour qu'il y ait liaison. Ce mécanisme est

aussi valide pour des protéines qui diffusent à la surface de la membrane. Cependant, à une même densité de protéine, la probabilité d'entrer en collision avec une molécule adéquatement orientée afin de permettre une liaison est plus grande en deux dimensions (2D) qu'en trois dimensions (3D) si le milieu dans lequel voyage les protéines est suffisamment fluide (Liebman et Sitaramayya, 1984; Liebman et al., 1987). À cet effet, on doit mentionner que la composition en phospholipides de la membrane visuelle est très particulière car plus de 50 % des acides gras des phospholipides des photorécepteurs visuels sont polyinsaturés (AGPI) (constituant majeur: acide docosahexaénoïque ou 22:6 $\omega$ 3). Cette particularité confère à ces membranes une très grande fluidité. La composition phospholipidique des SEB pourrait donc avoir une influence sur le mode d'interaction des protéines entre elles et avec la membrane.

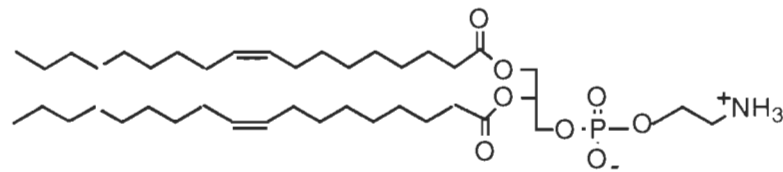
Voyons d'abord quelques caractéristiques des phospholipides. Ce sont des molécules amphiphiles composées d'une tête polaire (hydrophile) et d'un squelette glycérol auquel sont branchés deux acides gras non polaires (hydrophobes). La tête polaire du phospholipide peut être un groupement choline, éthanolamine, sérine, inositol ou hydroxyl lié à un phosphate que l'on appelle alors, respectivement, phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI) ou acide phosphatidique (PA) (Lehninger, 1981) (voir schéma 1.11). À pH neutre, la PC et la PE ont une charge globale neutre (molécules zwitterioniques) tandis que la PS, le PI et le PA sont chargés négativement (Lehninger, 1981). L'association des protéines avec les membranes dépend de la composition lipidique de celles-ci. La charge des phospholipides ou la grosseur de leur tête



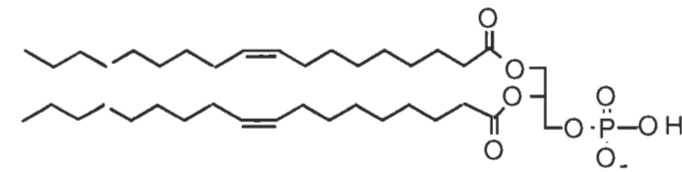
**DOPC: dioléoyl (18:1) phosphatidylcholine**



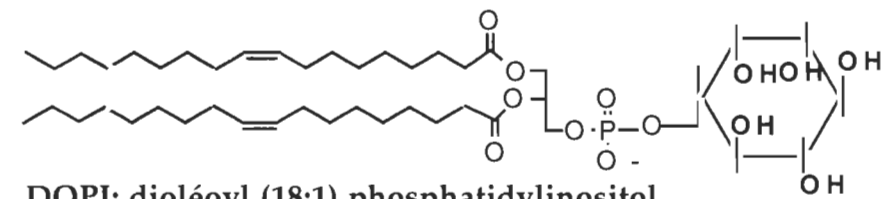
**DOPS: dioléoyl (18:1) phosphatidylsérine**



**DOPE: dioléoyl (18:1) phosphatidyléthanolamine**



**DOPA: acide dioléoyl (18:1) phosphatidique**



**DOPI: dioléoyl (18:1) phosphatidylinositol**

Schéma 1.11: Structure de phospholipides

polaire peut avoir une influence sur leur interaction avec les protéines (Marsh, 1990).

Dans les SEB, la PC, la PE et la PS représentent, respectivement, environ 45, 35 et 15 mol % (Miljanich, 1978; Miljanich et al., 1981, Wang et al., 1992). La composition en acides gras de ces phospholipides est très hétérogène: de façon générale, 64 % des acides gras qui composent les lipides des SEB sont polyinsaturés (Miljanich, 1978). Cela est très différent de ce qui est observé pour les autres types de cellules. Les SEB sont donc de loin les membranes naturelles les plus insaturées qui sont connues jusqu'à maintenant (Fliesler et Anderson, 1983).

Compte tenu que les membranes des disques des SEB sont très insaturées, que les vitesses de diffusion de la rhodopsine, de la  $G\alpha$  et de la PDE sont très grandes et que les variations de concentration d'ions monovalents et divalents au cours du processus visuel sont également très importantes, il est possible que la  $G\alpha$  ait une interaction très particulière avec ces membranes. Pour mesurer cette interaction, nous avons utilisé la spectroscopie de fluorescence.

## 1.7 La spectroscopie de fluorescence

Pour déterminer la localisation de protéines dans les membranes, la spectroscopie de fluorescence est un outil fort puissant (London et Feigenson, 1981). On peut étudier le transfert d'énergie entre les groupements tryptophanes

de protéines et un un groupement accepteur adéquat. Cependant, cette méthode présente un inconvénient majeur, le chromophore accepteur de l'énergie en provenance du tryptophane a un rayon critique qui est de l'ordre de l'épaisseur d'une monocouche lipidique (Bolen et Holloway, 1990). Il est alors difficile de conclure si la protéine a pénétré ou non la membrane (Bolen et Holloway, 1990). La méthode que nous avons choisie pour contourner ce problème repose sur l'utilisation de lipides bromés ou d'acide gras doxylés. Ces derniers sont des atténuateurs de fluorescence collisionnels et doivent donc être en contact étroit avec les tryptophanes pour atténuer leur fluorescence (Bolen et Holloway, 1990). Comme la  $G\alpha$  possède seulement deux tryptophanes, cette méthode se révèle donc tout à fait adéquate pour vérifier si l'un ou les deux tryptophanes de la  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  ou la  $G\alpha$ -GDP interagit avec la membrane. Si la fluorescence d'au moins un des tryptophanes de la  $G\alpha$  est atténuée par les lipides bromés cela indiquera que la protéine a pénétré la membrane.

### 1.7.1 Fluorescence intrinsèque de la $G\alpha$

La  $G\alpha$  possède deux tryptophanes, l'un en position 127 et l'autre en position 207 (Lambright et al., 1994). Le changement conformationnel que subit cette protéine lors de son passage de la forme inactive ( $G\alpha$ -GDP) vers la forme active ( $G\alpha$ -GTP) induit une augmentation de sa fluorescence intrinsèque (Phillips et Cerione, 1988), toutefois le magnésium doit être présent en quantité suffisante (Higashijima et al., 1987). Le schéma 1.12 montre la  $G\alpha$  sous sa forme  $G\alpha$ -GTP et  $G\alpha$ -GDP et indique la position des tryptophanes 127 et 207

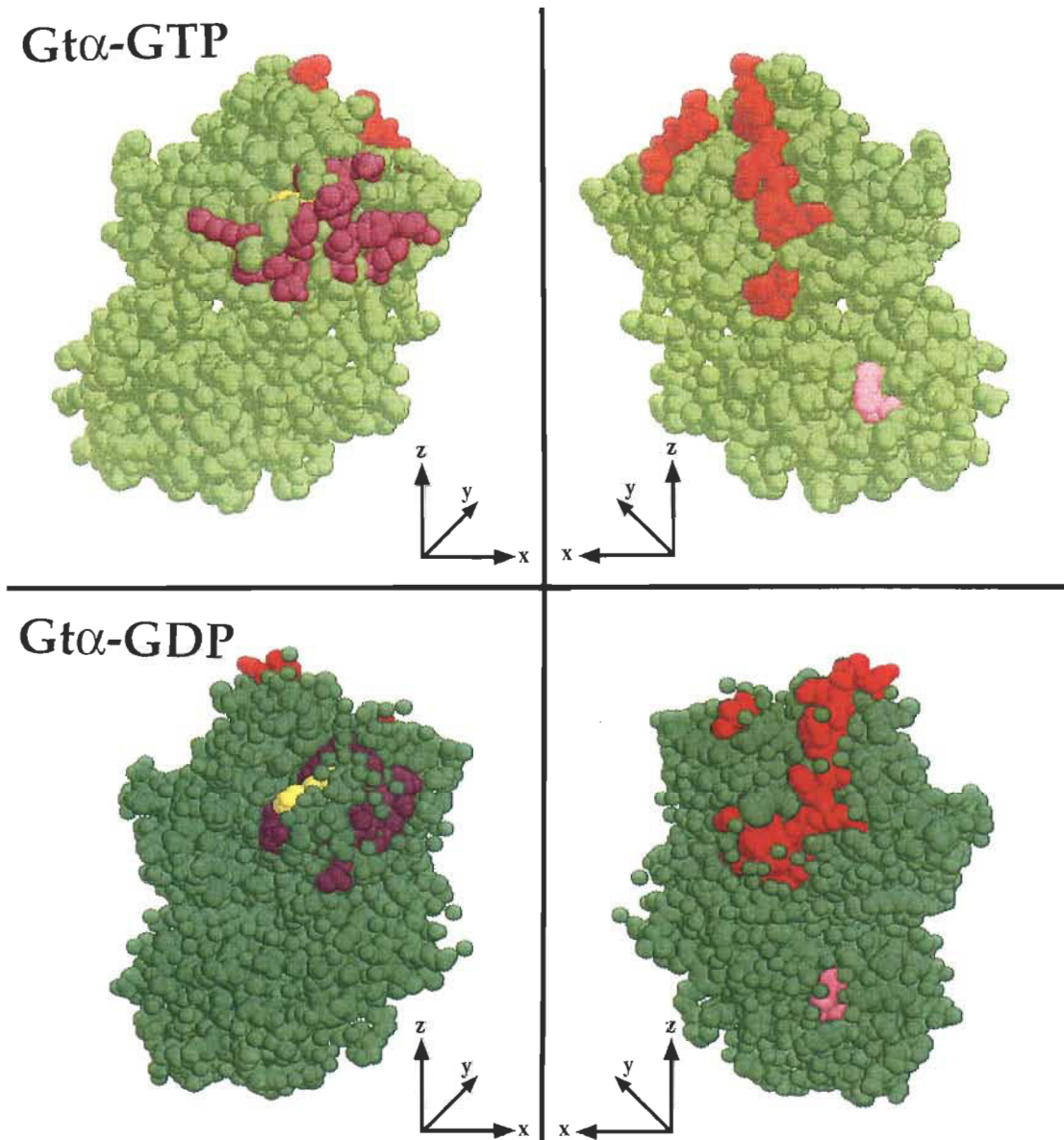


Schéma 1.12: Structure de la Gt $\alpha$  et position de ses tryptophanes

Le tryptophane 207 est coloré en jaune tandis que le tryptophane 127 apparaît en violet pâle. Les atomes colorés en rouge et en mauve représentent les sites d'interaction avec la rhodopsine et la PDE, respectivement.



ainsi que les sites d'interaction avec la PDE et la rhodopsine. La présence dans le site actif de la  $G\alpha$  d'un  $GTP\gamma S$  ou d'un  $GDP$  plus un  $AlF_4^-$  a un effet similaire à la présence d'un  $GTP$  (Phillips et Cerione, 1988). Par contre, ce dernier est hydrolysable et, par conséquent, l'augmentation de fluorescence est donc temporaire. C'est au tryptophane 207 qu'on attribue cette augmentation de fluorescence (Faurobert et al., 1993). De plus, la structure de la  $G\alpha-GTP\gamma S$  et celle de la  $G\alpha-GDP-AlF_4^-$ , déterminées par radiocristallographie, sont similaires (Noel et al., 1993; Sondek et al., 1994).

### 1.7.2 Bases théoriques des techniques de fluorescence utilisées

L'atténuation de fluorescence collisionnelle peut être décrite par l'équation classique de Stern-Volmer:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

où  $F_0$  et  $F$  représentent respectivement la fluorescence en absence et en présence d'atténuateur.  $K_{sv}$  est la constante de Stern-Volmer et  $[Q]$  est la concentration d'atténuateur. On observe fréquemment une déviation de la linéarité lorsqu'on porte en graphique  $F_0 / F$  en fonction de  $[Q]$  (pour une revue, voir Eftink (1991), Lakowicz (1983) et Chattopadhyay et London (1987)). Le résumé qui suit s'inspire principalement de ces trois documents. Une déviation négative de la linéarité est expliquée par le fait qu'une partie des fluorophores est dans un état de fluorescence différent par rapport au reste de la population des fluorophores ou par le fait que l'atténuateur ne peut atteindre une certaine population des fluorophores. Cela est notamment le cas lorsqu'une certaine partie des fluorophores d'une protéine ou d'un

peptide étudié est enfoui dans la membrane alors que le restant de la population des fluorophores de cette même protéine ou de ce peptide est à l'extérieur de la membrane. L'atténuation de la fluorescence de ces deux populations de fluorophores dont l'un est inaccessible à l'atténuateur peut être analysée par une forme modifiée de l'équation de Stern-Volmer. La fluorescence en absence d'atténuateur est décrite par l'équation:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \quad (2)$$

où le 0 en indice indique l'intensité de fluorescence en absence d'atténuateur. "a" représente la proportion de fluorophores accessibles et "b" la proportion de fluorophores inaccessibles. En présence d'atténuateur, l'intensité de fluorescence de la fraction de fluorophore accessible ( $F_{0a}$ ) décroît selon l'équation de Stern-Volmer, tandis que la fraction inaccessible à l'atténuateur demeure inchangée. L'équation de Stern-Volmer devient alors:

$$F = (F_{0a} / (1 + K_{sv}[Q])) + F_{0b} \quad (3)$$

En soustrayant l'équation 3 de l'équation 2, on obtient:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} (K_{sv}[Q] / (1 + K_{sv}[Q])) \quad (4)$$

une inversion de cette dernière équation nous donne:

$$F_0 / \Delta F = (1 / (f_a K_{sv}[Q])) + 1/f_a \quad (5)$$

$$\text{où } f_a = F_{0a} / (F_{0a} + F_{0b}) \quad (6)$$

et représente la fraction de fluorophores qui est accessible à l'atténuateur. Il est donc possible de connaître cette fraction ainsi que la constante d'atténuation  $K_{sv}$  grâce à l'ordonnée à l'origine ( $f_a$ ) et à la pente ( $f_a K_{sv}$ ) d'un graphique Stern-Volmer modifié.

Pour tenir compte de la déviation positive, on doit modifier l'équation de Stern-Volmer pour y inclure un terme additionnel qui est la constante de

quenching statique (V). On décrit souvent l'atténuation de fluorescence statique comme étant un mécanisme impliquant une "sphère d'action" où V représente le volume élémentaire autour du fluorophore à l'intérieur duquel toute la fluorescence est atténuée. Cette démarche nous conduit à l'équation de Perrin.

$$F / F_0 = \exp -V[Q] \quad (7)$$

Cette équation est utilisée pour l'analyse de l'atténuation de fluorescence statique d'un fluorophore et d'un atténuateur distribué au hasard en solution mais elle peut être modifiée pour l'analyse de l'atténuation de fluorescence dans les membranes en deux dimensions. En considérant que le fluorophore et l'atténuateur sont distribués au hasard dans un plan et que l'on substitue le volume infinitésimal d'une coquille par l'aire d'un anneau d'une épaisseur infinitésimale, on obtient l'équation bidimensionnelle de Perrin pour l'atténuation de fluorescence statique:

$$F / F_0 = \exp -\int [2\pi r C_s (1-F(r)/ F_0)] dr \quad (8)$$

où les bornes d'intégration vont de 0 à l'infini. F(r) correspond à l'intensité de fluorescence du fluorophore lorsque l'atténuateur est situé à une distance r et C<sub>s</sub> est la densité de surface de l'atténuateur. Le modèle le plus souvent utilisé pour décrire l'atténuation de fluorescence est l'approximation de la sphère rigide par lequel l'atténuation est décrite comme une fonction carrée où, au-delà d'un certain rayon R<sub>c</sub>, il n'y a aucune atténuation et, en deçà duquel, toute la fluorescence est atténuée. Si l'on réécrit mathématiquement ces propos, on aura:

$$F(r)/F_0 = 0 \quad \text{pour } r \leq R_c \quad (9)$$

et

$$F(r)/F_0 = 1 \quad \text{pour } r \geq R_c \quad (10)$$

lorsque l'on substitue ces valeurs dans l'équation 8, on obtient,

$$F/F_0 = \exp - \int [2\pi r C_S] dr = \exp - (\pi C_S R_C^2) \quad (11)$$

où les bornes d'intégration vont de 0 à  $R_C$  et l'expression  $\pi R_C^2$  représente un cercle autour de chaque atténuateur à l'intérieur duquel la fluorescence est complètement atténuée. On estime qu'il y a seulement 1 % d'erreur sur le valeur de  $R_C$  si les valeurs expérimentales de  $F/F_0$  sont supérieures ou égales à 0,5.

L'équation 8 peut être modifiée pour déterminer la profondeur de pénétration du fluorophore. Pour ce faire, on doit considérer que le fluorophore et l'atténuateur sont localisés sur des plans différents par une distance que l'on appelle "différence de distance verticale ou profondeur" et qui est symbolisée par  $z$ . Puisque  $z$  est la distance minimale entre le fluorophore et l'atténuateur, il devient la limite inférieure de l'intégrale de l'équation 8 et l'atténuation, selon l'approximation de la sphère rigide, devient alors:

$$F/F_0 = \exp - [\pi C_S (R_C^2 - z^2)] \quad \text{si } z \leq R_C \quad (12)$$

$$F/F_0 = 1 \quad \text{si } z \geq R_C \quad (13)$$

Chattopadhyay et London (1987) ont démontré que cette approximation est très bonne jusqu'à ce que  $z/R_C = 0,9$ . La détermination de  $z$  en utilisant l'équation 12 et en ayant un  $z/R_C < 0,9$  est valide à quelques pourcents près pour tout type d'atténuateur.

La spectroscopie de fluorescence nous a permis d'investiguer la fonction de la  $G\alpha$ . Ainsi, il a été possible de déterminer, à l'aide des équations 12 et 13, la profondeur de pénétration de la  $G\alpha$ -GTP. Une interaction de la  $G\alpha$ -GTP avec les membranes implique qu'il est possible que, *in vivo*, la  $G\alpha$ -GTP diffuse

latéralement pour activer la PDE. Ces résultats sont présentés au chapitre 3 et représentent un argument en faveur du mécanisme de diffusion latérale qui a été présenté à la section 1.4.2.1. De plus, les équations 1 à 13 sont utilisées au chapitre 4 où on y démontre que les acides doxylstéariques sont, tout comme les lipides bromés, adéquats pour déterminer la profondeur de pénétration de protéines ou de peptides dans les membranes modèles.

En plus de nous être intéressés à la fonction de la Gt $\alpha$ , nous nous sommes également intéressés à sa structure et nous avons tenté de cristalliser la Gt en présence de lipides.

## 1.8 Cristallisation bidimensionnelle de la Gt $\alpha$

«La structure et la fonction des protéines sont souvent comme des soeurs siamoises, on peut rarement les séparer sans causer de dommage» (Uhl et al., 1990). Il est pourtant fréquent que l'on ait à modifier considérablement le milieu dans lequel se trouve une protéine et d'en altérer ainsi ses propriétés fonctionnelles afin de la cristalliser pour déterminer sa structure. C'est le cas notamment lorsque la radiocristallographie est utilisée .

Bien que cette technique offre l'avantage d'une résolution supérieure à 2 Å dans les cas les plus favorables, il n'est pas exclu que la structure de la protéine étudiée soit altérée par les conditions de cristallisation. De plus, cette méthode nécessite l'obtention de cristaux tridimensionnels de qualité et de

taille satisfaisantes, ce qui implique l'emploi d'une quantité importante de protéines à un niveau de pureté supérieur à 95 % (McPherson et al., 1995).

Outre cette méthode qui est la plus connue, il existe deux autres méthodes permettant de connaître la structure tridimensionnelle des protéines: la RMN et la cristallographie électronique. La RMN permet, tout comme la radiocristallographie, d'obtenir une résolution de niveau atomique et offre l'avantage de travailler avec des protéines en solution sans requérir l'obtention de cristaux au préalable (Wütrich, 1986; Clore et Gronenborn, 1991). On doit toutefois utiliser aussi des dizaines de milligrammes de protéines car la concentration requise pour la prise de spectres doit être très élevée. Cela peut aussi engendrer des problèmes d'agrégation des protéines étudiées. Toutefois, la principale limitation de cette méthode est la taille des protéines étudiées qui est en général de 15 à 30 kDa. Au-delà de cette taille, les mouvements des protéines sont lents, ce qui a une influence sur la résolution spectrale qu'il est possible d'atteindre (Wütrich, 1986; Clore et Gronenborn, 1991).

La cristallographie électronique offre une résolution habituellement beaucoup moins grande, soit d'environ 15 à 20 Å, mais qui peut être considérablement améliorée par l'utilisation de la cryomicroscopie et du traitement d'image. Dans le meilleur des cas, il est possible d'atteindre une résolution d'environ 3 Å (Baldwin et al., 1988; Kubalek et al., 1991; Wong et al., 1992). Bien que, de façon générale, cette méthode offre une résolution moins grande que la radiocristallographie et la RMN, elle possède de nombreux avantages qui en font une méthode complémentaire de choix.

Voici d'abord une brève description de cette méthode qui consiste à étudier un arrangement bidimensionnel (2D) d'un cristal protéine-lipide. Le développement de la cristallographie électronique a d'ailleurs débuté par l'observation de protéines membranaires qui, comme la bactériorhodopsine, adoptent de façon naturelle un arrangement cristallin dans la membrane. Plusieurs variantes de cette technique ont par la suite été développées pour cristalliser des protéines périphériques (Yoshimura et al., 1990). La plus employée est celle faisant intervenir une monocouche de lipides (Pour une revue, voir Lebeau et al., 1996). On utilise un lipide lié ou non à un groupement fonctionnel capable d'interagir avec la protéine cible qui se trouve dans la sous-phase. La protéine peut alors interagir avec la monocouche de lipides pour former un arrangement cristallin en 2D. L'utilisation de lipides non fonctionnalisés mise sur les interactions électrostatiques entre les lipides utilisés et la protéine à cristalliser. Ces lipides peuvent être naturels (PE, PC, PS, etc.) ou synthétiques. Le potentiel de surface de la monocouche et la charge de la protéine peuvent être contrôlés par le pH de la sous-phase. La présence d'ions divalents ou la force ionique du milieu peuvent influencer l'interaction protéine-lipide. Il est également préférable d'utiliser une préparation protéique ayant un degré de pureté élevé afin d'être certain de ne pas cristalliser l'impureté plutôt que la protéine visée (Lebeau et al., 1996).

L'utilisation de lipides fonctionnalisés provoque une préorientation de la protéine facilitant le processus de cristallisation (Lebeau et al., 1996). Les schémas 1.13 A et B illustrent, respectivement, le processus de cristallisation en 2D avec des lipides fonctionnalisés et l'influence de la longueur du bras

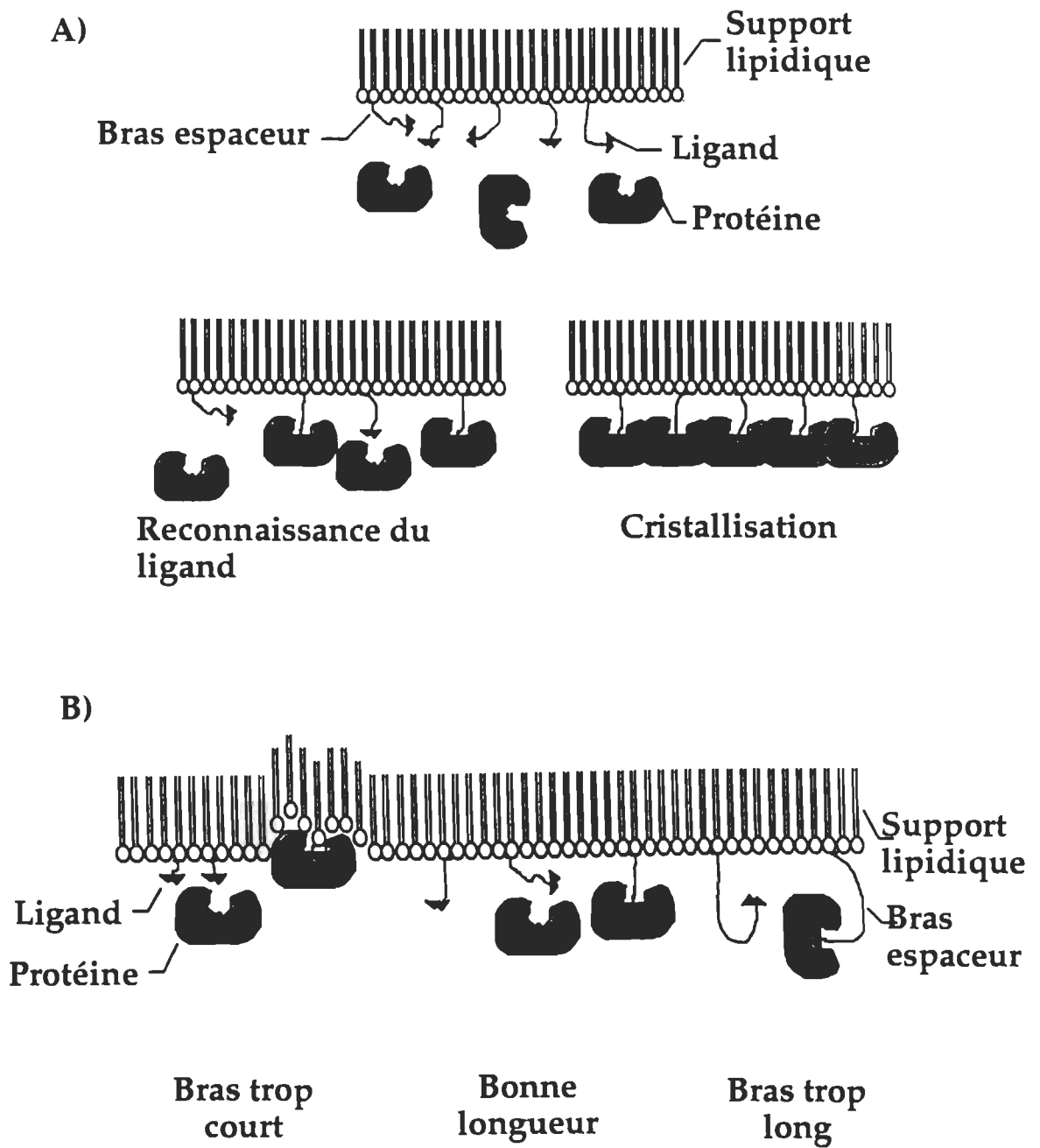


Schéma 1.13: Cristallisation en deux dimensions. A) Processus de cristallisation en 2D avec des lipides fonctionnalisés. B) Influence de la longueur du bras espaceur sur la cristallisation. (Vincent, 1997)



espaceur sur la cristallisation. Une interaction spécifique lipide-protéine est reconnue comme étant la meilleure stratégie pour cristalliser des protéines en deux dimensions.

Les avantages de cette méthode résident d'abord dans le fait qu'il est possible de visualiser la protéine en interaction avec un ligand choisi et/ou avec une membrane modèle (Ribi et al., 1988). On peut contrôler également la composition de la sous-phase. Dans le cas des lipides fonctionnalisés, la spécificité de l'interaction avec le ligand permet l'utilisation de protéines ayant un degré de pureté moindre sans compromettre le processus de cristallisation (Ludwig et al., 1986). Une résolution à l'échelle atomique est rarement atteinte par cette méthode. Par contre, il est possible avec une résolution de 15 Å de déterminer la forme générale tridimensionnelle (3D) de la protéine. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir des prises de vue du cristal protéique sous différents angles afin de compiler les multiples projections de la protéine (Lebeau et al., 1996). Enfin, précisons que l'un des développements récents de cette technique consiste à intégrer les données de radiocristallographie et de RMN de haute résolution obtenues pour des fragments protéiques dans la structure de la protéine entière (Lebeau et al., 1996).

La stratégie que nous avons choisie pour cristalliser la  $G\alpha$  en deux dimensions consiste à utiliser d'abord des lipides non fonctionnalisés puis des lipides fonctionnalisés. Ces derniers seront composés d'un dérivé non hydrolysable du GDP branché à un lipide à l'aide d'un bras espaceur au niveau de la tête polaire afin de lier spécifiquement la  $G\alpha$ . Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec Stéphane Vincent sous la direction du Dr Luc

Lebeau du Laboratoire de Synthèse Bioorganique de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg qui ont effectué la synthèse des molécules pour lesquelles nous avons fait des tests d'affinité.

## 1.9 Problématique de ce travail de recherche

Précisons que toutes les interactions qui ont lieu entre les protéines impliquées dans la cascade de réactions biochimiques au cours de processus visuel sont dues à la diffusion et à la collision des protéines entre elles. Les coefficients de diffusion latérale ou cytoplasmique ainsi que la densité de chacune des protéines impliquées dans les mécanismes d'activation ou d'inactivation ont une importance certaine sur les réactions qui seront favorisées (Lamb et Pugh, 1992b). De plus le type d'interaction qu'ont les protéines avec les membranes peut être déterminant en ce qui a trait à la vitesse à laquelle elles activeront ou inactiveront une cascade de réactions biochimiques (Lamb et Pugh, 1992a). C'est à ce niveau que se situe la problématique de recherche de cette thèse.

Il existe une controverse dans la littérature concernant le type d'interaction qu'entretient la  $G\alpha$  avec la membrane. Certains auteurs suggèrent que la  $G\alpha$ , une fois activée par  $R^*$ , se déplace à la surface de la membrane (mécanisme de diffusion latérale) (voir schéma 1.7) (Uhl et al., 1990; Lamb et Pugh, 1992a) alors que d'autres proposent qu'elle se déplace par le biais du cytoplasme (mécanisme de diffusion par saut) (voir schéma 1.7) (Kühn, 1981; Fung et al., 1981; Gilman, 1987; Bruckert et al., 1988; Chabre, 1987). L'étape

limitante du processus d'activation visuelle est l'échange du GDP pour le GTP et la migration de la sous-unité active, la  $G\alpha$ -GTP, vers la phosphodiesterase (Chabre et Deterre, 1989; Uhl et Ryba, 1990; Lamb et Pugh, 1992b; Pfister et al., 1993). De plus, le mode d'interaction de la  $G\alpha$  avec la membrane discale peut avoir des répercussions non seulement sur les vitesses d'activation mais aussi sur les vitesses d'inactivation du processus visuel (voir schéma 1.10). Il est donc d'un intérêt certain de mieux connaître le mode d'interaction de la  $G\alpha$  avec les membranes. Le premier objectif de cette thèse est donc de mieux caractériser l'interaction de la  $G\alpha$  avec les membranes.

La deuxième problématique de notre travail a trait à la structure de la  $G\alpha$ . La détermination de la structure tridimensionnelle (3D) est susceptible d'apporter des informations sur le fonctionnement de la Gt. Au début de ce projet de recherche, aucune structure cristallographique de la Gt n'avait été publiée.

Les structures radiocristallographiques de la  $G\alpha$ -GTP $\gamma$ S,  $G\alpha$ -GDP,  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  et de la  $G\beta\gamma$  ainsi que la structure de la forme hétérotrimérique de la Gt nous ont beaucoup appris sur le site actif de la  $G\alpha$ , sur le changement conformationnel que subit la  $G\alpha$  lors de l'échange du GDP pour le GTP ainsi que sur l'interaction des sous-unités entre elles (Noel et al., 1993; Lambright et al., 1994; Sondek et al., 1994; Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996). Bien qu'à partir des résultats de radiocristallographie, certains auteurs ont spéculé sur les zones d'interaction de la Gt avec les membranes (Onrust et al., 1997; Lichtarge et al., 1996) (voir schéma 1.8), ces résultats nous donnent peu d'information quant à l'interaction de la  $G\alpha\beta\gamma$  ou de la  $G\alpha$  sous sa forme

active ou inactive avec la membrane. C'est pourquoi nous avons tenté par cristallographie électronique d'obtenir ce type d'information.

### 1.10 Objectifs de recherche

Pour déterminer si la  $G\alpha$  interagit avec les membranes modèles et définir les conditions régissant cette interaction, nous avons fait des mesures de liaison de la  $G\alpha$  en présence de monocouches de différents lipides. Ces résultats (chapitre 2) démontrent que la  $G\alpha$ , sous sa forme active ( $G\alpha$ -GTP) et inactive ( $G\alpha$ -GDP), interagit avec les membranes en présence de NaCl et de  $MgCl_2$ .

Pour estimer la profondeur d'insertion de la  $G\alpha$  dans les membranes modèles, nous avons utilisé la spectroscopie de fluorescence. Nous avons mesuré l'atténuation de la fluorescence intrinsèque de la  $G\alpha$  par des phospholipides pourvus d'un atome lourd (le brome) à des positions bien précises de la chaîne hydrocarbonée. Ces résultats font l'objet du chapitre 3. On y démontre entre autres que la  $G\alpha$  sous sa forme active pénètre d'au moins 6.5 Å dans les membranes.

Nous avons aussi mis au point une autre méthode pour mesurer la profondeur de pénétration d'un peptide dans des vésicules. Pour ce faire, nous avons utilisé un lipide auquel est lié un groupement nitroso à des positions précises afin d'atténuer la fluorescence intrinsèque du tryptophane d'un peptide synthétique. Moyennant quelques adaptations, cette méthode pourra

aussi être utilisée pour déterminer la profondeur de pénétration de la  $G\alpha$  ou de tout autre protéine périphérique (voir chapitre 4).

On a aussi mesuré l'affinité de différents analogues du GDP pour la  $G\alpha$ . Ces analogues couplés ou non à un bras espaceur furent testés en vue de les lier à des lipides qui pourraient éventuellement être utilisés dans la cristallisation de la  $G\alpha$ -GDP ou de la  $Gt$  hétérotrimérique. Enfin, nous avons cristallisé la  $G\alpha$ -GDP ainsi que la  $G\alpha\beta\gamma$  à l'interface lipide-tampon à l'aide de lipides non spécifiques. Les résultats de ces dernières expériences sont montrés au chapitre 5.

Ces résultats sont nouveaux et toutes les preuves expérimentales qui s'y rattachent sont exposées aux chapitres 2 à 5 de cette thèse. Le chapitre 6 donne une conclusion générale et mentionne les implications et les perspectives de ce travail de recherche. On y fait aussi état d'une hypothèse de travail concernant un mécanisme d'inhibition possible des SEB.

## 1.11 Références

- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M. et Roberts, K. Molecular Biology of the Cell (3rd ed.), New York, Garland Publishing Inc., 1992.
- Ali, M.A. et Klyne, M.A. La vision chez les vertébrés. Ville Mont-Royal, Décarie ed., 1986.
- Angleson, J.K. et Wensel, T.G. A GTPase-accelerating factor for transducin, distinct from its effector cGMP phosphodiesterase, in rod outer segment membranes. Neuron. 1993. 11: 939-949.
- Angleson, J.K. et Wensel, T.G. Enhancement of rod outer segment GTPase accelerating protein activity by the inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 16290-16296.
- Antonny, B., Otto-Bruc, A., Chabre, M. et Vuong, T.M. GTP hydrolysis by purified  $\alpha$ -subunit of transducin and its complex with the cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor. Biochemistry. 1993. 32: 8646-8653.
- Arshavsky, V.Y., Antoch, M.P., Lukjanov, A.K.A. et Philipov, P.P. Transducin GTPase for rapid quenching of the cGMP cascade in rod outer segments. FEBS Letters. 1989. 250: 353-356.
- Arshavsky, V.Y., Dumke, C.L. et Bownds, M.D. Noncatalytic cGMP-binding sites of amphibian rod cGMP phosphodiesterase control interaction with

its inhibitory  $\gamma$ -subunits. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 24501-24507.

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

Bayer, B., Naynert M. et Stieve, H. Phototransduction: Different mechanisms in vertebrate and invertebrate. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology. 1990. 7: 107-148.

Baldwin, J.M., Henderson, R., Beckman, E. et Zemlin, F. Images of purple membrane at 2.8 Å resolution obtained by cryo-electron microscopy. Journal of Molecular Biology. 1988. 202: 585-591.

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

Bolen, E.J. et Holloway, P.W. Quenching of tryptophan fluorescence by brominated phospholipids. Biochemistry. 1990. 29: 9638-9643.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. et McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature. 1991. 349: 117-127.

Brown, F.M. Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. Chemistry and Physics of Lipids. 1994. 73: 159-180.

- Bruckert, F., Vuong, T.M. et Chabre, M. Light and GTP dependence of transducin solubility in retinal rods. European Biophysics Journal. 1988. 16: 207-218.
- Bruckert, F., Chabre, M. et Vuong, M.T. Kinetic analysis of the activation of transducin by photoexcited rhodopsin: Influence of the lateral diffusion of transducin and competition of guanosine diphosphate and guanosine triphosphate for the nucleotide site. Biophysical Journal. 1992. 63: 616-629.
- Bruckert, F., Catty, P., Deterre, P. et Pfister, C. Activation of phosphodiesterase by transducin in bovine rod outer segments: Characteristics of the successive binding of two transducins. Biochemistry. 1994. 33: 12625-12634.
- Casey P. G protein: Visual difference. Nature. 1992. 359: 671-672.
- Casey, P. Lipid modification of G proteins. Current Opinion in Cell Biology. 1994. 6: 219-225.
- Catty, P., Pfister, C., Bruckert, F. et Deterre, P. The retinal phosphodiesterase-transducin complex: membrane binding, subunits interactions and activity. Structures and Functions of Retinal Proteins. 1992. 221: 387-390.
- Chabre, M. Trigger and amplification mechanisms in visual phototransduction. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry. 1985. 14: 3321-360.



- Chabre, M. The G protein connection: is it in the membrane or the cytoplasm? Trends in Biochemical Sciences. 1987. 12: 213-215.
- Chabre, M., Bigay, J., Deterre, P. et Pfister, C. Fast termination and adaptation in the cGMP cascade of visual transduction. NATO ASI Series (H). 1987. 6: 225-239.
- Chabre, M. et Deterre, P. Molecular mechanism of visual transduction. European Journal Biochemistry. 1989. 179: 255-266.
- Chabre, M. et Deterre, P. Transducin, rhodopsin, and 3',5'-cyclic GMP phosphodiesterase: typical G-protein-mediated transduction system, *dans* G proteins. San Diego, Academic Press, 1990.
- Chabre, M., Antonny, B., Bruckert, F. et Vuong, T.M. The G protein cascade of visual transduction: kinetics and regulation, *dans* The GTPase Superfamily. Wiley, Chichester (Ciba Fondation Symposium 176) 1993. 112-124 .
- Chattopadhyay, A. et London, E. Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-label phospholipids. Biochemistry. 1987. 26: 39-45.
- Clore, G.M. et Gronenborn, A.M. Structure of large proteins in solution: Three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. Science. 1991. 252: 1390-1399.

