

Actualité moléculaire de la phototransduction des bâtonnets réiniens

Marc Chabre

Dans les bâtonnets réiniens, quatre protéines pourraient suffire à la production d'un signal cellulaire à partir de la photo-isomérisation d'un rétinol. La rhodopsine active de nombreuses sous-unités de la transducine qui activent autant de la sous-unités de la phosphodiesterase du GMPc. Une chute brutale et massive de ce dernier entraîne la fermeture des canaux ioniques dans la membrane cellulaire, et la production du signal d'hyperpolarisation. Mais la mise en forme du signal, son adaptation et sa terminaison très rapide demandent un réglage extrêmement subtil. Il est effectué pour une grande part par des calciprotéines sensibles à la chute du calcium qui suit la fermeture des canaux dépendants du GMP cyclique. Au total, une vingtaine de sous-unités protéiques ont été identifiées, qui participent directement à la transmission du signal dans les segments externes des bâtonnets, et suffisent à rendre compte de la plupart des caractéristiques, cinétiques et adaptatives, des réponses physiologiques. Des mutations sur tous les gènes correspondants sont susceptibles d'induire des maladies très diverses, fonctionnelles et/ou dégénératives.

Après plus d'un siècle d'analyse « moléculaire », où en est actuellement notre inventaire des molécules impliquées dans les mécanismes de transduction visuelle dans la rétine ?

Un siècle d'études moléculaires

Cette analyse a, en effet, débuté avant la fin du siècle dernier, avec

l'extraction de la première macromolécule « lipo-protéique » photosensible, la rhodopsine. Il a fallu ensuite presque quarante ans pour que son co-facteur pigmentaire, la molécule de rétinol, soit isolée, et vingt ans de plus pour caractériser l'étape photochimique initiale d'isomérisation du rétinol 11-*cis* en tout-*trans*. Les premières purifications à homogénéité de rhodopsine native (de bâtonnets de bovins) furent réalisées dans les années 1970. Du fait

ADRESSE

M. Chabre : directeur de recherche au Cnrs. Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Cnrs UPR 411, 660, route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France.

de son fort caractère hydrophobe, la séquence complète de la rhodopsine ne fut obtenue qu'en 1983, d'abord par l'ancienne méthode de dégradation chimique, puis peu après par les nouvelles techniques d'ADN recombinant. Toutes les rhodopsines humaines, des bâtonnets et des trois types de cônes, enfin, ont été séquencées, en 1986, par J. Nathans [1].

Sur le plan fonctionnel, il est établi depuis 1970 que la photoréponse des bâtonnets, l'onde A hyperpolarisante de l'électrorétinogramme, résulte d'une chute de conductance ionique de la membrane cellulaire des segments externes. Il restait à découvrir la séquence d'interactions moléculaires qui conduisent de la photoactivation d'une rhodopsine à cette hyperpolarisation cellulaire, et d'abord à identifier le messager soluble et rapidement diffusible entre les disques, vésicules intracellulaires supports de la rhodopsine, et la membrane cellulaire des segments externes des bâtonnets dans laquelle doivent être insérés des canaux à conductance modulable. Un fort préjugé en faveur de l'ion calcium a longtemps retardé l'identification comme messager de la petite molécule nucléotidique de GMP cyclique – généralement reléguée au rôle de messager lent des phénomènes secondaires d'adaptation – dont le métabolisme, perturbé par l'illumination, était déjà élucidé. Mais, au début des années 1980, il a fallu enfin admettre que l'illumination de la rhodopsine n'entraîne pas de relâchement de calcium des disques et que sa seule réaction est de déclencher une cascade d'activations enzymatiques qui entraîne la chute brutale et massive de la concentration de GMPc. Les acteurs protéiques de la cascade, la protéine G « transducine » et la phosphodiesterase du GMP cyclique (PDE) furent isolés et caractérisés, et les premiers schémas de cette « cascade du GMPc » publiés en 1981 [2, 3]. Il faudra cependant attendre encore quatre ans pour que tombe une dernière barrière sur le rôle du GMPc, jusque-là sensé agir indirectement sur les canaux en activant des kinases sensibles au GMPc et consommatrices d'ATP. Une expérience « hérétique », parce que sans ATP ni kinase, *in vitro* sur un fragment de membrane cellulaire excisée,

démontra que le GMPc y contrôlait directement l'ouverture de canaux ioniques [4]. Ces canaux d'un type tout à fait nouveau, insensibles au potentiel, et dont l'ouverture est commandée par la liaison d'un GMPc sur un site intracellulaire, furent isolés peu après.