- Cook, N.J., Hanke, W. et Kaupp, U.B. Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1987. 84: 585-589.
- Cote, R.H., Bownds, M.D. et Arshavsky, V.Y. cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: Role in feedback inhibition of visual transduction. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1994. 91: 4845-4849.
- Darnell, J.E., Lodish, H. et Baltimore, D. Molecular Cell Biology. 2<sup>e</sup> éd. New York: Scientific American Book, 1990.
- Deterre, P., Bigray, J., Pfister, C. et Chabre, M. Guanine nucleotides and magnesium dependence of the association states of the subunits of transducin. FEBS Letters. 1984. 178: 228-232.
- Doly, M. et Meyniel, G. La transduction rétinienne. Journal de Médecine Nucléaire et Biophysique. 1989. 13: 337-341.
- Eismann, E., Bönigk, W. et Kaupp, U.B. Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. Cell Physiology and Biochemistry. 1993. 3: 332-351.
- Eftink, M.R. Fluorescence spectroscopy, Volume 2: Principles, Lakowicz, J.R. (ed.) Plenum Press, New York, 1991.

- Faurobert, E., Otto-Bruc, A., Chardin, P. et Chabre, M. Tryptophan W207 in transducin T $\alpha$  is the fluorescence sensor of the G protein activation switch and is involved in the effector binding. The EMBO Journal. 1993. 12: 4191-4198.
- Fleischman, D. et Denisevich, M. Guanylate cyclase of isolated bovine retinal rod axonemes. Biochemistry. 1979. 18: 5060-5066.
- Fliesler, S.K. et Anderson, R.E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. Progress in Lipid Research. 1983. 22: 79-131.
- Franke, R. R., König, B. Sakmar, T. P., Khorana, H. G. et Hofmann, K. P. Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transducin. Science. 1989. 250: 123-125.
- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T. Akino, T. et Shimonoshi, Y. Farnesylated  $\gamma$ -subunit of photoreceptor G protein is indispensable for GTP-binding. Nature. 1990. 346: 358-360.
- Fung, B.K.K., Hurley, J.B. et Stryer, L. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1981. 78: 152-156.
- Fung, B.K.K. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits. The Journal of Biological Chemistry. 1983. 258: 10495-10502.

- Gilman, A.G. G protein: transducer of receptor-generated signals. Annual Review of Biochemistry. 1987. 56: 615-649
- Gilman, A.G., G proteins and regulation of adenylate cyclase (Nobel lecture) Angewandte Chemie International Edition in English. 1995. 34: 1406-1419.
- Gorodovikova, E.N., Senin, I.I. et Philipov, P.P. Calcium-sensitive control of rhodopsin phosphorylation in the reconstituted system consisting of photoreceptor membranes, rhodopsin kinase and recoverin. FEBS Letters. 1994. 353: 171-172.
- Gray-Keller, M.P., Biernbaum, M.S. et Bownds, M.D. Transducin activation in electropermeabilized frog rod outer segments is highly amplified, and a portion equivalent to phosphodiesterase remains membrane-bound. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 15323-15332.
- Gray-Keller, M.P., Polans, A.S., Palczewski, K. et Detwiler, P.B. The effect of recoverin-like calcium binding proteins on the photoresponse of retinal rods. Neuron. 1993. 10: 523-531.
- Gregor, J.J., Jones, J. et Cornwall, M.C. Movement of retinal along cone and rod photoreceptors. Visual Neuroscience. 1994. 11: 389-399.
- Grenier, S. Lagüe, P. et Salesse, C. Phospholipid, GTP, and salt dependent binding of the alpha subunit of rod outer segment G protein transducin in

monolayers. Frontiers of Peptide-Protein Chemistry and Biotechnology, Li Qing-Shan and Wang Zhong-Mu, éd. China, Guangxi Teacher's University Press, 1994. 60-67.

Grenier, S., Desmeules, P., Dutta, A.K., Yamazaki, A. et Salesse, C. Determination of the depth of penetration of the alpha subunit of retinal G protein in membranes: A spectroscopic study. Biochimica Biophysica Acta. 1998. 1370: 199-206.

Grigorjev, I.V., Alexanger, I.G., Artamonov, I.D., Baranova, L.A. et Volotovski, I.D.  $\beta\gamma$ -transducin stimulates hydrolysis and synthesis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate in bovine rod outer segment membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 1996. 1310: 131-136.

Gurevich, V.V. et Benovic, J.L. Visual arrestin interaction with rhodopsin: Sequential multi-site binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 11628-11638.

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

Hargrave, P.A., Hamm, H.E. et Hofmann, K.P. Interaction of rhodopsin with the G-protein, Transducin. BioEssays. 1992. 15: 43-50.

- Hargrave, P.A. Future directions for rhodopsin structure and function studies. Behavioral and Brain Sciences. 1995. 18: 403-414.
- Hepler, J.R. et Gilman, A.G. G proteins. Trends in Biochemical Sciences. 1992. 17: 383-387.
- Higashijima, T., Ferguson, K. M., Sternweis, P. C., Smigel, M. D. et Gilman, A. G. Effects of  $Mg^{2+}$  and  $\beta\gamma$ -subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. The Journal of Biological Chemistry. 1987. 262: 762-766.
- Homburger, V. Les protéines G: leur rôle dans la transduction du message hormonal et leur pathologie. Annales d'endocrinologie (Paris). 1991. 52: 373-380.
- Horio, Y. et Murad, F. Solubilization of guanylyl cyclase from bovine rod outer segments and effects of lowering  $Ca^{2+}$  and nitro compound. The Journal of Biological Chemistry. 1991. 266: 3411-3415.
- Hurley, J.B. Isolation and assay of a phosphodiesterase inhibitor from retinal rod outer segments. Methods in Enzymology. 1982. 81: 542-547.
- Hurley, J.B. Signal transduction enzymes of vertebrate photoreceptors. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 1992. 24: 219-226.

- Hurley, J.B. Recoverin and  $\text{Ca}^{2+}$  in vertebrate phototransduction. Behavioral and Brain Sciences. 1995. 18: 425-428.
- Kahler, M., König, B. et Hofmann, K.P. Displacement of rhodopsin by GDP from three-loop interaction with transducin depends critically on the diphosphate  $\beta$ -position. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 18928-18932.
- Kaupp, U.B. et Koch, K.W. Mechanism of photoreception in vertebrate vision. Trends in Biochemical Sciences. 1986. 11: 43-47.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bonigk, W., Stuhmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. et Numa, S. Primary structure and functional expression from cDNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. Nature. 1989. 342: 762-766.
- Kaupp, U.B. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. Trends in Neurosciences. 1991. 14: 150-157.
- Kaupp, U.B. et Koch, K.W. Role of cGMP and  $\text{Ca}^{2+}$  in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. Annual Review of Physiology. 1992. 54: 153-175.
- Kawamura, S. Light-sensitivity modulating protein in frog rods. Photochemistry and Photobiology. 1992. 56: 1173-1180.

- Kawanura, S. et Murakami, M. Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. Nature. 1991. 349: 420-423.
- Koch, K.W. Biochemical mechanism of light adaptation on vertebrate photoreceptors. Trends in Biochemistry. 1992a. 17: 307-311.
- Koch, K.W. Recovery of the photoresponse in vertebrate photoreceptors: Role of Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of guanylate cyclase. Structures and Functions of Retinal Proteins. 1992b. 221: 391-394.
- Koch, K.W, Eckstein, F. et Stryer, L. Stereochemical course of the reaction catalyzed by guanylate cyclase from bovine retinal rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1990. 265: 9659-9663.
- Koch, K.W. et Stryer, L. Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. Nature. 1988. 334: 64-66.
- Kohnken, R.E., Chafouleas, J.G., Eadie, D.M., Means, A.R. et McConnell, D.G. Calmodulin in bovine rod outer segments. The Journal of Biological Chemistry. 1981. 256: 12517-12522.
- Kokame, K., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Takao, T. et Shimonishi, Y. Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein  $\alpha$ -subunit. Nature. 1992 359: 749-752.



- König, B., Arendt, A., McDowell, J.H., Kahlert, P.A., Hargrave, P.A. et Hofmann, K.P. Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1989. 86: 6878-6882.
- Kubalek, E.W., Kornberg, R.D. et Darst, S.A. Improved transfer of two-dimensional crystals from air/water interface to specimen support grid for high-resolution analysis by electron microscopy. Ultramicroscopy. 1991 35: 295-304.
- Kühn, H. Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. Biochemistry. 1978. 17: 4389-4395.
- Kühn, H. Interactions of rod cell proteins with the disk membrane: Influence of light, ionic strength, and nucleotides. Current Topics in Membranes and Transport. 1981. 15: 171-201.
- Kühn, H. Interactions between photoexcited rhodopsin and light-activated enzymes in rods, *dans* Progress in Retinal Research, vol. 3. New York: Pergamon Press, 1984.
- Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, N.Y. 1983.
- Lamb, T.D. et Pugh Jr, E.N. A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors. Journal of Physiology. 1992a. 449: 719-758.

- Lamb, T.D. et Pugh Jr, E.N. G-protein cascade: gain and kinetics. Trends in Neurosciences. 1992b. 15: 291-298.
- Lambrecht, H.G. et Koch, K.W. Phosphorylation of recoverin, the calcium-sensitive activator of photoreceptor guanylyl cyclase. FEBS Letters. 1991. 294: 207-209.
- Lambright, D.G., Noel, P.N., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. Structural determinant for activation of the  $\alpha$ -subunit of a heterotrimeric G protein. Nature. 1994. 369: 621-627.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. The 2.0 Å crystal structure of heterotrimeric G protein. Nature. 1996. 379: 311-319.
- Lebeau, L., Schultz, P., Celia, H., Messini, P., Nuss, S., Klinger, C., Olland, S., Oudet, P. et Mioskowski, C. Specifically designed lipid assemblies as tools for two-dimensional crystallization of soluble biological macromolecules, *dans* Handbook of nonmedical applications of liposomes. Barenholz, Y. et Lasic, D.D. (éd.). New York, CRC Press, 1996. Boca Raton, New York, London, Tokyo. 153-186.
- Lee, R.H., Brown, B.M. et Lolley, R.N. Light-induced dephosphorylation of a 33 K protein in rod outer segments of rat retina. Biochemistry. 1984. 23: 1972-1977.

- Lee, R.H., Lieberman, B.S. et Lolley, R.N. A novel complex from bovine visual cells of a 33 000-dalton phosphoprotein with beta- and gamma-transducin: purification and structure determination. Biochemistry. 1987. 26: 3983-3990.
- Lee, R.H., Ting, T.D., Lieberman, B.S., Tobias, D.E., Lolley, R.N. et Ho, Y.K. Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 25104-25112.
- Lehninger, A.L. Biochimie: Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. France, Flammarion Médecine-Science, 1981.
- Lerea, C.L., Stomers, D.E., Hurley, J.B., Kloch, I.B. et Blunt-Milam, A.H. Identification of specific transducin  $\alpha$  subunits in retinal rod and cone photoreceptors. Science. 1986. 234: 77-80.
- Lichtarge, O., Bourne, H. R. et Cohen, F. E. Evolutionarily conserved  $G\alpha\beta\gamma$  binding surfaces support a model of the G protein-receptor complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1996. 93: 7507-7511.
- Liebman, P. A. et Sitaramayya, A. Receptor interaction in amplified phosphodiesterase activation of retinal rods. Advance in Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Research. 1984. 17: 215-225.

- Liebman, P.A., Parker, K.R. et Dratz., E.A. The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment. Annual Review of Physiology. 1987. 49: 765-791.
- Liebman, P.A. et Pugh Jr, E.N. ATP modulates rapid reversal of cGMP phosphodiesterase activation in visual receptor membranes. Nature. 1980. 287: 634-636.
- Linder, M.E. et Gilman, A.G. G proteins. Scientific American. 1992. 267: 56-61.
- Ludwig, D.D., Ridi, H.O., Schoolnik, G.K. et Kornberg, R.D. Two-dimensional crystals of cholera toxin B-subunit-receptor complexes: projected structure at 17 Å resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1986. 83: 8585-8588.
- London, E. et Feigenson, G. W. Fluorescence quenching in model membranes. Biochemistry. 1981. 20: 1932-38.
- Marsh, D. Lipid-protein interactions in membranes. FEBS Letters. 1990. 268: 371-375.
- McPherson, A., Maldin, A.J. et Kuznetsov, Y.G. The science of macromolecular crystallization. Structure. 1995. 3: 759-768.

- Miljanich, G.P. Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane. Thèse de doctorat, University of California, Santa Cruz, 1978.
- Miljanich, G.P., Nemes, P.P., White, D.L. et Dratz, E.A. The asymmetric transmembrane distribution of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and fatty acids of the bovine rod outer segment disk membranes. Journal of Membrane Biology. 1981. 60: 249-255.
- Molday, R.S. et Hsu, Y.T. The cGMP-gated channel of photoreceptor cells: Its structural properties and role in phototransduction. Behavioral and Brain Science. 1995. 18: 441-451.
- Nagao, S., Yamazaki, A. et Bitensky, M.W. Calmodulin and calmodulin binding proteins in amphibian rod outer segments. Biochemistry. 1987. 26: 1659-1665.
- Navon, S.E., et Fung, B.K.-K. Characterisation of transducin from bovine retinal rod outer segments. Participation of amino-terminal region of  $\alpha$  in subunit interaction. The Journal of Biological Chemistry. 1987. 262: 15746-15751.
- Neubert, T.A., Johnson, R.S., Hurley, J.B. et Walsh, K.A. The rod transducin  $\alpha$  subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 18274-18277.

- Noel, P.N., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP $\gamma$ S. Nature. 1993. 366: 654-663.
- Ohguro, H., Fukada, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Yoshizawa, T. et Akino, T. Carboxyl methylation and farnesylation of transducin  $\gamma$ -subunit synergistically enhance its coupling with metarhodopsin II. The EMBO Journal. 1991. 10: 3669-3674.
- Ohguro, H., Palczewski, K., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. et Johnson, R.S. Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. Biochemistry. 1993. 32: 5718-5724.
- Onrust, R., Hermark, P., Chi, P. Garcia, P.D., Lichtarge, O, Kingsley, C. et Bourne, H.R. Receptor and  $\beta\gamma$  binding sites in the  $\alpha$  subunit of the retinal G protein transducin. Science. 1997. 275: 281-283.
- Otto-Bruc, A., Antony, B., Vuong, T.M., Chardin, P. et Chabre, M. Interaction between the retinal cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor and transducin: Kinetics and affinity studies. Biochemistry. 1993. 32: 8636-8645.
- Palczewski, K., McDowell, J.H. et Hargrave, P.A. Purification and characterization of rhodopsin kinase. The Journal of Biological Chemistry. 1988. 263: 14067-14073.

- Palczewski, K., Rispoli, G. et Detwiler, P.B. The influence of arrestin (48K protein) and rhodopsin kinase on visual transduction. Neuron. 1992. 8: 117-126.
- Palczewski, K. Is vertebrate phototransduction solved? New insights into the molecular mechanism of phototransduction. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1994. 10: 3578-3581.
- Papac, D.I., Oatis Jr, J.E., Crouch, R.K. et Knapp, D.R. Mass spectrometric identification of phosphorylation sites in bleached bovine rhodopsin. Biochemistry. 1993. 32: 5930-5934.
- Pfister, C., Bennet, N., Bruckert, F., Catty, P., Clerc, A., Pages, F. et Deterre, P. Interactions of a G-protein with its effector: transducin and cGMP phosphodiesterase in retinal rods. Cellular Signalling. 1993. 5: 235-251.
- Phillips, W.J. et Cerione, R.A. The intrinsic Fluorescence of the  $\alpha$  subunit of transducin. The Journal of Biological Chemistry. 1988. 263: 15498-15505.
- Phillips, W.J. et Cerione, R.A. Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin- $\beta\gamma$  subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy. The Journal of Biological Chemistry. 1992a. 267: 17032-17039.
- Phillips, W.J., Wong, S.C. et Cerione, R.A. Rhodopsin/transducin interactions. II. Influence of the transducin- $\beta\gamma$  subunit complex on the coupling of the

transducin- $\alpha$  subunit to rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry. 1992b. 267: 17040-17046.

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

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

Rayer, B., Naynert, M. et Stieve, H. Phototransduction: Different mechanisms in vertebrates and invertebrates. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology. 1990. 7: 107-148.

Ribi, H.O., Ludwig, D.S., Schoolnik, G.K. and Kornberg, R.D. Three-dimensional structure of cholera toxin penetrating a lipid membrane. Science. 1988. 239: 1272-1276.

Rodbell, M. Birbaumer, L., Pohl, S.L. et Kans, H.M.J. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase in plasma membrane of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. The Journal of Membrane Biology. 1971. 246: 1877-1882.

Rodbell, M. Signal transduction: evolution of an idea (Nobel lecture) Angewandte Chemie International Edition in English. 1995. 34: 1420-1428.



- Sanada, K., Shimizu, F. Kameyama, K., Haga, K., Haga, T. et Fukada, Y. Calcium-bound recoverin targets rhodopsin kinase to membranes to inhibit rhodopsin phosphorylation. FEBS Letters. 1996. 384: 227-230.
- Schleicher, A. et Hofmann, K.P. Kinetic study on the equilibrium between membrane bound and free protoreceptor G-protein. The Journal of Membrane Biology. 1987. 95: 271-281.
- Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A. et Neer, E.J. Specificity of G protein  $\beta$  and  $\gamma$  subunit interactions. The Journal of Biological Chemistry. 1992. 267: 13807-13810.
- Shichi, H. Biochemistry of vision. NewYork, Academic Press, 1983.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, P.N., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-Å cristal structure of transducin  $\alpha$ -GDP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Nature. 1994. 372: 276-279.
- Sondek, J., Bohm, A, Lambright, D.G., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. Crystal structure of a G $\alpha$  protein  $\beta\gamma$  dimer at 2.1 Å resolution. Nature. 1996. 379: 369-374.
- Spence, A.P. et Mason, E.B. Anatomie et physiologie: une approche intégrée. Montréal: Éditions du Renouveau Inc., 1983.

- Spiegel, A.M., Backlund, P.S. Jr., Butrynski, J.E., John, T.L.Z. et Simonds W.F. The G protein connection: molecular basis of membrane association. Trends in Biochemical Science. 1991. 16: 338-341.
- Sternweis, P.A. The active role of G $\beta\gamma$  in signal transduction. Current Opinion in Cell Biology. 1994. 6: 198-203.
- Stryer, L. Cyclic GMP cascade of vision. Annual Review of Neurosciences. 1986. 9: 87-119.
- Stryer, L. Visual excitation and recovery. The Journal of Biological Chemistry. 1991. 266: 10711-10714.
- Tortora, G.J., Grabowski, S. R. et Parent J.-C. Principes d'anatomie et de physiologie, CEC collégial et universitaire. 1994.
- Tsuboi, S., Matsumoto, H. et Yamazaki, A. Phosphorylation of an inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase in *Rana catesbiana* rod photoreceptors. II. A possible mechanism for the turnoff of cGMP phosphodiesterase without GTP hydrolysis. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 15024-15029.
- Udovichenko, I.P., Cunnick. J., Gonzalez, K. et Takemoto, D.J. The visual transduction and the phosphoinositide system: a link. Cellular Signalling. 1994. 6: 601-605.

- Uhl, R. et Ryba, N. Transducin activation and deactivation in rod systems of different structural integrity. Attempt at a focussed view through scattered light. Biochimica Biophysica Acta. 1990. 1054: 56-68.
- Uhl, R., Wagner, R. et Ryba, N. Watching G proteins at work. Trends in Neurosciences. 1990. 13: 64-70.
- Vincent, S. Synthèse d'analogues non hydrolysables de guanosine diphosphate en vue de l'analyse structurale de la protéine G du photorécepteur visuel. Thèse de doctorat en Chimie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg, 1997.
- Vuong, T.M., Chabre, M. et Stryer, L. Millisecond activation of transducin in the cyclic nucleotide cascade of vision. Nature. 1984. 311: 659-661.
- Vuong, T.M. et Chabre, M. Deactivation kinetics of the transduction cascade of vision. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1991. 88: 9813-9817.
- Wang, N., Wiegand, R.D. et Anderson, R.E. Uptake of 22-carbon fatty acids into rat retina and brain. Experimental Eye Research. 1992. 54: 933-939.
- Wensel, T.G. et Stryer, L. Reciprocal control of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase by its  $\gamma$  subunits and transducin. Protein: Structure, Function, and Genetics. 1986. 1: 90-99.

- Wensel, T.G. et Stryer, L. Enzyme Dynamics and Regulation. Chock, éd., Springer-Verlag, New York, 1988.
- Wensel, T.G. et Stryer, L. Activation mechanism of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase probed by fluorescein-labeled inhibitory subunit. Biochemistry. 1990. 29: 2155-2161.
- Wilden, U., Hall, S.W. et Kühn, H. Phosphodiesterase activation by photo-excited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1986a. 83: 1174-1178.
- Wilden, U., Wust, E., Weyand, I. et Bitensky, M.W. Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin. FEBS Letters. 1986b. 207: 292-295.
- Willardson, B.M., Belfondia, P., Tatsuro, Y. et Bitensky, M.W. Cooperative binding of the retinal rod G-protein, transducin, to light-activated rhodopsin. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 6371-6382.
- Wong, W., Baird, T., Fryer, J.R., Guilmore, C.J., MacNicol, D.D., Bricogne, G. Smith, D.J., O'Keefe, M.A. et Hövmoller, S. Electron microscopy at 1 Å resolution by entropy maximization and likelihood ranking. Nature. 1992 355: 605-609.

- Wu, S.M. Synaptic transmission in the outer retina. Annual Review of Physiology. 1994. 56: 141-168.
- Wütrich, K. NMR of protein and nucleic acid. New York, John Wiley and Sons. 1986.
- Yamane, H.K. et Fung, B.K.-K. Covalent modifications of G proteins. Annual Review in Pharmacology and Toxicology. 1993. 32: 201-241.
- Yamazaki, A., Stein, P.J., Chernoff, N. et Bitensky, M.W. Activation mechanism of rod outer segment cyclic GMP phosphodiesterase: Release of inhibitor by the GTP/GTP-binding protein. The Journal of Biological Chemistry. 1983. 258: 8188-8194.
- Yamazaki, A., Tatsumi, M., Torney, D.C. et Bitensky, M.W. The GTP-binding protein of rod outer segments. I. Role of each subunit in the hydrolytic cycle. The Journal of Biological Chemistry. 1987b. 262: 9316-9323.
- Yamazaki, A., Hayashi, F., Tatsumi, M., Bitenski, M.W. et George, J.S. Interaction between the subunits of transducin and cyclic GMP phosphodiesterase in *Rana Catesbiana* rod photoreceptors. The Journal of Biological Chemistry. 1989. 265: 11539-11548.
- Yamazaki, A. The GTP-binding protein-dependent activation and deactivation of cyclic GMP phosphodiesterase in rod photoreceptors. Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research. 1992. 25: 135-154.

- Yamazaki, A., Yamazaki, M., Tsuboi, S., Kishigami, A., Umbarger, K.O., Hutson, L.D., Madland, W.T. et Hayashi, F. Regulation of G protein function by an effector in GTP-dependent signal transduction: An inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase inhibits GTP hydrolysis by transducin in vertebrate photoreceptors. The Journal of Biological Chemistry. 1993. 268: 8899-8907.
- Yarfitz, S. et Hurley, J.B. Transduction mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 14329-14332.
- Yoshimura, H., Matsumoto, M., Endo, S. et Nagayama, K., Two-dimensional crystallisation on mercury. Ultramicroscopy. 1990. 32: 265-274.

## CHAPITRE 2

PHOSPHOLIPID, GTP AND SALT DEPENDENT BINDING OF THE ALPHA SUBUNIT  
OF ROD OUTER SEGMENT G-PROTEIN TRANSDUCIN IN MONOLAYERS

publié comme compte rendu de conférence avec comité de lecture dans:

*Frontiers of Peptide-Protein Chemistry and Biotechnology*  
Li Qing-Shan and Wang Zhong-Mu, eds.  
Guangxi Teacher's University Press  
China, pp. 60-67 (1994)

PHOSPHOLIPID, GTP AND SALT DEPENDENT BINDING OF THE ALPHA SUBUNIT  
OF ROD OUTER SEGMENT G-PROTEIN TRANSDUCIN IN MONOLAYERS

Sonya Grenier, Patrick Lagüe, and Christian Salesse

Centre de recherche en photobiophysique,  
Université du Québec à Trois-Rivières,  
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

Key words: Rod outer segments, G-protein, transducin, alpha subunit,  
monolayer, phospholipid



## 2.1 Abstract

The absorption of light in rod outer segment photoreceptor cells leads to the photoactivation of rhodopsin which then binds a GTP-binding protein called transducin. Rhodopsin mediates the exchange of GDP for GTP on the alpha subunit of transducin ( $G\alpha$ ) leading to a conformational change of  $G\alpha$  and its subsequent release from rhodopsin and from  $G\beta\gamma$ .  $G\alpha$ -GTP is responsible for the activation of phosphodiesterase. GTP is then slowly hydrolyzed and  $G\alpha$ -GTP is converted to  $G\alpha$ -GDP which spontaneously reassociates with  $G\beta\gamma$ . It is not clear whether the binding of transducin to disk membranes at moderate ionic strength involves only  $G\beta\gamma$  subunits or whether  $G\alpha$ -GDP experiences also membrane binding. It is also not clear whether the  $G\alpha$ -GTP subunit remains associated with the disk membrane after its release from  $R^*$  as proposed by the membrane lateral diffusion model or whether it is released into the cytosol as proposed by the hopping mechanism.  $G\alpha$ -GDP binding onto monolayers of several phospholipids was thus monitored at constant surface pressure. The results show that  $G\alpha$ -GDP strongly binds phospholipid monolayers with a preference for dioleoylphosphatidylethanolamine. These results suggest that  $G\alpha$ -GDP is also involved in transducin membrane binding and that the asymmetric distribution of rod outer segment disk membrane phospholipids is organized to optimize  $G\alpha$ -GDP membrane binding. Moreover, the binding of a  $G\alpha$ -GTP analog onto monolayers of dioleoylphosphatidylethanolamine was also monitored. The results show that  $G\alpha$ -GTP binds phospholipid monolayers stronger than  $G\alpha$ -GDP.

## 2.2 Introduction

The visual process in vertebrates involves a specific G-protein called transducin. All known G-proteins bind GTP in response to stimulation of specific receptor proteins and then regulate the activity of an enzyme. Transducin, like all of the well characterized G-proteins, is made up of three polypeptide subunits [1]. The alpha subunit ( $G_{\alpha}$ ) has an apparent molecular weight of 39 kD and contains binding sites for guanine nucleotide and magnesium.  $G_{\beta}$  and  $G_{\gamma}$  are polypeptides of 36 and 6-10 kD, respectively. In the inactive state, transducin is a complex of  $G_{\alpha}$ ,  $G_{\beta}$  and  $G_{\gamma}$  [2].

The photoactivated rhodopsin ( $R^*$ ) specifically binds  $G_{\alpha}$  and catalyzes the exchange of GDP for GTP [3,4]. This exchange leads to a conformational change of  $G_{\alpha}$  which is then released from both  $R^*$  and  $G_{\beta\gamma}$  [5].  $G_{\alpha}$ -GTP subunit then activates phosphodiesterase (PDE) which hydrolyses cGMP [6]. The GTPase activity of transducin will slowly hydrolyze GTP, thereby forming the inactive  $G_{\alpha}$ -GDP which spontaneously reassociates with  $G_{\beta\gamma}$ . Transducin is thus a mediator between  $R^*$  and PDE. The information transferred from one protein to the other is thought to occur through collision coupling. However, the state of association between free  $G_{\alpha}$ -GTP subunit and disk membranes during this process is unclear. Figure 2.1 shows a schematic diagram of the two models currently used to describe the association between  $G_{\alpha}$ -GTP and the photoreceptor membrane. Convincing data supporting one model is not yet available. The question is whether the  $G_{\alpha}$ -GTP subunit remains associated with the disk membrane after its release from  $R^*$  as proposed by the membrane

lateral diffusion model [7,8,9] or whether it is released into the cytosol as proposed by the hopping mechanism [10,11].

$Gt\beta\gamma$  subunits are thought to be responsible for the association of transducin with the membrane [12]. Most models suppose that  $Gt\alpha$ -GDP, in the  $Gt\alpha\beta\gamma$  complex, undergoes binding with the disk membrane through its association with the  $Gt\beta\gamma$  subunits and does not experience membrane binding by itself [12]. In the present study, we show that  $Gt\alpha$ -GDP strongly binds to phospholipid monolayers with a preference for phosphatidylethanolamine.  $Gt\alpha$ -GDP binding is depressed when similar measurements are performed with lower concentrations of sodium chloride. Moreover, the results show that a  $Gt\alpha$ -GTP analog binds phospholipid monolayers stronger than  $Gt\alpha$ -GDP.

## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Materials

Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, DTT, and EDTA were purchased from Sigma (St-Louis, USA). Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), and dioleoylphosphatidylserine (DOPS) were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). The sulforhodamine fluorescent lipid probe (Texas Red DOPE), N-(Texas Red sulfonyl)-1,2-(cis-9-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine triethylammonium salt, was purchased from Molecular Probes (Eugene, USA), NaCl (Suprapur) from Merck (Darmstadt, Germany), and No Chromix from Godax Laboratories (New York, USA).

### 2.3.2 Purification of ROS and ROS G<sub>tα</sub>-GDP subunit

ROS were purified by use of a buffered continuous sucrose concentration gradient (VBG-ROS) as previously described [13]. ROS transducin G<sub>tα</sub>-GDP subunit was then purified as described by Yamazaki et al. [14] except that a 0-2.5 M NaCl gradient was used to eluate the G<sub>tα</sub>-subunit during the chromatography on Blue-Sepharose. The activity and the gel electrophoresis of G<sub>tα</sub> was performed as described by Yamazaki et al. [14]. The activity of G<sub>tα</sub>-GDP subunit was 10 nmol of GTP $\gamma$ S bound per mg of protein and its gel electrophoresis showed only one band.

### 2.3.3 Protein binding onto phospholipid monolayers

All dishes were cleaned in No Chromix solubilized in concentrated sulfuric acid. Water used for buffer subphases was purified through a Millipore filtration apparatus (18 M $\Omega$  cm resistivity). The home-made monolayer trough used in these studies was similar to the one described by Albrecht [15] except that its surface is only 50 cm<sup>2</sup> (2.5 cm width X 20 cm long X 0.3 cm depth) and its volume 17 cm<sup>3</sup>. The temperature of the trough is maintained at 20 °C with a bath circulator. The trough is fully controlled by a personal computer. Surface pressure is measured with a Wilhelmy plate as previously described [15]. The subphase contained 10 mM Tris buffer pH 7.5, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, and 150 mM NaCl. Monolayers were spread over this buffer from lipid solutions in hexane : ethanol (9:1). Before spreading, the buffer surface was cleaned by suction. Compression was initiated 5 min after spreading in order to allow the solvent to evaporate. The monolayer is compressed to a surface pressure of 10 mN/m at a rate of 2.5 Å<sup>2</sup>/molecule min. Then, 11 µg of Gt $\alpha$ -GDP subunit is injected into the subphase through the lipid monolayer. Then, the increase of molecular area as a function of time was monitored at constant surface pressure. Between each experiment, great care was taken to clean the trough to make sure that all traces of protein are removed. Washing of the trough was performed by rubbing the teflon with clean tissues using the following sequence of solvents: methanol (several times), chloroform : ethanol (2:1), and pure water. The well-known characteristics of the surface pressure isotherm of palmitic acid was used to

ascertain the absence of impurities and thus to insure consistency of monolayer measurements as previously reported by Albrecht [15].

#### **2.3.4 Fluorescence microscopy of protein-lipid monolayers**

The fluorescence microscope used for these experiments is similar to the one previously described by Meller [16] except that the fluorescence microscope was from Nikon. Only 0.5 mol% of the fluorescent dye, Texas Red DOPE, was added to the DPPC spreading chloroform solution. In this case, measurements at constant molecular area were performed after the injection of  $G_{t\alpha}$ -GDP. Measurements were performed as previously described [17,18].

## 2.4 Results and discussion

Bovine rod outer segment photoreceptors contain respectively 42, 39 and 14% of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, and phosphatidylserine [19]. Synthetic phospholipids bearing these polar headgroups were thus used as a matrix to mimic photoreceptor membranes. Moreover, rod outer segment phospholipids are very unsaturated [20] and, in bulk, they all show a phase transition much below room temperature [19]. The phospholipids used for protein binding measurements all bear oleoyl (18:1 $\omega$ 9) fatty acid chains (dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE; dioleoylphosphatidylcholine, DOPC; dioleoylphosphatidylserine, DOPS) and are all in the liquid crystalline state at room temperature. Their properties are thus similar to the bulk photoreceptor phospholipids and can thus be used as model compounds. Moreover, protein binding can be easily compared because only the phospholipid polar headgroup has been varied (ethanolamine, choline, and serine) to evaluate the importance of the main ROS phospholipids on G $\alpha$ -GDP binding.

Figure 2.2 shows the binding of G $\alpha$ -GDP onto monolayers of DOPE, DOPC, and DOPS at a constant pressure of 10 mN/m. Upon protein binding, phospholipid apparent molecular area increases. The extent of apparent molecular area increase is strictly dependent on the amount of protein molecules penetrating the phospholipid monolayer. It is simply calculated by the following relation:

$$\Delta A = A_f - A_i \quad (1)$$

where  $\Delta A$  is the extent of apparent molecular area increase,  $A_f$  is the final apparent molecular area, i.e. the area reached at the plateau, and  $A_i$  is the initial molecular area, i.e. the phospholipid area at time=0 at the injection of the protein into the subphase. The rate of protein binding onto phospholipid monolayers is mainly diffusion dependent. Protein binding is expected to be very little restricted at a surface pressure of 10 mN/m. Maximum binding, which is testified by the achievement of a plateau, is almost completed within 30 min for all phospholipids.

Protein binding onto DOPE monolayers leads to the largest increase in apparent molecular area ( $\Delta A = 125 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ ) compared to protein binding onto DOPC ( $\Delta A = 80 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ ) and DOPS ( $\Delta A = 69 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ ) monolayers (see figure 2.2).  $Gt\alpha$ -GDP thus shows a slight preference for DOPE over DOPC and DOPS. The increase in apparent molecular area of DOPE upon  $Gt\alpha$ -GDP binding after two hours incubation is almost 82% larger than in the case of DOPS and approximately 56% larger than in the case of DOPC. DOPS is the only phospholipid bearing a negative charge whereas DOPE and DOPC are zwitterionic. Electrostatic (charge-charge) interactions, therefore, do not appear to play a very important role in  $Gt\alpha$ -GDP/phospholipid binding. Moreover, these results suggest that the negative charge of PS does not prevent protein binding if steric hindrance is not involved.

It is difficult to understand which structural characteristic of DOPE favors  $Gt\alpha$ -GDP binding. The ethanolamine headgroup is the smallest when compared to serine and choline. This smaller headgroup may thus lead to a lower steric hindrance and allow either each individual protein to penetrate



more extensively or more proteins to bind onto the phospholipid monolayer. Such a preferential binding for DOPE may be related to the asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine in ROS disk membranes. Indeed, Miljanich et al. [21] have shown that 73-87% of the PE is located on the cytoplasmic side (outer leaflet) of ROS disk membranes. Transducin is also located on the cytoplasmic side of ROS disk membranes and has no access to the inner leaflet of the membrane. Therefore, the asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine allow optimal binding of  $Gt\alpha$ -GDP.

We were also interested to measure the affinity of  $Gt\alpha$ -GTP for disaturated phospholipids because ROS membranes also include large amounts of these phospholipids [22] that can phase separate when mixed with unsaturated phospholipids. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) was used as the model compound because ROS contain as much as 13% palmitic acid (16:0) and 29% of ROS phosphatidylcholine is disaturated [22]. In addition, DPPC is also interesting because it forms solid-like domains in monolayers that can be visualized by fluorescence microscopy [23] and thus allow to mimic membrane phase separation. By using this method, it has been possible to observe the effect of  $Gt\alpha$ -GDP binding onto DPPC monolayers at constant apparent molecular area. Figure 2.3 shows fluorescence micrographs of DPPC monolayers before and 2 hours after the injection of  $Gt\alpha$ -GDP into the subphase. In figure 2.3A, the DPPC monolayer has reached a surface pressure of 9.7 mN/m which corresponds to the beginning of its phase transition at this temperature [24] where solid-like domains can be observed as shown in this figure.  $Gt\alpha$ -GDP binding increases the monolayer surface pressure which results in a reduced apparent molecular area of DPPC as performed by usual

film compression. Such a compression leads to an increase of the size and the surface concentration of the domains [16] similar to what can be seen in figure 2.3B. The usual shape of the DPPC domains [16] is not affected by  $G\alpha$ -GDP binding except that the outer surface of the domains are irregular compared to the normal ones.  $G\alpha$ -GDP does not, therefore, seem to bind DPPC molecules undergoing a phase transition nor those present in the solid domains before protein injection. This suggests that  $G\alpha$ -GDP prefers to bind phospholipids in a liquid crystalline state, i.e. fluid membranes rather than phospholipids in the solid state. This also suggests that  $G\alpha$ -GDP would not readily bind to phase separated disaturated phospholipids that could be present in the ROS disk membranes.

Figure 2.4 shows the binding of  $G\alpha$ -GDP in the presence of different concentrations of NaCl in the subphase. It is noteworthy that when measurements are performed in the presence of 100 mM NaCl, no protein binding is observed. The measurements at 150 and 300 mM NaCl show a very similar extent of  $G\alpha$ -GDP binding to DOPE monolayers. The data at these higher salt concentrations are very similar to the one obtained for the binding of  $G\alpha$ -GDP to DOPE (see figure 2.2). It is very surprising that such a small variation in the salt concentration (100 to 150 mM) has so much influence on  $G\alpha$ -GDP / phospholipid monolayer binding. It has been estimated that upon closing of the sodium/calcium channels during the visual process, the decrease of the Na concentration can be as much as 180 mM, from about 200 mM to 20 mM [25]. This decrease in NaCl concentration may thus also have a large influence on the interaction between  $G\alpha$ -GTP and or  $G\alpha$ -GDP with the ROS

disk membrane and can act as a regulation mechanism occurring during the activation-inactivation process.