Quatre protéines pour la cascade

Le premier schéma complet, datant donc de 1985, conduit de l'isomérisation du rétinol de la rhodopsine dans la membrane des disques jusqu'à la fermeture des canaux dans la membrane cellulaire, et rend compte de la production de la phase excitatrice d'hyperpolarisation avec seulement quatre protéines : d'abord la rhodopsine, récepteur membranaire, archétype des récepteurs sensoriels, hormonaux et neuronaux dits « à sept hélices » ; puis la transducine, archétype des protéines G hétérotrimériques liant le GDP ou le GTP, qui couplent les récepteurs à sept hélices à leurs effecteurs intracellulaires ; toujours sur la membrane des disques, l'effecteur, la PDE spécifique du GMPc, constituée d'un dimère de sous-unités catalytiques homologues PDE $\alpha\beta$ maintenues inactives au repos par deux exemplaires d'une petite sous-unité inhibitrice PDE γ . Enfin, à l'autre bout de la chaîne, dans la membrane cellulaire, la protéine canal, sensible au GMPc, est constituée de sous-unités α de 63 kDa comportant chacune six segments transmembranaires et un site de liaison du GMPc, et de sous-unités β homologues qui portent un site de régulation sur la calmoduline et comportent, de plus, dans la partie amino-terminale, une longue extension riche en acides glutamiques, de rôle inconnu. Ce schéma fonctionnel très simple est fondé sur la consommation de deux métabolites nucléotidiques très énergétiques : le GTP et le GMP cyclique ; la rhodopsine activée par l'isomérisation de son rétinol (Rh*) catalyse l'activation par le GTP de certaines de molécules de transducine (T α GDP-T β) qui, à leur tour, activent, ou plutôt désinhibent, en se liant à leur inhibiteur PDE γ , les sous-unités catalytiques PDE $\alpha\beta$ des phosphodiesterases. Ces enzymes hydrolytiques, extrêmement effi-

caces, peuvent alors en quelques dixièmes de secondes éliminer du cytoplasme environnant des centaines de milliers de molécules de GMPc. Le GMPc diffusant très rapidement dans le cytoplasme, la baisse de concentration s'étend rapidement de l'espace interdiscal à la zone cellulaire sous-membranaire. Les canaux de la membrane cellulaire sont maintenus ouverts, au repos, par le GMPc lié, et permettent une entrée importante d'ions sodium responsables de la dépolarisation de la cellule dans l'obscurité. La fermeture des canaux, à la suite de la perte de leur GMPc, entraîne la coupure du flux entrant de sodium, et donc l'hyperpolarisation de la cellule : c'est la phase montante de l'onde A des photorécepteurs.

Le GMPc excite, puis le calcium inhibe

La régulation et l'arrêt rapide des réponses des photorécepteurs à des *flashes*, et leur adaptation à des niveaux très variables d'illumination exigent que cette cascade quasi explosive de réactions enzymatiques soit fortement contrôlée et rapidement bloquée à toutes les étapes amplificatrices, et que le niveau de GMPc soit rapidement régénéré. Il s'agissait du problème majeur restant à résoudre ces dix dernières années. Deux premières molécules régulatrices, la rhodopsine kinase et l'arrestine, étaient déjà connues, et leur rôle de « découpleur » de la rhodopsine photoactivée déjà entrevu en 1985. Mais de nombreuses autres molécules régulatrices allaient suivre, pour arriver à la complexité actuelle du schéma de la *figure 1*.

On remarque d'abord sur ce schéma qu'à côté du GMPc, messager d'excitation, le calcium a fait un retour en force comme messager pléiotrope de régulation et d'inhibition. La coordination entre ces deux messagers est assurée par les canaux sensibles au GMPc qui contrôlent les flux de sodium, mais aussi de calcium. Au repos, dans l'obscurité, le flux principal de sodium entrant par les canaux ouverts maintient le photorécepteur dépolarisé, mais un flux plus faible de calcium passe par les mêmes canaux et maintient une concentration intracellulaire notable de cet