A fluoroaluminate analog of  $G_{t\alpha}$ -GTP has been used to determine which model is most probable for the activation of PDE, i.e. the lateral diffusion or the hopping (see figure 2.1). The structural analogy between  $PO_4^-$  and  $AlF_4^-$  has led to the proposal that fluoroaluminates mimic the  $\gamma$ -phosphate of GTP in its binding site as shown in figure 2.5 [26]. The exchange of GDP for GTP on  $G_{t\alpha}$  subunit when bound to rhodopsin is known to induce a large conformational change of  $G_{t\alpha}$  leading to its release from both the  $G_{t\beta\gamma}$  subunits and rhodopsin. The conformation of  $G_{t\alpha}$ -GTP must, therefore, be very different compared to  $G_{t\alpha}$ -GDP. Phillips and Cerione [27] have shown evidences for this conformational change by measuring the intrinsic fluorescence of  $G_{t\alpha}$  subunit in the inactive  $G_{t\alpha}$ -GDP form and the active  $G_{t\alpha}$ -GTP form. A large increase of intrinsic fluorescence was observed when GTP was bound compared to GDP which strongly suggests that a large conformational change has taken place upon GTP binding. They have also shown that fluoroaluminates very well mimic the  $\gamma$ -phosphate of GTP in its binding site. Indeed, very similar levels of intrinsic fluorescence were obtained with  $G_{t\alpha}$ -GTP and its analog ( $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_4^-$ ). This analog has thus been used to estimate the extent of monolayer binding of  $G_{t\alpha}$ -GTP.

The large conformational change undergone by  $G_{t\alpha}$ -GTP compared to  $G_{t\alpha}$ -GDP could lead either to a largely depressed protein binding onto phospholipid monolayers thus supporting the hopping mechanism, or to a similar or even larger extent of protein binding thus supporting the lateral

diffusion model for the activation of PDE. Figure 2.6 shows the binding of the  $G\alpha$ -GTP analog onto a monolayer of DOPE. It can be seen that the active  $G\alpha$ -GTP form shows a much larger extent of binding than the inactive  $G\alpha$ -GDP form. Our results thus suggest that  $G\alpha$ -GTP must diffuse in the plane of the membrane to activate PDE thus supporting the lateral diffusion model (see figure 2.1). In conclusion, it is obvious that  $G\alpha$ -GDP experiences membrane binding. Our results also suggest that  $G\alpha$ -GDP is also involved in membrane binding and that this property is not restricted to  $G\beta\gamma$ .

## 2.5 Acknowledgements

The useful advice of Dr. Akio Yamazaki (Kresge Eye Institute, Detroit, USA) in the purification of ROS  $G\alpha$ -GDP is gratefully acknowledged. This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds FCAR and the FRSQ.

## 2.6 References

- [1] Kühn, H. (1980) *Nature* 283, 587-9.
- [2] Stryer, L., Hurley, J.B. and Fung, B.K.-K. (1981) in: *Current Topics in Membranes and Transport: vol. 15* (Miller, W.H., editor) pp 93-108, Academic Press, New York.
- [3] Godchaux, W.III and Zimmerman, W.F. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7874-84.
- [4] Fung, B.K.-K. and Stryer, L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2500-4.
- [5] Fung, B.K.-K., Hurley, J.B. and Stryer, L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 152-6.
- [6] Bitensky, M.W., Wheeler, G.L., Yamazaki, A., Rasenick, M.M. and Stein, P.J. (1981) in: *Current Topics in Membranes and Transport: vol. 15* (Miller, W.H. ed) pp 237-71, Academic Press, New York.
- [7] Uhl, R., Wagner, R. and Ryba, N. (1990) *Trends Neurol. Sci.* 13, 64-70.
- [8] Uhl, R. and Ryba, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1054, 56-68.
- [9] Liebman, P.A. and Sitaramayya, A. (1984) in: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* (Greengard, P. et al. eds), pp 215-225, Raven Press, New York.
- [10] Chabre, M. and Deterre, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 255-66.
- [11] Chabre, M. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 213-15.
- [12] Kühn, H. (1984) in: *Progress in Retinal Research: vol. 3* (Osborne, N. and Chader, J. eds) pp 123-56, Pergamon Press, New York.
- [13] Salesse, C., Boucher, F. and Leblanc, R.M. (1984) *Anal. Biochem.* 142, 258-66.

- [14] Yamazaki, A., Tatsumi, M., Torney, D.C. and Bitensky, M.W. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9316-23.
- [15] Albrecht, O. (1983) *Thin Solid Films* 99, 227-32.
- [16] Meller, P. (1988) *Rev. Sci. Instrum.* 59, 2225-31.
- [17] Grainger, D.W., Reichert, A., Ringsdorf, H. and Salesse, C. (1989) *FEBS Lett.* 252, 73-82.
- [18] Blankenburg, R., Meller, P., Ringsdorf, H. and Salesse, C. (1989) *Biochemistry* 28, 8214-21.
- [19] Miljanich, G.P. (1978) Ph.D. Dissertation, University of California, Santa Cruz.
- [20] N'Soukpoé-Kossi, C.N., Salesse, C., Leblanc, R.M. and F. Boucher (1985) *Anal. Biochem.* 151, 409-417.
- [21] Miljanich, G.P., Nemes, P.P., White, D.L. and Dratz, E.A. (1981) *J. Membrane Biol.* 60, 249-55.
- [22] Miljanich, G.P., Sklar, L.A., White, D.L. and Dratz, E.A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 552, 294-306.
- [23] Weis, R.M. and McConnell, H.M. (1984) *Nature* 310, 47-49.
- [24] Albrecht, O., Gruler, H., Sackmann, E. (1978) *J. Physique* 39, 301-13.
- [25] Shichi, H. (1983) *Biochemistry of vision*, pp. 239-51, Academic Press, New York.
- [26] Bigay, J., Deterre, P., Pfister, C., Chabre, M. (1985) *FEBS Lett.* 191, 181-185.
- [27] Phillips, W.J. and Cerione, R.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15498-505.

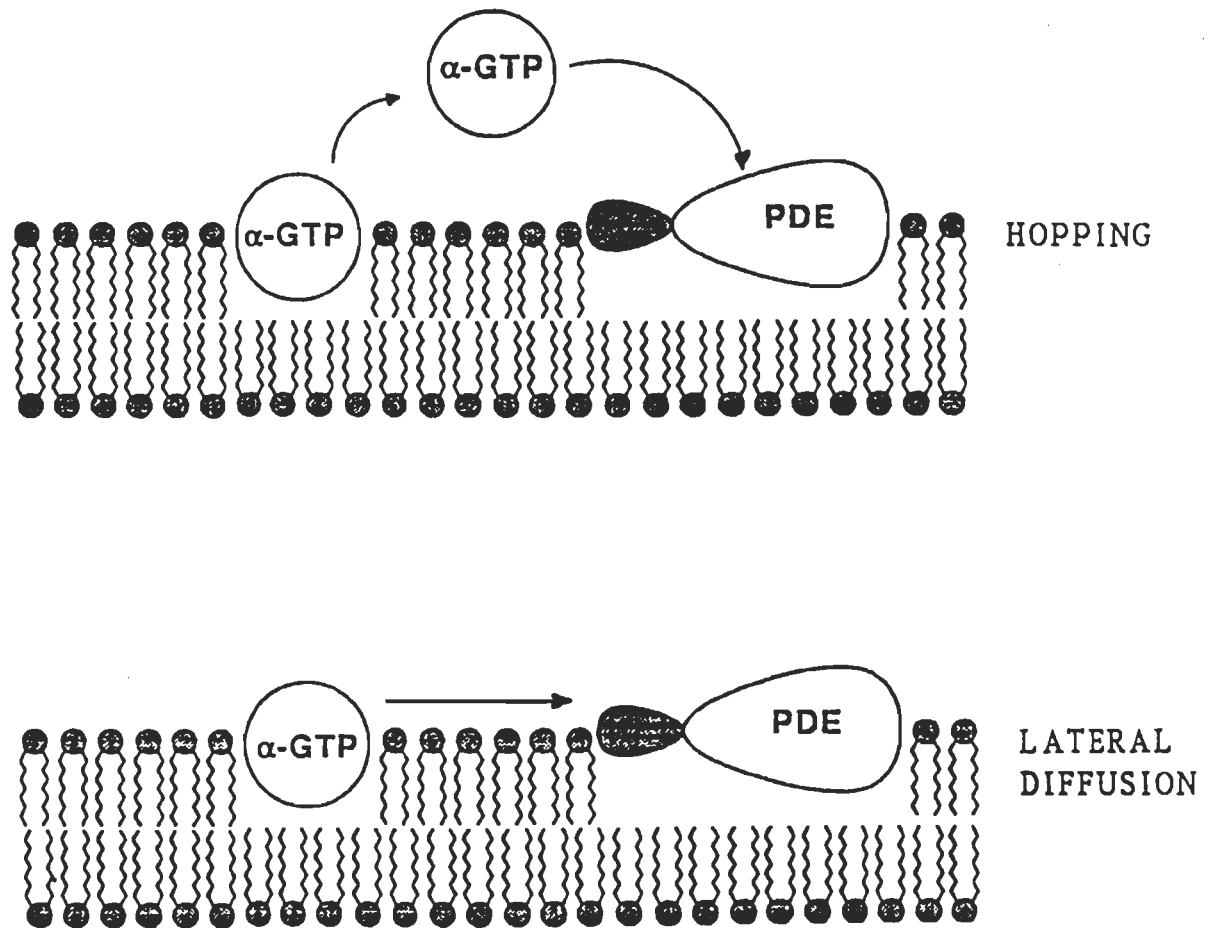


Figure 2.1 Models for the activation of phosphodiesterase by G $\alpha$ -GTP in ROS membranes according the hopping or the lateral diffusion hypothesis.

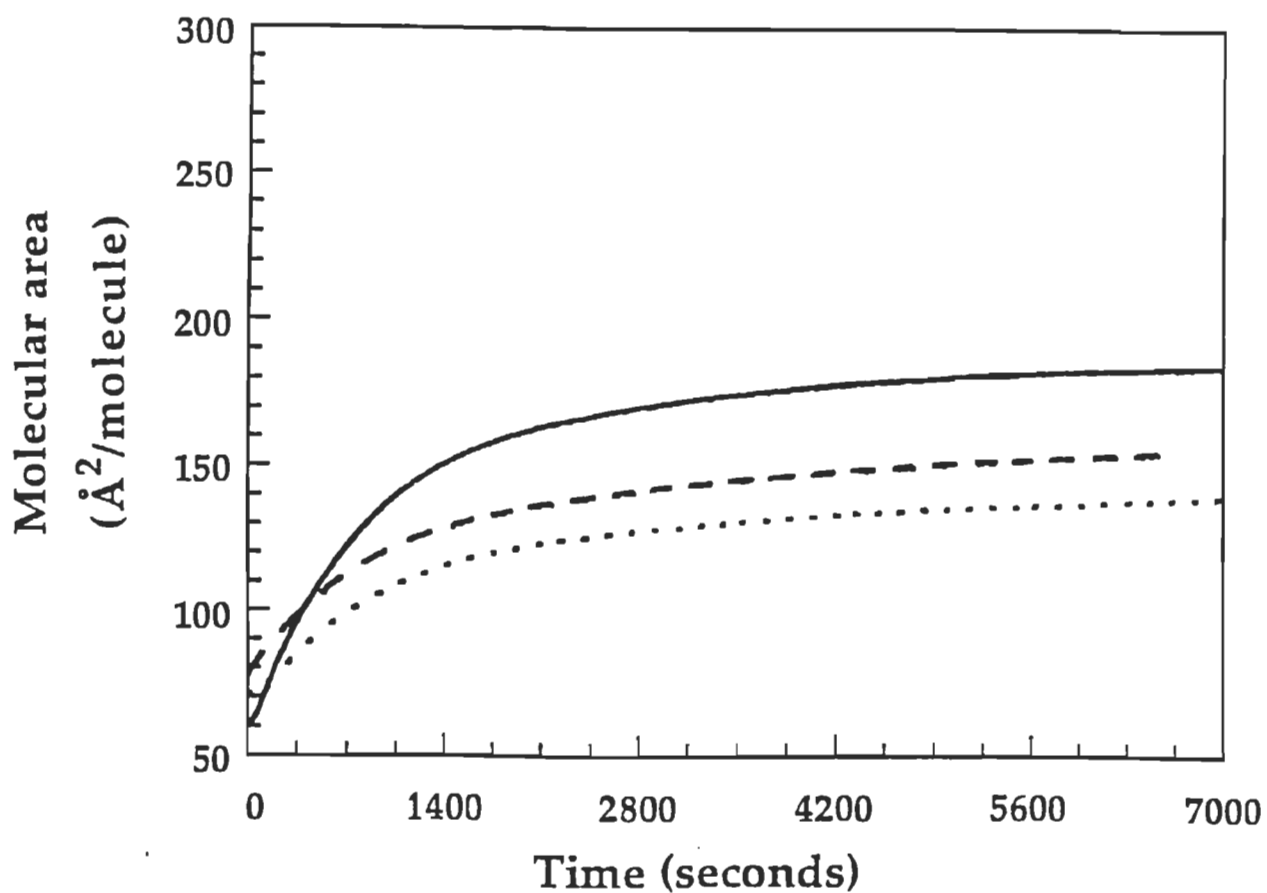


Figure 2.2 Binding of  $G\alpha$ -GDP onto different phospholipid monolayers at constant surface pressure as a function of time. 11  $\mu$ g of protein is injected into the subphase of DOPE (—), DOPS (- - -), DOPC ( $\cdots$ ) at 20 °C containing 10 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, 6 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.5.



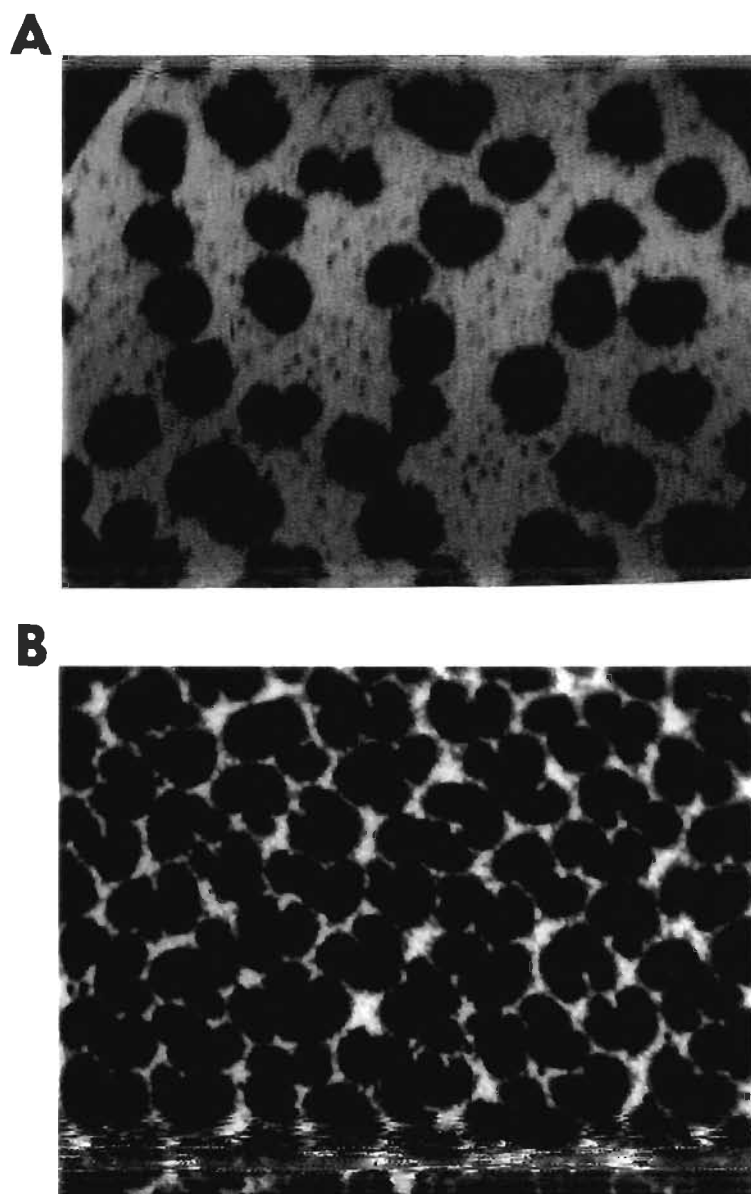


Figure 2.3 Fluorescence micrographs of DPPC monolayers including 0.5 mol% of Texas Red DOPE: (A) before and (B) 2 hours after the injection of 11 μg of Gt $\alpha$ -GDP into the subphase containing 10 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.5 at 20 °C. Magnification used was 100X for A and B. The micrographs were obtained at constant molecular area. Surface pressure in A and B are 9.7 mN/m and 19 mN/m, respectively.

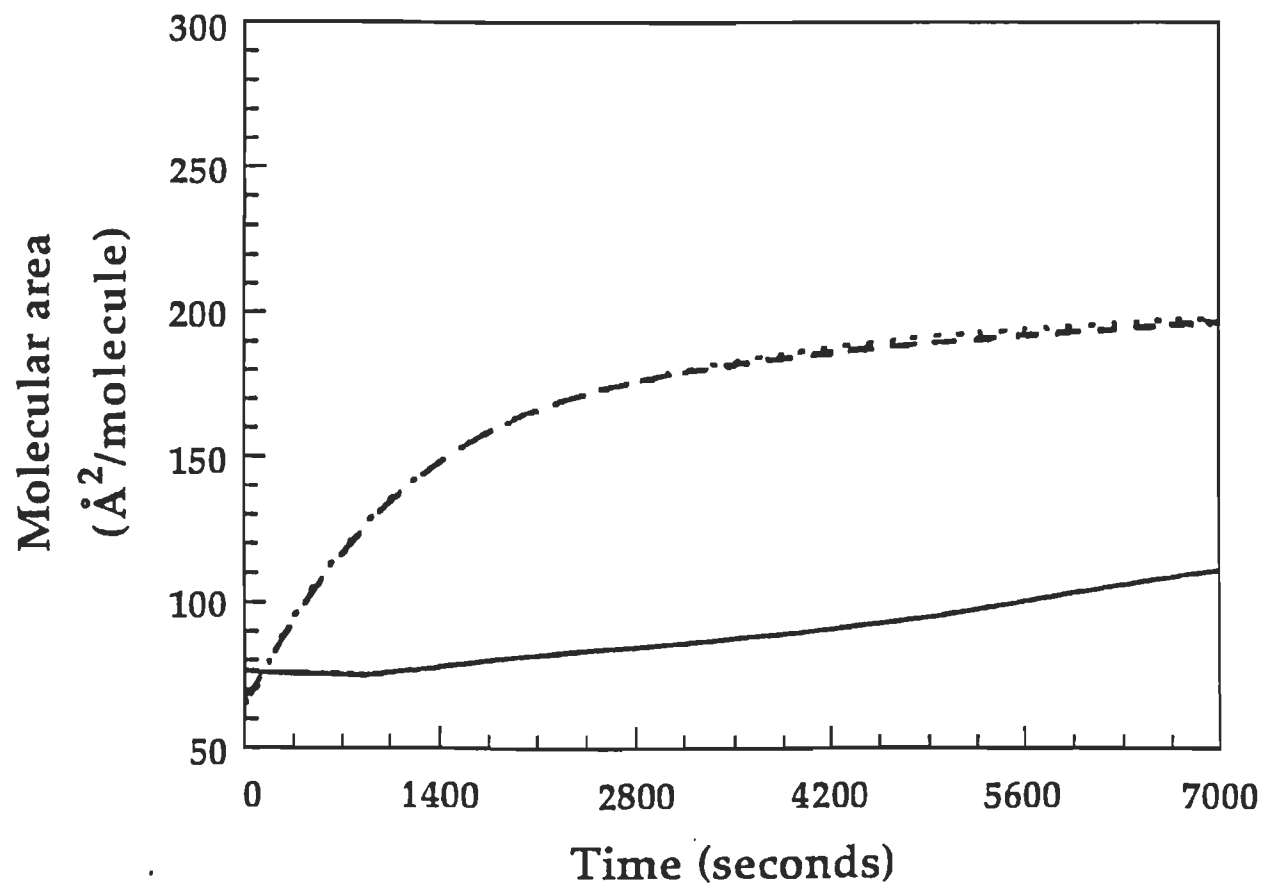


Figure 2.4 Binding of Gt $\alpha$ -GDP onto DOPE monolayers at constant surface pressure as a function of time for different salt concentrations. 11  $\mu$ g of protein is injected into the subphase containing 10 mM Tris buffer, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.5 at 20 °C and either 100 (—), 150 (- - -) or 300 (· · ·) mM NaCl.

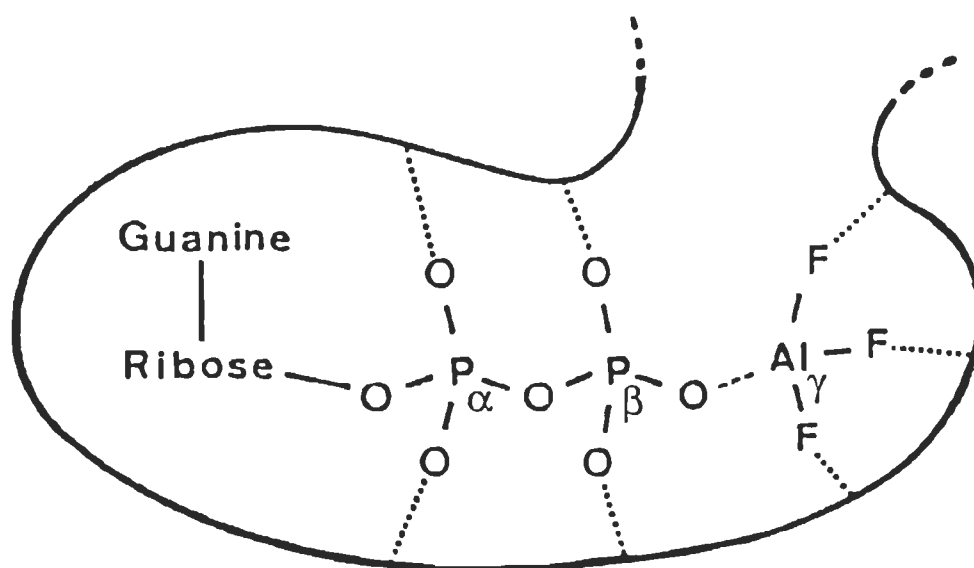


Figure 2.5 Structural model for the binding of  $\text{AlF}_4^-$  acting as the  $\gamma$ -phosphate in the binding site of GTP in  $\text{Gt}\alpha$  (from ref. 26).

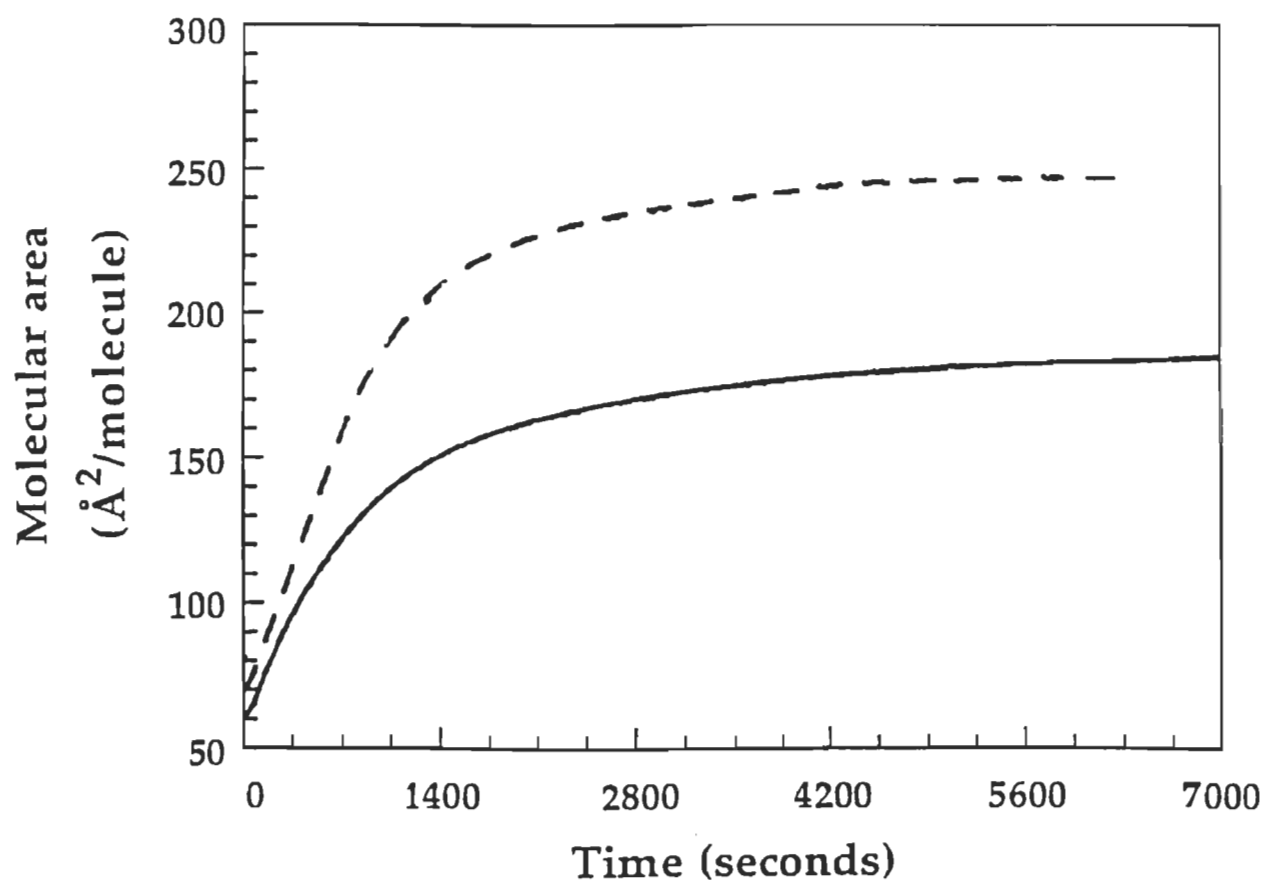


Figure 2.6 Binding of Gt $\alpha$ -GDP (—) and Gt $\alpha$ -GTP (- - -) onto DOPE monolayers at constant surface pressure as a function of time. 11  $\mu$ g of protein is injected into the subphase containing 20  $\mu$ M AlF $_4^-$  (the analog of Gt $\alpha$ -GTP was obtained by adding 20  $\mu$ M NaF and 2.5 mM AlCl $_3$  to the subphase), and 10 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl $_2$ , 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.5.

### CHAPITRE 3

#### DETERMINATION OF THE DEPTH OF PENETRATION OF THE ALPHA SUBUNIT OF RETINAL G PROTEIN IN MEMBRANES: A SPECTROSCOPIC STUDY

publié dans la revue

*Biochimica et Biophysica Acta*

1998. 1370 (2): 199-206

DETERMINATION OF THE DEPTH OF PENETRATION OF THE ALPHA SUBUNIT OF  
RETINAL G PROTEIN IN MEMBRANES: A SPECTROSCOPIC STUDY

Sonya Grenier<sup>‡</sup>, Philippe Desmeules<sup>‡</sup>, Ashim K. Dutta<sup>‡</sup>, Akio Yamazaki<sup>§</sup> and  
Christian Salessé<sup>‡¶</sup>

GREIB<sup>‡</sup>, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec  
à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7;

Kresge Eye Institute<sup>§</sup>, Department of Ophthalmology and Pharmacology,  
Wayne State University, School of Medicine, Detroit, MI 48201.

Key words: G-proteins, fluorescence quenching, lipid-protein interactions

¶ Corresponding author. Tel.: 819-376-5077; Fax number: 819-376-5057; e-mail:  
christian\_salessé@uqtr.quebec.ca.

### 3.1 Abstract

This paper reports the fluorescence quenching of the alpha subunit of retinal rod outer segment G protein ( $G_{t\alpha}$ ) by vesicles of brominated phospholipids. Two different brominated phospholipids with the bromine quencher groups attached at the 6-7 and 9-10 positions in one of the fatty acyl chains have been used to estimate the depth of penetration of the  $G_{t\alpha}$  protein in the lipid vesicles using steady state fluorescence quenching techniques. Our studies provide evidence of the interaction between  $G_{t\alpha}$  protein, in its active conformation, with the lipid vesicles mimicking natural membranes. This study demonstrates that *in vitro* the distance between fluorescent tryptophan site of  $G_{t\alpha}$  and the membrane surface is approximately 6.5Å.

### 3.2 Introduction

In recent years, there has been considerable interest in G proteins owing to their role in signal transduction processes [1]. It is now well known that in vertebrates, the heterotrimeric G proteins ( $G_{\alpha\beta\gamma}$ ) mediate a variety of cellular responses to hormonal signals, including the hormonal regulation of cAMP level [2] and sensory stimuli such as vision, olfaction and taste [3-5]. All these processes utilize a common molecular mechanism that involves a guanine-nucleotide binding protein performing a three step task. The first step involves stimulation by a signal detecting protein, which is a hepta-helical transmembrane receptor ( $R^*$ ); the second step involves the binding of G protein to  $R^*$ , releasing GDP and binding GTP. The alpha subunit ( $G_{\alpha}$ ) then separates from  $R^*$  and its beta-gamma subunits ( $G_{\beta\gamma}$ ). Finally,  $G_{\alpha}$  in its activated conformation ( $G_{\alpha}$ -GTP) regulates the function of effector elements which are usually an enzyme or an ion channel [6]. Regulation of the effector ceases when  $G_{\alpha}$  hydrolyzes its bound GTP to GDP and returns to its basal inactive state and a conformational change of the  $G_{\alpha}$  allows its reassociation with  $G_{\beta\gamma}$ . Interestingly,  $G_{\alpha}$  act as molecular switches the "on" and "off" state of which is triggered by the binding and hydrolysis of GTP [7].

In the visual transduction process, the alpha subunit of G protein ( $G_{t\alpha}$ ) plays a key role involving a sequence of biochemical and electrophysiological events [8]. Two distinctly important features of the visual transduction process are gain and speed, for example, it has been estimated that response to a single photon rises to its maximum in 0.2 s and decays nearly as rapidly in 0.3 s [8,9] and information transfer from one protein to another is brought about by



collisional coupling [10]. According to some authors,  $G_{t\alpha}$  with its effector, the cGMP phosphodiesterase (PDE), modulates the speed of the transduction process [1, 8, 10, 11]. However, several mechanisms have been suggested by different workers [8, 10, 12-16]. Chabre et al. [8, 15, 16] have suggested a hopping mechanism where  $G_{t\alpha}$  diffuses in an aqueous space with a speed that is two orders of magnitude faster than that in the lipid phase or  $G_{t\alpha}$  is located at the surface of the membrane without binding that probably allows a sufficiently rapid encounter between  $G_{t\alpha}$  and PDE. Liebman et al, [13, 14] have proposed a two dimensional (2D) lateral diffusion model where the diffusion process is fast enough to result in a favourable collision process which is rate limiting. The concept of an increased success rate of collision coupling originates from a decrease in orientational freedom imposed by membrane association which compensates for the slower diffusion speed along the surface [13, 14].

Since interaction of the membranes with  $G_{t\alpha}$  in its active and inactive conformation may regulate the signal transduction process, it is of utmost importance to achieve a good understanding of the phenomena. Considerable evidence exists that the behaviour of the proteins *in vivo* and *in vitro* may not be identical [17]. To have a better understanding of these systems and in an effort to understand better whether or not  $G_{t\alpha}$  interacts with membranes *in vitro*, we have studied the quenching of the intrinsic fluorescence of  $G_{t\alpha}$  in the presence of brominated lipids that serve as a model system to study such interactions. Several methods exist [18]. One method is to study energy transfer from the tryptophan residues in the protein to an energy acceptor chromophore [18]. Usually the critical radius in such cases is quite large and it is difficult to conclude whether or not the protein has actually penetrated the

membrane [18]. An elegant method to bypass these disadvantages is the use of heavy molecular quenchers like bromine which are known to quench through molecular collisional processes [18].

In this study, we have investigated the fluorescence quenching of  $G_{t\alpha}$  by brominated lipids incorporated in vesicles mimicking natural membranes to determine whether or not the  $G_{t\alpha}$  subunit interacts and penetrates the membrane. Our fluorescence quenching, and polarization anisotropy measurements demonstrate that *in vitro* the  $G_{t\alpha}$  in its active conformation partially penetrates the lipid membrane with one of the tryptophan residues participating in the process.

### 3.3 Materials and methods

Highly purified egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (egg PC), 1-palmitoyl-2-stearoyl (6-7 dibromo)-sn-glycero-3-phosphocholine and 1-palmitoyl-2-stearoyl (9-10 dibromo)-sn-glycero-3-phosphocholine referred to as 6-7 BrPC and 9-10 BrPC, respectively, were obtained from Avanti Polar Lipids and used as received. Rhodamine B (laser grade) and 1-2 propanediol were purchased from Kodak and Sigma, respectively.

Highly purified G $\alpha$ -GDP-binding protein from *Rana catesbiana* was obtained as described in details elsewhere [19]. Prior to fluorescence measurements, the protein samples were dialyzed against buffer A to remove glycerol that was used for storage. Buffer A contained Tris 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 6mM, EDTA 1 mM, DTT 1mM at pH 7.4 (at room temperature). Centrifugation at 100 000g for a period of one hour using a Beckman L7-80 ultracentrifuge was used to remove insoluble materials. Protein concentration was determined using the Coomassie blue binding method [20].

The structural analogy between PO<sub>4</sub><sup>-</sup> and AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> has led to the proposal that fluoroaluminates mimic the  $\gamma$ -phosphate of GTP at the binding site [21]. Interestingly, the comparison between the crystal structures of G $\alpha$ -GDP + AlF<sub>x</sub> and G $\alpha$ -GTP $\gamma$ S have yielded almost identical protein conformations [22]. In addition, similar levels of intrinsic fluorescence were obtained with G $\alpha$ -GTP and its analogue G $\alpha$ -GDP + AlF<sub>x</sub> where x=3-5 [23, 24]. These results thus indicate that G $\alpha$ -GDP + AlF<sub>x</sub> may be utilized to simulate G $\alpha$ -GTP. A fluoroaluminate analogue of G $\alpha$ -GTP was thus prepared by adding AlF<sub>x</sub> to

$G_{t\alpha}$ -GDP as described in details elsewhere [21, 24-26]. In all the experiments, we have used 2.5 mM NaF and 20  $\mu$ M  $AlCl_3$  in accordance with the method of Kanaho et al. [25].

Vesicles were prepared at room temperature as described elsewhere [27] by sonicating the phospholipids, 6-7 BrPC, 9-10 BrPC or egg PC in buffer A. Briefly, a lipid concentration of 0.3 mM is sonicated at room temperature followed by a centrifugation to remove titanium contaminants and multilamellar structures. After centrifugation, the phospholipid concentration was determined by measuring the phosphorus content in accordance with the method of Miljanich [28] modified by Jacob et al. [29].

Steady state fluorescence emission was recorded on a Spex Fluorolog 2 spectrophotometer. Rhodamine B was used as a quantum counter in 1-2 propanediol and the detector voltage and amplification factor in all cases were maintained constant. Excitation was provided at 289 nm using a single beam monochromator. Fluorescent grade suprasil quartz cuvettes 5 mm X 5 mm and narrow (5 nm) excitation and emission slits were used for recording all spectra. All experiments were recorded at ambient room temperature. Corrected fluorescence emission spectra were obtained by subtracting the background fluorescence using a software supplied by SPEX Inc.

Anisotropy measurements were made using Glan-Thompson polarizers placed in between the excitation source and the sample while the other one is placed between the sample and detector. Anisotropy (A) was calculated using the formula:

$$A = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}$$

Where  $I_{vv}$  is the fluorescence intensity when the excitation and emission polarizers are parallel to the z axis of the laboratory frame while  $I_{vh}$  is the fluorescence intensity when the excitation and emission polarizers are parallel to the z and y axis of the laboratory frame. The G factor is obtained from the relation  $I_{hv}/I_{hh}$  and is a constant for the apparatus determined at the excitation wavelength of 289 nm.

### 3.4 Results and discussion

Addition of lipids to the protein solution resulted in the dilution of the protein. To estimate the correct concentration of proteins, a normalization procedure was used. Inset of Fig. 3.1 shows the calibration curves of  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  and  $G_{t\alpha}$ -GDP that correlates the protein fluorescence intensity to the protein concentration in absence of vesicles. The calibration curves are found to be almost linear in the range of concentrations used in this work.

Fig. 3.1A shows the fluorescence emission spectra of  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  and  $G_{t\alpha}$ -GDP corresponding to excitation provided at 289 nm. The emission profile in the 300-400 nm spectral region is broad, structureless and diffuse with the band maximum for both  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  and  $G_{t\alpha}$ -GDP located at approximately 337 nm. This observed broad emission profile originates from the two tryptophan residues W207 and W127 in the protein [30]. The fluorescence emission from  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  is more intense compared to  $G_{t\alpha}$ -GDP that has been attributed to the presence of the tryptophan residue W207 located near the GTP binding site [23] on the  $\alpha_2$  helix compared to W127 located on the  $\alpha_C$  helix [31]. Fig. 3.1B shows the excitation spectra of  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  and  $G_{t\alpha}$ -GDP with their maximum at approximately 290 and 288 nm, respectively, which are in agreement with reported results [24] obtained on monitoring the fluorescence emission band maximum at 337 nm.