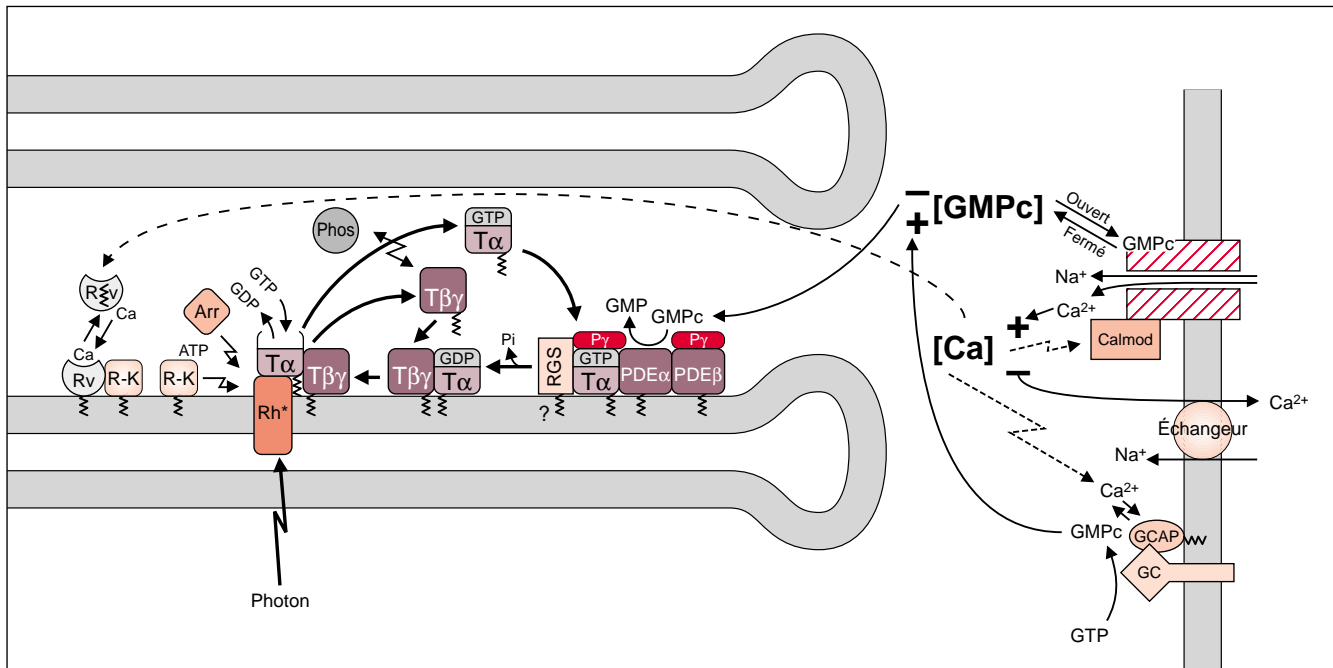


Figure 1. **Schéma moléculaire de transmission, d'amplification et de régulation du signal dans les bâtonnets rétiniens.** Arr: arrestine; Calmod: calmoduline; RGS: GTPase activating protein; GC: guanylyl cyclase; GCAP: calciprotéine activatrice de la guanylyl cyclase; PDE $\alpha\beta$: sous-unité catalytique de la phosphodiésterase; P γ : sous-unité inhibitrice; Phos: phosducine; Rh*: rhodopsine photoactivée; R-K: rhodopsine kinase; Rv: recoverine; T α , T $\beta\gamma$: sous-unités de la transducine.

ion. Lors de l'illumination, la fermeture des canaux entraîne la coupure du flux de sodium, ce qui engendre le signal d'hyperpolarisation, mais aussi la coupure du flux de calcium. Comme l'extrusion du calcium est assurée par un échangeur sodium/calcium classique qui, lui, est insensible au GMPc, elle se poursuit pendant la phase d'hyperpolarisation; il en résulte une diminution progressive du calcium intracellulaire, qui se développe toutefois avec retard par rapport à la chute du GMPc, détail important comme nous allons le voir. Le calcium agit sur diverses calciprotéines dont la conformation, et donc l'activité, sont sensibles à l'état d'occupation de leurs multiples sites de liaisons calciques.

Régulateur à triple cran pour Rh*

L'inventaire complet des calciprotéines régulatrices et leur caractérisation semblent maintenant en bonne voie après quelques aléas dus à la précipitation. La première calciprotéine isolée dès 1990, et trop hâtive-

ment baptisée recoverine, pour un rôle supposé dans la restauration (*recovery*) du niveau de GMPc par activation de la guanylyl cyclase, s'est ensuite révélée totalement inactive sur la guanylyl cyclase: la recoverine est en fait un régulateur de la rhodopsine kinase dépendant du calcium [5]. Tant que le calcium intracellulaire reste élevé, la recoverine reste liée à la membrane des disques et à la rhodopsine kinase, dont elle inhibe l'interaction avec la rhodopsine photoactivée. Lorsque le calcium intracellulaire a suffisamment diminué, donc seulement après la fermeture des canaux et la montée de l'hyperpolarisation, la recoverine devient soluble et relâche la rhodopsine kinase qui peut alors aller phosphoryler Rh* sur la membrane, première étape de l'inhibition de Rh*. Ce mécanisme ingénieux d'inhibition retardée par le message calcique secondaire permet au signal d'hyperpolarisation de se développer et d'atteindre rapidement une amplitude maximale avant que l'inhibition progressive de Rh* par sa phosphorylation par la rhodopsine kinase (et de