Figs. 3.2A and 3.2B show the plot of the fluorescence intensity of  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  and  $G_{t\alpha}$ -GDP, respectively, as a function of the concentrations of the brominated lipids 6-7 BrPC and 9-10 BrPC. To elucidate the effects of the

brominated lipids, a control experiment using egg PC instead of the brominated lipids was performed and the results are shown in Fig. 3.2C. Comparing Figs. 3.2A and 3.2B with 3.2C, it is evident that while considerable fluorescence quenching occurs with the brominated lipids, there seems to be no quenching of the tryptophan fluorescence in the absence of the brominated lipids (in the presence of egg PC) which confirms quenching of the tryptophan fluorescence due to the presence of the bromine moieties. It was observed that while approximately 55% of the  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  fluorescence was quenched by 6-7 BrPC, only 15% quenching was observed for 9-10 BrPC (Fig. 3.2A) under identical experimental conditions. Several possible explanations exist. A trivial case could be the large excess of protein molecules that may be actually quenched by the added quenchers. To circumvent these difficulties, we have studied the quenching process in large excesses of the brominated lipids. In all cases, 100 percent quenching of the tryptophan fluorescence was never observed. Such an observation indicates two possibilities, (a) only one of the two tryptophans in the protein participates in the quenching process and/or (b) the protein is partially embedded in the vesicles such that one or both tryptophans are located within the radius of interaction with the bromine atoms. Crystallographic data of  $G_{t\alpha}$  [31] show that one of the  $G_{t\alpha}$  tryptophans, W127 is more externally located compared to W207. It is observed that 6-7 BrPC quenches the tryptophan fluorescence of  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  by only 55% which probably suggests that only one of the two tryptophans either W127 or W207, participates in the quenching process because bromine, being a collisional quencher with a small atomic radius, is able to quench the tryptophan very close to it, and is probably one of the greatest advantages over using energy transfer probes [32]. Furthermore, the fact that the tryptophan fluorescence is

even less quenched in 9-10 BrPC suggests that very likely  $G_{t\alpha}$  does not penetrate the membrane deeply.

To evaluate the depth of penetration of the tryptophan residues of  $G_{t\alpha}$  in the membrane, we have used Perrin's formula modified for a two dimensional (2D) system [33]. Considering a random distribution of fluorophores and quenchers distributed in a 2D plane as on the surface of a membrane, the three dimensional Perrin's formula:

$$F/F_0 = \exp -V[Q] \quad (1)$$

is modified to:

$$F/F_0 = \exp -\int [2\pi r C_s (1-F(r)/F_0)] dr \quad (2)$$

where  $F$  and  $F_0$  is the fluorescence emission intensity of the fluorophore in the presence and absence of the quencher, respectively.  $V$  is the elementary volume surrounding the fluorophore,  $[Q]$  is the concentration of the quencher.  $F(r)$  corresponds to the intensity of the fluorophore when the quencher is located at a distance of  $r$  from it [33-36].  $C_s$  is the surface density of the quenchers. Using a "hard sphere" approximation, i.e. considering a sphere of critical radius  $R_C$  with the fluorophore located at its center and assuming that within this sphere any quencher would quench the fluorophore but not outside this critical radius, this is mathematically equivalent to a step function given by:

$$F(r)/F_0 = 0 \quad \text{for } r \leq R_C \quad (3a)$$

and

$$F(r)/F_0 = 1 \quad \text{for } r \geq R_C \quad (3b)$$

which when simplified yields:

$$F/F_0 = \exp - (\pi C_s R_C^2). \quad (4)$$



In this equation, the term  $\pi C_s R_C^2$  physically represents a circle of radius  $R_C$  around each quencher within which a fluorophore is completely quenched but not outside it [33]. Considering the fluorophore and the quencher to be located on separate planes [34], the above equation modifies to:

$$F/F_0 = \exp - [\pi C_s (R_C^2 - z^2)] \quad z \leq R_C \quad (5a)$$

$$F/F_0 = 0 \quad z \geq R_C \quad (5b)$$

In Eqs. (5a and b)  $z$  corresponds to the distance of separation between the fluorophore and the quencher assuming that the origin of the measurement is located at the center of mass of the quencher which seems justified as the quencher is quite small. Extensive work on the tryptophan fluorescence quenching by brominated lipids have established that  $R_C$  is approximately 9 Å [18]. Choosing  $R_C = 9$  Å we have fitted our experimental data with Eqs. (5). Excellent fits have been obtained for  $z = 7$  Å (Fig. 3.3A) in case of the 6-7 BrPC's. This means that only one of the tryptophan residue of  $G_{t\alpha}$  is located in the lipid membrane at a distance of approximately 7 Å from the quencher. X-ray and electron density strip model calculations have established that the total length of the 6-7 BrPC lipid is approximately 24.5 Å ( i.e. 49 Å for the bilayer thickness) and the Br group is located at a distance of 11 Å approximately from the end of the methylene chain [37]. These results imply that the fluorophore may be located at a depth of 6.5 Å from the membrane surface. Identical results may be expected, assuming the tryptophan fluorophore to be well within the lipid layer at a depth of 4 Å from the centre of the bilayer or 20.5 Å from the top of the polar head. These results simply imply that the tryptophan residue of the  $G_{t\alpha}$  are indeed incorporated in the bilayer and are located at a depth of at least 6.5 Å from the membrane surface. This value obtained for the depth of penetration of the tryptophan residue of  $G_{t\alpha}$  in the membrane is in excellent

agreement with those reported for other proteins using quenching experiments performed with 6-7 BrPC [27, 32, 36]. In this context, it may however be pointed out that although a precise location of the fluorophores in the membrane is not determinable by the method used, a distribution of the protein molecules located at different depths ranging from 6.5 Å to 20.5 Å measured from the membrane surface also seems plausible.

Electron and X-ray scattering studies have indicated that each CH<sub>2</sub> unit in the lipid is approximately 0.9 Å in length which means that the bromine moieties in 9-10 BrPC is located approximately 2.7Å below the location of the bromine moiety of 6-7 BrPC that justifies the fact that in 9-10 BrPC's the fluorescence from the tryptophan residues are less quenched compared to that in 6-7 BrPC's and is good agreement with our data [37]. This conclusion is again based on the assumption that the tryptophan residues of G<sub>tα</sub>-GDP + AlF<sub>x</sub> penetrates into the membrane of the 6-7 or 9-10 BrPC's to the same extent that is well supported by x-ray and electron density profile studies that have established these lipid structures to be almost identical [37].

Interestingly, the G<sub>tα</sub>-GDP under identical conditions yielded z equal to 8.2 Å corresponding to R<sub>c</sub> = 9 Å (Fig. 3.3B). This value is 1.2 Å larger than that obtained for G<sub>tα</sub>-GDP + AlF<sub>x</sub> form. Such a result is not readily explicable. Various possibilities exist. One possibility could be the change in the conformation of the protein [22] that probably makes the tryptophan moiety less accessible to the bromine moieties. The change in the conformation of the protein may allow the other tryptophan residue to participate in the quenching

process that gives an impression of a smaller depth of penetration although they may be located at the same depth as its  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  counterpart.

Anisotropy measurements provide an excellent method to determine whether or not a protein is bound to a membrane. Figs. 3.4A and 3.4B show the plot of the anisotropy of  $G_{t\alpha}$  versus the concentration of 6-7 BrPC and 9-10 BrPC, respectively. It can be seen that the fluorescence anisotropy of  $G_{t\alpha}$  increases with the concentration of brominated lipids. Similar results are obtained with egg PC vesicles (results not shown). However, anisotropy measurements of the protein in the absence of vesicles exhibited a constant value that is independent of protein concentration, that rules out the possibility of protein-protein interaction (Fig. 3.4C). The large changes observed in Figs. 3.4A and 3.4B in contrast to Fig. 3.4C indicate strong binding or interaction between brominated lipids and  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  or  $G_{t\alpha}$ -GDP that are consistent with results reported elsewhere [38, 39].

In conclusion, this study reports the depth of penetration of  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  and  $G_{t\alpha}$ -GDP in lipid membranes prepared from brominated lipids where the bromine moieties are anchored to the lipid at different positions on one of the lipid fatty acyl chain. Using fluorescence quenching of the  $G_{t\alpha}$  tryptophan residues, we have assessed the depth of penetration of the  $G_{t\alpha}$  in the membrane. Our results clearly demonstrate for the first time that *in vitro* tryptophan residue of  $G_{t\alpha}$ -GDP +  $AlF_x$  is located at a depth of 6.5 Å from the membrane surface which is consistent with the results and conclusions by Liebman and Uhl [10, 13, 14, 17] who have used completely different techniques to show that  $G_{t\alpha}$  interacts with the membrane.

### 3.5 Acknowledgements

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds FCAR, FRSQ (CS) and to the National Institute of Health (EY07546 and EY09631) (AY) for financial support as well as for a Jules and Doris Stein Professorship to AY for Research to Prevent Blindness.

### 3.6 References

- [1] Lamb, T.D. and Pugh E.N. Jr, (1992) *Trends Neurosci.* 15, 291-298.
- [2] Gilman, A.G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
- [3] Stryer, L. (1986) Cyclic GMP cascade of vision *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 87-119.
- [4] Jones, D.T. and Reed, R.R. (1989) *Science* 244, 790-795.
- [5] McLaughlin, S.K. Mc Kinnon, P.J. and Margolskee, R.F. (1992) *Nature* 357, 563-569.
- [6] Bourne, H.R., Masters, S.B. and Sullivan K.A. (1987) *Biochem. Soc. Trans.* 15, 35-38.
- [7] Homburger, V. (1991) *Ann. Endocrinol.* 52, 373-380.
- [8] Chabre, M. and Deterre, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 255-266.
- [9] Chabre, M., Antonny, B., Bruckert and Vuong T.M. (1993) Willey, Chichester (Ciba Foundation Symposium 176) 112-124.
- [10] Uhl, R. and Ryba, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1054, 56-68.
- [11] Pfister, C., Bennett, N., Bruchert, P.C., Clerc, A., Pagès, F. and Deterre, P. (1993) *Cell Signalling* 5, 235-251.
- [12] Chabre, M. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 213-215.
- [13] Liebman, P.A. and Sitaramayya, A. (1984) *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* (Greengard, P., et al., eds.), pp 215-225, Raven Press, New York.
- [14] Liebman, P.A., Parker, K.R. and Dratz, E.A. (1987) *Annu. Rev. Physiol.* 49, 765-791.
- [15] Chabre, M. (1985) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 14, 331-360.

- [16] Bruckert, F., Vuong, T.M. and Chabre, M. (1988) *Eur. Biophys. J.* 16, 207-218.
- [17] Uhl, R., Wagner, R. and Ryba, N. (1990) *Trends Neurol. Sci.* 13, 64-70.
- [18] Bolden, J.E. and Holloway, P.W. (1990) *Biochemistry* 29, 9638-9643.
- [19] Yamazaki, A., Tatsumi, M., Torney, D.C. and Bitensky, M.W. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9316-9323.
- [20] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [21] Bigay, J., Deterre, P., Pfister, C., and Chabre, M. (1985) *FEBS Lett.* 191, 181-185.
- [22] Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1994) *Nature* 372, 276-279.
- [23] Faurobert, E., Otto-Bruc, A., Chardin, P. and Chabre, M. (1993) *EMBO J.* 12, 4191-4198.
- [24] Phillips, W.J., and Cerione, R.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15498-15505.
- [25] Kanaho, Y., Moss, J. and Vaughan, M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 11493-11497.
- [26] Antonny, B., Sukumar, M., Bigay, J., Chabre, M. and Higashijima, T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 2393-2402.
- [27] Berkhout, T.A., Rietveld, A. and de Kruijff, B. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 897, 1-4.
- [28] Miljanich, G.P. (1978) *Studies of The Molecular Organization of the Vertebrate Photoreceptor Membrane*, Ph.D. Dissertation, University of California, Santa Cruz.
- [29] Jacob, M., Weech, P.K., and Salesse, C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19209-19218.
- [30] Manevich, Y., and Liebman, P.A. (1994) *Biophys. J.* 66, A69.

- [31] Noel, J.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1993) *Nature* 366, 654-663.
- [32] Markello, T., Zlotnick, A., Everett, J., Tennyson, J. and Holloway, P.W. (1985) *Biochemistry* 24, 2895-2901.
- [33] Wolbert, P.K. and Hudson, B.S. (1979) *Biophys. J.* 28, 197-210.
- [34] Chattopadhyay, A. and London, E. (1987) *Biochemistry*. 26, 39-45.
- [35] Chattopadhyay, A. and McNamee, M.G. (1991) *Biochemistry*. 30, 7159-7164.
- [36] Ladokhin, A.S. and Holloway, P.W. (1995) *Biophys. J.* 69, 506-517.
- [37] McIntosh, T.J. and Holloway, P.W. (1987) *Biochemistry*. 26, 1783-1788.
- [38] Brownbridge, G.G., Lowe, P.N., Morem K.J.M., Skinner, R.H. and Webb, M.R. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10914-10919
- [39] William, B.W, Scotto, A.W. and Stubbs, C.D. (1990) *Biochemistry*. 29, 3248-3255.

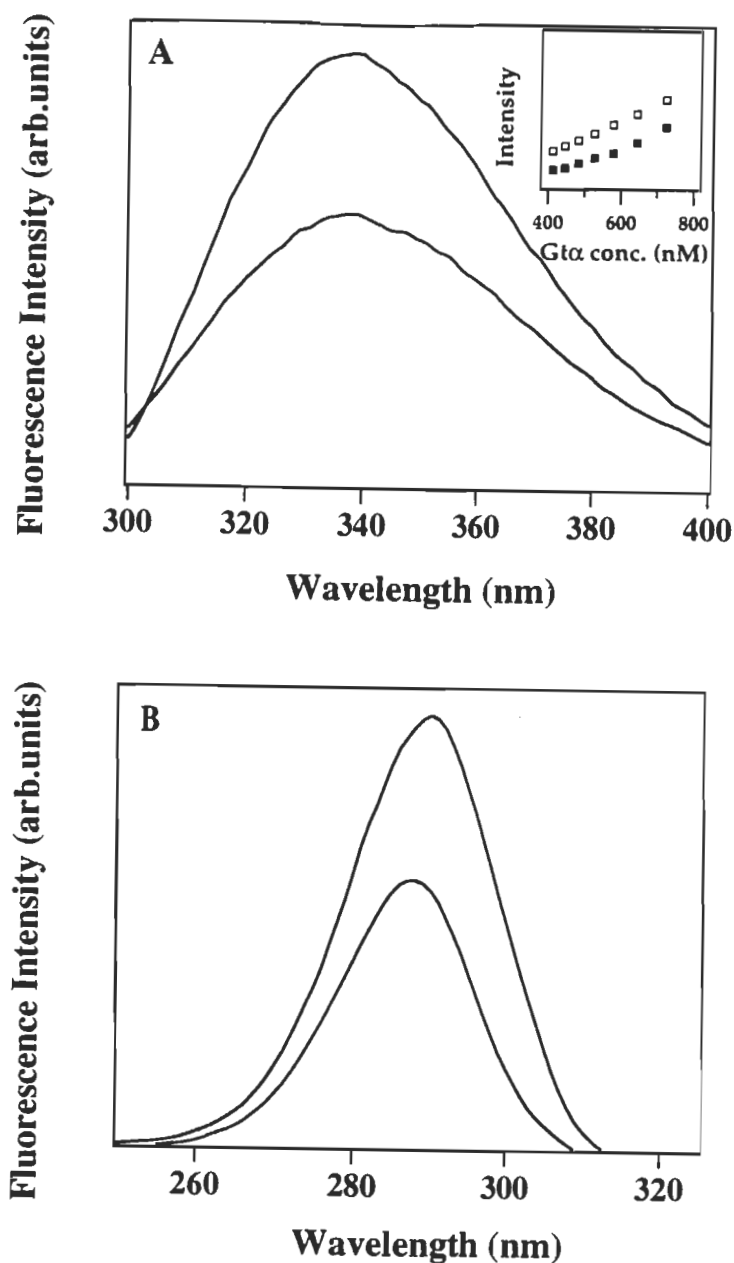


Figure 3.1. Emission and excitation spectra of Gt $\alpha$ -GDP + AlF $_x$  and Gt $\alpha$ -GDP (A) Emission spectra of Gt $\alpha$ -GDP + AlF $_x$  (upper curve) and Gt $\alpha$ -GDP (lower curve),  $\lambda_{ex}$ = 289nm. (B) Excitation spectra of Gt $\alpha$ -GDP + AlF $_x$  (upper curve) and Gt $\alpha$ -GDP (lower curve),  $\lambda_{em}$ = 337 nm. Inset: Calibration curve. Plot of the fluorescence intensity of Gt $\alpha$ -GDP + AlF $_x$  (open squares) and Gt $\alpha$ -GDP (filled squares) versus the concentration of Gt $\alpha$ .  $\lambda_{em}$ = 337nm;  $\lambda_{ex}$ =289 nm.



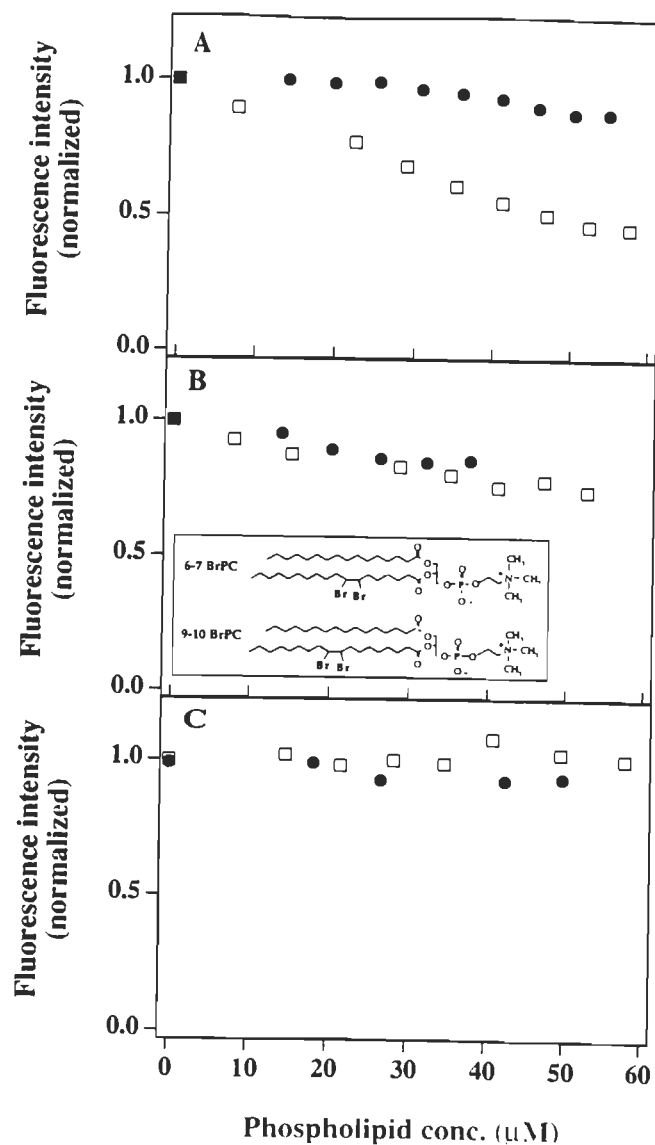


Figure 3.2. Fluorescence quenching of  $\text{Gt}\alpha\text{-GDP} + \text{AlF}_x$  and  $\text{Gt}\alpha\text{-GDP}$

(A) Fluorescence intensity of  $\text{Gt}\alpha\text{-GDP} + \text{AlF}_x$  versus the concentration of 6-7 BrPC (open squares) and 9-10 BrPC (filled circles). (B) Fluorescence intensity of  $\text{Gt}\alpha\text{-GDP}$  versus the concentration of 6-7 BrPC (open squares) and 9-10 BrPC (filled circles). (C) Fluorescence intensity of  $\text{Gt}\alpha\text{-GDP} + \text{AlF}_x$  (open squares) and  $\text{Gt}\alpha\text{-GDP}$  (filled circles) versus the concentration of egg PC (in the absence of the brominated phospholipids).  $\lambda_{em} = 337 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{ex} = 289 \text{ nm}$ . Inset: Structure of 6-7 and 9-10 BrPC lipids.

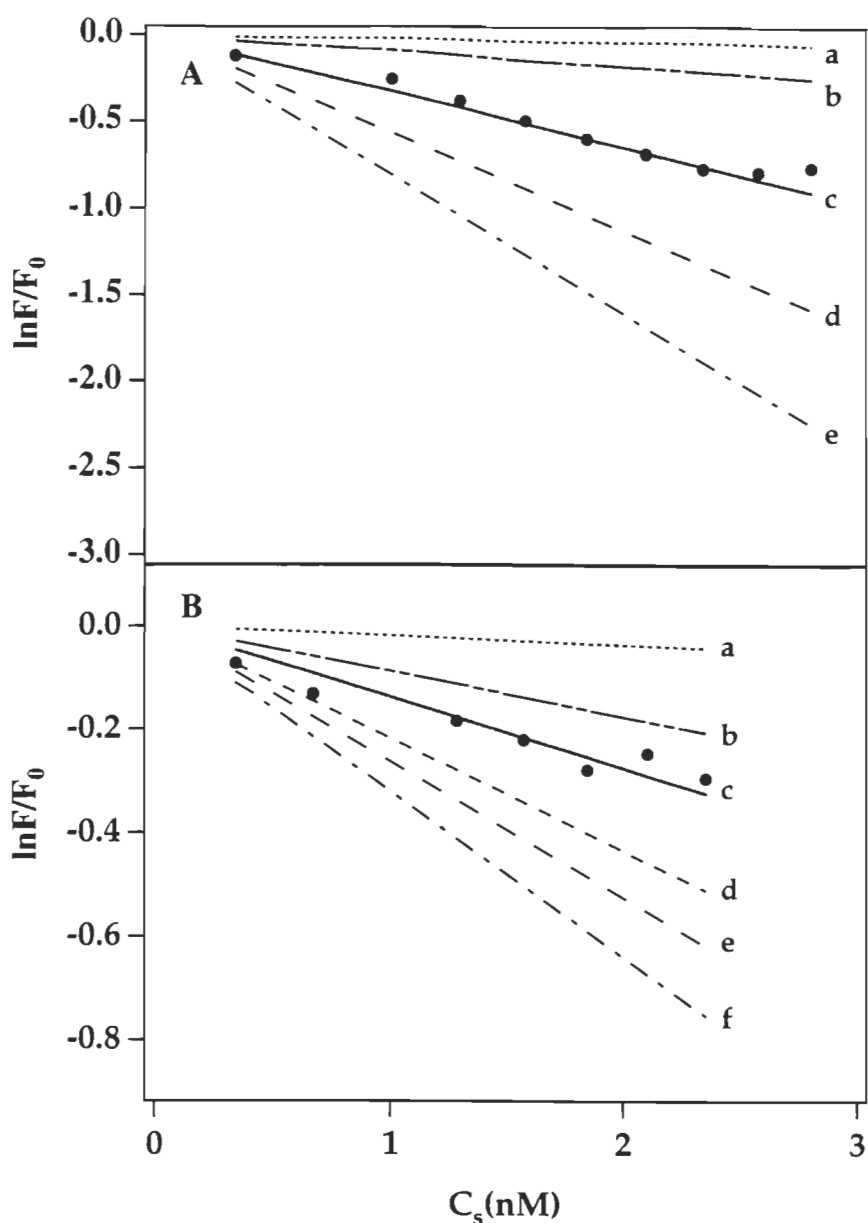


Figure 3.3. Estimation of the distance of separation between the fluorophore and the quencher. (A) Theoretical fits for the fluorescence quenching curves in 6-7 BrPC vesicles in presence of  $Gt\alpha$ -GDP +  $AlF_x$ :  $R_c = 9 \text{ \AA}$  and  $z$  is a) 8.9 b) 8.5 c) 7.0 d) 5.0 and e) 1.0  $\text{\AA}$ . (B) Theoretical fits for the fluorescence quenching curves in 6-7 BrPC vesicles in presence of  $Gt\alpha$ -GDP:  $R_c = 9 \text{ \AA}$  while  $z$  is a) 8.9 b) 8.5 c) 8.2 d) 7.7 e) 7.4 and f) 7.0  $\text{\AA}$ .

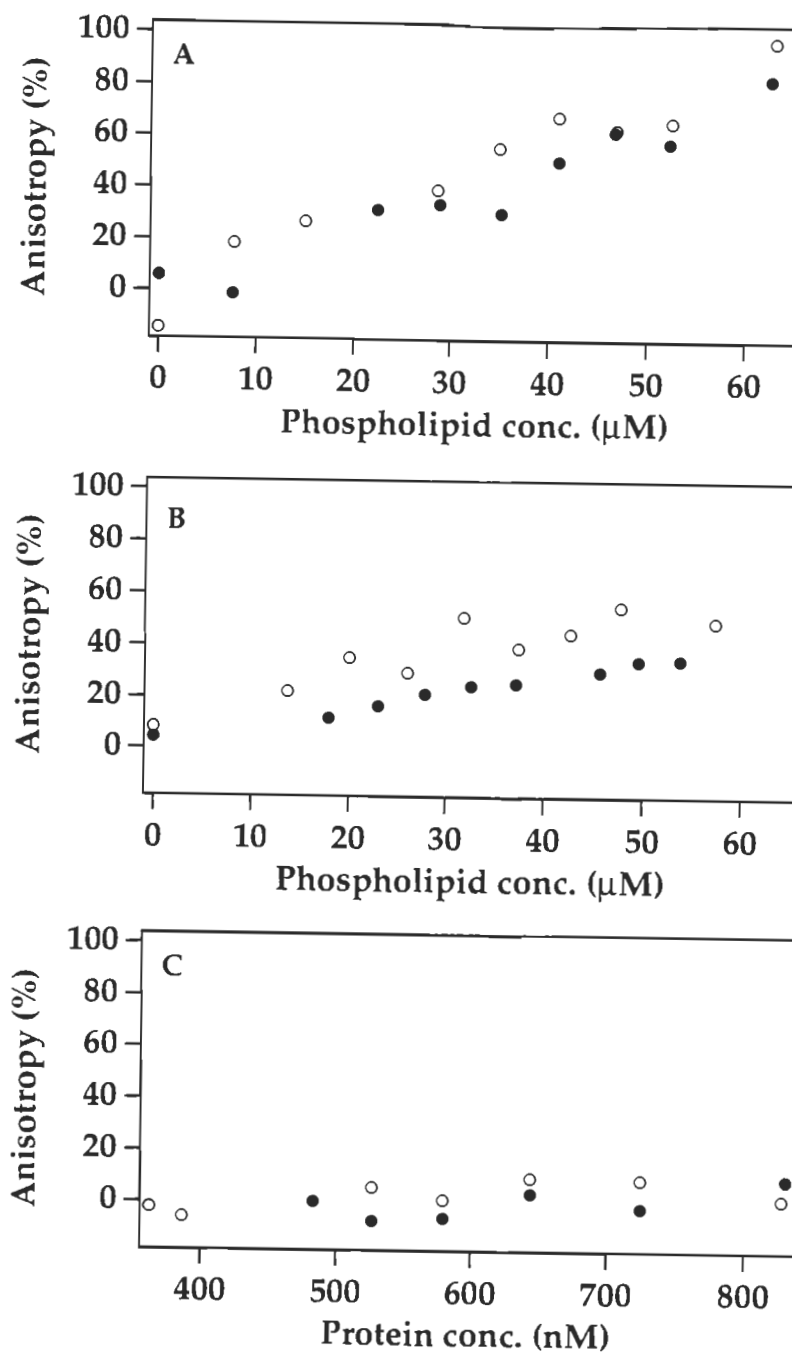


Figure 3.4. Anisotropy measurements. Plot of the anisotropy versus the phospholipid concentration. (A) Gt $\alpha$ -GDP + AlF $_X$  (filled circles) and Gt $\alpha$ -GDP (open squares) for 6-7 BrPC quenchers. (B) Gt $\alpha$ -GDP + AlF $_X$  (filled circles) and Gt $\alpha$ -GDP (open circles) for 9-10 BrPC quenchers. (C) Gt $\alpha$ -GDP + AlF $_X$  (filled circles) and Gt $\alpha$ -GDP (open circles) in absence of vesicles.

## CHAPITRE 4

### EVALUATION OF MEMBRANE PENETRATION DEPTH UTILIZING FLUORESCENCE QUENCHING BY DOXYLATED FATTY ACIDS

Sous presse

Accepté pour publication.

le 3 juin 1998

dans la revue:

*Langmuir*

EVALUATION OF MEMBRANE PENETRATION DEPTH UTILIZING FLUORESCENCE  
QUENCHING BY DOXYLATED FATTY ACIDS

Sonya Grenier, Ashim K. Dutta, and Christian Salesse

GREIB, Département de Chimie-Biologie,  
Université du Québec à Trois-Rivières,  
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

Corresponding author. Christian Salesse, Tel: 819-376-5077; Fax : 819-376-5057;  
e-mail: christian\_salesse@uqtr.quebec.ca.

#### 4.1 Abstract

In this paper, we have attempted to evaluate the depth of penetration of doxylated fatty acids in lipid vesicles and estimate the location of fluorophores in these model membrane systems. The fluorescence emission from the tryptophan residues in a transmembrane peptide is used as the fluorophore in this experiment and fluorescence quenching results have been used to evaluate the depth of penetration of the doxylated fatty acids. Our results show that the peptides are partially bound to the surface of the membrane and the rest very likely are located with their tryptophan residues at the centre of the bilayer. Detailed studies demonstrate that these doxylated fatty acid probes are efficient and excellent in locating the position of the tryptophan residues.

## 4.2 Introduction

Amphipathic molecules tend to distribute differently in membranes and aqueous phases based on their local environmental conditions such as temperature, pH, etc. and their thermodynamical state of equilibrium<sup>1,2</sup>. This distribution determines the effective concentration of these molecules in each phase which may control the extent of interaction with other molecules such as receptors and enzymes that may be located in the cytoplasm or embedded at different depths in lipid membranes. Interaction with enzymes may further alter the nature of the amphipathic molecules and their distribution in the membrane which may play key roles in the biological functioning of the membranes. It is therefore crucial to determine the location of these amphipathic molecules in membranes. In real biological systems, the tryptophan fluorescence quenching by various membrane-bound probes has emerged as a powerful tool to determine the location of proteins in membranes<sup>3-7</sup>. One of these methods involves studying energy transfer between the fluorescence tryptophan (trp) group in the protein/peptide and another appropriate acceptor group located on a distant probe. However, such a method has an inherent defect. Since quenching of the fluorophore occurs by resonance energy transfer (RET), it is virtually impossible to pinpoint the location of the fluorophores. To circumvent these difficulties, heavy atom quenchers were used with the justification that collisional quenching being a short range interaction would allow a precise determination of the location of the fluorophores.<sup>8-13</sup> Several authors<sup>10-12,14-16</sup> have demonstrated that the quencher molecules are separated from donor molecules within 3-5 Å effectively quench the donor's fluorescence. In this connection, it must be

mentioned that several authors<sup>10,15,16</sup> have used brominated lipids to determine the depth of fluorescent tryptophans of cytochrome b<sub>5</sub> in the membrane. Other workers<sup>17-21</sup> have used doxyl probes for the same purpose. Although doxyl groups attached to fatty acid chains were thought to be completely incorporated in the membrane, Chatelier et al.<sup>22</sup> have demonstrated that it was not so for the purple membranes. In an effort to determine whether or not the doxylated fatty acid compounds penetrate the membrane and to what extent, we have studied fluorescence quenching of the tryptophan residue of a synthetic transmembrane peptide incorporated in 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC) vesicles by 12-doxylstearic acid (D12) and 16-doxylstearic acid (D16). Our interest in these doxylated fatty acids stems from the fact that these probes have been extensively used as ESR and EPR probes and seldom used as quenchers in fluorescence methods. This work demonstrates that doxylated fatty acids are efficient quenchers which provide an excellent alternate choice for brominated quencher lipids.



### 4.3 Materials and methods

D12 and D16 were purchased from Molecular Probes, Eugene, U.S.A and used without further purification. The molecular structures of D12 and D16 are provided in Figure 4.1. POPC was obtained from Avanti Polar Lipids, Alabama, U.S.A. and used as received. A synthetic peptide of 22 residues with a sequence of H-K<sub>2</sub>GL<sub>8</sub>WL<sub>8</sub>KA-amide was obtained from Research Genetic Inc. Alabama, U.S.A. The purity of the peptide was greater than 90 % and was confirmed by mass spectroscopy.

Vesicles containing the peptide were prepared by mixing the peptide and POPC in methanol at a molar ratio of 1:100. Sonication of the mixture for a period of 10 min was accomplished in a Brandson 2210 water bath sonicator to ensure complete solubilization of the peptide and POPC. The methanol in the mixture was subsequently evaporated under argon and the dried product was dissolved in cyclohexane and lyophilized overnight. Large unilamellar vesicles (LUV) of the peptide mixed with POPC were formed using the extrusion method of Hope et al.<sup>23</sup>. The lyophilized peptide-lipid mixture was hydrated with Tris acetate 10 mM and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1mM buffer. The pH was 8.0 at 20 °C. The volume of buffer added was calculated to give a lipid concentration of 4.0 mM which was subsequently sonicated for 10 min in the water bath followed by 10 time cycles through the extruder (Lipex Biomembranes Inc) using a 0.1 µm polycarbonate filter (Nucleopore Canada Inc., Toronto). Vesicles of POPC containing D12 and D16 were prepared in an identical method as described above.

The vesicles were characterized by electron microscopy. The vesicles formed were transferred on carbon coated electron microscope grids, dried and stained with 1% uranyl acetate solution, dried and finally examined under a transmission electron microscope (Phillips EM 201) with a magnification of 45000.

Absorption spectra of the samples were recorded on a Hewlett-Packard (HP 8452) diode array absorption spectrophotometer. Standard 10 mm x 10 mm cross-section matched suprasil cuvettes were used. Steady-state fluorescence emission was recorded on a SPEX Fluorolog-2 spectrophotometer. A solution of laser grade Rhodamine B (Kodak) in 1-2-propanediol was used as a quantum counter keeping the detector voltage and amplification factor constant for all the experiments reported in this work. Narrow slits and suitable filters were used to reduce the effects of scattering. In the fluorescence quenching experiments, we have used methanolic solutions of D12 or D16 ( $2 \times 10^{-5}M$ ) that were slowly injected into the cuvette containing the peptide in the POPC vesicles. The ratio of the peptide: POPC: doxyl was 1:100: 5 corresponding to the maximum amount of quencher added.

#### 4.4 Results and discussion

Figure 4.2 shows the absorption spectrum of the peptide in methanol. The spectral profile is broad and diffuse in the 250-320 nm region with its band maxima located at 282 nm and the 0-0 band corresponding to the  $S_1$ - $S_0$  transition located at 292 nm. This absorption profile may be attributed to the absorbance of the tryptophan residues in methanol. Figure 4.2 also shows the absorption spectrum of the peptide incorporated in the POPC vesicles. Interestingly, the spectral profile shows a distinct blue shift with the band maximum at 272 nm indicating incorporation and/or binding of the peptide to the membrane. This feature was further confirmed from the fact that increasing the concentration of the peptide in methanol (figure not shown) showed an increase in absorbance but no shift of the spectral profile or of the band maximum position.

Figure 4.3 shows the emission spectrum of the peptide in methanol. The fluorescence profile in the 300-500 nm region is broad and diffuse with the band maximum at 345 nm and is in good agreement with reported results<sup>24</sup>. It is reported that this emission originates from the  $S_1$ - $S_0$  transition of the tryptophan molecule. The emission spectrum of the peptide incorporated in the POPC vesicles is also shown in figure 4.3. The band maximum of the fluorescence band of the peptide in vesicles shows a blue shift relative to the emission band in methanol with its band maximum at 320 nm. This is in fact consistent with the blue shift of the absorption band discussed above and is indicative of incorporation and/or binding of the peptide to the vesicles. This feature was further confirmed from the fact that on increasing the

concentration of the peptide in methanol (figure not shown) an increase in the fluorescence emission was observed without any corresponding shift of the spectral profile or band maximum positions.

Figure 4.4 shows the absorption spectra of D16 in methanol and in vesicles. The absorption spectrum of D16 in methanol in the 200-320 nm region shows a broad band with its maximum located at 232 nm. With increasing concentration the absorbance is observed to increase linearly without any changes in the spectral profile (figures not shown). In the vesicles, D16 shows a broad band in the 200-320 nm region with its maximum at 238 nm. The observed broadening of the spectral profile and red shift of the absorption band maximum by 6 nm in vesicles with respect to methanol suggests incorporation and/or binding of D16 to the vesicles. It was also confirmed that on increasing the concentration of D16 in the vesicles, the absorbance increased without any corresponding changes in the spectral profile, full width at half maximum (FWHM) or position of the band maximum. Identical results were obtained for D12. In fact, this is expected as the nitroso group contributes to the absorption spectra in the 200-320 nm region and hence is independent of the chain length.

Figure 4.5 shows the excitation spectra of the peptide in methanol and in the vesicles. The excitation spectrum of the peptide in methanol with its emission maximum monitored at 345 nm shows a broad band in the 220-300 nm region with its band maximum at 280 and the 0-0 band at 289 nm. This value agrees excellently with the absorption spectrum (Figure 4.2) of the peptide in methanol. Interestingly, the excitation spectrum of the peptide in vesicles with the emission monitored at 326 nm reveals a band maximum at

280 nm which is consistent with the results obtained from the absorption spectrum. A comparison of the excitation spectrum of the peptide in methanol and vesicles shows that in vesicles the 0-0 band is blue shifted which is similar to the blue shift observed in the absorption spectra. These features confirm that the peptide is indeed incorporated and/or bound to the vesicles.

Figure 4.6 shows quenching of the tryptophan fluorescence with increasing concentrations of the doxylated fatty acid derivative D16 in methanol. Methanol was used as both the peptide and the doxylated derivatives are soluble in this solvent. A plot of  $F_0/F$  vs the concentration of D16 (see inset of this figure) shows a straight line with an intercept of unity on the  $F_0/F$  axis which is consistent with the Stern-Volmer equation<sup>24,26</sup> given as  $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$ . Here  $F_0$  and  $F$  correspond to the fluorescence of the tryptophan residue of the peptide in the absence and presence of the quencher, respectively.  $K_{SV}$  is the Stern-Volmer rate constant and  $[Q]$  is the concentration of the quencher. Fitting the quenching data to the Stern-Volmer relation yields  $K_{SV} = (3 \times 10^3 \text{ M}^{-1})$  which is in excellent agreement with published data.<sup>24,26</sup> It must be pointed out that the slight deviation (upward curvature) of the Stern-Volmer plot observed at high concentrations of the quencher may be attributed to static quenching effects. Such deviation may be mathematically treated with a modified Stern-Volmer relation.<sup>24,26</sup> In this context it must be mentioned that a careful examination of the fluorescence emission spectrum of the peptide (figure 4.3) and the absorption spectrum of the D16 (figure 4.4) shows no overlap that rules out the possibility of fluorescence quenching due to energy transfer.<sup>25</sup> Hence the quenching process is 100 % collisional quenching process in this particular case.

Perrin's equation provides a simple yet unique means of evaluating the distance of separation between an excited donor and an acceptor and is expressed as  $F_0/F = \exp(4/3 \pi R_C^3 N'[Q])$  where  $N' = 6.023 \times 10^{20}$ , and  $R_C$  represents the radius of an imaginary sphere with the fluorophore located at the centre of the sphere while the quencher is located within this sphere or on its surface. It is assumed that the fluorescence from the fluorophore is fully quenched when the quencher is located within this sphere or on its surface while no quenching occurs if the quencher is located outside this sphere thereby assuming a step like function for simplicity. Our preliminary calculations from the quenching of the tryptophan fluorescence of the peptide in methanol show that  $R_C = 9.5 \text{ \AA}$  which is in good agreement with reported data.<sup>2,3</sup> The step like function in reality does not hold well. It has been demonstrated that these calculations nevertheless provide reasonably good estimates of  $R_C$ .<sup>12</sup> It may be pointed out that although Perrin's equation was originally formulated and used for evaluating the distance of separation between a donor and a quencher incorporated in rigid matrices, the fact that the tryptophan and doxyl groups are localized in the vesicles and diffusion effects being low in the time domain of energy transfer processes justifies the use of Perrin's equation and has been employed successfully by several authors.<sup>3,27,28</sup>

In an effort to determine the depth of penetration of the doxylated fatty acids in the vesicles, we have prepared vesicles of POPC and the peptide as described in details in the experimental section of this paper. While studying the quenching of the tryptophan fluorescence in the vesicles by D12 and D16,

several experimental difficulties were encountered as described here: first, the fluorescence of the peptide in the buffer or vesicles was observed to decrease with time. Second, the fluorescence from the tryptophan residues in the peptide appeared to degrade faster in time with the addition of methanol. In this context, it must be pointed out that the state of the vesicles in the presence of methanol and the distribution of the peptide in the vesicles as well as their state as a function of time is not precisely known.

To correctly determine the contribution of the doxyl groups towards quenching and eliminate the effects of degradation of the peptide due to methanol and over time in the quenching process, a control experiment identical to the actual quenching experiment was performed with an equal amount of methanol instead of a methanolic solution of the doxyl. To examine if the vesicles were ruptured or deformed over time, we have recorded the electron micrographs of the vesicles at different time intervals (figures not shown). Figure 4.7 shows the electron micrograph of vesicles of POPC containing the peptide after seven days confirming that the vesicles were extremely stable during this period of time. However to circumvent the possible effects of vesicle fusion and degradation of the peptide in the vesicles freshly prepared vesicles were always used. Careful estimates show that the vesicles have an average diameter of 130 nm that demonstrate these vesicles to be large unilamellar vesicles (LUV) which are highly stable over time.

To determine whether or not the peptide is completely incorporated in the vesicles, we have tried to quench the fluorescence of the tryptophan residues of the peptide with acrylamide. Such an experiment is based on the

fact that soluble acrylamide is incapable of penetrating the vesicles and quenching the tryptophan fluorescence of the peptide located in the vesicle membranes<sup>24,26</sup>. Acrylamide is a collisional quencher<sup>24</sup> and hence is an excellent probe to locate the tryptophan residues on the surface of the vesicles. Figure 4.8 shows the plot of  $F_0/F$  versus the concentration of acrylamide.  $F_0$  and  $F$  stand for the fluorescence of the tryptophan residue of the peptide incorporated and/or bound in vesicles in the absence and in the presence of the acrylamide, respectively. As mentioned earlier, since acrylamide is incapable of penetrating the vesicles, the quenching of tryptophan fluorescence in vesicles is due to quenching of the tryptophan residues localized or bound to the surface of the vesicles.<sup>24,26</sup> Although considerable quenching of the tryptophan fluorescence by acrylamide was observed, addition of large amounts of acrylamide to the vesicles failed to quench the tryptophan fluorescence by 100 % confirming that a part of the peptide is definitely located within the membrane vesicles and are consistent with the published results of Bolen and Holloway.<sup>14</sup> From the linear portion of the plot  $F_0/F$  vs the concentration of acrylamide (figure 4.8), we have estimated the Stern-Volmer constant,  $K_{sv} = 32.5 \text{ M}^{-1}$  (Figure 4.6). However, the Stern Volmer constant obtained from the quenching of the peptide fluorescence by D16 in methanol yielded  $K_{sv} = 3.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Such a large difference in  $K_{sv}$  again indicates that the peptide in vesicles is bound to the membrane surface rather than freely diffusing as monomers in methanol. To further confirm that the peptide is indeed bound to the surface of the vesicles, we have attempted to eliminate the unbound peptide, if at all present, through gel chromatography following standard procedures.<sup>14</sup> Interestingly, our fluorescence quenching results with acrylamide obtained for the filtered and unfiltered vesicles were found to be



identical. Ruling out the trivial case of the filtration process being ineffective, it follows that the peptide quenched by acrylamide is indeed strongly bound to the surface of the vesicles, and that there is no free peptide in the aqueous phase outside the vesicles.

The inset of figure 4.8 shows the modified Stern-Volmer plot of  $F_0/F_0-F$  versus the inverse of the concentration of the acrylamide for the peptide incorporated or bound to the POPC vesicles. The curve appears to be linear with an intercept of 4 that yields  $F/F_0 = 0.75$  which indicates that 75 % of the fluorescence is inaccessible to acrylamide. It means that 25 % of fluorescence quenching originates from the peptide bound to the outer surface of the vesicles membrane. Similar results have been reported by Bolen and Holloway<sup>14</sup> for small unilamellar vesicles (SUV) using the same peptide as used in this work. Preliminary calculations of the critical radius of quenching ( $R_c$ ) using Perrin's formula as discussed in an earlier section yields  $R_c = 7.5 \text{ \AA}$  which is consistent with reported data.<sup>26</sup> Considering the tryptophan residues of the peptide to be bound at the surface of the vesicles and the origin of measurement located on the surface of the vesicle, a value of  $R_c = 7.5 \text{ \AA}$  is obtained which implies that acrylamide quencher moieties located at a distance of  $7.5 \text{ \AA}$  from the surface are capable of quenching the tryptophan residues which is consistent with the findings of Bolen and Holloway who reported a value of  $R_c = 7.0 \text{ \AA}$  for the same peptide as used in this work and brominated hydrocarbons.<sup>14</sup> In addition, these results also imply that the tryptophan quencher moieties located at a depth of  $7.5 \text{ \AA}$  units from the surface of the vesicles are still capable of being quenched by the quenchers located at the surface of the vesicles.

Figure 4.9A shows a plot of  $F_0/F$  versus the concentration of D12 or D16 representing the fluorescence quenching of the tryptophan residues in the vesicles. It is evident from this figure that there exists considerable deviation from the expected linearity implying static quenching effects<sup>24-26</sup>. These effects are well known and have been extensively investigated by Keizer<sup>29</sup>. Figures 4.9B and 4.9C show a modified Stern-Volmer plot of  $F_0/F_0-F$  versus the inverse of the concentration of D16 and D12, respectively. At first sight, the curves appear complicated. However, close examination of the curves reveal that they may be resolved into two straight lines with different gradients as shown in the figures. The straight line corresponding to the low concentration zone as shown in figure 4.9B was extrapolated to intercept the y-axis at  $F_0/F_0-F = 9.13$  that yields  $F/F_0 = 0.89$  implying 89 % of the fluorescence is inaccessible to D16. Similar extrapolation for high concentration of the quencher as in figure 4.9B yielded  $F_0/F_0-F = 1.88$  that yields  $F/F_0 = 0.47$  implying 47% of the fluorescence is inaccessible to D16 at high quencher concentrations. In summary, only 11 % of the fluorescence is quenched by D16 at low concentration while a maximum of 53 % of the fluorescence is quenched at high concentrations of the quencher. Similar quenching experiments with D12 yield intercepts of 3.13 for the high concentration zone (figure 4.9C) that produces  $F/F_0 = 0.68$  implying that 68 % of the fluorescence is inaccessible to the doxylated group. The intercept corresponding to the low concentration zone for D12 is 1.43 that yields  $F/F_0 = 0.89$ , i.e., 89 % is inaccessible to quenching by D12 implying that 32 % of the fluorescence is quenchable at high concentrations of D12 and only 11 % at low concentration. The fact that 53 % of the fluorescence of the tryptophan residues in the vesicles is quenched by D16 in contrast to only 32 % being quenched by

D12 under identical conditions demonstrate that the doxylated fatty acid molecules are well organized and the nitroso groups in D12 and D16 are localized at different depths in the vesicles. The quenching by D16 is observed to be more efficient than D12 which suggests that the nitroso quenching moiety in D16 is closer to the tryptophan than D12. In this context, the works of the group of Holloway must be mentioned. It was demonstrated through quenching of the peptide by brominated lipids that the peptide incorporated in the vesicles were so distributed that the tryptophan residue of the peptide was localized at the centre of the bilayer<sup>14</sup> and by X-Ray diffraction measurements showing the precise location of the bromine moieties in the brominated lipids.<sup>11</sup> Interestingly, at low concentrations both the doxylated fatty acids, D12 and D16, seem to quench the tryptophan fluorescence equally under identical conditions. One possible explanation could be that the doxylated fatty acid undergoes concentration dependent partitioning between the aqueous phase outside the vesicles and the membranous environment of the vesicles. At low concentrations, the doxylated fatty acid molecules exist as free molecules in the aqueous phase that maximally quench the peptide molecules bound to the surface of the vesicles and has little quenching effect on the tryptophan residues localized in the membrane vesicles. At high concentrations, a considerable number of the doxylated fatty acid molecules are located within the membrane vesicles that contribute to the quenching process that is reflected as an increase in the quenching efficiency. The differences in the quenching efficiencies observed for D12 and D16 imply organization of the doxylated molecules in the bilayer. A random orientation of these molecules is not expected to show dependence of quenching on the location of the nitroso group in the fatty acid chain or the chain length itself. Furthermore, a random

orientation of the doxylated fatty acids in vesicles is very likely not possible due to energetic, enthalpic and other thermodynamic reasons.

Several authors<sup>30,32</sup> have studied diffusion in lipid membranes and preliminary calculations have shown that there is less than one collision every 50 ns and hence the process is essentially static in nature. Collisional processes in membranes have been treated with advantage in terms of a 2D process by several authors.<sup>27,28</sup> Since the fluorescence lifetime of tryptophan is about 5 ns,<sup>26</sup> the fluorescence quenching of these tryptophan residues in the vesicles may be analysed in terms of a static process in a 2D system. Considering a random distribution of the quenchers with regard to the fluorophores in the plane of the membrane and the quenching process being essentially static and an uniqueness of depth for the entire population of both the quencher and probe, the three dimensional Perrin's formula:

$$F / F_0 = \exp -V[Q] \quad (1)$$

modifies to a two dimensional form given as

$$F / F_0 = \exp -\int [2\pi r C_s (1-F(r)/ F_0) dr] \quad (2)$$

where  $F$  and  $F_0$  are the fluorescence emission intensity of the fluorophore in the presence and absence of the quencher, respectively.  $V$  is the elementary volume surrounding the fluorophore,  $[Q]$  is the concentration of the quencher.  $F(r)$  corresponds to the intensity of the fluorophore when the quencher is located at a distance of  $r$  from it.  $C_s$  is the surface density of the quenchers. Using a "hard sphere" approximation, i.e. considering a sphere of critical radius  $R_c$  with the fluorophore located at its centre and assuming a step like function that within this sphere any quencher would quench the fluorophore but not outside this critical radius, we have

$$F(r)/F_0 = 0 \quad \text{for } r \leq R_c \quad (3a)$$

and

$$F(r)/F_0 = 1 \quad \text{for } r \geq R_c \quad (3b)$$

which when simplified yields:

$$F/F_0 = \exp -(\pi C_s R_c^2). \quad (4)$$

In this equation, the term  $\pi C_s R_c^2$  physically represents a circle of radius  $R_c$  around each quencher within which a fluorophore is completely quenched but not outside it<sup>25,33,35</sup>. Considering the fluorophore and the quencher to be located on separate planes,<sup>34</sup> the above equation modifies to:

$$F / F_0 = \exp -[\pi C_s (R_c^2 - z^2)] \quad z \leq R_c \quad (5a)$$

$$F / F_0 = 1 \quad z \geq R_c \quad (5b)$$

In Eqs. 5a and 5b,  $z$  corresponds to the distance of separation between the fluorophore and the quencher, assuming that the origin of the measurement to be located at the centre of mass of the quencher which seems justified as the quencher is quite small.

Figures 4.10A and 4.10B show the plot of  $F_0/F$  versus  $C_s$ . Good fits were obtained using  $R_c = 9 \text{ \AA}$  and  $z = 4.35 \text{ \AA}$  for D16 and  $R_c = 9 \text{ \AA}$  and  $z = 5.41 \text{ \AA}$  for D12 using equation 5a. It must be noted that although good fits were obtained for points corresponding to the high concentrations of doxyl, the fitting was poor for points corresponding to the low concentrations. The calculated values of  $z = 4.35 \text{ \AA}$  obtained for D16 and  $z = 5.41 \text{ \AA}$  for D12 physically correspond to the distance of separation between the quencher moieties and the fluorescent tryptophan residues in the vesicles. In this context, it must be mentioned that Bolen and Holloway in their work have demonstrated that the tryptophan

groups in the peptide are localized at the centre of the bilayer when the peptide is incorporated in the DOPC vesicles.<sup>14</sup> Fluorescence quenching studies of the tryptophan residues by bromine moieties anchored at different positions along the chain length of the lipids have confirmed these findings.<sup>15</sup> It must be pointed out that all the tryptophan residues are not localized strictly along the centre of the bilayer. It is likely that there exists a distribution in the location of the residues in the vertical plane of the vesicle membrane due to thermal fluctuations and the process of incorporation being a statistical process.<sup>14</sup> One possibility is that the distribution of the peptide in the vesicles is so narrow that the centre of the mass of the distribution may be considered to be localized at the centre of the bilayer. Since the same peptide as used by Bolen and Holloway<sup>14</sup> has been used in this work and the vesicles have been prepared in the same manner by these workers it is likely that the distribution of the tryptophan is the same, i.e. localized near the centre of the bilayer. Preliminary calculations show that  $R_c$  for D12 is 5.41 Å while  $R_c$  for D16 is 4.35 Å. Considering the tryptophan residues localized in a narrow distribution profile along the centre of the bilayer, our results indicate that the nitroso group of the D16 or D12 is located at a depth of 17.6 Å or 16.6 Å, respectively, as measured from the surface of the vesicles. These values are also consistent with the fact that the length of POPC is about 22 Å.<sup>11</sup> It is reported that the head group of POPC extends to a length of 6 Å that makes the distance between the centre of the bilayer and the base of the polar head group equal to 16 Å. Considering that the  $\text{COO}^-$  group of D16 lies in the same horizontal plane as the base of the polar head group of POPC (see schematic diagram in the inset of figures 4.9B and 4.9C) we obtain a chain length of 12 Å. This value yields a distance of 4 Å between the location of the nitroso group at the end of the D16 chain and the

centre of the bilayer that is in excellent agreement with our calculations. The results obtained with D12 are similar and are in reasonably good agreement with our theoretical calculations.

#### 4.5 Conclusions

Briefly, this study has demonstrated that doxylated fatty acids D12 and D16 which are well known ESR and EPR probes may be used as excellent photoprobes to determine the location of tryptophan residues in peptides and proteins in vesicles or biomembranes. The nitroso group in the doxylated fatty acids being small serves as excellent probes to locate with high precision the position of tryptophan groups in vesicles and biomembranes. Perhaps the most outstanding feature of this work is that the Stern-Volmer plots are non-linear may be resolved into two linear components. While the higher concentration components for D16 and D12 reveal considerable difference in their efficiency of quenching, no such difference was observed at low concentrations under identical conditions. These results are accounted for in terms of concentration dependent partitioning of the doxylated fatty acids between the aqueous phase outside the vesicles and the bilayer in the vesicle. At low concentration, a large fraction of the doxylated fatty acids are in the aqueous phase where they exist as free molecules while a small fraction exist as organized entities in the membrane vesicles that quench the tryptophan fluorescence of peptides localized at the centre of the membranes. At higher concentrations however they are able to penetrate the vesicles and exist as organized entities in the vesicles. Computer simulations showed reasonably good fits to the

experimental data indicating the  $z = 4.35 \text{ \AA}$  for D16 and  $z = 5.41 \text{ \AA}$  for D12, suggesting that the tryptophan residues of the peptides are located at the centre of the bilayer which is in excellent agreement with reported results. Our work has demonstrated that about 11 % of the peptides are bound to the outer surface of the vesicles while the remaining part, about 89 %, are anchored in such a way that the tryptophan residues are located at the centre of the bilayer. This work illustrates that using doxylated fatty acids provides an elegant and versatile method to probe the depth of penetration of peptides localized inside the membranes. More extensive works are under way to test and compare the behaviour of doxylated lipids as probes in similar systems.

#### 4.6 Acknowledgements

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds FCAR and FRSQ.

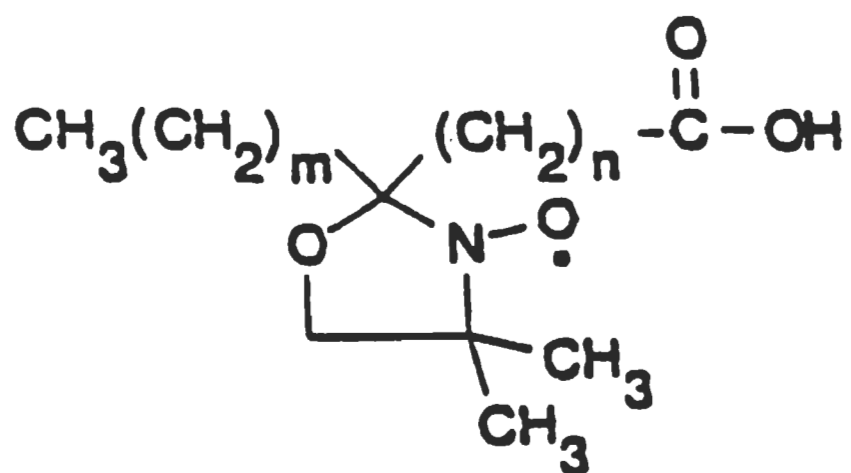


#### 4.7 References

- (1) Blatt, E.; Sawyer, W.H. *Biochim. Biophys. Acta* 1985, 822, 43.
- (2) London, E. *Mol. Cell Biochem.* 1982, 45, 181.
- (3) London, E.; Feigenson, G.W. *Biochemistry* 1981a, 20, 1932.
- (4) London, E.; Feigenson, G.W. *Biochim. Biophys. Acta* 1981b, 649, 89.
- (5) Shaklai, N.; Yguerabide, J.; Romney, H.M. *Biochemistry* 1977, 16, 5585.
- (6) Sklar, L.A.; Doody, M.C.; Gotto, A.M.; Pownall, H.J. *Biochemistry* 1980, 19, 1294.
- (7) Hasselbacher, C.A.; Preuss, D.K.; Dewey, T.G. *Biochemistry* 1986, 25, 668.
- (8) Kao, Y.J.; Soutar, A.K.; Hong, K.Y.; Pownall, H.J.; Smith, L.C. *Biochemistry* 1978, 17, 2689.
- (9) East, J.M.; Lee, A.G. *Biochemistry* 1982, 21, 4144.
- (10) Everett, J.; Zlotnick, A.; Tennyson, J.; Holloway, P.W. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 6725.
- (11) McIntosh, T.J.; Holloway, P.W. *Biochemistry* 1987, 26, 1783.
- (12) Ladokhin, A.S.; Holloway, P.W. *Biophys. J.* 1995, 69, 506.
- (13) Grenier, S.; Desmeules, P.; Dutta, A.K.; Yamazaki, A.; Salesse, C. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1370, 199.
- (14) Bolen, E.J.; Holloway, P.W. *Biochemistry* 1990, 29, 9638.
- (15) Markello, T.; Zlotnick, A.; Everett, J.; Tennyson, J.; Holloway, P.W. *Biochemistry* 1985, 24, 2895.

- (16) Jain, M.K.; Rogers, J.; Simpson, L.; Gierasch, L.M. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 816, 153.
- (17) Atik, S.S.; Singer, L.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 3234.
- (18) Atik, S.S.; Kwan, C.L.; Singer, L.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5696.
- (19) Florine, K.I. ; Feigenson, G.W. *Biochemistry* **1987**, 26, 2978.
- (20) Luisetti, J.; Möhwald, H.; Galla, H.-J. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 552, 519.
- (21) Bieri, V. G.; Wallach, D. F. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 406, 415.
- (22) Chatelier, R.C.; Rogers, P.J.; Ghiggino, K.P.; Sawyer, W.H. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 776, 75.
- (23) Hope, M.J.; Bally, M.B.; Webb, G.; Cullis, P.R. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 812, 55.
- (24) Eftink, M.R. *In Topics in Fluorescence Spectroscopy* Ed, Lackowicz, J.R.; Plenum Press, N.Y. 1991. p 53.
- (25) Birks, J.B. *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley Interscience , N.Y. 1970.
- (26) Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, N.Y. 1983.
- (27) Trauble, H.; Sackmann, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4499.
- (28) Galla, H.J.; Sackmann, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, 339, 103.
- (29) Keizer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1494.
- (30) Devaux, P.; McConnell, H.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4475.
- (31) Sheats, J.R.; McConnell, H.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **1978**, 75, 4661.
- (32) Schlessinger, J.; Koppel, D.E.; Axelrod, D.; Jacobsen, K.; Webb, W. W.; Elson, E.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **1976**, 73, 2409.

- (33) Wolber, P.K.; Hudson, B.S. *Biophys. J.* 1979, 28, 197.
- (34) Chattopadhyay, A.; London, E. *Biochemistry* 1987, 26, 39.
- (35) Chattopadhyay, A.; McNamee, M.G. *Biochemistry* 1991, 30, 7159.



D12 :  $n=10$   $m=5$

D16 :  $n=14$   $m=1$

Figure 4.1 Molecular structure of D12 and D16 (a) 12-doxylstearic acid (D12) and (b) 16-doxylstearic acid (D16).

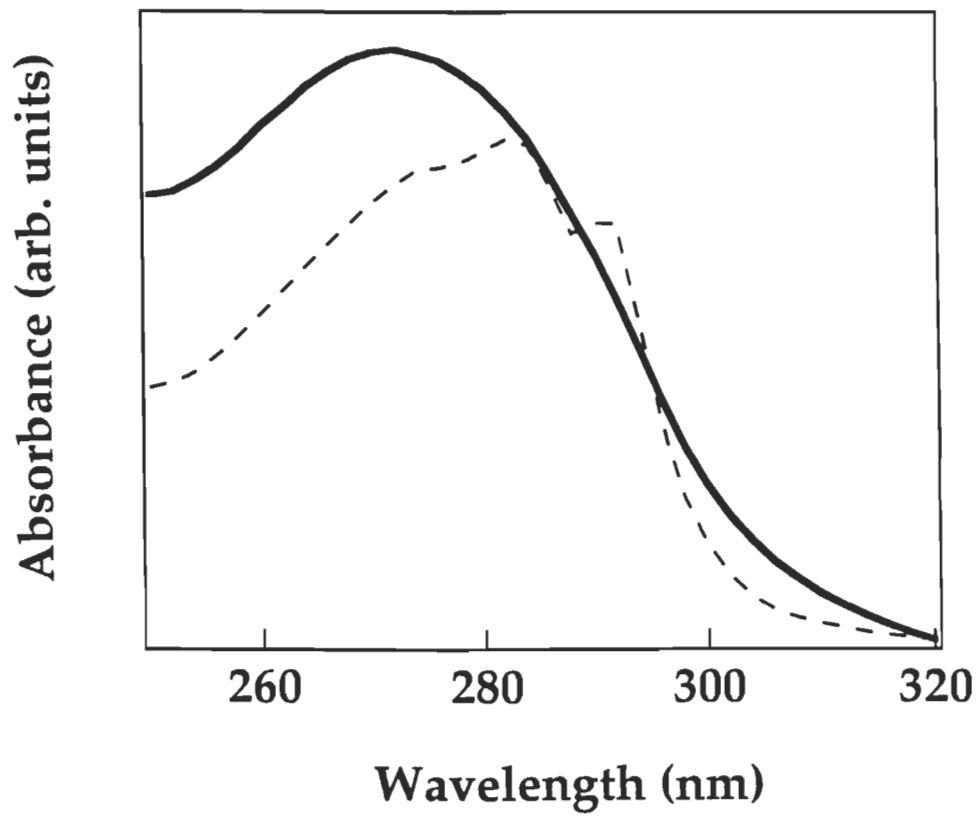


Figure 4.2 Absorption spectrum of the peptide in methanol (broken line) and in POPC vesicles (solid line).

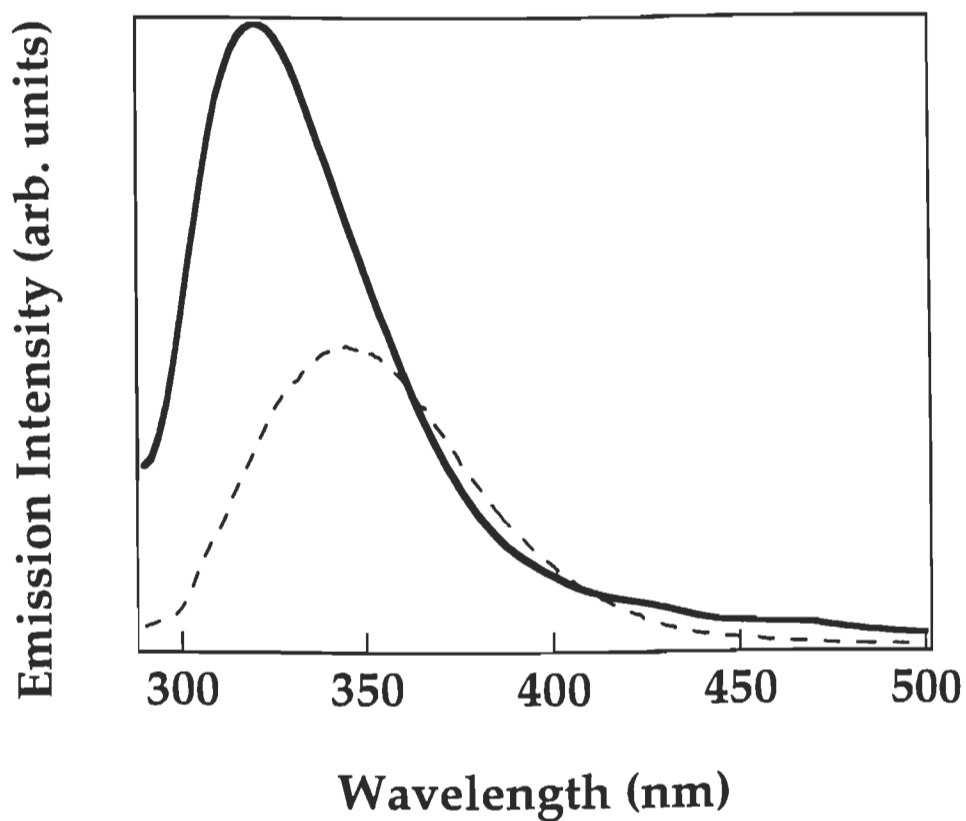


Figure 4.3 Fluorescence spectrum of the peptide in methanol and in POPC vesicles. Fluorescence spectrum of the peptide in methanol shown by broken line and the emission spectrum of the peptide in the POPC vesicles shown by a continuous line.  $\lambda_{\text{ex}} = 275$  nm.

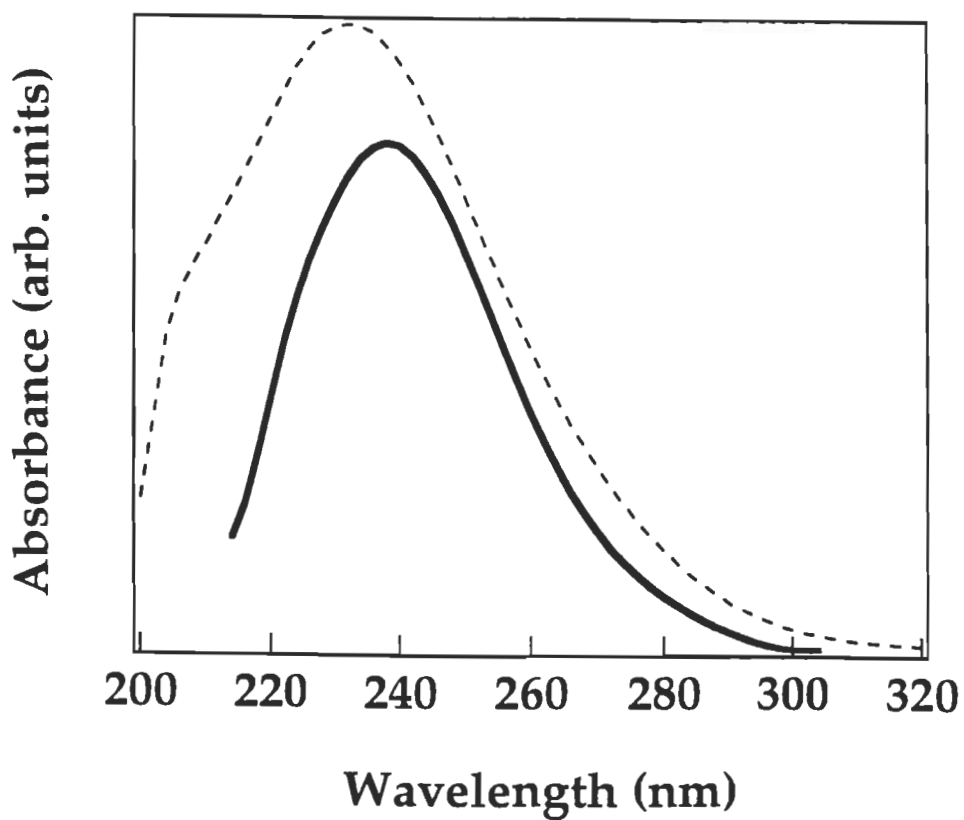


Figure 4.4 Absorption spectrum of D16 in methanol and in POPC vesicles. Absorption spectra of D16 in methanol shown by a broken line and in vesicles shown by a continuous line.

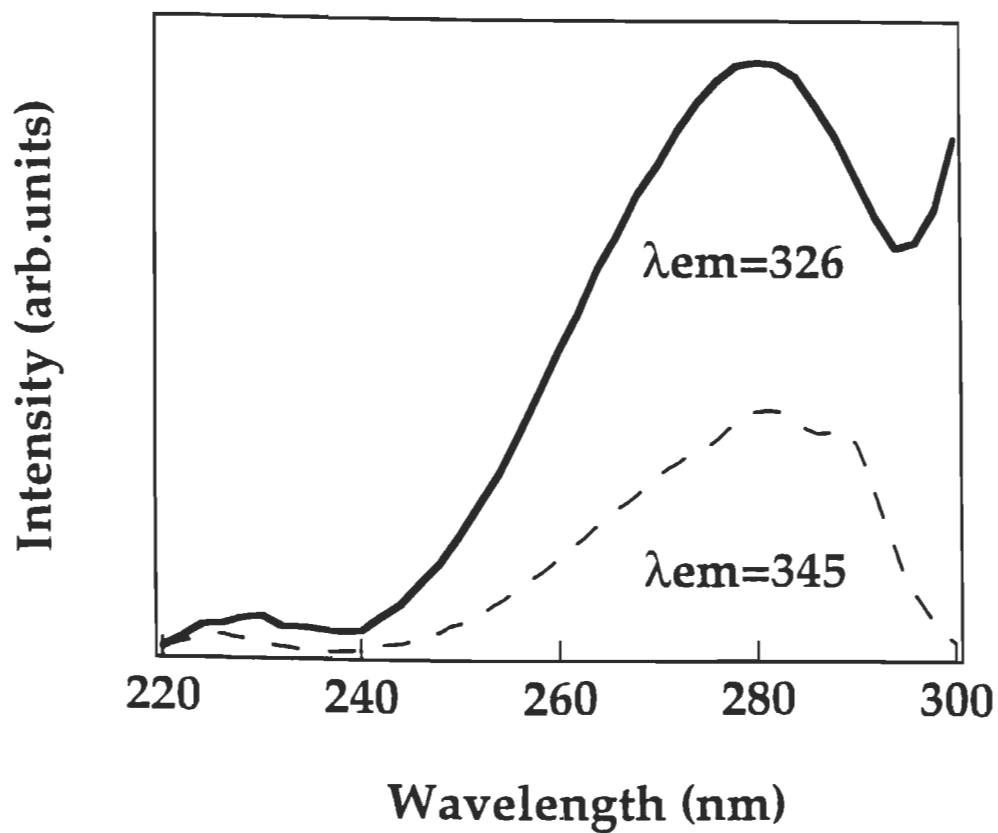


Figure 4.5 Excitation spectrum of the peptide in methanol and in POPC vesicles. Excitation spectrum of the peptide in methanol shown by broken line while the excitation spectrum in POPC vesicles is shown by a continuous line.



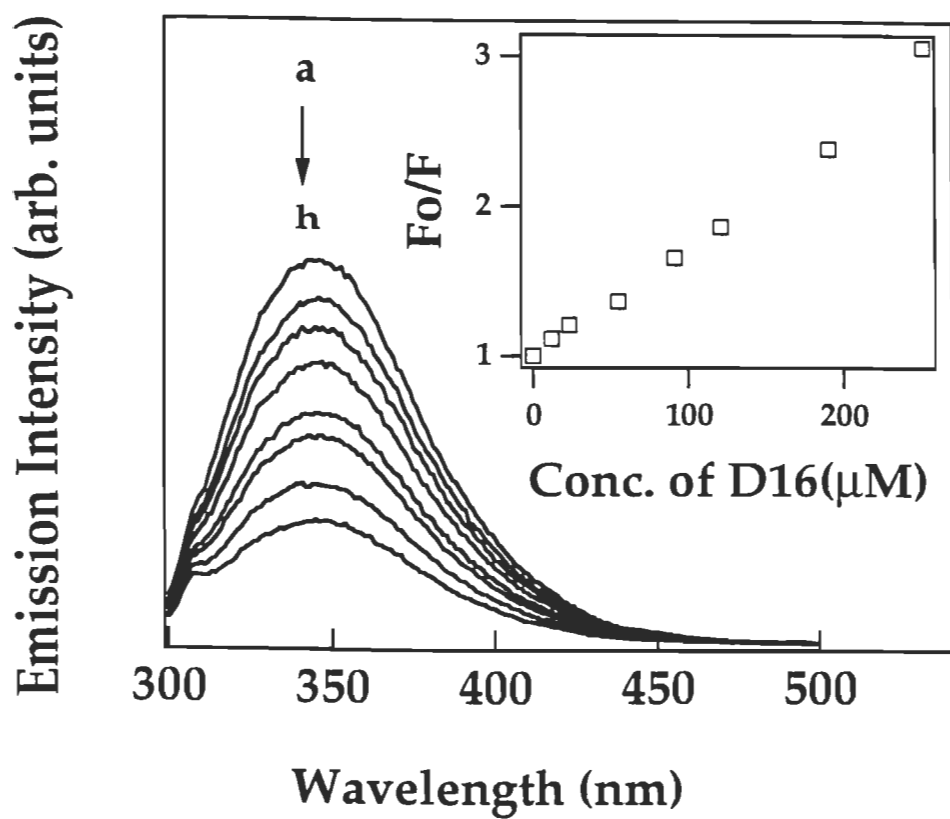


Figure 4.6 Fluorescence quenching of the tryptophan residue of the peptide in methanol at different concentration of D16. Inset shows the Stern-Volmer plot of  $F_0/F$  versus the concentration of D16.  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ .

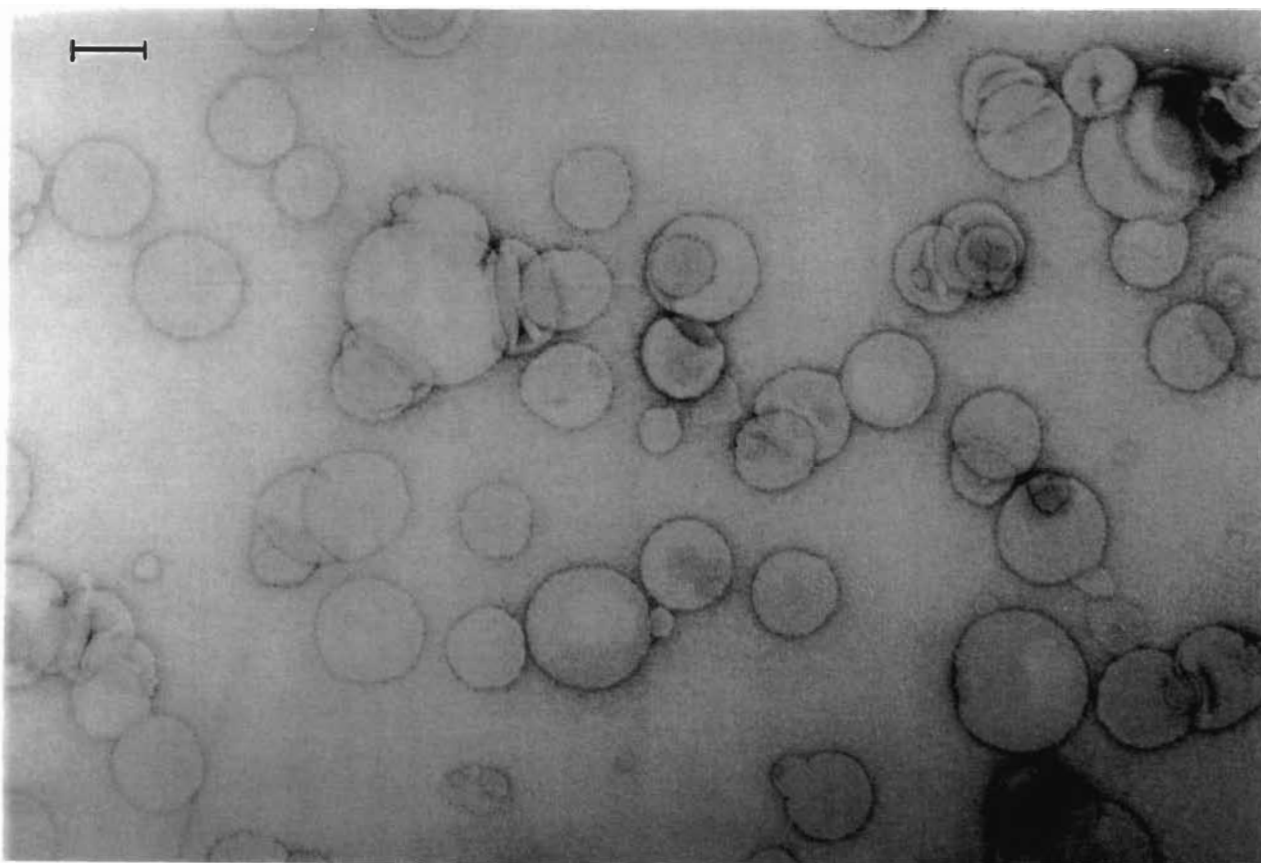


Figure 4.7 Electron micrograph of the vesicles recorded after 7 days. The bar on the figure indicates 120 nm.