l'ATP) est ensuite complétée par la liaison à la rhodopsine multiphosphorylée d'une arrestine qui bloque définitivement tout couplage catalytique de Rh* à la transducine. Un nouveau raffinement cinétique de ce mécanisme d'inhibition fait intervenir un variant d'épissage court (44 kDa) de l'arrestine récemment découvert [6]. Moins abondante que l'arrestine classique de 48 kDa et, contrairement à cette dernière, non soluble, l'arrestine courte reste liée sur la membrane discale où elle peut interagir rapidement avec de faibles quantités de Rh* phosphorylée: l'arrestine courte serait donc seule impliquée dans l'arrêt rapide des réponses des bâtonnets aux faibles illuminations. Le *pool* plus abondant d'arrestine soluble est dilué dans le cytoplasme de toute la cellule photoréceptrice, y compris son segment interne volumineux. Il n'intervient que plus lentement dans les processus adaptatifs après de fortes illuminations qui activent de très nombreuses rhodopsines.

La régénération de la rhodopsine nécessite l'intervention de phosphatases pour déphosphoryler l'opsine.

Une phosphatase de type PP2A, indépendante du calcium, a été caractérisée il y a quelques années [7] et, plus récemment, une activité phosphatase dépendante du calcium a été mise en évidence dans des segments externes de bâtonnets *in vitro* [8]. Le gène d'une phosphatase spécifique de la rétine et sensible au calcium a récemment été cloné chez l'homme et les mammifères [9], sur la base d'analogies avec le gène de la protéine rdgC impliquée dans une dégénérescence rétinienne chez la drosophile. Mais, dans la rétine de mammifère, cette protéine n'est exprimée que dans les segments internes des photorécepteurs. Ce n'est donc pas la calciprotéine impliquée dans la déphosphorylation de la rhodopsine.

Combien de calciprotéines régulatrices ?

Les ADNc de deux calciprotéines très proches de la recoverine ont été plus récemment clonés dans les bâtonnets et leurs produits bien caractérisés. Baptisés cette fois correctement GCAP1 (*guanylate cyclase activating protein 1*) et GCAP2, ces protéines contrôlent effectivement l'activité de deux guanylyl cyclases spécifiques des photorécepteurs, RetGC1 et RetGC2, les activant en cas de diminution du calcium intracellulaire. Cependant, seules les protéines GCAP1 et RetGC1 ont été clairement localisées dans le segment externe, condition requise pour leur implication directe dans la régulation de la phototransduction [10]. L'action de GCAP1 est bien de type inhibiteur et retardée sur le signal d'hyperpolarisation, puisqu'elle répond à la diminution de calcium en activant la guanylyl cyclase et tend donc à restaurer le niveau de repos du GMPc (*m/s 1997*, n° 4, p. 581) [11]. Les protéines RetGC2 et GCAP2 sont probablement impliquées dans la fonction synaptique du segment interne plutôt que dans la fonction de transduction du segment externe.

La dernière calciprotéine identifiée dans les bâtonnets est la très banale calmoduline, régulateur ubiquitaire de l'activité de nombreuses protéines dans divers types cellulaires. Dans les segments externes, la calmoduline

module la conductance des canaux dépendants du GMPc par l'intermédiaire de leurs sous-unités β de haut poids moléculaire. Comme pour les autres calciprotéines des photorécepteurs, son action s'oppose avec retard à l'hyperpolarisation qui résulte de la fermeture des canaux : lorsque, à la suite de cette fermeture, le calcium diminue, la calmoduline se dissocie des canaux. Cela a pour conséquence d'augmenter l'affinité apparente des canaux pour le GMPc, et permet leur réouverture plus rapidement avec le faible niveau de GMPc restant, avant que la guanylyl cyclase n'en ait totalement régénéré le niveau initial.

Mais des études électrophysiologiques récentes [12] suggèrent qu'encore une autre calciprotéine, non identifiée, mais différente de la calmoduline, participerait aussi à la régulation des canaux. L'inventaire n'est peut-être pas encore complet.

Une GAP et/ou la PDE γ pour régler la transducine ?

Toutes les molécules régulatrices décrites jusqu'ici agissent, soit à l'étape initiale de la cascade de transduction sur l'activité de Rh* (recoverine, rhodopsine kinase et arrestines), soit à l'étape finale, sur l'activité de la cyclase qui produit le GMPc (GCAP1), ou directement sur la conductance des canaux (calmoduline). Qu'en est-il de la régulation à l'étage amplificateur intermédiaire, capital, de la cascade : l'activation des phosphodiésterases par les transducines activées de manière catalytique par Rh* ? Cette régulation nécessite-t-elle l'intervention d'autres protéines que les sous-unités de transducine et de phosphodiésterase en interaction, et lesquelles ? Cette question, très controversée depuis près de dix ans, pourrait enfin être résolue par une publication toute récente [13]. L'historique de cette controverse peut être instructive. Le débat a porté sur le mécanisme d'inactivation rapide des phosphodiésterases activées par les sous-unités T α GTP des transducines. Une PDE reste active tant qu'une T α GTP lui reste liée, et cette dernière ne se détachera qu'après avoir hydrolysé son GTP et donc rebasculé dans sa

conformation inactive T α GDP. Or, *in vitro*, T α GTP isolé n'hydrolyse son GTP qu'en 20 secondes environ : c'est beaucoup trop lent pour rendre compte de l'arrêt d'un signal de phototransduction. Cependant, notre équipe a démontré en 1990 et en 1991, par des mesures de microcalorimétrie rapide [14, 15], toujours *in vitro*, mais dans des fragments de cellules photoréceptrices, que l'hydrolyse du GTP dans T α et l'arrêt de la PDE γ sont beaucoup plus rapides ($\approx 0,6$ s), ce qui est proche du temps d'arrêt *in vivo* ($\approx 0,2$ s). Nous avions donc suggéré, avec d'autres, qu'il pouvait exister *in situ* un facteur, vraisemblablement une protéine, qui accélère l'hydrolyse du GTP dans T α . Ce type de protéine, appelé GAP (pour *GTPase activating protein*) était bien connu pour d'autres familles de protéines G, telles que les petites protéines G de type Ras des voies de transduction des récepteurs de croissance. Mais aucune GAP n'a jamais été trouvée par les techniques classiques de purification biochimique, ni dans les photorécepteurs, ni dans aucune autre voie de transduction des protéines G hétérotrimériques. D'où l'autre hypothèse judicieuse, que nous avons aussi envisagée, selon laquelle les effecteurs des protéines G hétérotrimériques, ici la PDE ou plus simplement sa sous-unité PDE γ , jouent aussi le rôle de GAP régulatrice. Cette hypothèse a rapidement reçu le très fort soutien d'une publication dans *Nature* [16] par un groupe ayant observé une accélération de l'activité GTPase de la transducine par ajout de PDE γ à des préparations de membranes rétinienne reconstituées *in vitro* (*ms 1992*, n° 7, p. 731). Mais ces préparations devaient être insuffisamment purifiées et caractérisées. Nos reconstitutions à partir de protéines purifiées n'ont pas réussi à mettre en évidence la moindre accélération de GTPase de T α GTP par PDE γ [17], à notre grande déception d'ailleurs, car nous avons été parmi les premiers partisans de l'hypothèse GAP = PDE γ . Un résultat négatif, qui de plus démolit une hypothèse intéressante, est rarement bien accepté ! Heureusement peu après, un troisième groupe [18, 19] a confirmé le fait que PDE γ seule n'a aucun effet GAP sur T α , mais surtout ces auteurs

ont montré qu'une autre protéine rétinienne, fortement attachée à la membrane des disques et probablement présente dans les préparations de la première équipe, est responsable de l'effet GAP, cet effet étant simplement renforcé par l'ajout de PDE γ . Notre groupe, par une approche un peu différente, a rapidement confirmé cette découverte [20], mais pas plus que les autres, n'a réussi à isoler et à purifier sur le plan biochimique cette nouvelle protéine, ce qui n'a pas facilité l'extinction définitive de la controverse avec les partisans de PDE γ .

La GAP, c'est RGS9... + PDE γ !

La résolution du dilemme « GAP ou PDE γ » est venue de la génétique de la levure: c'est une nouveauté pour un problème de transduction visuelle dans les photorécepteurs rétiens, où jusque-là toutes les protéines intéressantes avaient été purifiées par méthode biochimique, avant que leur gène soit repéré. Les généticiens de la levure ont identifié, il y a déjà une dizaine d'années, un gène responsable de la désensibilisation d'une voie de signalisation par des protéines G hétérotrimériques. En 1996, toute une famille d'analogues de ce gène a été trouvée chez les mammifères supérieurs et l'homme. Les produits de ces gènes ont un domaine conservé appelé RGS (pour *regulator of G-protein signalling*) responsable de leur activité GAP sur les protéines G hétérotrimériques [23]. La plupart de ces RGS ont une expression tissulaire large et une faible spécificité de protéine G substrat. La chasse aux gènes RGS spécifiques de la rétine s'organise rapidement: un premier candidat est baptisé *RGS-r* [21] mais sa spécificité rétinienne est loin d'être exclusive, et, dans la rétine, sa spécificité cellulaire éventuelle pour les photorécepteurs n'est pas analysée. La protéine *RGS-r* est active sur la transducine, mais toutes les RGS le sont. L'activité de *RGS-r* sur $T\alpha$ GTP n'est pas augmentée par l'ajout de PDE γ , mais plutôt diminuée, ce qui est aussi observé pour d'autres RGS non rétiennes. *RGS-r* n'est donc probablement pas dans les photorécepteurs et certainement pas impliqué dans la phototransduction. Le deuxième can-