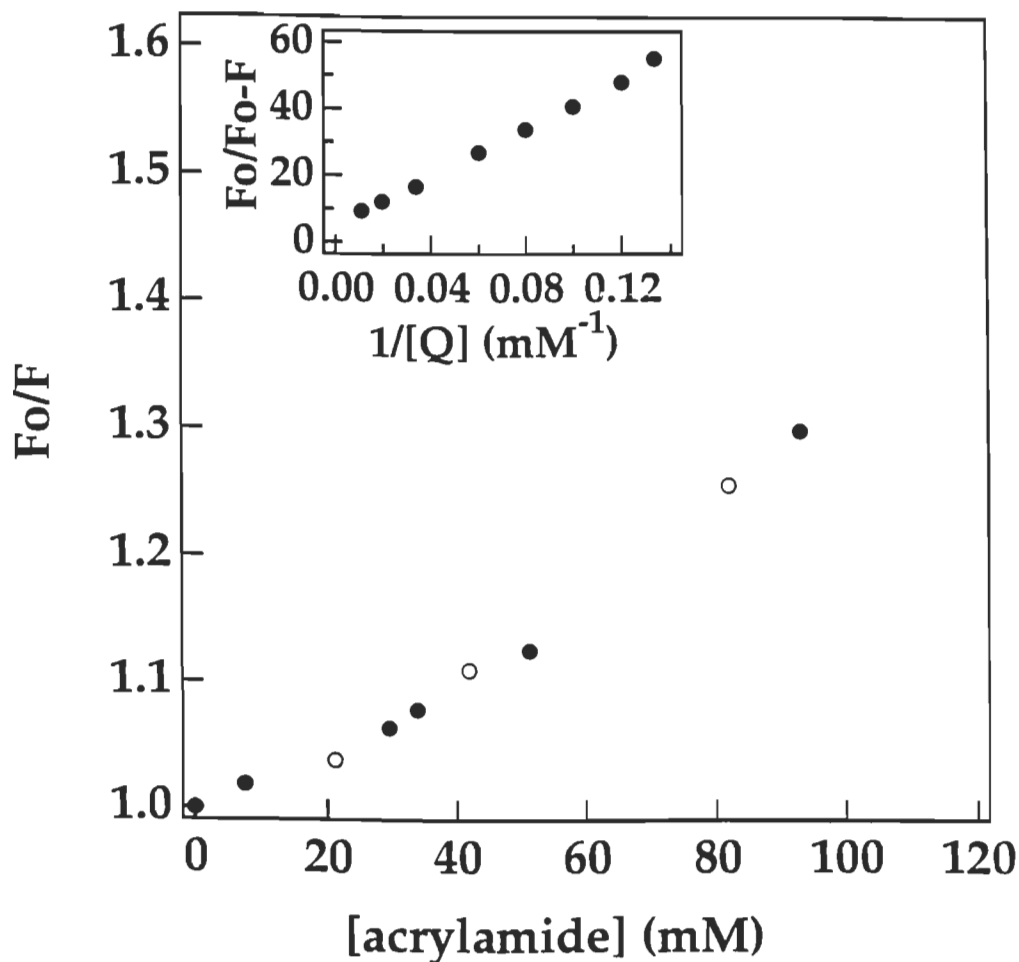


Figure 4.8 Stern Volmer plot of  $F_0/F$  versus the concentration of acrylamide in buffer. Open circles indicate peptide in vesicles (unfiltered) while filled circles indicate vesicles (filtered using gel chromatography). (inset) Plot of  $F_0/F_0-F$  versus the inverse of the concentration of the acrylamide for vesicles filtered using gel chromatography.

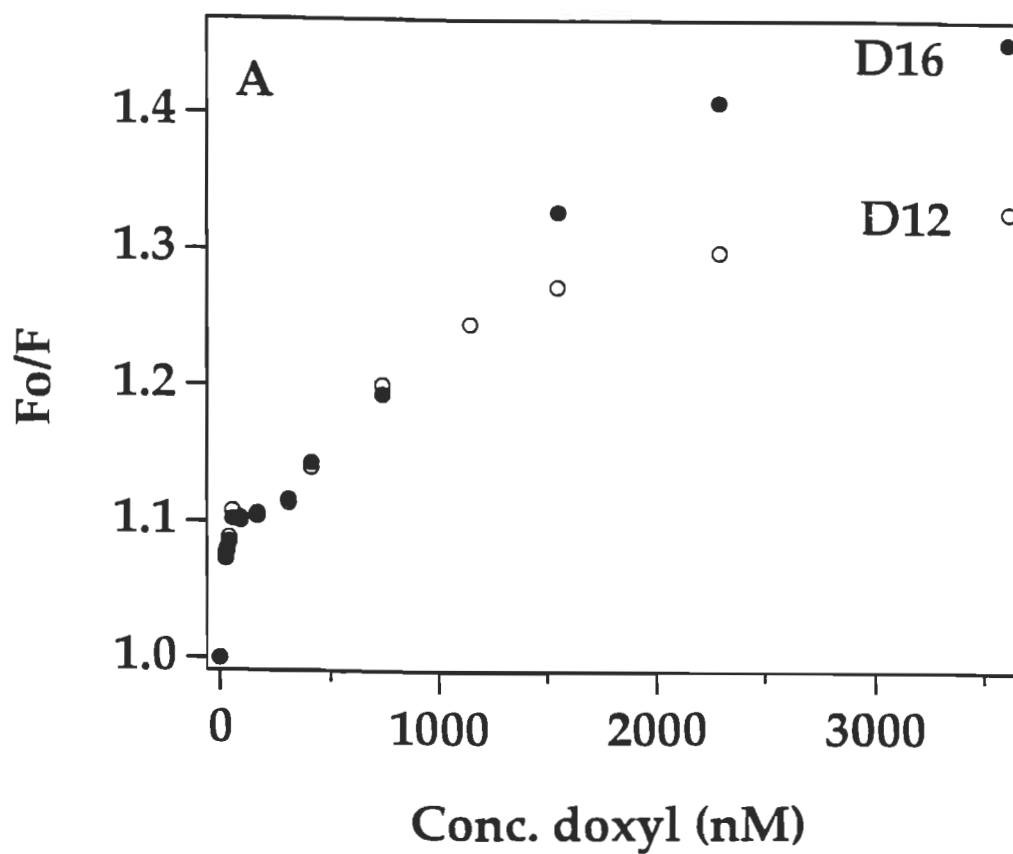


Figure 4.9 (A) Plot of  $F_0/F$  versus the concentration of doxylated fatty acids in vesicles. Filled circles correspond to D16 and D12 to open circles.

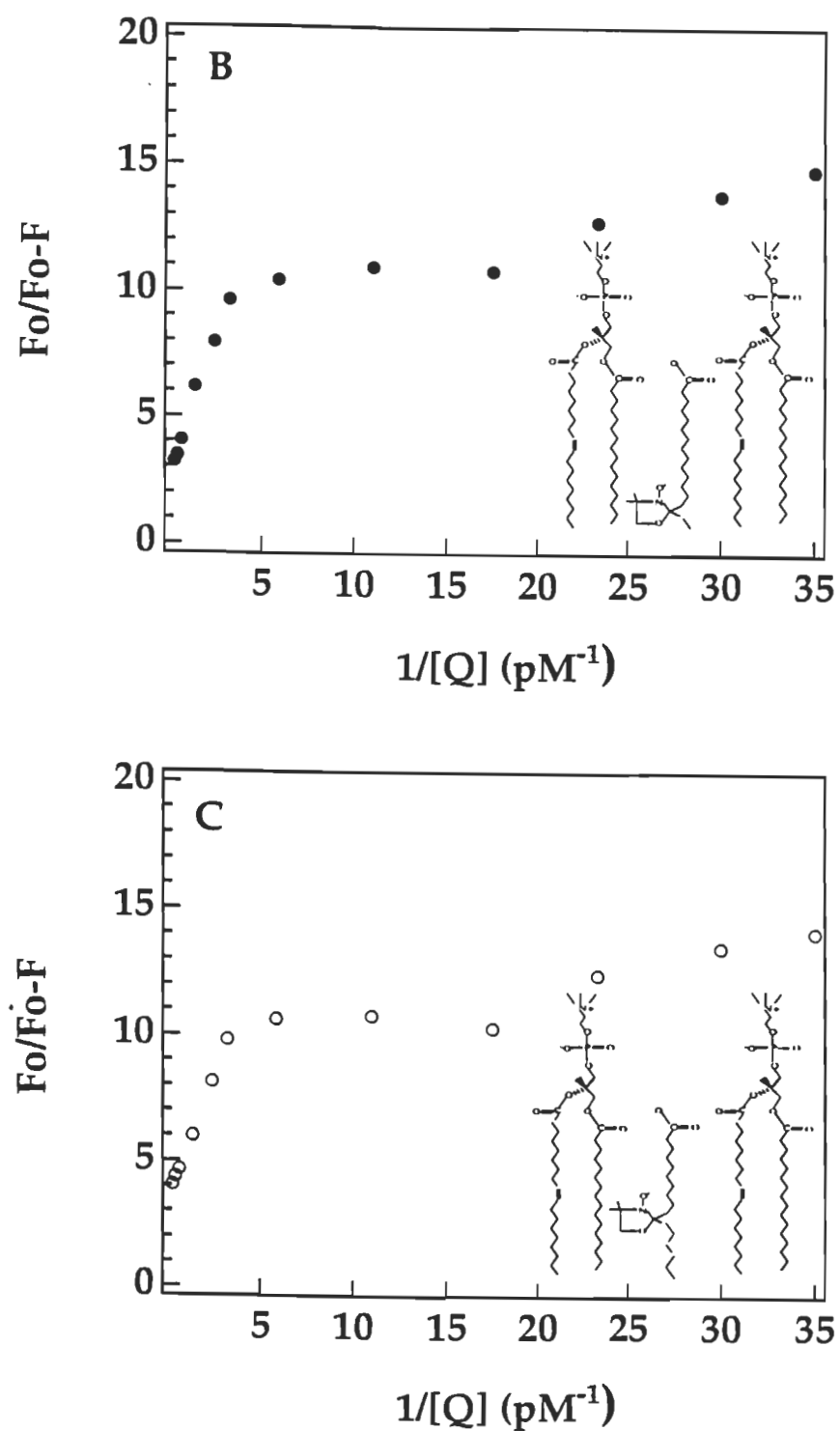


Figure 4.9 Plot of  $F_0/F_{0-F}$  versus the inverse of the concentration of D16 and D12 (B) Plot of  $F_0/F_{0-F}$  versus the inverse of the concentration of D16. (C) Plot of  $F_0/F_{0-F}$  versus the inverse of the concentration of D12.

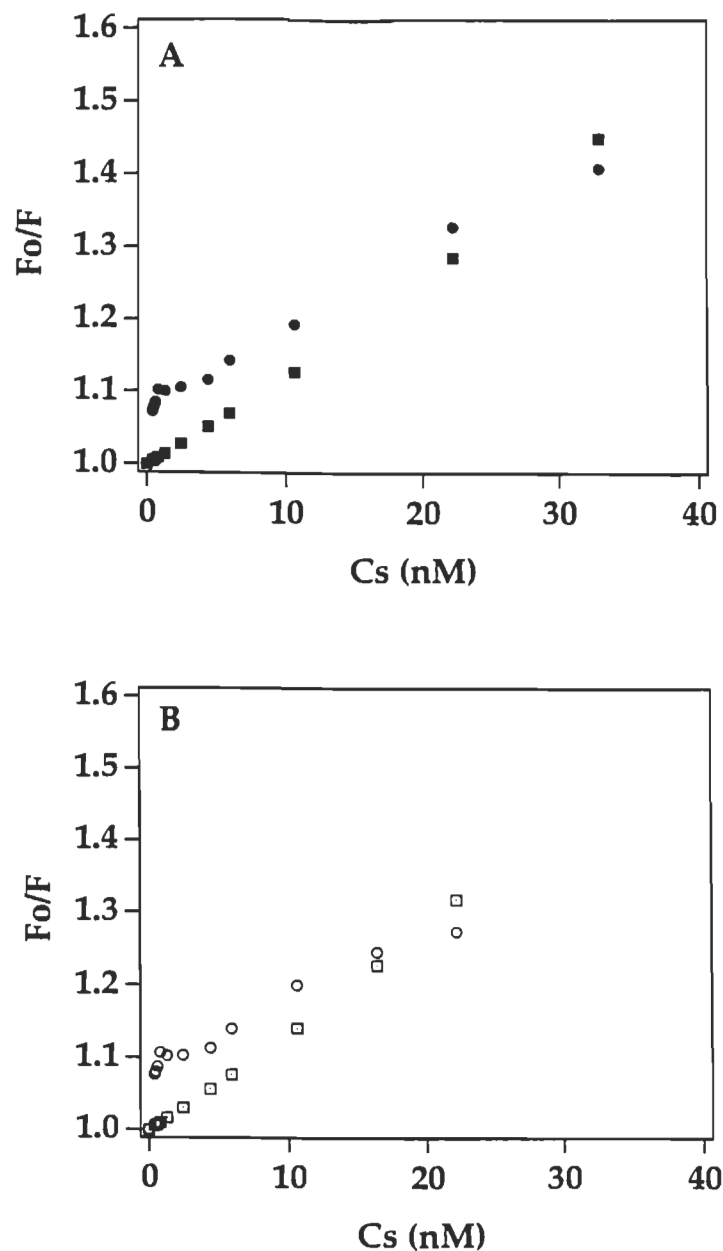


Figure 4.10. Plot of  $F_0/F$  versus  $C_s$  of D16 and D12 in vesicles (A) Plot of  $F_0/F$  versus  $C_s$  of D16 in vesicles. D16 is indicated by filled circles and the computer fit corresponding to equation 5a assuming  $R_c = 9 \text{ \AA}$  and  $z = 4.35 \text{ \AA}$  is shown by filled squares. (B) Plot of  $F_0/F$  versus  $C_s$  of D12 in vesicles. D12 is indicated by open circles and the computer fit of the equation 5a with  $R_c = 9 \text{ \AA}$  and  $z = 5.41$  is shown by open squares.

## CHAPITRE 5

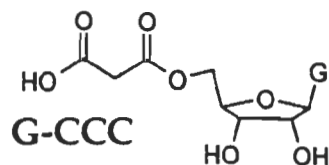
### MESURE DE L'AFFINITÉ ENTRE DES ANALOGUES DU GDP ET LA $Gt\alpha$ ET TENTATIVES DE CRISTALLISATION BIDIMENSIONNELLE DE LA $Gt$

Pour cristalliser la  $Gt$  en deux dimensions, nous avons choisi d'utiliser des lipides de synthèse possédant un bras espaceur au bout duquel est lié un analogue du GDP (voir chapitre 1, schéma 1.12). Ces derniers ont l'avantage, comparativement à un analogue du GTP, de lier l'hétérotrimère  $Gt\alpha\beta\gamma$  en plus de la  $Gt\alpha$  seule. Il serait donc possible de cristalliser la  $Gt\alpha$  ainsi que la forme hétérotrimérique de la  $Gt$  en utilisant un lipide fonctionnalisé avec du GDP. Lorsque nous avons débuté les expériences de cristallisation en janvier 1995, la structure de la  $Gt\alpha$  sous sa forme inactive ( $Gt\alpha$ -GDP) et sa forme active ( $Gt\alpha$ -GTP $\gamma$ S et  $Gt\alpha$ -GDP- $AlF_4$ ) avait été élucidée par diffraction des rayons X (Noel et al., 1993; Lambright et al., 1994; Sondek et al., 1994) mais la structure de la forme hétérotrimérique de la  $Gt$  semblait difficile à déterminer par cette méthode. En effet, le poids moléculaire du complexe  $Gt\alpha\beta\gamma$  est de 83 kDa et la taille moyenne des structures protéiques déterminées à ce jour par diffraction des rayons X se situe aux environs de 50 kDa (Vincent, 1997). Bien que ce 50 kDa ne soit qu'une moyenne et que la structure de protéines de poids moléculaire supérieur ait été déterminée (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory), il y avait

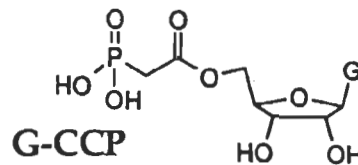
peu d'espoir pour l'imposant trimère  $G\alpha\beta\gamma$  parce que plus le poids moléculaire augmente, plus il devient difficile d'obtenir des cristaux de qualité suffisante pour atteindre une résolution atomique. Il semblait donc opportun de se tourner vers la cristallographie électronique, qui présente certains avantages qui en font une méthode complémentaire de choix. D'abord, il serait possible de comparer la structure de la  $G\alpha$ -GDP cristallisée à l'interface lipide-eau avec celle obtenue par Lambright et al. (1994), où la  $G\alpha$ -GDP a été cristallisée sous l'influence d'interactions protéine-protéine et à laquelle il manque les 25 premiers acides aminés. De plus, cette méthode pourrait nous permettre de cristalliser la forme hétérotrimérique de la Gt ainsi que de plus gros complexes comme la  $R^*$ - $G\alpha$ -GDP. L'objectif de nos travaux était donc de déterminer, dans un premier temps, les conditions de cristallisation de la  $G\alpha$ -GDP et de la  $G\alpha\beta\gamma$  en présence de lipides fonctionnalisés.

Pour obtenir un lipide fonctionnalisé, des analogues du GDP ont été synthétisés par Stéphane Vincent sous la tutelle du Dr Luc Lebeau de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. Les analogues ont été conçus en vue d'être liés à un bras espaceur qui sera ensuite branché à un lipide. Les informations relatives à la synthèse des analogues sont décrites dans la thèse de Stéphane Vincent (Vincent, 1997). Donc, deux catégories d'analogues ont été synthétisés, soit avec et sans bras espaceur. Les schémas 5.1 et 5.2 en illustrent la structure. D'abord, on a dû faire des mesures pour vérifier si les ligands synthétisés, qui étaient tous des analogues du GDP, pouvaient être reconnus par la protéine à cristalliser. Il nous a également fallu nous assurer que le bras espaceur devant relier le ligand au lipide ne nuisait pas à la reconnaissance du ligand par la protéine à cristalliser. Deux catégories d'analogues de synthèse ont

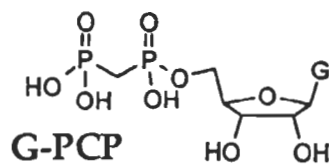




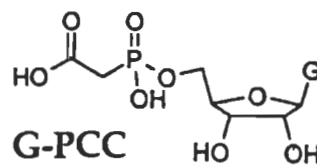
9-(5'-O-(malonyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-  
guanine



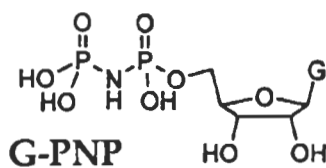
9-(5'-O-(phosphono-acétyl)- $\beta$ -D-  
ribofuranosyl)-guanine



9-(5'-O-(méthylène-biphosphonate)- $\beta$ -  
D-ribofuranosyl)-guanine



9-(5'-O((carboxyméthyl)  
hydroxyphosphinyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-  
guanine



9-(5'-O(imido-diphosphate)-  
 $\beta$ -D-ribofuranosyl)-guanine

Schéma 5.1: Analogues du GDP sans bras espaceur



donc été testés, les analogues ne possédant pas de bras espaceur, puis ceux en possédant un.

En vue d'utiliser un lipide fonctionnalisé capable de lier la  $Gt\alpha$ , il nous a d'abord fallu mettre au point un test d'affinité pour évaluer la reconnaissance des analogues de synthèse par la  $Gt\alpha$ . Il s'agit d'un test de compétition entre les analogues de synthèse du GDP et le GDP tritié. La procédure visant à mesurer l'affinité des analogues de synthèse s'inspire des articles publiés par les groupes de Stryer et de Yamazaki (Yamanaka et al., 1985; Yamanaka et al., 1986; Yamazaki et al., 1987). Toutefois, contrairement à ces groupes, nous avons utilisé des membranes discales enrichies en  $Gt$ , en  $R$  et en PDE (ME-GRP) plutôt que de la  $Gt\alpha$  purifiée et des membranes discales lavées à l'urée (MLU) qui ne contiennent plus que la rhodopsine. Il faut aussi préciser que Yamanaka et al. (1986) et Yamazaki et al. (1987) ont étudié des analogues du GTP tandis que Yamanaka et al. (1985) ont travaillé avec des analogues du GDP. L'utilisation des ME-GRP qui contiennent les éléments essentiels au test d'affinité soit la  $R$  et la  $Gt$ , avait l'avantage de nous éviter les étapes longues et fastidieuses de la purification de la  $Gt\alpha$ .

### **5.1 Préparation des membranes discales enrichies en $Gt\alpha$ , en $R$ et en PDE**

Les SEB ont été obtenus selon la méthode décrite par Salesse et al. (1984). Brièvement, après la dissection des yeux de boeuf à l'obscurité, les rétines sont recueillies sur la glace. Ces dernières sont ensuite vortexées dans un tampon isotonique (100 mM Hepes, 50 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 0.15 mM  $CaCl_2$ , 5 mM

DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, pH 7.4) pour briser le cil connectif qui unit les SEB à la rétine. On ajoute alors suffisamment de sucrose 80 % pour obtenir une concentration finale de 40 % en sucrose. Ce mélange est centrifugé à 15 600 g avec un rotor à godets oscillants pendant une heure. Les SEB flottent alors à la surface de la solution de 40 % en sucrose. On lave ensuite les SEB par centrifugation pour éliminer le surplus de sucrose. Les SEB sont ensuite purifiés par centrifugation sur un gradient de concentration de sucrose à 100 000 g pendant au moins quatre heures. On recueille la bande des SEB. Ces derniers sont ensuite lavés deux fois avec trois volumes de tampon isotonique.

Par la suite, on remet en suspension les SEB à une concentration de 2 mM en rhodopsine. On expulse ensuite les SEB à l'extérieur d'une seringue munie d'une aiguille de taille 21 afin de faire éclater la membrane plasmique des SEB pour produire une suspension de disques ou de membranes discales vésiculées en solution. Pour éliminer les protéines solubles comme la rhodopsine kinase et l'arrestine, on fait ensuite deux lavages isotoniques dans le tampon A (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,01 mM PMSF) en centrifugeant à 13 000 g avec une centrifugeuse de marque Sorvall et un rotor SS-34. Dans ces conditions isotoniques, la Gt et la PDE restent associées aux membranes discales en plus de la rhodopsine qui est une protéine transmembranaire. On peut alors qualifier ces membranes de ME-GRP. Les culots de ME-GRP sont homogénéisés et leur contenu en rhodopsine ainsi que leur indice de pureté sont déterminés, tel que décrit par Salesse et al. (1984) qui ont utilisé une procédure modifiée de Miljanich (1978). La quantité de rhodopsine est évaluée en mesurant la différence d'absorbance à 500 nm avant et après photolyse. L'indice de pureté des SEB est évalué par le rapport entre

l'absorbance des protéines à 280 nm et l'absorbance de la rhodopsine à 500 nm ( $280/\Delta 500\text{nm}$ ). Des rapports de 2,0 à 2,5 sont généralement obtenus, ce qui correspond à des membranes de très grande pureté. Le contenu en rhodopsine a ensuite été utilisé pour estimer la quantité de Gt puisque leur proportion est bien connue (Chabre, 1985). En effet, il y a une seule Gt pour 10 molécules de rhodopsine.

## 5.2 Description du test d'affinité entre la Gt et les analogues du GDP

Afin d'effectuer le test d'affinité, les ME-GRP sont suspendues dans le tampon B (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7,4) de manière à avoir une concentration en rhodopsine de 8  $\mu\text{M}$ . Une concentration de 2,0  $\mu\text{M}$  en GDP tritié (GDP-<sup>3</sup>H) est ensuite ajoutée pour saturer les sites de liaison de la Gt $\alpha$ . On incube pendant deux heures à la lumière puis on ajoute alors un volume équivalent d'analogue du GDP à des concentrations variant de 80 nM à 4 mM. Cet analogue va compétitionner avec le GDP-<sup>3</sup>H pour le site actif de la Gt $\alpha$ . L'incubation se fait à 20 °C pendant trois heures. Ensuite, un volume fixe d'échantillon est prélevé et déposé sur un filtre de nitrocellulose (Millipore Corp.) dans un appareil à filtration millipore (Millipore Corp.). Le filtre de nitrocellulose a la propriété d'adsorber la Gt à sa surface (Yamazaki et al., 1987). On rince ensuite le filtre trois fois avec le tampon C (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,4) afin d'éliminer le GDP-<sup>3</sup>H qui n'est pas lié à la Gt. Ce filtre est ensuite prélevé et déposé dans une fiole à scintillation contenant 3 ml de liquide à scintillation (Safety-Solve; Research Products International Corp.). Après environ une heure, la

nitrocellulose se dissout au contact du liquide à scintillation et on peut procéder au comptage de la radioactivité. Cette méthode permet de quantifier le GDP-<sup>3</sup>H se trouvant dans le site actif de la Gt. On peut ainsi tracer des courbes de la quantité de GDP-<sup>3</sup>H en fonction de la concentration en analogue du GDP. Si l'analogue est reconnu, on devrait observer une décroissance de la radioactivité car l'analogue testé aura remplacé le GDP-<sup>3</sup>H lié à Gt $\alpha$ . La radioactivité est mesurée en DPM puis convertie en picomole de GDP-<sup>3</sup>H grâce à l'étalonnage de deux échantillons de concentration connue en GDP-<sup>3</sup>H. Pour valider ce test, on utilise le GDP $\beta$ S comme standard puisque son affinité pour la Gt $\alpha$  est bien connue (Yamanaka et al., 1985). L'affinité relative des différents analogues est représentée par des valeurs d'IC<sub>50</sub> qui indiquent la quantité d'analogue nécessaire pour déloger la moitié des molécules de GDP-<sup>3</sup>H qui sont présentes dans le site catalytique des Gt $\alpha$ .

### 5.3 Analogues du GDP étudiés par d'autres auteurs

Les seuls analogues du GDP qui ont été testés avec la transducine sont, à notre connaissance, les stéréoisomères du GDP $\alpha$ S et du GDP $\beta$ S présentés au schéma 5.3. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de ces analogues telles que publiées par Yamanaka et al. (1985) sont présentées au tableau 5.1. L'ordre de reconnaissance de ces trois analogues est le suivant: (Sp)-GDP $\alpha$ S > GDP > (Rp)-GDP $\alpha$ S > GDP $\beta$ S (ce dernier est 2,5 fois moins bien reconnu que le GDP). Parce que le GDP $\beta$ S est stable en solution, nous avons décidé de l'utiliser comme contrôle pour les tests d'affinité. Par contre, ces analogues soufrés sont lentement métabolisés par l'enzyme (Eckstein, 1983), ce qui les rend moins intéressants pour la cristallisation, malgré leur très bonne affinité pour la Gt $\alpha$ .

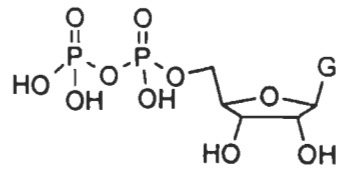
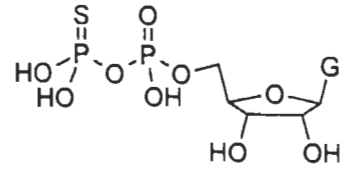
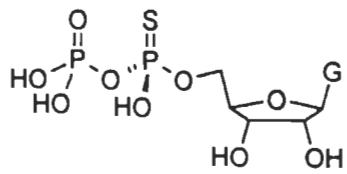
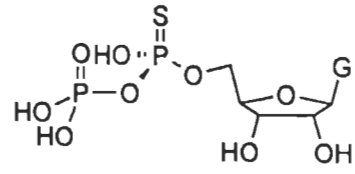
**GDP****GDPβS****(Rp)-GDP $\alpha$ S****(Sp)-GDP $\alpha$ S**

Schéma 5.3: Structure du GDP et de trois analogues soufrés du GDP

**Tableau 5.1: Valeurs d'IC<sub>50</sub> d'analogues du GDP de la littérature**

Analogues	Valeur de IC <sub>50</sub>
(Sp)-GDP $\alpha$ S	0,3 $\mu$ M
GDP	1,2 $\mu$ M
(Rp)-GDP $\alpha$ S	2,0 $\mu$ M
GDP $\beta$ S	3,0 $\mu$ M

Ces valeurs proviennent de l'article de Yamanaka et al. (1985)

À notre connaissance, aucune étude systématique n'a été faite sur des analogues de synthèse dont les phosphates ont été remplacés par des carbonyles ou dont l'oxygène central du pyrophosphate (P $\alpha$ -O-P $\beta$ ) a été remplacé par un groupement méthylène ou imido.

#### 5.4 Mesure de l'affinité du G-PCC, G-PCP, G-CCP, G-CCC et G-PNP pour la G $\alpha$

Les résultats des tests d'affinité des analogues G-PCC, G-PCP et G-CCP sont présentés à la figure 5.1A et ceux du G-CCC et du G-PNP à la figure 5.1B. Rappelons que la structure de ces analogues est illustrée au schéma 5.1. L'ordonnée des figures 5.1 A et B indique la quantité de GDP-<sup>3</sup>H liée à la G $\alpha$  et l'abscisse indique le logarithme de la concentration en analogue utilisée pour déloger ce GDP-<sup>3</sup>H du site actif de la G $\alpha$ . On remarque qu'à l'exception du G-PNP, aucun des autres analogues ne montre une affinité comparable à celle du GDP $\beta$ S.



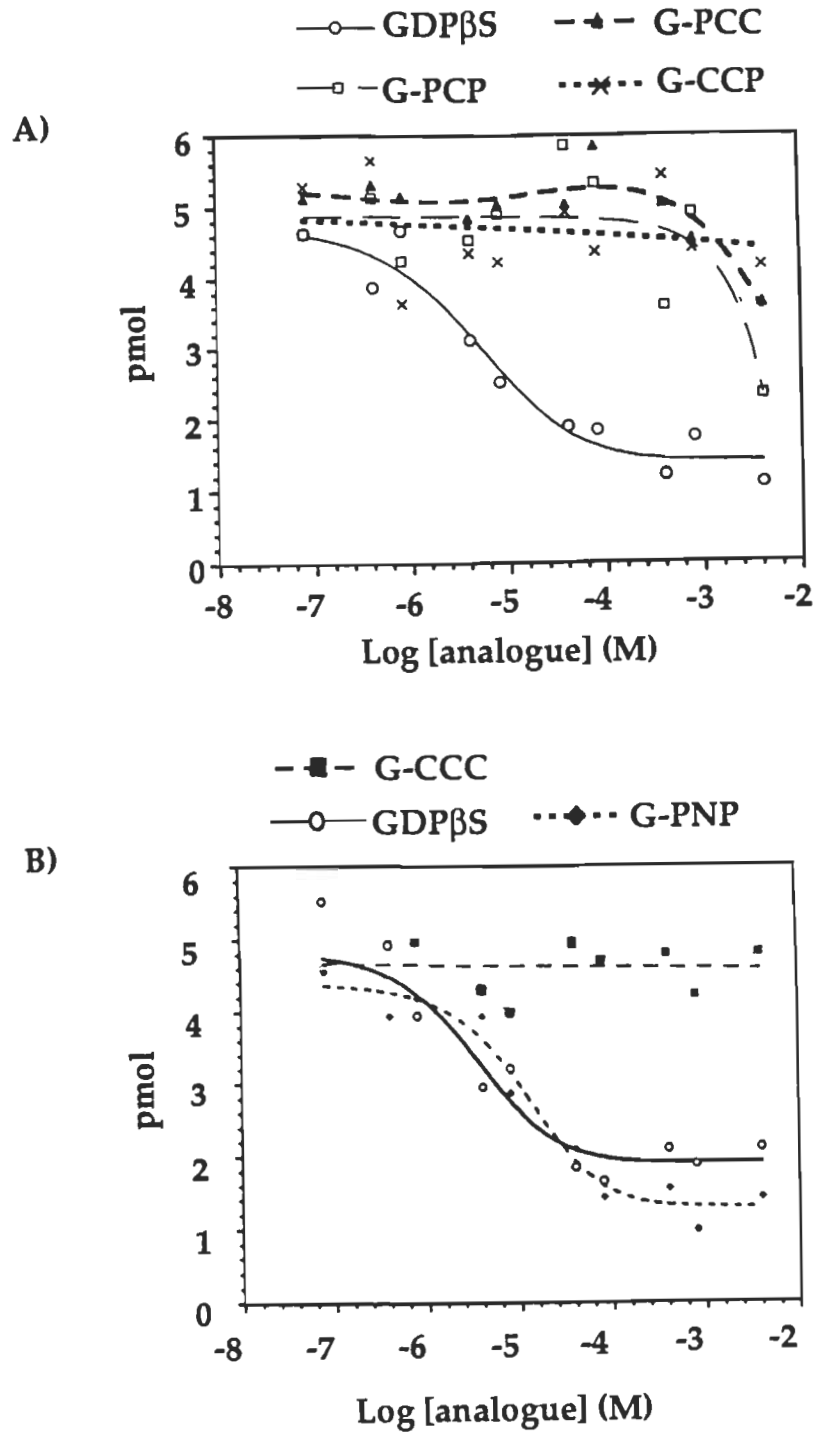


Figure 5.1: Affinité des analogues du GDP sans bras espaceur pour la  $G\alpha$ . A) Tests d'affinité des analogues G-PCC, G-PCP et G-CCP, B) Tests d'affinité des analogues G-CCC et G-PNP.

Le remplacement de l'oxygène central du pyrophosphate du GDP ( $P^{\alpha}\text{-O-}P^{\beta}$ ) par un groupement méthylène nous donne une molécule de G-PCP dont la structure est illustrée au schéma 5.1. Comme nous pouvons le constater à la figure 1, ce remplacement entraîne une perte de reconnaissance de cet analogue par la  $Gt\alpha$ . Bien que le groupement méthylène rende le composé plus stable (Vincent, 1997), les perturbations électroniques et géométriques entraînent une perte importante de l'affinité du G-PCP pour la  $Gt\alpha$ . Ce même phénomène a déjà été observé pour la forme triphosphate de la guanosine G-PPCP (Loewus et Eckstein, 1983). En effet, ces auteurs ont montré que le remplacement de l'oxygène entre les atomes de phosphore  $\beta$  et  $\gamma$  par un groupement méthylène atténue grandement la reconnaissance du G-PPCP par la  $Gt\alpha$ . Il semble que le même phénomène se produise pour la forme diphosphate de la guanosine.

Si, en plus de cette substitution de l'oxygène central ( $P^{\alpha}\text{-O-}P^{\beta}$ ) par un méthylène, un ou deux phosphates sont remplacés par un ou deux groupements carbonyles, comme c'est le cas des molécules G-PCC, G-CCP et G-CCC (voir schéma 5.1), l'affinité du ligand pour la  $Gt\alpha$  est alors définitivement compromise. Toutefois, puisque déjà nous avons une perte considérable d'affinité lorsque l'oxygène a été remplacé par un méthylène, on ne peut conclure directement quant à l'effet de la présence de groupements méthylènes en position  $\alpha$  ou  $\beta$  des analogues testés sur leur affinité pour la  $Gt\alpha$ .

Par contre, comme mentionné ci-dessous, le remplacement de l'oxygène central par un atome d'azote permet une bonne reconnaissance de cet analogue par la  $Gt\alpha$  tel que montré à la figure 5.1. Le tableau 5.2, qui est tiré de la thèse de

Stéphane Vincent (1997), montre que du point de vue géométrique, l'imidodiphosphate (P-N-P) est plus proche du pyrophosphate (P-O-P) que du phosphonate (P-C-P). Les valeurs des angles P-X-P et des distances P-P apparaissant dans ce tableau ont été déterminées par radiocristallographie (Larsen et al., 1969). De plus, les fonctions acides des P-N-P ont des pKa plus proches de celles des pyrophosphates (Reynolds et al., 1983; Gerlt et al., 1983). Par conséquent, c'est l'analogue P-N-P qui a été choisi pour porter un bras espaceur en vue d'être par la suite branché à un lipide.

**Tableau 5.2: Géométrie du P-O-P, du P-N-P et du P-C-P**

	P-O-P	P-N-P	P-C-P
Angles P-X-P	129°	127°	117°
Distances P-P	3,05 Å	3,01 Å	2,94 Å

### 5.5 Analogues du GDP portant un bras espaceur

Le schéma 5.4 montre les sites potentiels de fonctionnalisation du G-PNP. Il est possible de développer des analogues portant un bras espaceur lié à la guanine ou au sucre ou encore à l'enchaînement imidophosphate. Il y a trois sites possibles de fonctionnalisation sur la guanine soit en O<sup>6</sup>, en N<sup>1</sup> ou sur l'amine exocyclique en N<sup>2</sup> et deux sites potentiels sur le sucre soit en 2' ou en 3'. On peut aussi fonctionnaliser sur l'un des deux phosphates ou sur l'azote central de l'enchaînement diphosphate. Bien que l'analyse de la structure obtenue par l'équipe de Hamm (Noel et al., 1993) ait permis de suggérer qu'une fonctionnalisation sur la guanine semblait la plus prometteuse, nous allons

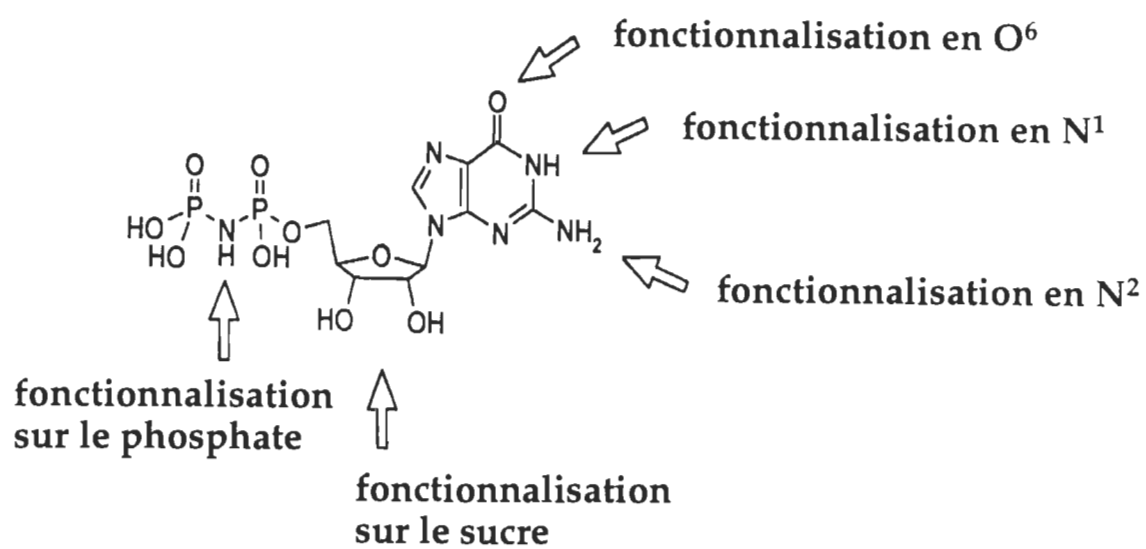


Schéma 5.4: Sites potentiels de fonctionnalisation du G-PNP

dans un premier temps prendre connaissance des résultats d'autres auteurs qui ont étudié l'affinité d'analogues fonctionnalisés du GTP et du GDP pour la  $G\alpha$ .