didat, dénommé *Ret-RGS1* [23] paraît déjà plus intéressant: le gène est exprimé exclusivement dans la rétine, préférentiellement (mais pas exclusivement) dans la couche nucléaire externe des cellules photoréceptrices: la protéine RET-RGS1 joue donc certainement un rôle dans ces cellules, mais peut-être pas dans le segment externe et donc pas directement dans la phototransduction; elle est plus probablement localisée dans le segment interne ou dans les terminaisons synaptiques du bâtonnet. Enfin, tout récemment, le groupe qui a le premier démontré biochimiquement l'existence d'une GAP différente de PDE γ dans les photorécepteurs, vient de caractériser une nouvelle protéine RGS, labélisée très prudemment RGS9, qui semble remplir parfaitement tous les critères d'identification d'une GAP de la transducine [13]: le gène est exprimé exclusivement dans les bâtonnets et la protéine est localisée dans les segments externes, et fortement liée aux membranes des disques; la protéine est assez longue (484 résidus) et difficile à exprimer complètement; son domaine RGS (125 résidus), exprimé seul, est actif *in vitro* sur $T\alpha$, ce qui est banal, mais cette activité est fortement augmentée par l'ajout de PDE γ , ce qui est très suggestif de son implication dans la régulation de la phototransduction. L'inhibition de la transducine par RGS9 ne devient donc pleinement efficace qu'après que la transducine ait interagi avec PDE γ , et donc activé son effecteur, la PDE. On retrouve le principe d'inhibition retardée, déjà observé pour Rh^* , à la différence que le retard n'est pas ici imputable au signal calcique: l'activité de RGS9 est totalement insensible au calcium. Le complexe d'inhibition de la transducine n'inclut donc pas de calciprotéine, mais comprend déjà pas moins de 6 unités protéiques: PDE α , PDE β , 2PDE γ , $T\alpha$ GTP et RGS9. Dernière remarque qui a son importance, RGS9, ou un proche analogue de même immunoréactivité, est exprimé aussi dans les segments externes des cônes, et à une concentration plus élevée que dans les bâtonnets. Cela est très bien corrélé avec un rôle de RGS9 dans la régulation et l'arrêt des cascades de phototransduction: la plus grande rapidité de réponse et de récupération des cônes, et leur plus

faible sensibilité par rapport aux bâtonnets sont probablement explicables par une plus grande rapidité de coupure de leur cascade de phototransduction, ce qui exige, entre autres, une concentration plus élevée de protéine GAP.

Et la phosducine?

C'est la question rituelle à la fin de tout séminaire sur la biochimie de la phototransduction: la phosducine est une protéine soluble, abondante dans les segments externes, depuis longtemps purifiée, à l'ADNC cloné et même cristallisée, mais sans aucune activité enzymatique décelable; à quoi peut-elle servir ici? On lui connaît seulement une certaine affinité pour la sous-unité $T\beta\gamma$ de la transducine, quand elle trouve cette dernière dissociée de son partenaire régulier $T\alpha$ qui, activé par un GTP, a pris sa liberté pour courir après une PDE. Un travail cristallographique récent [24] montre qu'en fait la phosducine peut se lier étroitement à $T\beta\gamma$ et la découpler de $T\alpha$, un peu comme l'arrestine se lie à Rh^* -phosphorylée et la découple de la transducine. Or $T\alpha$, inactivé par la GAP après un cycle d'activation de la PDE, a besoin de $T\beta\gamma$ pour être « présentée » à Rh^* et réactivée par un nouveau GTP. C'est en fait le seul rôle attribué jusqu'à présent à $T\beta\gamma$ dans la phototransduction, alors que les $G\beta\gamma$ homologues des autres voies de transduction ont plusieurs autres rôles. En séquestrant $T\beta\gamma$, la phosducine inhibe donc l'activation répétitive de $T\alpha$. Cela a probablement un rôle dans l'adaptation et la désensibilisation des bâtonnets aux fortes illuminations, en limitant la répétition de cycles futiles d'activation et de désactivation de $T\alpha$.