### 5.5.1 Analogues du GTP et du GDP étudiés par d'autres auteurs

Voyons d'abord les fonctionnalisations qui ont été faites sur l'enchaînement di- ou triphosphate et testés sur la  $G\alpha$ . Différentes équipes ont testé des analogues du GTP fonctionnalisés sur le phosphate  $\gamma$  (voir schéma 5.5). Les analogues  $GTP\gamma F$  et  $BuGTPC6$  se caractérisent par l'absence de l'une des deux charges négatives sur le phosphate  $\gamma$ , ce qui entraîne une importante perte d'affinité pour la  $G\alpha$  (Yamanaka et al., 1986; Kelleher et al., 1986). Par contre, le AA-GTP qui compense l'absence de la charge négative par une interaction hydrophobe est capable de se lier à la  $G\alpha$  (Hingorani et al., 1989). À notre connaissance, il n'existe pas, dans la littérature, de données du même type pour des analogues du GDP. Il faut cependant préciser que les analogues du GTP ont une affinité plus grande que ceux du GDP pour la  $G\alpha$ . Cependant, les valeurs de constante de dissociation ( $K_d$ ) publiées varient beaucoup en fonction de la technique de mesure utilisée. Ainsi, pour le GTP, les valeurs de  $K_d$  varient entre 0,05 et 300 nM pour le GTP et de 0,5 à 10  $\mu$ M pour le GDP (Kelleher et al., 1986; Malinski et al., 1996).

En ce qui a trait aux fonctionnalisations sur le sucre, différents composés portant un groupement antranoylé du type mGTP et ses analogues non

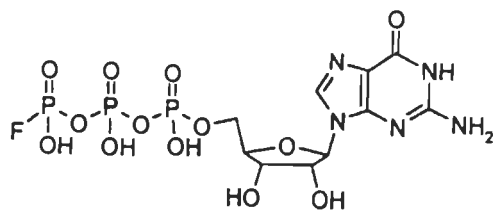
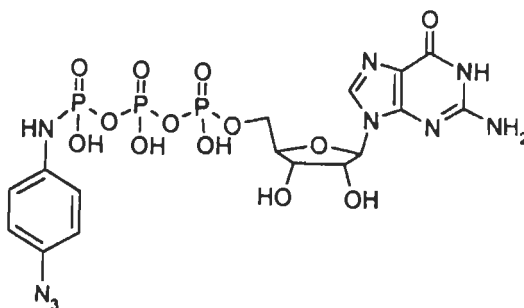
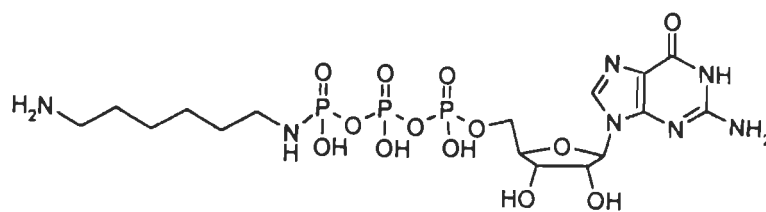
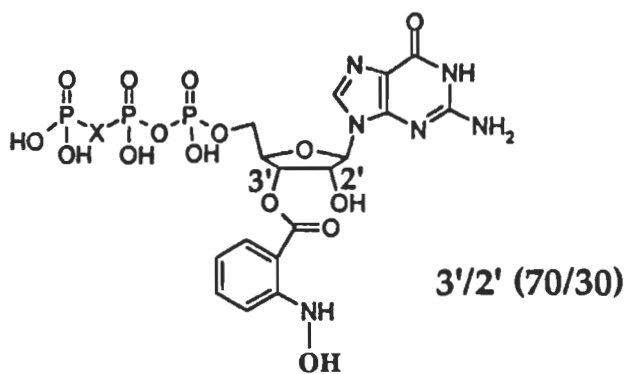
**GTP $\gamma$ F****AA-GTP****BuGTPC6**

Schéma 5.5: Analogues fonctionnalisés sur le phosphate gamma

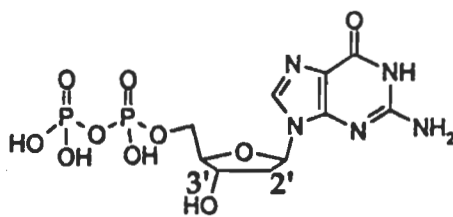
hydrolysables mG-PPNP et mG-PPCP sont illustrés au schéma 5.6. Ces analogues ne sont pas reconnus par la  $Gt\alpha$  (Zera et al., 1996). Ceci peut être dû à un problème d'encombrement stérique ou de la difficulté à établir des liens hydrogène. Toutefois, ils sont reconnus par une autre protéine G hétérotrimérique, la  $G_o$ , et par une petite protéine G de la famille Ras, la p21 (Neal et al., 1990; Remmers et al., 1994; Remmers et Neubig, 1996). Ces résultats suggèrent que le site actif de la Gt est plus restrictif que celui d'autres protéines G.

Il a aussi été démontré que le 2'-désoxy-GDP (dGDP), illustré au schéma 5.6, est 15 fois moins bien reconnu que le GDP (Hingorani et al., 1989). Cela indique que l'alcool en position 2' du ribose est important dans la liaison du GDP avec la  $Gt\alpha$ . De plus, avec la p21, des analogues fonctionnalisés en 3' sont six fois mieux reconnus que ceux en 2' (Remmers et Neubig, 1996). Il sera donc préférable de greffer un bras espaceur en position 3'.

Concernant la fonctionnalisation sur la guanine, le seul analogue reconnu par la transducine qui soit décrit dans la littérature porte un groupement n-butyl phényl (BuGDP) sur l'amine exocyclique (Hingorani et al. 1989). Cet analogue est un diphosphate (voir schéma 5.7). Ce résultat confirme qu'une fonctionnalisation du G-PNP en position  $N^2$  aurait de bonnes chances de permettre à cet analogue d'être reconnu par la  $Gt\alpha$ .



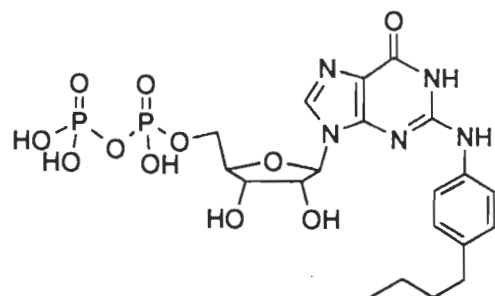
**x = 0 : mGTP**  
**x = NH : mG-PPNP**  
**x = CH<sub>2</sub> : mG-PPCP**



**dGDP**

Schéma 5.6: Analogues fonctionnalisés sur le sucre





**BuGDP**

Schéma 5.7: Analogue fonctionnalisé sur la guanine

## 5.6 Mesure de l'affinité des analogues du GDP portant un bras espaceur pour la G $\alpha$

Le schéma 5.2 montre la structure des analogues étudiés portant un bras espaceur et dont les résultats des tests d'affinité sont présentés à la figure 5.2. Les résultats du G-PNPN1a n'y sont pas représentés car ils sont similaires à ceux du G-PNPN1b. De plus, le G-PNP3' a/b est un mélange de 2 régioisomères 3'/2' dans des proportions de 70/30. Les résultats montrent que ces analogues sont faiblement reconnus par la G $\alpha$  quelle que soit la position du bras d'ancrage. Cela peut être dû au fait que le bras espaceur perturbe la reconnaissance de l'analogue par la G $\alpha$ , soit pour des raisons stériques, soit en empêchant la formation des liaisons hydrogène ou soit qu'il impose une forme tautomère défavorable.

Il serait intéressant de réussir à séparer les deux régioisomères du GPNP3' a/b (70/30) pour mesurer l'affinité du G-PNP3' seulement. Il serait également intéressant de fonctionnaliser le G-PNP sur l'amine exocyclique car une fonctionnalisation d'un autre analogue à cette position a déjà permis la reconnaissance d'un tel analogue par la Gt (Hingorani et al., 1989). De plus, les fonctionnalisations en O6 et sur le phosphate restent à être exploitées. Ces analogues fonctionnalisés ne sont pas disponibles en ce moment. Ces travaux seront poursuivis au laboratoire du Dr Luc Lebeau de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. La poursuite de ces travaux nécessitera également l'amélioration du test d'affinité (voir sections 5.9 et 6.4).

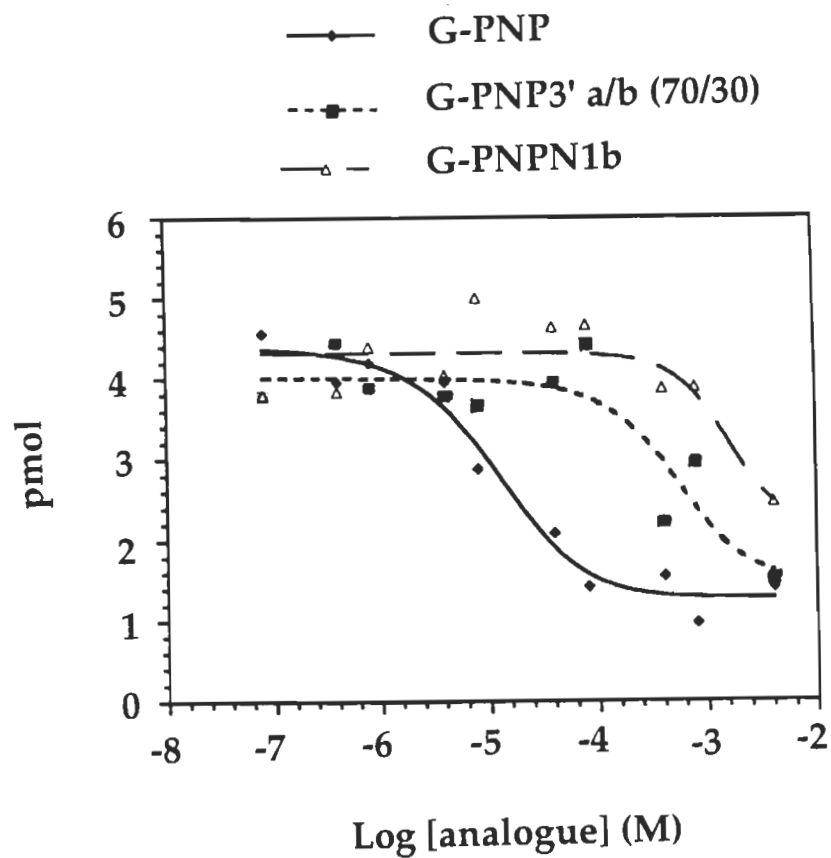


Figure 5.2: Affinité des analogues du GDP avec un bras espaceur pour la  $Gt\alpha$ .  
Tests d'affinité des analogues G-PNP3' a/b (70/30) et G-PNP1b

Enfin, n'ayant pas la possibilité d'utiliser des lipides fonctionnalisés reconnus par la Gt, nous avons tenté de cristalliser la Gt $\alpha$  à l'aide de lipides non spécifiques. L'utilisation de ces lipides pour lier et cristalliser la Gt sera discutée à la section 5.9.

### 5.7 Améliorations possibles du test d'affinité relative

Il est nécessaire de mentionner que l'écart type n'est pas illustré aux figures 5.1 et 5.2 dans un but de clarté. Ces mesures ont été faites en triplicata et l'écart-type est de 1 pmole pour chacun des points représentés sur les courbes. Cela représente 20 % d'erreur sur la mesure. La seule explication que nous avons trouvée pour interpréter cette grande variation est l'inhomogénéité du matériel biologique utilisé. En effet, on pouvait remarquer une précipitation des membranes lorsque l'échantillon reposait sur le comptoir. Les ME-GRP auraient donc tendance à s'agréger dans le tampon. Même en portant une attention particulière à ce problème, c'est-à-dire en les homogénéisant à toutes les étapes des manipulations, on ne parvient pas à réduire l'écart-type à moins d'une picomole. Si les quantités de ces membranes (ME-GRP) qui sont déposées dans les éprouvettes varient d'un tube à l'autre, cela entraîne nécessairement une variation de la quantité de Gt présente dans ces tubes. De plus, l'accès du GDP-<sup>3</sup>H à la Gt $\alpha$  peut être restreint parce que la Gt $\alpha$  serait enfouie à l'intérieur de ces agrégats. Pour remédier à ce problème, on pourrait ajouter à cette suspension de ME-GRP un détergent doux comme le n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside. Ce détergent non ionique est utilisé afin de solubiliser et stabiliser les protéines membranaires. À une concentration de 0.03 % (p/v), il solubilise les protéines

(Gallant, 1998) mais à une concentration moindre il pourrait peut-être solubiliser les agrégats de ME-GRP. Cela doit être vérifié expérimentalement. Il serait alors possible de mesurer la quantité de Gt dont le site actif est accessible au moyen d'un substrat radioactif comme le  $\text{GTP}\gamma^{35}\text{S}$ . Cela permettrait de connaître la quantité de  $\text{Gt}\alpha$  de façon plus précise et de vérifier si, en présence d'une solution homogène de ME-GRP, la concentration de Gt est constante d'une préparation à l'autre.

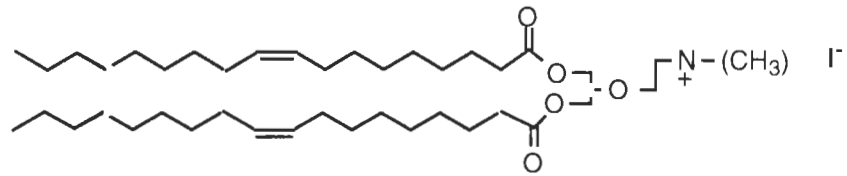
### 5.8 Utilisation de lipides non spécifiques pour lier et cristalliser la Gt

La méthode utilisée pour cristalliser une protéine en deux dimensions est décrite dans l'article de revue de Lebeau et al. (1996). Brièvement, on utilise une plaque de Téflon dans laquelle sont creusés 16 godets pouvant contenir 15  $\mu\text{l}$  de liquide. Cette plaque est déposée dans un pétri contenant un peu d'eau afin de maintenir le taux d'humidité constant. On dépose dans chacun de ces godets la sous-phase désirée. On recouvre ensuite ces godet d'une monocouche de lipides en étalant 1  $\mu\text{l}$  d'une solution de lipides d'une concentration de  $6.5 \times 10^{-4} \text{ M}$  (voir schéma 5.9). Cette quantité de lipides est plus que suffisante pour leur permettre de couvrir entièrement la surface du godet, qui a un diamètre d'environ 4 mm et est suffisante pour leur permettre d'atteindre le collapse. Les rebords du godet auraient toutefois une fonction de réservoir de lipides et nous pensons qu'une monocouche de lipides serait présente à la surface. Ces hypothèses n'ont jamais été vérifiées, mais l'obtention de cristaux sur des surfaces planes de lipides par cette méthode a été maintes fois

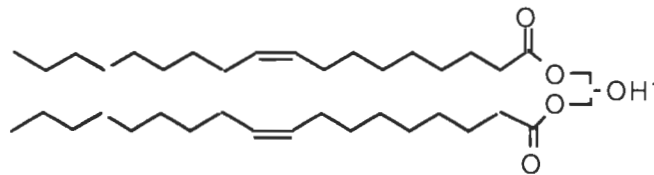
démontrée (pour une revue, voir Lebeau et al. (1996), Kornberg et Ribi (1987) et Kornberg et Darst (1991)).

Les lipides que nous avons utilisés sont illustrés aux schémas 5.8 et 1.11. Les chaînes hydrocarbonnées de ces lipides, appelées oléoyl, ont 18 carbones de long et une double liaison entre les carbones 9 et 10. Cette insaturation rend la monocouche fluide, ce qui permet aux complexes protéines-lipides de se déplacer latéralement et facilite donc la cristallisation. De plus, cette insaturation empêche la formation de domaines de lipides. Le choix des phospholipides PC, PE et PS est justifié parce que l'on retrouve des quantités appréciables de ces lipides dans les membranes des SEB (voir section 1.6). La PC et la PE ont une charge globale neutre à pH 7 tandis que la PS porte une charge globale négative à ce pH. Les lipides synthétiques DOTMA (dioléoyltriméthylammonium) et DOOH (dioléoylalcool) ont été synthétisés par Lebeau et al. (1996) et se sont avérés être des lipides favorisant la cristallisation de protéines (Lebeau et al., 1996).

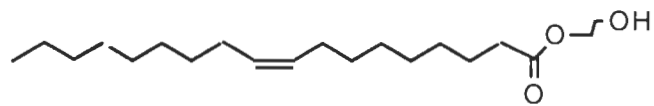
Les forces d'interaction entre les monocouches de lipides non spécifiques et la Gt sont de nature électrostatique. Les interactions électrostatiques entre une protéine et une monocouche de lipides chargés peuvent être influencées par le pH, la force ionique de la sous-phase, la présence d'ions divalents ainsi que la capacité tampon de la sous-phase (Lebeau et al., 1996). Nous avons donc fait varier ces paramètres pour tenter de cristalliser la Gt $\alpha$ , la Gt $\beta\gamma$  et la Gt $\alpha\beta\gamma$ . De plus, d'autres paramètres tels que la température, le temps d'incubation et la concentration en protéine dans la sous-phase ont aussi une influence sur le phénomène de cristallisation en deux



**DOTMA: Dioléoyltriméthylamonium**



**DOOH: Dioléoylalcool**



**OOH: Oléoylalcool**

Schéma 5.8: Lipides non spécifiques utilisés pour cristalliser la Gt $\alpha$

dimensions (Lebeau et al., 1996). Pour recueillir la monocouche de lipides à laquelle est liée la protéine cristallisée sur une grille de microscopie électronique, on utilise des grilles recouvertes d'une mince couche de carbone (voir schéma 5.9). Ces grilles peuvent être ionisées négativement ou positivement pour accentuer l'interaction entre la grille et le matériel portant une charge. À titre d'exemple, une solution de protéine de charge globale positive s'adsorbera plus facilement sur une grille chargée négativement que sur une grille recouverte de carbone qui est hydrophobe. Comme la Gt est chargée positivement à pH 7,5, nous n'avons utilisé que des grilles chargées négativement. Pour faire ces grilles, nous avons utilisé un appareil ("glow discharge") qui permet, dans une cloche à vide, d'ioniser le gaz en appliquant une différence de potentiel (comme dans l'ionisation du néon dans des tubes fluorescent). Des ions sont formés à partir de ce gaz et se déposent sur la grille de microscopie qui est placée sur une des électrodes. La surface du carbone qui est normalement hydrophobe se charge et devient hydrophile, ce qui permet une meilleure adsorption des molécules et une bonne coloration (Dubochet et al., 1971 et 1981). Enfin, nous avons parfois ajouté du glutaraldéhyde (0,2 % v/v) dans la sous-phase afin de favoriser les interactions entre les protéines.

### **5.9 Conditions expérimentales étudiées en vue d'obtenir des cristaux bidimensionnels de Gt à l'aide de lipides non spécifiques**

Les conditions expérimentales étudiées sont décrites sous forme de tableaux (voir tableaux 1 à 20). Les conditions de cristallisation d'une protéine doivent être déterminées par essais et erreurs. C'est pourquoi nous avons testé



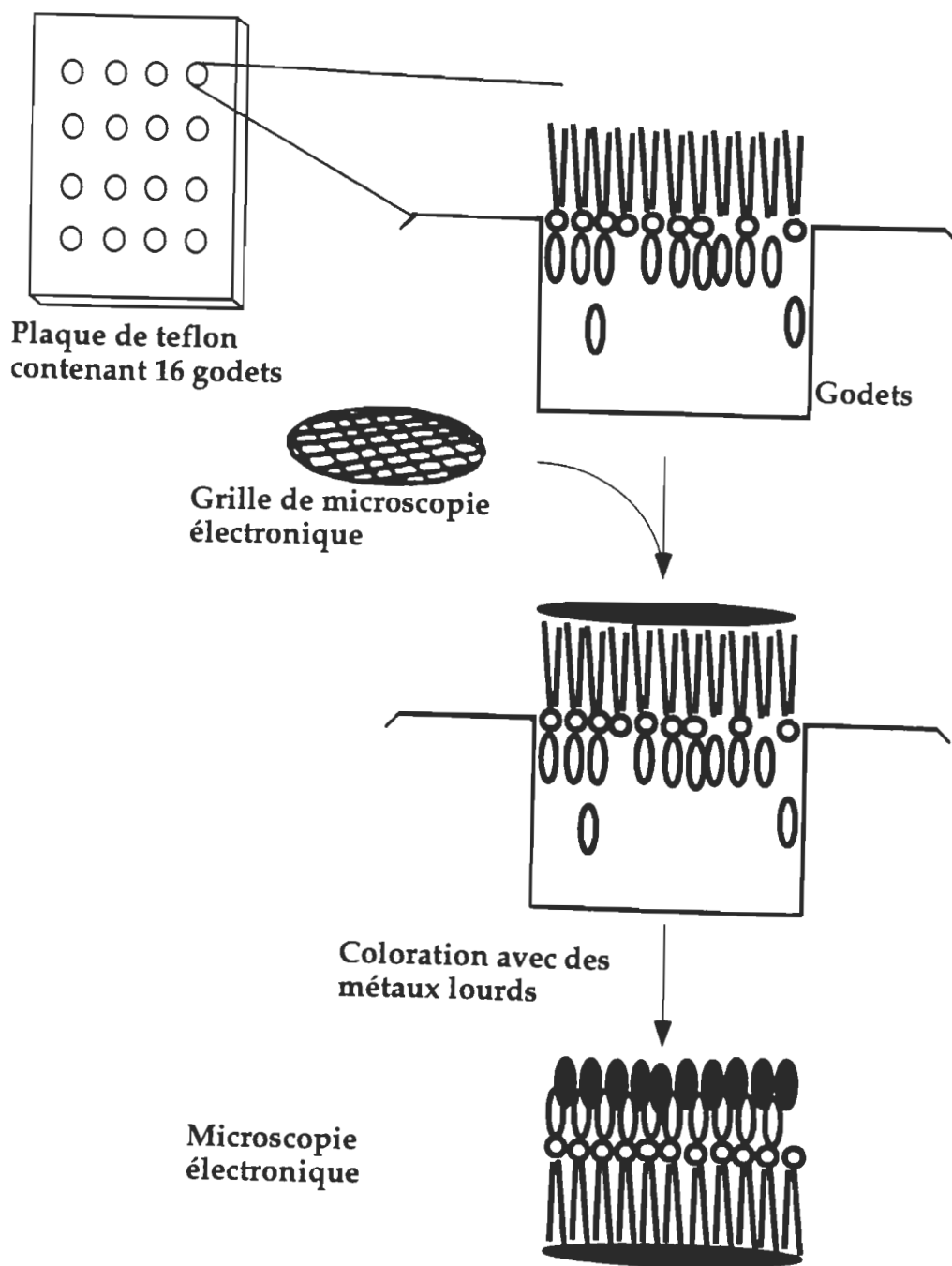


Schéma 5.9: Technique utilisée pour la cristallisation de protéines en deux dimensions

tour à tour les différents paramètres énumérés aux deux derniers paragraphes de la section 5.8. Nous avons choisi ces paramètres en nous basant sur l'article de revue publié par Lebeau et al. (1996). Le tampon C utilisé comme sous-phase pour ces expériences est le Tris 10 mM, pH 7,5 contenant du NaCl 100 mM, du MgCl<sub>2</sub> 1 mM d'EDTA et du DTT 1 mM, à moins de spécifications contraires indiquées dans la légende des tableaux. Les expériences 1 à 18 ont été effectuées avec de la Gt d'origine bovine et les expériences 18 à 20 avec de la Gt de SEB de grenouille (*Rana catesbiana*). Toutes ces expériences ont été faites en duplicata. Seulement 3 types de structures ont été observées suite aux expériences visant à cristalliser la Gt. Lorsqu'une structure est observée en microscopie électronique suite à une expérience décrite dans les tableaux 5.3 à 5.15, nous indiquerons à l'aide d'une étoile et de caractères gras les données du tableau qui ont conduit à ce résultat. On ne connaît pas les raisons qui incitent la Gt à cristalliser.

**Tableau 5.3: Expérience 1: Effet de mélanges lipidiques, du type de protéine et de la concentration en protéine sur la formation de cristaux\***

Mélanges lipidiques	Type de protéine		
	[Gt $\alpha$ ] ( $\mu$ g/ml)	[Gt $\beta\gamma$ ] ( $\mu$ g/ml)	[Gt $\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu$ g/ml)
OOH	10 ou 50	10 ou 50	10 ou 50
OOH + DOTMA (4:1)	10 ou 50	10 ou 50	10 ou 50*
	10 ou 50*	10 ou 50	10 ou 50

\* Le temps d'incubation était de 4 heures.

**Tableau 5.4: Expériences 2, 3 et 4: Effet du temps d'incubation sur la formation de cristaux\***

Mélanges lipidiques	Type de protéine		
	[Gt $\alpha$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ )	[Gt $\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ )	[Gt $\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ )
OOH	10 ou 50	10 ou 50	10 ou 50
OOH + DOTMA (4:1)	10 ou 50	10 ou 50	10 ou 50
OOH + DOPS (4:1)	10 ou 50	10 ou 50	10 ou 50
PE + PC + PS (2:2:1)	10 ou 50	10 ou 50	10 ou 50

\* Ces expériences sont semblables à l'expérience 1 sauf que l'on a utilisé un mélange lipidique additionnel. Les temps d'incubation ont été, respectivement, de 2 heures, 5 heures 30 minutes et 12 heures pour les expériences 2, 3 et 4.

**Tableau 5.5: Expériences 5-6: Répétition de l'expérience 1 où l'on a observé la formation de structure**

Mélanges lipidiques	[Gt] ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	OOH + DOTMA (4:1)	10 [Gt $\alpha\beta\gamma$ ]
OOH + DOPS (4:1)	10 [Gt $\alpha$ ]	50 [Gt $\alpha$ ]

\*Les temps d'incubation ont été de 2 et 4 heures, respectivement, pour les expériences 5 et 6. Ces deux expériences ont été répétées trois fois en duplicata.

**Tableau 5.6: Expérience 7: Effet du glutaraldéhyde sur la formation de cristaux\***

Mélanges lipidiques	[Gt $\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	OOH + DOTMA (4:1)	10
DOOH + DOTMA (4:1)	10	50

\* Cette expérience est identique à l'expérience 6 sauf que nous avons ajouté du glutaraldéhyde 0,2 % (v/v) dans la sous-phase.

**Tableau 5.7: Expériences 8-9: Effet de la concentration en protéine et de la présence du glutaraldéhyde sur la formation de cristaux\***

Mélanges lipidiques	[Gt $\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	OOH + DOTMA (4:1)	5	15	25
DOOH + DOTMA (4:1)	5	15	25	35

\* Ce qui distingue les expériences 8 et 9 est, respectivement, la présence ou l'absence du glutaraldéhyde 0,2 % (v/v). Le temps d'incubation a été de 4 heures.

**Tableau 5.8: Expériences 10-11: Effet de la concentration en NaCl sur la formation de cristaux\***

Mélanges lipidiques				
	[Gt $\alpha$ $\beta$ $\gamma$ ] ( $\mu$ g/ml) / [NaCl] (mM)			
DOOH + DOTMA (4:1)	15 / 50	15 / 100	15 / 150	15 / 200
DOOH + DOTMA (4:1)	35 / 50	35 / 100	35 / 150	35 / 200

\* La concentration en NaCl utilisée était de 50, 100, 150 et 200 mM.

**Tableau 5.9: Expériences 12-13: Effet du rapport Gt $\alpha$  : Gt $\beta$  $\gamma$  et de la concentration en Tris sur la formation de cristaux\***

Mélange lipidique				
	[Gt $\alpha$ $\beta$ $\gamma$ total] ( $\mu$ g/ml) / rapport Gt $\alpha$ : Gt $\beta$ $\gamma$			
DOOH + DOTMA (4:1)	10 / 1:1	10 / 1:2	10 / 3:4	10 / 2:1

\* Le temps d'incubation a été de 4 heures. Ce qui distingue les expériences 12 et 13 est le fait qu'elles ont été effectuées, respectivement, en présence de 10 ou de 100 mM Tris dans la sous-phase. Les autres composantes du tampon C n'ont pas été changées.

**Tableau 5.10: Expérience 14: Effet du pH et de la concentration en Tris sur la formation de cristaux\***

[Gtαβγ total] (μg/ml) / [Tris] (mM)				
pH de la sous-phase				
pH : 6,5	15 / 10	15 / 50	15 / 100	15 / 150
pH : 7,5	15 / 10	15 / 50	15 / 100	15 / 150
pH : 8,5	15 / 10	15 / 50	15 / 100	15 / 150

\* Le temps d'incubation a été de 4 heures. Le mélange lipidique utilisé est le OOH + DOTMA (4:1).

**Tableau 5.11: Expériences 15-16: Effet des ions Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, TMAbu, TMAet sur la formation de cristaux\***

[Gtαβγ] (μg/ml) / Type d'ion utilisé				
Mélanges lipidiques				
DOOH + DOTMA (4:1)	10 / Mg(1)	10 / Mg(2)	10 / Ca	10 / Fe
DOOH + DOTMA (4:1)	10 / Cu	10/TMAbu	10/TMAet	

\* Les symboles Mg(2), Ca, Fe, Cu, TMAbu, TMAet indiquent la présence de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub>, acide triméthylammoniumbutyrique ou de l'acide triméthylammoniumméthylique, respectivement. Le symbole Mg(1) indique que ce tampon contient 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. Ce qui distingue l'expérience 15 de l'expérience 16, c'est le contenu en Tris qui était, respectivement, de 10 et 100 mM. Le temps d'incubation fut de 4 heures.

**Tableau 5.12: Expérience 17: Effet du temps d'incubation et de la température sur la formation de cristaux\***

	[Gt $\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ ) / Temps d'incubation (heure)			
Mélanges lipidiques				
DOOH + DOTMA (4:1)	10 / 2	10 / 4	10 / 12	10 / 24
DOOH + DOTMA (4:1)	10 / 36	10 / 48	10 / 78	

\* Contrairement aux autres expériences, celle-ci a été faite à 4 °C pour minimiser les problèmes de dégradation aux longs temps d'incubation.

**Tableau 5.13: Expérience 18: Observation de la formation de cristaux de Gt $\alpha\beta\gamma$  provenant des SEB de grenouille\***

	[Gt $\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ )
Mélanges lipidiques	
OOH + DOTMA (4:1)	50 *
DOOH + DOTMA (4:1)	50 *

\* Cette expérience a été effectuée 6 fois en duplicata. La concentration en NaCl du tampon C était de 200 mM. Le temps d'incubation était de 4 heures.

**Tableau 5.14: Expérience 19: Effet de l'incubation de la  $G\alpha\beta\gamma$  avec des membranes des SEB sur la formation de cristaux\***

	[ $G\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ ) / Temps d'incubation (heure)		
ME-GRP vortexées	0 / 1	50 / 1	50 / 2
ME-GRP non vortexées	0 / 1	50 / 1	50 / 2
MLU non vortexées	0 / 1	50 / 1	50 / 2

\* Les SEB ont subi différents traitements qui sont décrits au début de la section 5.8 de ce chapitre. La concentration en NaCl du tampon C a été augmentée à 200 mM.

**Tableau 5.15: Expériences 20-21: Effet du type de grille pour prélever la monocouche sur la récolte de cristaux\***

	[ $G\alpha\beta\gamma$ ] ( $\mu\text{g/ml}$ ) / Type de grilles utilisées	
Mélange lipidique		
OOH + DOTMA (4:1)	50 / non ionisée	50 / ionisée

\* Les grilles ionisées et non ionisées ont des caractéristiques différentes et sont décrites au début de la section 5.8. La concentration en NaCl du tampon C était de 200 mM. Les temps d'incubation étaient, respectivement, de 2 et 48 heures pour les expériences 20 et 21.



### 5.10 Observation de cristaux bidimensionnels de Gt

Nous avons obtenu trois types de structure. L'un avec la Gt $\alpha$  bovine, un autre avec de la Gt $\alpha\beta\gamma$  bovine et le troisième type avec de la Gt $\alpha\beta\gamma$  de grenouille. Les photographies de ces trois types de structure ainsi que les conditions expérimentales utilisées sont présentées aux figures 5.3, 5.4 et 5.5, respectivement. Nous avons obtenu seulement une fois les structures apparaissant aux figures 5.3 et 5.4. La structure apparaissant à la figure 5.5 a été obtenue lors de trois expériences distinctes présentées au tableau 5.13. On a obtenu des cristaux avec le mélange lipidique OOH + DOTMA (4:1) lors de deux expériences effectués à des moments différents et lors d'une expérience faite avec le mélange lipidique DOOH + DOTMA (4:1). On ne peut pas expliquer pourquoi en utilisant les mêmes conditions expérimentales certains jours on obtient des cristaux et d'autres pas. Les conditions expérimentales en vue d'obtenir ces structures ne sont donc pas optimisées. Cependant, pour faire l'analyse des structures, il faudrait être en mesure d'obtenir une plus grande quantité de ces dernières.

On doit toutefois préciser qu'à la figure 5.3 une expérience contrôle où l'on aurait étalé le mélange lipidique seul n'a pas été faite. Dans ce cas, on ne peut donc pas être certain qu'il s'agit bien d'une structure cristalline de Gt $\alpha$ . Par contre, les dimensions de la Gt $\alpha$  varient entre 20 et 60 Å dépendant de l'angle sous lequel on la regarde et correspondent à la périodicité des structures observées à la figure 5.3. En effet, on observe une périodicité d'environ 45 Å au centre de la photo alors que celle de la partie située en haut à droite est de 20 Å.

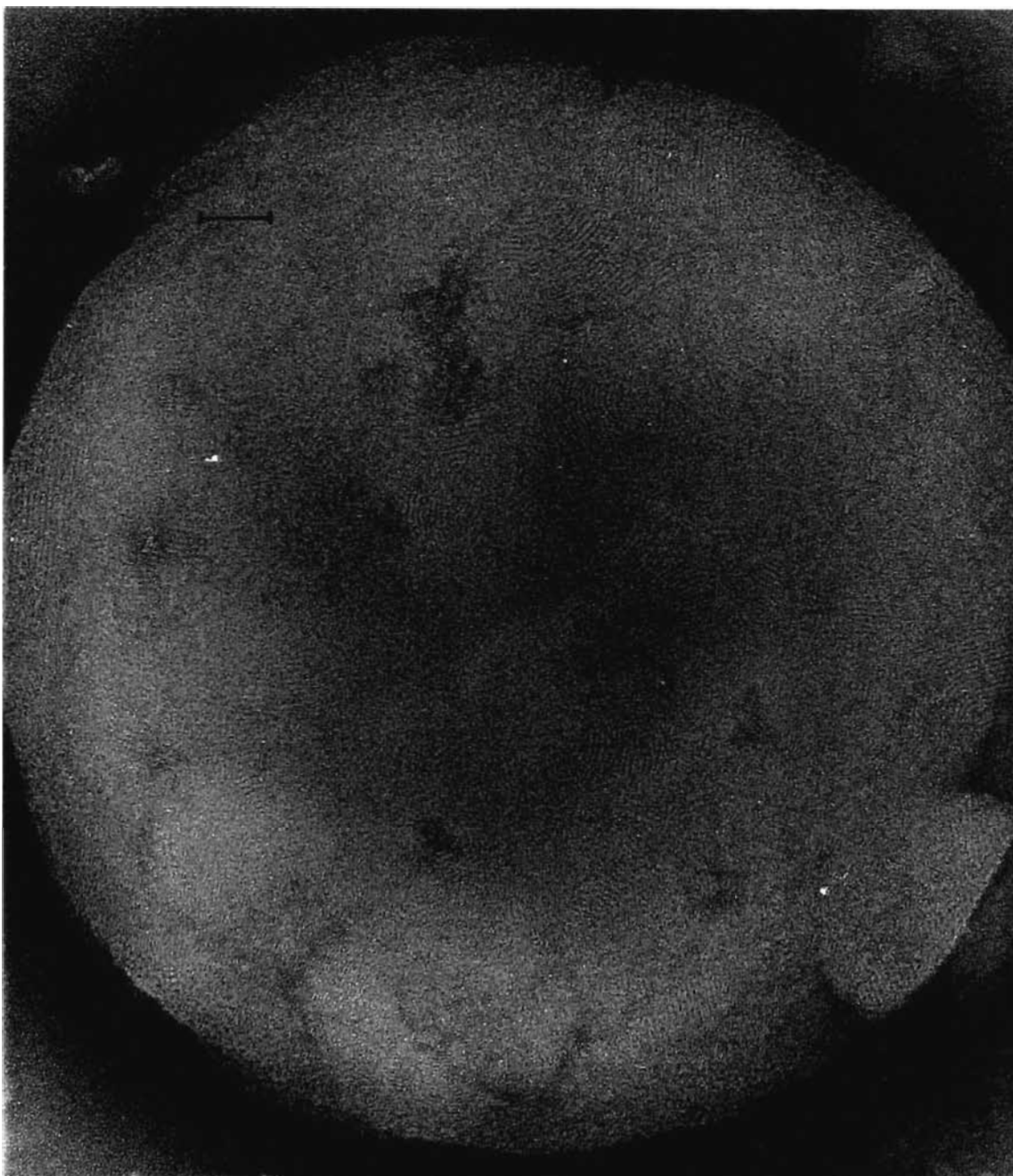


Figure 5.3: Structure observée en présence de OOH: DOPS (4:1) et de G $\alpha$  bovine. Les lignes ressemblant parfois à des empreintes digitales sont des structures cristallines. Toutefois n'ayant pas fait de témoin pour vérifier si le lipide seul présente la même structure, on ne peut affirmer avec certitude qu'il s'agit d'un cristal de G $\alpha$ . Le temps d'incubation était de 4 heures et la concentration de protéine dans la sous-phase était de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (voir tableau 5.3) (1 cm = 440 Å).