Conclusions... et perspectives

Jusqu'ici 18 protéines (ou sous-unités protéiques) ont été citées, localisées dans les segments externes des bâtonnets et directement impliquées dans la cascade de la phototransduction. C'est plus qu'il n'en faut aux physiologistes pour construire des modèles très élaborés de fonctionnement des bâtonnets, et tenter de comprendre toutes les subtilités de

leurs régulations rapides et lentes ainsi que les processus d'adaptation. Il serait surprenant que de nouveaux variants, d'épissage alternatif ou de duplication de gène, ne soient rapidement découverts, surtout dans les cônes. Mais il n'est pas certain que beaucoup de protéines réellement nouvelles restent à découvrir. En revanche, restent à déterminer la plupart des structures moléculaires de ces protéines et à comprendre les mécanismes de leurs interactions dans les complexes transitoires qu'elles forment successivement aux diverses étapes de la cascade de transduction.

Des mutations sur les gènes correspondant à toutes ces protéines connues sont susceptibles d'induire des perturbations de la structure des bâtonnets, et éventuellement de conduire à leur dégénérescence, surtout pour les gènes codant pour des protéines membranaires et abondantes telles que la rhodopsine. Mais les mutations sur d'autres gènes peuvent aussi provoquer des perturbations fonctionnelles plus subtiles conduisant à des affections très diverses, en bloquant la cascade de phototransduction ou, inversement, en provoquant une hyperactivation de la cascade, voire même une activation continue « constitutive ». Ce dernier cas paraît généralement le plus grave : les mutations qui rendent la rhodopsine ou la PDE constitutivement actives conduisent le plus souvent à la dégénérescence des bâtonnets, alors que celles qui rendent la rhodopsine ou la transducine inactivable ne conduisent qu'à des héméralopies* sans aucune dégénérescence. Une revue très récente fait déjà état de 15 gènes dans lesquels des mutations entraînent des maladies rétinienne avec perte de photorécepteurs [25]. Cela ne comprend naturellement pas le gène de RGS9 qui n'était pas encore connu. Or, dans beaucoup de voies de transductions relayées par des protéines G, la régulation de la GTPase par une GAP est un point de contrôle très sensible du gain de la cascade. Il est donc probable que des mutations du gène de RGS9 soient impliquées dans des affections rétinienne.

* Inaptitude à percevoir les faibles quantités de lumière ou défaut d'adaptation à l'obscurité.

Pour être plus complet, notre inventaire des protéines impliquées dans la phototransduction aurait peut-être dû aussi inclure les protéines responsables de la production et de la régénération du 11-*cis* rétinol, le déclencheur de la cascade. Toutefois, la plupart de ces protéines, mise à part une rétinol déshydrogénase soluble, ne se trouvent pas dans les cellules photoréceptrices, mais dans celles de l'épithélium pigmentaire, et n'interviennent donc pas directement dans notre schéma de la phototransduction dans les segments externes. Cela ne diminue pas leur importance pour la physiologie de la vision, ni leur implication dans des maladies génétiques, comme le souligne le cas récent de la mutation dans la protéine RPE 65 de l'épithélium pigmentaire, impliquée dans l'amaurose de Leber** [26, 27] ■

RÉFÉRENCES

1. Nathans J, Piantanida TP, Eddy RL, Shows TP, Hogness DS. Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science* 1986; 232: 203-10.
2. Fung BKK, Hurley JB, Stryer L. Flow of information in the light triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 178: 152-6.
3. Kühn H, Bennett H, Michel-Villaz M, Chabre M. Interaction between photoexcited rhodopsin and GTP binding protein. Kinetic and stoichiometry analysis from light scattering changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6873-7.
4. Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 1985; 313: 310-3.
5. Chen CH, Inglese J, Lefkowitz RJ, Hurley JB. Calcium dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 1995; 30: 18060-6.
6. Smith WC, Milam AH, Dugger D, et al. A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *J Biol Chem* 1994; 269: 15407-10.
7. Palczewski K, Hargrave PA, McDowell JH, Ingebritsen TS. The catalytic subunit of phosphatase 2A desphosphorylates phosphopsin. *Biochemistry* 1989; 28: 415-9.

** Dégénérescence tapétorétinienne congénitale provoquant dès la naissance une cécité avec électrorétinogramme éteint alors que les modifications du fond d'œil ne surviennent souvent que plus tard.

8. Kutozov MA, Bennett N. Calcium-activated opsin phosphatase activity in retinal rod outer segments. *Eur J Biochem* 1996; 238: 613-22.
9. Sherman PM, Sun H, Macke JP, et al. Identification and characterization of a conserved family of protein serine/threonine phosphatases homologous to Drosophila retinal degeneration C (rdgC). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11639-44.
10. Gorczica WA, Polans A, Surgucheva I, et al. Guanylyl cyclase activating protein. A calcium-sensitive regulator of phototransduction. *J Biol Chem* 1995; 270: 22029-36.
11. Baylor D. How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 560-5.
12. Gordon SE, Downing-Park J, Zimmerman AL. Modulation of the cGMP-gated ion channel in frog rods by calmodulin and an endogenous inhibitory factor. *J Physiol* 1995; 486.3: 533-46.
13. He W, Cowan CW, Wensel TG. RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* 1998; 20: 95-102.
14. Vuong TM, Chabre M. Subsecond deactivation of transducin by endogenous GTP hydrolysis. *Nature* 1990; 346: 71-4.
15. Vuong TM, Chabre M. Deactivation kinetics of the transduction cascade of vision. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9813-7.
16. Arshavsky V, Bownds MD. Regulation of deactivation of photoreceptor G-protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* 1992; 357: 416-7.
17. Antonny B, Otto-Bruc A, Chabre M, Vuong TM. GTP hydrolysis by purified α -subunit of transducin and its complex with the cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor. *Biochemistry* 1993; 32: 8646-53.
18. Angleson JK, Wensel TG. A GTPase-accelerating factor for transducin, distinct from its effector cGMP phosphodiesterase, in rod outer segment membranes. *Neuron* 1993; 11: 939-49.
19. Angleson JK, Wensel TG. Enhancement of rod outer segment GTPase accelerating protein activity by the inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1994; 269: 16290-6.
20. Otto-Bruc A, Antonny B, Vuong TM. Modulation of the GTPase activity of transducin. Kinetic studies of reconstituted systems. *Biochemistry* 1994; 33: 15215-22.
21. Fischer T, De Vries L, Rouot B. La famille des RGS: enfin des GAP pour les protéines G hétérotrimériques. *Med Sci* 1997; 12: 1191-6.
22. Chen C, Wieland T, Simon MI. RGS-r, a retinal specific RGS protein, binds an intermediate conformation of transducin and enhances recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12885-9.

RÉFÉRENCES

23. Faurobert E, Hurley JB. The core domain of a new retina specific RGS protein stimulates the GTPase activity of transducin *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2945-50.
24. Gaudet R, Bohm A, Sigler PB. Crystal structure at 2.4 Å resolution of the complex of transducin $\beta\gamma$ and its regulator, phosducin. *Cell* 1996; 87: 577-88.
25. Farber DB, Danciger M. Identification of genes causing photoreceptor degenerations leading to blindness. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 666-73.
26. Wright AF. A searchlight through the fog. *Nat Genet* 1997; 17: 132-4.
27. Hamel CP, Marlhens F. Des mutations de gènes contrôlant le métabolisme des rétinoïdes 11-cis responsables de dystrophies rétinienne sévères. *Med Sci* 1998; 14: 754-75.

TIRÉS À PART

M. Chabre.

Summary

Molecular aspects of phototransduction in retinal rods

In retinal rod outer segments, four proteins could suffice to transduce the molecular trigger of retinal photoisomerisation into the cellular hyperpolarisation signal: a photoactivated rhodopsin (Rh^*) activates many $T\alpha$ subunits of transducin, an heterotrimeric G-protein which in turn activates a cGMP specific phosphodiesterase (PDE). The drop in cGMP induces the closure of cGMP sensitive cationic channel proteins in the cell membrane, hence the generation of the hyperpolarising signal. But pulse shaping, adaptation and rapid termination of the signal require subtle regulations. Most of them are based on retroaction of calcium sensing calcioproteins which detect the drop in calcium subsequent to the closure of the cGMP-sensitive channels. Three proteins at least regulates Rh^* activity: rhodopsin kinase, itself regulated by the calcioprotein recoverin, and arrestin, which has at least two fast and slow variants. The activity of transducin $T\alpha$ GTP subunit on PDE is regulated mainly by a recently identified GTPase activating protein, RGS9, whose action is modulated by the $PDE\gamma$ subunit of PDE. Furthermore recycling of $T\alpha$ GDP is regulated by phosducin which can sequester $T\beta\gamma$ subunits hence inhibiting regeneration of $T\alpha$ GDP- $T\beta\gamma$. cGMP levels are regulated by a guanylate cyclase, the activity of which is modulated by the calcioprotein GCAP1. Finally the cGMP sensitive channels cationic conductance is modulated by calmoduline and possibly still another calcioprotein. Altogether about 20 protein subunits have been identified that participate directly to the transduction of the signal in the rod outer segment, and may account for most of the kinetic and adaptation characteristics of the physiological response. Mutations on all the corresponding genes may induce functional and/or degenerative retinal pathologies.