Figure 5.4: Structure observée de  $Gt\alpha\beta\gamma$  bovine en présence de OOH: DOTMA (4:1). Les structures indiquées par une flèche et ressemblant à des rosaces sont analysables par diffraction optique. Le temps d'incubation était de 4 heures et la concentration de protéine dans la sous-phase était de  $50 \mu\text{g/ml}$  (voir tableau 5.3) ( $1 \text{ cm} = 440 \text{ \AA}$ ).

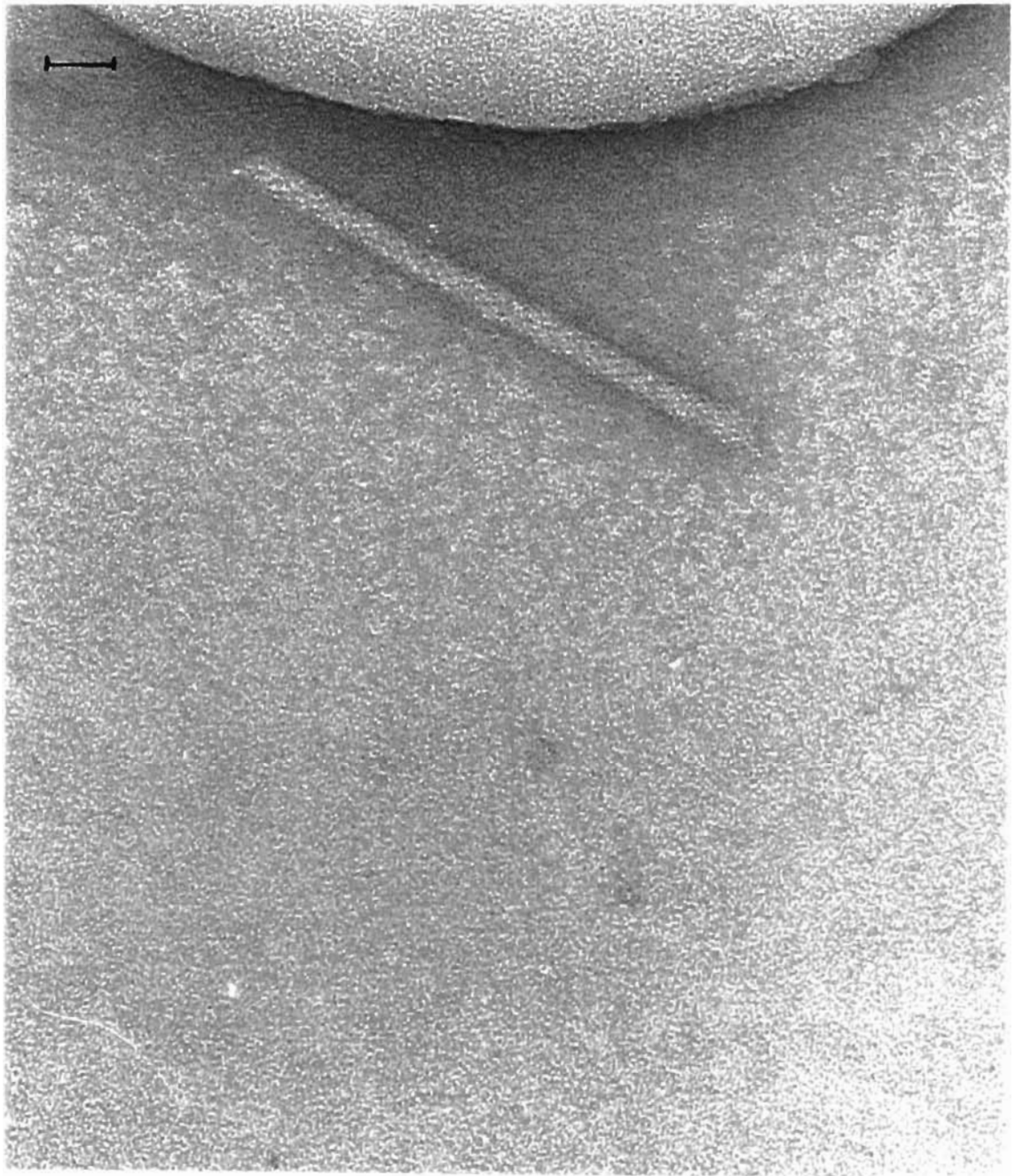


Figure 5.5: Structure cristalline tridimensionnelle de  $Gt\alpha\beta\gamma$  de grenouille en présence de OOH: DOTMA (4:1). Le tube semble être composé d'hélices de protéines cristallisées qui sont des structures analysables par diffraction optique. Le temps d'incubation était de 4 heures et la concentration de protéines dans la sous phase était de  $50 \mu\text{g/ml}$  (voir tableau 5.13) ( $1 \text{ cm} = 360 \text{ \AA}$ ).

À la figure 5.4, on a observé des structures en rosace d'environ 150 Å qui sont donc beaucoup plus grosses que celles de la figure 5.3 (45 Å). Cependant, il faut mentionner que l'on a utilisé, dans ce cas-ci, l'hétérotrimère ( $G\alpha\beta\gamma$ ) dont les dimensions varient entre 59 à 141 Å selon l'angle d'observation. Il serait donc possible que deux 2 hétérotrimères s'imbriquent l'un dans l'autre pour présenter un objet de cette taille. Cet objet pourrait également être le résultat d'un regroupement de quatre sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta\gamma$ .

Enfin, à la figure 5.5, on doit préciser que l'objet qui a la forme d'un tube est composé d'hélices de protéines dont chaque unité mesure environ 51 Å par 51 Å. Bien que les trois sous-unités de la Gt étaient présentes dans la sous-phase, la dimension de chaque unité ne nous permet pas de déterminer si ces tubes sont formés de  $G\alpha\beta\gamma$ , de  $G\alpha$  ou de  $G\beta\gamma$  seulement. Ces tubes provenant de la sous-phase sont des cristaux tridimensionnels plutôt que bidimensionnels.

Depuis janvier 1996, la structure de la  $G\alpha\beta\gamma$  et de la  $G\beta\gamma$  a été résolue par diffraction des rayons X (Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996). Toutefois, il faut mentionner que la sous-unité alpha utilisée pour cristalliser l'hétérotrimère était une chimère réalisée à partir de la transducine et d'une autre protéine G, la  $G_i$ , présente dans le cerveau (Skiba et al., 1996).

Il serait donc tout de même intéressant de comparer la forme des protéines cristallisées et analysées par radiocristallographie avec celle d'éventuels cristaux obtenus à l'aide de lipides fonctionnalisés avec du GDP et observés par cristallographie électronique. Il serait également intéressant de

cristalliser de plus gros complexes comme la R-Gt $\alpha$ -GDP, la Gt $\alpha$ -GTP-PDE $\gamma$  ou encore la Gt $\alpha$ -GTP-PDE $\alpha\beta(\gamma)_2$  en deux dimensions à l'aide de lipides fonctionnalisés avec du GDP ou du GTP. La dimension de ces complexes est inaccessible à la radiocristallographie mais se prête très bien à la cristallographie électronique.

La synthèse de lipides fonctionnalisés avec un analogue du GDP ou du GTP demeure donc toujours d'actualité. Ces lipides augmenteraient grandement les chances d'obtenir des cristaux bidimensionnels.

## 5.11 Références

- Chabre, M. Trigger and amplification mechanisms in visual phototransduction. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry. 1985. 14: 3321-360.
- Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger, M. et Kellenberg, E.A. New preparation methodes for dark field electron microscopy of biomacromolecules. Journal of Ultrastructure Research. 1971. 35: 147-167.
- Dubochet, J., Groom, M. et Mueller-Neutoboom, S. The mounting of macromolecules for electron microscopy with particular reference of surface phenomena and the treatment of support films by glow discharge. Advances in Optical and Electron Microscopy. 1981. 8: 107-135.
- Eckstein, F. Phosphorothionates analogues of nucleotides: Tool for investigation of biochemical processes. Angewandte Chemie International Edition in English. 1983. 22: 423-506.
- Gallant, J. Spectroscopie et propriétés interfaciales du photosystème II en film monomoléculaire à l'interface air-eau. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 1998.

- Gerlt, J.A., Reynolds, M.A., Demou, P.C. et Keyon, G.L. O17 NMR spectral properties of pyrophosphate, simple phosphonates and triphosphate and phosphonates analogues of ATP. Journal of American Chemical Society. 1983. 105: 6469-6474.
- Hingorani, V.J., Chang, L.-F.H. et Ho, Y.-K. Chemical modification of bovine transducin: probing the GTP-binding site with affinity analogues. Biochemistry. 1989, 28: 7424-7432.
- Kelleher, D.J., Dudyetz, L.W., Wright, G.E. et Johnson, G.L. Ability of binding nucleoside derivatives to bind and activate bovine transducin. Molecular pharmacology. 1986. 30: 603-608.
- Kornberg, R.A. et Ribí, H.O. Formation of two-dimensional crystals of proteins on lipid layers. Protein Structure, Folding and Design, Oxender, D. L. et Liss, R. A. (éd.). 1987. pp 175-186.
- Kornberg, R.A. et Darst, S.A. Two-dimensional crystals of proteins on lipid layers. Current Opinion in Structural Biology. 1991. 1: 632-646.
- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. The 2.0 Å crystal structure of heterotrimeric G protein. Nature. 1996. 379: 311-319.



- Larsen, M., Willet, R. et Young, R.G. Imidophosphate and pyrophosphate: possible biological significance of similar structures. Science. 1969. 166: 1510-1511.
- Lebeau, L., Schultz, P., Celia, H., Messini, P., Nuss, S., Klinger, C., Olland, S., Oudet, P. et Mioskowski, C. Specifically designed lipid assemblies as tools for two-dimensional crystallization of soluble biological macromolecules. *dans* Handbook of nonmedical applications of liposomes. Barenholz, Y. and Lasic, D. D. (éd.). 1996. CRC Press: Boca Raton. 153-186.
- Loewus, D.I. et Eckstein, F. Symmetrical monothiopyrophosphate. Journal of American Chemical Society. 1983. 105: 3287-3292.
- Malinski, J., Zera, E., Angleson, J. et Wensel, T. High affinity interactions of GTP $\gamma$ S with the heterotrimeric G protein, transducin. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 12919-12924.
- Miljanich, G.P. Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane. Thèse de doctorat, University of California, Santa Cruz, 1978.
- Neal, E.N., Eccleston, J.F. et Webb, M.R. Hydrolysis of GTP by p21<sup>NRAS</sup>; the NRAS protooncogene product is accompanied by a conformational change in the wild-type protein: Use of a single fluorescent probe at the catalytic site. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1990. 87: 3562-3565.

Noel, P.N., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP $\gamma$ S. Nature. 1993. 366: 654-663.

Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Site Web:  
WWW.pdb.bln.gov

Rauback, R.A., Franklin, L.K. et Dratz, E.A. Vision research. 1974. 14: 335-337.

Remmers, A.E., Posner, R. et Neubig, R.R. Fluorescent guanine nucleotide analog and G protein activation. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 269: 13771-13778.

Remmers, A.E. et Neubig, R.R. Partial G protein activation by fluorescent guanine nucleotide analogs. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 4791-4797.

Reynolds, M.A., Gerlt, J.A., Demou, P.C. Openheimer, N.J. et Kenyon, G.L. N15 and O17 studies of the proton binding sites in imidophosphate, tetraethyl imidophosphate, and adenylyl imidophosphate. Journal of American Chemical Society. 1983. 105: 6475-6481.

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

- Skiba, N., Bae H. et Hamm, H.E. Mapping of effector binding sites of transducin  $\alpha$ -subunit using  $G\alpha_t/G\alpha_i1$  chimeras. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 413-424.
- Sondek, J., Bohm, A, Lambright, D.G., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. Crystal structure of a  $G\alpha$  protein  $\beta\gamma$  dimer at 2.1 Å resolution. Nature. 1996. 379: 369-374.
- Vincent, S. Synthèse d'analogues non hydrolysables de guanosine diphosphate en vue de l'analyse structurale de la protéine G du photorécepteur visuel. Thèse de doctorat en Chimie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg, 1997.
- Yamanaka, G., Eckstein, F. et Stryer, L. Stereochemistry of guanyl nucleotide binding site of transducin probed by phosphorothioate analogues of GTP and GDP. Biochemistry. 1985. 24: 8094-8101.
- Yamanaka, G., Eckstein, F. et Stryer, L. Interaction of retinal transducin with guanosine triphosphate analogues: Specificity of the gamma-phosphate binding region. Biochemistry. 1986. 25: 6149-6153.
- Yamazaki, A., Tatsumi, M., Torney, D.C. et Bitensky, M.W. The GTP-binding protein of rod outer segments. I. Role of each subunit in the hydrolytic cycle. The Journal of Biological Chemistry. 1987. 262: 9316-9323.

Zera, E., Molloy, D., Angleson, J., Lamture, J., Wensel, T. et Malinski, J. Low affinity of GDP $\beta$ S and ribose or phosphoryl substituted GTP analogues with the heterotrimeric G protein, transducin. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 12925-12931.

## CHAPITRE 6

### CONCLUSION

Les résultats présentés aux chapitres 2 et 3 démontrent que, premièrement, la  $G\alpha$ -GDP et la  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  interagissent *in vitro* avec les membranes. Deuxièmement, l'interaction de la  $G\alpha$ -GDP avec les membranes est influencée par le type de tête polaire des lipides. Troisièmement, la concentration en NaCl influence l'interaction de la  $G\alpha$  avec les membranes. En effet, à des concentrations inférieures à 100 mM, nous n'observons plus d'interaction Gt-membrane tandis qu'à 150 mM cette interaction est maximale. Quatrièmement, la  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  pénètre les membranes des vésicules constituées de lipides bromés jusqu'à une profondeur minimale de 6.5 Å. Au chapitre 4, il est démontré que l'on peut utiliser des acides gras doxylés plutôt que des lipides bromés pour mesurer la profondeur de pénétration des tryptophanes d'un peptide dans les membranes. Au chapitre 5, il est démontré qu'il est possible de cristalliser la Gt en présence de lipides non spécifiques.

Ainsi, les résultats des chapitres 2 et 3 appuient le modèle de diffusion latérale initialement proposé par différents auteurs (Liebman et al., 1987; Uhl et al., 1990; Lamb et Pugh, 1992). Ces observations impliqueraient donc que la  $G\alpha$ , après s'être dissociée de la  $G\beta\gamma$  et de la rhodopsine, diffuse latéralement pour

activer la PDE. De la même façon, ces résultats suggèrent que la  $G\alpha$ -GDP diffuse latéralement dans les membranes discales pour lier la  $G\beta\gamma$  et reformer le complexe  $G\alpha$ -GDP- $G\beta\gamma$ . Ayant démontré que la concentration en NaCl influence cette interaction (chapitre 2; Grenier et al., 1994) et sachant que les concentrations en ions  $Na^+$  varient considérablement lors de l'activation des SEB par la lumière (voir section 1.4.4; Shichi, 1983; Kaupp et Koch, 1992), cela nous amène à proposer un mécanisme d'inactivation des SEB.

### 6.1 Hypothèse proposée pour le mécanisme d'inactivation des SEB

Il se peut que *in vivo* tout comme ce que nous avons démontré *in vitro*, l'interaction de la  $G\alpha$  avec les membranes soit dépendante de la concentration en  $Na^+$  à la noirceur. La  $G\alpha$  interagirait alors avec les membranes à forte concentration en  $Na^+$  soit 110 mM (Kaupp et Koch, 1992) ou 200 mM (Shichi, 1983). Cette interaction prendrait place jusqu'à la fermeture des canaux ioniques. Elle voyagerait alors par le biais de la membrane pour activer la PDE. Par contre, lors de la fermeture de ces canaux et de la baisse subséquente de la concentration en ions  $Na^+$  (20 mM selon Shichi, 1983), la  $G\alpha$  ne serait plus en mesure d'interagir avec la membrane discale et voyagerait alors par le biais du cytoplasme. Lamb et Pugh ont proposé en 1992 que seul le mécanisme de diffusion latérale est entièrement satisfaisant du point de vue cinétique pour expliquer l'activation de la PDE par la  $G\alpha$  au cours de la période d'activation de 200-300 msec du processus visuel. On peut facilement imaginer, à la lumière des résultats montrés au chapitre 2, qu'une concentration de 110 à 200 mM en  $Na^+$  favoriserait ce mécanisme. Par contre, la concentration en  $Na^+$  diminue à

la fermeture des canaux ioniques, ce qui entraînerait une perte d'affinité de la  $G\alpha$  envers les membranes, tel que nous l'avons observé *in vitro*. Par conséquent, la  $G\alpha$ -GTP, aussi bien que la  $G\alpha$ -GDP, ne voyageraient plus par le biais de la membrane pour se lier, respectivement, à la PDE et à la  $G\beta\gamma$ . Elles diffuseraient alors par saut (voir schémas 1.7 et 1.10). L'activation de la PDE s'en trouverait alors ralentie, ce qui en soi contribuerait à l'inactivation du processus visuel. De plus, la formation de l'hétérotrimère de la Gt serait ralentie car la  $G\alpha$ -GDP qui voyagerait par le biais du cytoplasme (mécanisme par saut), doit entrer en collision avec la  $G\beta\gamma$  en 3 dimensions (diffusion par le biais du cytoplasme) plutôt qu'en 2 dimensions (diffusion latérale) et s'orienter adéquatement afin que leurs sites d'interaction respectifs soient alignés (Liebman et Sitaramayya, 1984; Liebman et al., 1987). Une plus faible quantité d'hétérotrimère de la Gt serait alors disponible pour être de nouveau activée par la rhodopsine. Par conséquent, ce mécanisme pourrait aussi contribuer au processus d'inactivation visuelle.

Tel que montré au schéma 1.9 et décrit à la section 1.4.3 du chapitre 1, la fermeture des canaux ioniques bloque non seulement l'entrée du  $Na^+$  dans les SEB mais aussi celle du  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et du  $Mg^{2+}$  (Kaupp et Koch, 1992). Il serait donc intéressant de vérifier l'effet de chacun de ces ions ainsi que celui des chlorures sur l'interaction de la  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  avec les membranes. Pour ce faire, on pourrait répéter les mesures d'atténuation de fluorescence des tryptophanes de la  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  en présence de vésicules de lipides bromés en position 6-7 de la chaîne hydrocarbonée à différentes concentrations d'ions  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  sous forme de sels de chlorure, de nitrate ou encore de sulfate. Ainsi, on pourrait mieux estimer l'importance de chacun de ces ions et

de leurs contre-ions sur l'interaction de la Gt avec les membranes. On sait déjà que le magnésium est essentiel à l'activation de la Gt. En effet, les données cristallographiques de la Gt $\alpha$ -GDP montrent l'emplacement de ce dernier au sein de la protéine (Lambright et al., 1994). De plus, le chlore a un effet sur la dissociation entre les sous-unités alpha et bêta-gamma de la Gs (Toyoshige et al., 1996)

On sait maintenant que la Gt $\alpha$  interagit avec les membranes à une concentration en NaCl de 150 mM (voir chapitres 2 et 3), il importe maintenant de savoir quel domaine de cette protéine fait face aux membranes.

## **6.2 Domaines d'interaction de la Gt $\alpha$ avec les membranes: perspectives d'avenir**

On a vu au chapitre 3 que 55 % de la fluorescence de la Gt $\alpha$ -GTP est atténuée par les vésicules de lipides bromés en position 6-7 (figure 3.2; Grenier et al., 1998). Une des explications possibles de cette observation est que la protéine s'enfouit partiellement dans les membranes et que la fluorescence d'un seul des deux tryptophanes, soit celui situé en position 127 ou celui en position 207, est atténuée par les bromes. Le brome est un atténuateur de fluorescence collisionnel ayant un petit rayon atomique (Markello et al., 1985). Il est donc fort probable que ce dernier atténue la fluorescence d'un seul des deux tryptophanes car ces deux tryptophanes sont situés dans des régions fort différentes de la Gt $\alpha$  (Noel et al., 1993; Sondek et al., 1994). En effet, la sous-unité alpha de la Gt est composée de deux domaines, le domaine de type Ras et



un domaine hélicoïdal qui contiennent chacun un tryptophane (voir schéma 1.8; Lichtarge et al., 1996). Le domaine de type Ras qui comprend le site de liaison et d'hydrolyse du GTP, possède une structure semblable à celle d'une petite protéine G de type Ras, la p21<sup>ras</sup>, dont la structure a été déterminée par diffraction des rayons X (De Vos et al., 1988; Pai et al., 1989). La plupart des interactions avec la R et la PDE ont lieu sur le domaine de type Ras (Coleman et Sprang, 1996). On ne connaît pas de fonction au domaine hélicoïdal, illustré en gris foncé dans le schéma 1.8, à part le fait qu'il pourrait agir comme stimulateur de l'activité hydrolytique du GTP (Coleman et Sprang, 1996).

Puisque les domaines d'interaction de la G $\alpha$  avec la R et la PDE se retrouvent au niveau du domaine de type Ras, certains auteurs ont soulevé l'hypothèse que les zones d'interaction entre la G $\alpha$  et la membrane se trouvent aussi au niveau de ce domaine (Onrust et al., 1997; Lichtarge et al., 1996). Le tryptophane 127 est situé dans la partie hélicoïdale de la G $\alpha$  tandis que le tryptophane 207 est situé sur la partie de type Ras. Si l'hypothèse d'Onrust et al. (1997) et Lichtarge et al. (1996) est exacte, c'est le tryptophane 207 qui devrait être atténué par les lipides bromés en position 6-7. Par contre, le tryptophane 127 est situé plus près de la protéine et est donc plus accessible que le tryptophane 207, d'après les données cristallographiques de Noel et al. (1993) et Lambright et al. (1994). Il serait intéressant de vérifier lequel de ces deux tryptophanes se trouve du côté de la membrane en utilisant la fluorescence intrinsèque de la G $\alpha$ .

Faurobert et al. (1993) ont démontré que c'est le tryptophane 207 qui était responsable de l'augmentation de la fluorescence intrinsèque de la G $\alpha$  suite à

la liaison du GTP. Pour ce faire, ils ont produit un mutant où le tryptophane 207 est remplacé par une phénylalanine. Ce mutant pourrait être utilisé pour vérifier si, en absence du tryptophane 207, on observe ou non une atténuation de la fluorescence intrinsèque de la  $G\alpha$ . En répétant les mesures d'atténuation de fluorescence de la  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  par des vésicules de lipides bromés, tel que décrit au chapitre 3, il serait possible de savoir si c'est la région de la  $G\alpha$ -GTP où se trouve le tryptophane 207 qui pénètre les membranes. La même chose pourrait être faite en utilisant un autre mutant où le tryptophane 127 serait remplacé par une phénylalanine. On pourrait ainsi déterminer quel domaine de la  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  interagit avec les membranes.

Nous aurions, d'autre part, avantage à utiliser un atténuateur plus efficace de la fluorescence des tryptophanes. Cela permettrait de préparer des vésicules contenant beaucoup moins d'atténuateur et, par conséquent, un plus fort pourcentage de lipides que l'on retrouve naturellement dans les membranes discales des SEB. Ces membranes modèles mimeraient donc mieux les membranes discales. L'utilisation de doxyl en remplacement du brome est une solution intéressante à ce problème.

### **6.3 Utilisation de lipides doxylés pour mesurer l'atténuation de fluorescence de la $G\alpha$**

Les résultats du chapitre 4 montrent que le doxyl est un atténuateur adéquat de fluorescence des tryptophanes et constitue donc une alternative intéressante à l'utilisation du brome. Bien que les lipides bromés comportent

l'avantage d'avoir été étudiés en détails par diffraction des rayons X (McIntosh et al., 1987) en regard de la position du brome dans les lipides, il n'en demeure pas moins que leur utilisation comporte tout de même un inconvénient majeur. En effet, le brome n'est pas un atténuateur efficace (Lakowicz, 1983). C'est pour cette raison qu'il est nécessaire d'utiliser des vésicules qui sont faites exclusivement de lipides bromés pour obtenir une atténuation adéquate de la fluorescence (Markello et al., 1985). Par contre, le brome perturbe très peu les membranes à cause de sa dimension qui est comparable à celle d'un groupement méthyl (Roseman et al., 1978; Lytz et al., 1984; Markello et al., 1985). Il serait donc avantageux d'utiliser un atténuateur de fluorescence plus efficace qui permettrait ainsi de diminuer le pourcentage de lipide servant à atténuer la fluorescence au profit de lipides qui mimeront mieux les membranes discales des SEB. Au chapitre 4, nous avons utilisé 5 mol % d'acide doxylstéarique en mélange avec le 1-palmitoyl-2-oléoylphosphatidylcholine pour obtenir un maximum d'atténuation de la fluorescence du tryptophane du peptide synthétique. Si l'on voulait utiliser le doxyl pour atténuer la fluorescence de la  $G\alpha$ , on pourrait fabriquer des vésicules contenant 5 % d'acide gras doxylstéarique ou 5 % de lipides dont une des deux chaînes hydrocarbonées serait un acide doxylstéarique. Ces lipides et ces acides gras sont disponibles commercialement et sont utilisés principalement pour des mesures en ESR et en EPR. En procédant de la même manière que pour la mesure de la profondeur de pénétration de la  $G\alpha$  en présence de lipides bromés (voir chapitre 3), soit en ajoutant des quantités croissantes de vésicules à la solution de  $G\alpha$  pour en atténuer la fluorescence intrinsèque, il serait ainsi possible de mesurer la profondeur de pénétration de la  $G\alpha$ -GDP et  $G\alpha$ -GDP- $AlF_4^-$  avec des membranes modèles ressemblant beaucoup plus aux membranes discales

des SEB. Sachant que le type de tête polaire des phospholipides a une influence sur l'interaction de la  $G\alpha$  avec les membranes (voir chapitre 2), cette expérience s'avérerait très intéressante. De plus, il serait possible d'étudier l'effet de l'insaturation des lipides sur l'interaction de la  $G\alpha$  avec les membranes. La composition lipidique de la membrane représente donc un paramètre qu'il serait intéressant de faire varier dans l'étude de l'association des sous-unités de la Gt avec la membrane. On pourrait étudier l'interaction de la  $G\alpha$ -GDP et de la  $G\alpha$ -GTP avec des vésicules de phospholipides purs comportant différentes têtes polaires (éthanolamine, choline, serine et inositol), différentes chaînes grasses (16:0, 18:0, 18:1, 22:6 $\omega$ 3, 16:0/18:1, 16:0/22:6 $\omega$ 3, 18:0/22:6 $\omega$ 3) ainsi que différents mélanges de ces phospholipides et de phospholipides extraits des photorécepteurs visuels. Ces mesures permettraient de caractériser précisément l'environnement lipidique favorisant la liaison de ces sous-unités aux membranes. Toutefois ces expériences représentent en soi le travail d'une autre thèse.

Il reste également beaucoup à faire pour mieux connaître le domaine de la  $G\alpha$  qui interagit avec les membranes et les conditions ioniques et lipidiques qui favorisent cette interaction. Les hypothèses ci-haut proposées apparaissent, dans ce cadre, dignes d'être vérifiées.

En plus des aspects fonctionnels, nous nous sommes également intéressés, au cours de cette thèse, aux aspects structurels de la Gt.

## 6.4 Cristallisation de la Gt

Des constantes de dissociation ( $K_d$ ) d'environ  $10^{-2}$  à  $10^{-5}$  M ont été mesurées pour l'interaction entre des lipides non spécifiques et des protéines comparativement à des  $K_d$  situées entre  $10^{-4}$  et  $10^{-15}$  M entre des lipides portant un ligand spécifique et une protéine particulière (Lebeau et al., 1996). Il est donc avantageux d'utiliser des lipides fonctionnalisés afin de poursuivre des expériences visant à cristalliser les différentes formes de la Gt. À la section 5.9, nous avons décrit tous les paramètres qui ont été testés pour tenter de cristalliser la Gt avec des lipides non spécifiques. Trois types de cristaux ont été obtenus dont les quantités étaient trop faibles pour être analysées. Il est donc inutile de continuer la cristallisation de la Gt en présence de lipides non spécifiques. Des efforts devront donc être consacrés à synthétiser des analogues qui seront mieux reconnus par la Gt $\alpha$ .

C'est pourquoi les chimistes du laboratoire du Dr Luc Lebeau tentent de synthétiser un analogue fluoré, le G-PCF<sub>2</sub>P. Cet analogue est plus stable dans le temps que les imidodiphosphates (P-N-P) qui présentent des problèmes d'hydrolyse après un jour en solution aqueuse (Vincent, 1997). Ils brancheront ensuite un bras espaceur en position 2 de la guanine puis sur le phosphore  $\beta$  et enfin entre les deux atomes de phosphore par l'intermédiaire d'un atome d'azote ou d'un groupement fluorométhylidène (voir schéma 6.1) (Vincent, 1997). Des mesures d'affinité quantitative de l'analogue sont nécessaires à la poursuite de ces travaux.

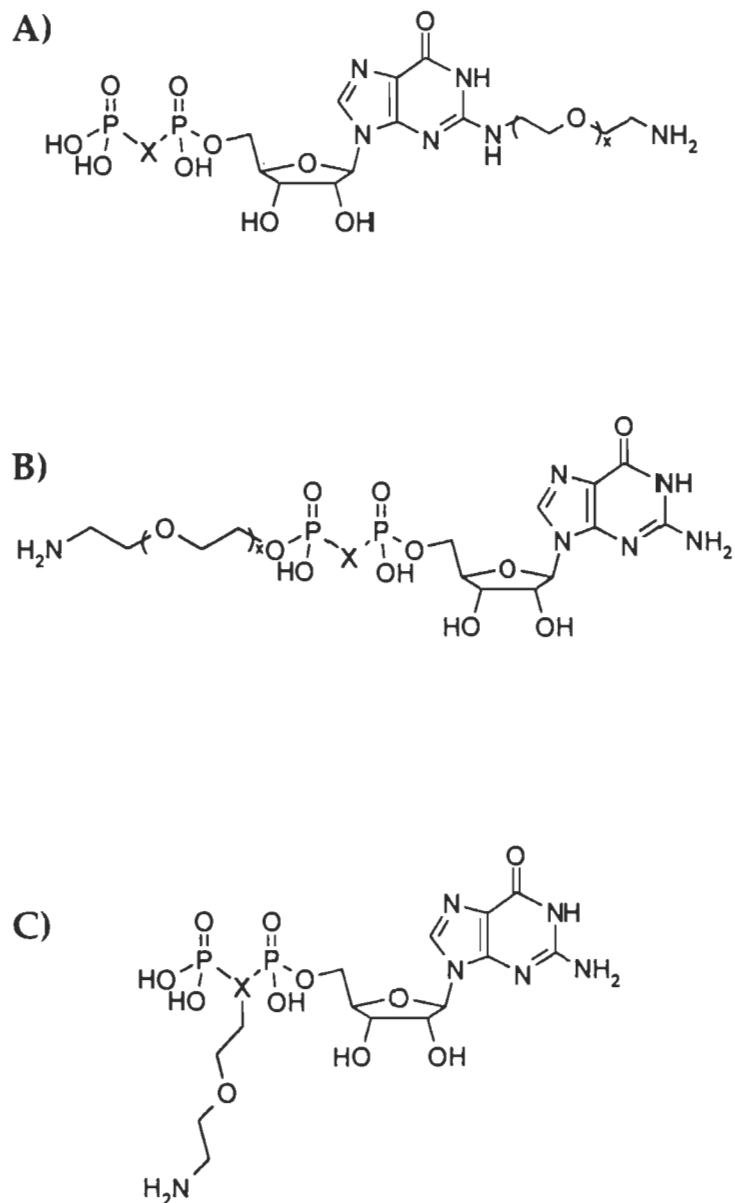


Schéma 6.1 Analogues fluorés G-PXP. X = CF<sub>2</sub> et porte un bras espaceur, A) en position N2, B) sur le phosphate bêta, et C) entre les deux atomes de phosphore.

En résumé, il a été démontré au chapitre 5 qu'il est possible d'obtenir des cristaux de  $G\alpha$  et de  $G\alpha\beta\gamma$  en présence de lipides non spécifiques. Bien que ces résultats soient le fruit du début d'une étude de cristallographie électronique, les résultats préliminaires obtenus nous montrent qu'il serait intéressant de tenter de cristalliser la Gt en deux dimensions à l'aide de lipides spécifiques car, déjà en présence de lipides non spécifiques, il est possible d'obtenir des structures organisées. Par ailleurs, il serait intéressant de tenter de cristalliser en deux dimensions de plus gros complexes comme la R- $G\alpha$ -GDP, la  $G\alpha$ -GTP-PDE $\gamma$  ou encore la  $G\alpha$ -GTP-PDE $\alpha\beta(\gamma)_2$  en utilisant des lipides fonctionnalisés avec un GDP ou un GTP.

## 6.5 Références

- Coleman, D.E. et Sprang, S.R. How G protein work: a continuing story. Trends in Biochemical Sciences. 1996. 21: 41-44
- De Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.V., Matias, P.M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohhtsuka, E. et Kim, S.-H. Three-dimensional structure of an oncogene protein: Catalytic domain of human c-H-ras p21. Science. 1988. 239: 888-893.
- Faurobert, E., Otto-Bruc, A., Chardin, P. et Chabre, M. Tryptophan W207 in transducin T $\alpha$  is the fluorescence sensor of the G protein activation switch and is involved in the effector binding. The EMBO Journal. 1993. 12: 4191-4198.
- Grenier, S., Lagüe, P. et Salesse, C. Phospholipid, GTP, and salt-dependent binding of the alpha subunit of rod outer segment G protein transducin in monolayers. Frontiers of Peptide-Protein Chemistry and Biotechnology, Li Qing-Shan and Wang Zhong-Mu, (ed.). China, Guangxi Teacher's University Press, 1994. 60-67
- Grenier, S., Desmeules P., Dutta, A.K. Yamazaki, A. et Salesse, C. Determination of the depth of penetration of the alpha subunit of retinal G protein in membranes: A spectroscopic study. Biochimica Biophysica Acta. 1998. 1370: 199-206.



- Kaupp, U.B. et Koch, K.W. Role of cGMP and Ca<sup>2+</sup> in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. Annual Review of Physiology. 1992. 54: 153-175.
- Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Plenum Press, 1983.
- Lamb, T.D. et Pugh Jr, E.N. G-protein cascade: gain and kinetics. Trends in Neurosciences. 1992. 16: 291-298.
- Lambright, D.G., Noel, P.N., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. Structural determinant for activation of the  $\alpha$ -subunit of a heterotrimeric G protein. Nature. 1994. 369: 621-627.
- Lebeau, L., Schultz, P., Celia, H., Messini, P., Nuss, S., Klinger, C., Olland, S., Oudet, P. et Mioskowski, C. Specifically designed lipid assemblies as tools for two-dimensional crystallization of soluble biological macromolecule, *dans* Handbook of nonmedical applications of liposomes. Barenholz, Y. et Lasic, D.D. Editors. 1996. CRC Press: Boca Raton. 153-186.
- Lichtarge, O., Bourne, H.R. et Cohen, F.E. Evolutionarily conserved G $\alpha\beta\gamma$  binding surfaces support a model of the G protein-receptor complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1996. 93: 7507-7511.

- Liebman, P.A. et Sitaramayya, A. Receptor interaction in amplified phosphodiesterase activation of retinal rods. Advance in Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Research. 1984. 17: 215-225.
- Liebman, P.A., Parker, K.R. et Dratz., E.A. The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of the rod outer segment. Annual Review of Physiology. 1987. 49: 765-791.
- Lytz, R.K., Reinert, J.C., Chirch, S.E. et Wickman, H.H. Structural properties of a monobrominated analog of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. Chemistry Physics Lipids. 1984. 35: 63-76.
- Markello, T., Zlotnick, A., Everett, J., Tennyson, J. et Holloway, P.W. Determination of the topography of cytochrome b<sub>5</sub> in lipid vesicles by fluorescence quenching. Biochemistry. 1985. 24: 2895-2901.
- McIntosh, T., Zlotnick, A., Evrett, J., Tennyson, J. et Holloway, P. Determination of the topography of cytochrome b<sub>5</sub> in lipid vesicles by fluorescence quenching. Biochemistry. 1987. 24: 2895-2901.
- Noel, P.N., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP $\gamma$ S. Nature. 1993. 366: 654-663.
- Onrust, R., Hermark, P., Chi, P. Garcia, P.D., Lichtarge, O, Kingsley, C. et Bourne, H.R. Receptor and  $\beta\gamma$  binding sites in the  $\alpha$  subunit of the retinal G protein transducin. Science. 1997. 275: 281-283.

- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K., John, J. et Wittinghofer, A. Structure of guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. Nature. 1989. 341: 209-214.
- Roseman, M.A., Lentz, B.R., Sears, B., Gibbs, D., et Thompson, T.E. Properties of sonicated vesicles of three synthetic phospholipids. Chemistry Physics Lipids. 1978. 21: 205-222.
- Shichi, H. Biochemistry of vision. New York: Academic Press, 1983.
- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, P.N., Hamm, H.E. et Sigler, P.B. GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin  $\alpha$ -GDP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Nature. 1994. 372: 276-279.
- Toyoshige, M., Basi, N.S. et Rebois, R.V. Chloride effects on Gs subunit dissociation. The Journal of Biological Chemistry. 1996. 271: 8791-8795
- Uhl, R., Wagner, R. et Ryba, N. Watching G proteins at work. Trends in Neuroscience. 1990. 13: 64-70.
- Vincent, S. Synthèse d'analogues non-hydrolysables de guanosine diphosphate en vue de l'analyse structurale de la protéine G du photorécepteur visuel. Thèse de doctorat en Chimie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg, 1997.